



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE DOS MUTANTES  
SENCILLAS QUE DAN ORIGEN A UNA DOBLE  
MUTANTE POLIMÓRFICA DE GLUCOSA-6-  
FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PD) A-**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**RAMÍREZ NAVA EDSON JOVANY**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. SAÚL GÓMEZ MANZO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2017**



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.

1. Datos del alumno

Ramírez

Nava

Edson Jiovany

15171888

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310216926

2. Datos del tutor

Dr.

Saúl

Gómez

Manzo

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jorge Antonio

García

Alvarez

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Jaime

Marcial

Quino

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Miguel Ángel

Alcántara

Ortigoza

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Juan Luis

Chávez

Pacheco

7. Datos del trabajo escrito

Análisis bioquímico de dos mutantes sencillas que dan origen a una doble mutante polimórfica de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa A-

61 pp.

2017

## **Agradecimientos**

Toda mi sincera gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, que me abrieron las puertas para continuar con mis estudios.

Al Instituto Nacional de Pediatría, al Laboratorio de Bioquímica Genética y al Taller: “Enzimología y proteómica aplicada a problemas de salud en pediatría”, donde pude realizar todo mi trabajo de tesis, además de ser una fuente constante de valiosos conocimientos.

A mi asesor, Dr. Saúl Gómez Manzo, por permitirme trabajar con su línea de investigación, por todos los conocimientos transmitidos, por toda su paciencia y confianza.

A los miembros de mi jurado: Dr. Jorge Antonio García Álvarez, Dr. Jaime Marcial Quino, Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza y Dr. Juan Luis Chávez Pacheco, por la revisión y asesoría para mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Jaime Marcial Quino por sus valiosos conocimientos que contribuyeron significativamente para la realización los experimentos, el procesamiento de los datos y sus comentarios sobre el trabajo escrito.

## **Agradecimientos a título personal**

A mi mamá, Celia Nava Ramírez. Gracias por darme la mejor lección de vida: Jamás rendirme; sin importar cuáles sean las circunstancias. No tengo como agradecer el esfuerzo que has hecho todo este tiempo para que yo esté aquí, sin duda ha sido años muy duros y sin embargo siempre has estado ahí para mí, y ten por seguro que yo siempre lo estaré para ti. Te amo.

A mi hermana, Karla. Esto es para ti, espero que te sirva de inspiración para lograr las cosas que te propones. Nada debe interponerse entre tú y tus sueños. Tienes una vida por delante y sabes que eres mi razón para esforzarme día a día y así, darte mejores oportunidades.

A mi papá, tu ausencia por un tiempo me hizo comprender que no hay que depender de nadie para lograr tus metas, sin embargo, te tengo un especial cariño ya que gracias a ti me he hecho fuerte. Gracias por tu apoyo.

Nena, Bigotes, Roberto, Tweety, Bombón, Kitty y Vanessa. Mis compañeros de cuatros patas, su llegada a mi vida sólo me ha traído felicidad, les agradezco por tantos momentos de alegría. Los tengo siempre presentes.

A mi tía Lena, su incondicional apoyo por tanto tiempo ha sido parte de esto. Gracias por tanto.

A mi tía Mary por saber escucharme en momentos difíciles, así como su respaldo para adquirir recursos que me pedía la carrera.

A mi abuelo Maquío, su cariño y apoyo han sido indispensables para mí. Gracias

A mi abuela “Nanis” por tanto cariño.

Don Rubén, sin su ayuda nada de esto pudo haber sido posible. Gracias por todo.

Angel, mi mejor amigo. Fuiste la primera persona que conocí en la carrera y desde el momento que te pregunte dónde nos tocaba la primera clase se empezó a escribir nuestra historia de amistad, la cual ha recorrido un sinfín de lugares y ha vivido tantas experiencias que no las puedo contar. Tu ayuda y consejos fueron un pilar para mí en la licenciatura. Muchas gracias “gorda”

Sofía, gracias por tu sincera amistad todos estos años, no sabes cómo valoro todos lo que hemos pasado juntos con la otra gorda, espero esta amistad dure mucho tiempo y que sigamos visitando muchos lugares.

Karla M., jamás imaginé que me llevara tan bien con alguien tan seria, y sin embargo encontré en ti una persona muy especial.

Itzel, muchas gracias por la confianza que siempre me has depositado, sin duda las clases y momentos que hemos vivimos estarán siempre presentes

Daniela, gracias por hacer de las clases que compartimos más amenas, gracias por tantos momentos de risas. Espero seguir compartiendo mucho más contigo

Evelyn, contigo me he reído tanto de amigos, como de gente que nos cae mal, contigo pasé más tiempo libre que en clase juntos, te estimo mucho y ojalá algún día seamos tan famosas como la Dra.

Oscar, nunca creí que nos llevaríamos tan bien como lo hacemos hoy, sin duda contigo disfruté momentos muy divertidos, gracias también por estos años de amistad.

Alejandra, gracias por tantos momentos de risa y comida desde el primer semestre.

Olyn, gracias por hacerme ver que no todos los matemáticos son malas personas. Te estimo mucho.

A Ally, Daniel, Priscila, Fernanda, Alex, Lucero, Rodrigo, Diana.

Dr. Saúl, le agradezco mucho por todas las enseñanzas académicas y personales, me han ayudado mucho, gracias por darme otra forma de ver las cosas. No tiene idea de cuánto me ha hecho cambiar.

Dr. Jaime, en usted siempre veo la determinación de lograr sus objetivos, haciendo lo que se debe hacer sin poner pretextos, gracias también por sus consejos y el aprendizaje en este tiempo.

A mis compañeros del taller: Laura, no conozco alguien tan preocupado por el bienestar de los demás, gracias por todo el apoyo en el laboratorio y por ser una persona que sabe escuchar.

Yadira, quién diría que quedarnos sin tutor al inicio del taller nos uniría tanto, gracias por tantas risas y consejos.

Erick, gracias por tu amistad y consejos, espero compartir más momentos contigo.

A Victor, Berenice, Tamara, Fabiola, Fabiola Santos, gracias amigos.

A Leslie (M-Dolla), espero compartamos muchos años más de amistad. Gracias por tantos consejos y apoyos.

A Ángel (Luffy), no tienes idea de cómo valoro tu amistad, eres alguien muy fuerte y para mí eres muy valioso. Gracias por todo.

A Gabriel (Badcucho), no tengo como agradecerle todo lo que has hecho por mí, estuviste en los momentos más difíciles. Espero tengamos más años de amistad, muchas gracias por todo.

A Damián, Monse, Ambar, Jatziri, Mou, Angélica, Iván, Gabriel, Oswin, Mildred, Ángel, César, Miguel Ángel, David.

A Jessica, Lizbeth, Julio, Diego, Jonathan, Edwin, Lulú, Hugo, Iván, Lexter, Luis.

A Carlitos, Peter, Angélica.

A todos los que están y los que no están. ¡Muchas gracias!

"Nunca dejes de sonreír, pues tu sonrisa ha dado origen a un sinfín de encuentros que nos conducirán a un futuro brillante"

Shigeru Ohmori, 2016

# Índice general

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1 Epidemiología y polimorfismo.</b> .....	1
<b>1.2 Genética de la G6PD</b> .....	3
<b>1.3 Estructura de la G6PD</b> .....	5
<b>1.4 Bioquímica de la G6PD</b> .....	6
<b>1.5 Deficiencia de la G6PD</b> .....	8
<b>1.6 Manifestaciones clínicas.</b> .....	9
<b>1.7 Estudios de deficiencia de G6PD en México.</b> .....	10
<b>1.8 Variante G6PD A+</b> .....	12
<b>1.9 Variante Nefza.</b> .....	12
<b>1.10 Variante A-</b> .....	12
<b>2. Objetivo General:</b> .....	15
<b>2.1 Objetivos particulares:</b> .....	15
<b>3. Materiales y métodos.</b> .....	16
<b>3.1 Construcción de las mutantes de G6PD por mutagénesis sitio dirigida.</b> .....	16
<b>3.2 Expresión y purificación de las enzimas recombinantes de G6PD humana.</b> .....	20
<b>3.3 Determinación de los parámetros cinéticos.</b> .....	23
<b>3.4 Evaluación de la estabilidad de las proteínas</b> .....	23
<b>3.4 a) Ensayo de termoinactivación</b> .....	23
<b>3.4 b) Estabilidad térmica seguido por dicroísmo circular</b> .....	24
<b>3.4 c) Efecto del clorhidrato de guanidina (Gdn- HCl) sobre la estabilidad de las variantes de G6PD</b> .....	24
<b>3.5 Caracterización espectroscópica</b> .....	24
<b>3.5 a) Análisis de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular (DC)</b> .....	24
<b>3.5 b) Análisis estructural por fluorescencia intrínseca y 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS)</b> .....	25
<b>4. Resultados.</b> .....	26
<b>4.1 Mutagénesis dirigida por QuickChange.</b> .....	26
<b>4.2 Expresión y purificación de las enzimas recombinantes de G6PD humana.</b> .....	28
<b>4.3 Purificación de las proteínas recombinantes.</b> .....	29
<b>4.4 Determinación de los parámetros cinéticos.</b> .....	31
<b>4.4 Evaluación de la estabilidad de las proteínas</b> .....	33
<b>4.4 a) Ensayo de termoinactivación</b> .....	33

<i>4.4 b) Estabilidad térmica de las enzimas G6PD humanas recombinantes</i> .....	34
<i>4.4 c) Estabilidad de las variantes de G6PD en presencia de clorhidrato de guanidina (Gdn- HCl)</i> .....	35
<b>4.5 Caracterización espectroscópica</b> .....	37
<i>4.5 a) Análisis de las G6PD por Dicroísmo Circular (DC)</i> .....	37
<i>4.5 b) Análisis estructural por fluorescencia intrínseca y 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS)</i> .....	38
<b>5. Discusión</b> .....	40
<b>6. Conclusiones</b> .....	48
<b>7. Referencias</b> .....	49

## Resumen

La Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD) es una enzima reguladora clave que desempeña un papel crucial en la regulación de la energía celular y el balance redox. Las mutaciones en el gen que codifica la G6PD causan la enzimopatía más común a nivel mundial, que conduce a la anemia hemolítica no esferocítica hereditaria.

Para obtener información sobre los efectos de las mutaciones en la eficacia de la enzima G6PD, se investigaron los cambios bioquímicos, cinéticos y estructurales de tres variantes clínicas de G6PD, las variantes sencillas G6PD A<sup>+</sup> (Asn126Asp) y G6PD Nefza (Leu323Pro) y la doble mutante G6PD (Asn126Asp + Leu323Pro).

Las mutantes mostraron una menor actividad residual ( $\leq 50\%$  que la enzima silvestre) y mostraron importantes cambios cinéticos. Aunque todas las mutantes son agrupadas en Clase III, se localizan en diferentes regiones de la estructura tridimensional y no se encuentran cerca del sitio activo, estas mutantes tienen un efecto perjudicial sobre la actividad catalítica y la estabilidad estructural.

Los resultados indicaron que la mutación que da origen a la mutante G6PD Nefza fue la principal responsable de las alteraciones funcionales y estructurales observadas en la doble mutante G6PD A<sup>-</sup>. Además, este estudio sugiere que las mutantes G6PD Nefza y G6PD A<sup>-</sup> afectan las funciones de la enzima de manera similar a las mutantes de G6PD agrupadas como Clase I

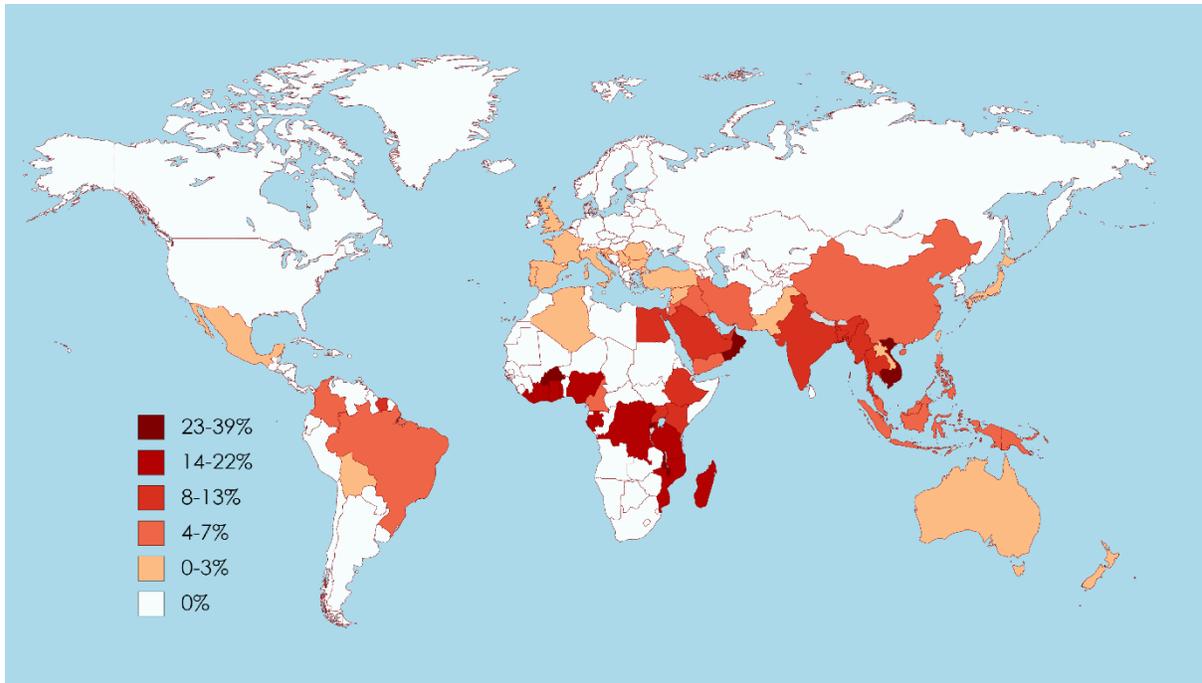
## 1. Introducción

### 1.1 Epidemiología y polimorfismo de la G6PD

La deficiencia de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía más frecuente en el hombre y el quinto defecto congénito más común a nivel mundial. Tiene una prevalencia aproximada del 4.9%, y un estimado de 330 a 400 millones de personas afectadas en el mundo. Se calcula que el 7.5% de la población mundial porta un gen deficiente de *G6PD* (Ramírez-Cheyne y Zarante, 2009). El 90% de los afectados son del sexo masculino (Wajcman y Galactéros, 2004), esto presuntamente se puede explicar debido al patrón de herencia que presenta la deficiencia, la cual está ligada al cromosoma X.

La frecuencia mundial varía desde 0.1% en Japón y Europa del norte hasta 62% entre los judíos kurdos (WHO, 1989). Las poblaciones con mayores proporciones de afectados van hasta el 30% de prevalencia y se encuentran en África, Asia, Medio Oriente, Mediterráneo y Papuasias (Figura 1) (Luzzatto y Mehta, 2001).

Actualmente, han sido reportadas 217 mutaciones en el gen *G6PD* humano (Gómez- Manzo *et al.*, 2016), 100 de ellas son polimórficas en varias poblaciones humanas ya que se encuentran con alta frecuencia (Fonseca *et al.*, 2005). Las variantes polimórficas de mayor distribución son: la G6PD Mediterráneo localizada en países que rodean el mar Mediterráneo, en el Medio Oriente y en la India; la G6PDA A- predominante en regiones de África, América, las Antillas, Europa del sur y en cualquier lugar donde haya población inmigrante de origen africano (Luzzatto y Mehta, 2001); la G6PD Viangchan y G6PD Mahidol con mayor frecuencia en regiones del Sudeste Asiático, G6PD Cantón en China, y la G6PD Unión alrededor del mundo (Wang *et al.*, 2005)



**Figura 1.** Distribución de la prevalencia mundial de la deficiencia de G6PD basado en un método bayesiano. Los porcentajes, en orden ascendente de intensidad de color, muestran la prevalencia por cada nación. Modificado de Nkhoma *et al.*, (2010).

Cuando una mutación en un gen confiere una ventaja selectiva adquiere una alta frecuencia en algunas poblaciones. En el momento en que se llega a un balance entre la ventaja y la desventaja conferidas por el gen, éste se designa como un polimorfismo balanceado (Fonseca *et al.*, 2005). El ejemplo más estudiado de este caso es la mutación para la anemia de células falciformes y la ventaja conferida por el gen de *G6PD* a la resistencia a la malaria. Esto se debe, a que la distribución geográfica de la deficiencia de G6PD correlaciona con la prevalencia de la malaria. En este sentido, estudios bioquímicos y epidemiológicos han llevado a sugerir que la deficiencia de ésta enzima es uno de los polimorfismos que confiere resistencia a la infección por malaria (Greene, 1993).

En Latinoamérica, la prevalencia estimada para la deficiencia de G6PD varía de manera importante entre países e incluso entre regiones. La deficiencia de G6PD se concentra en las regiones costeras (Gómez-Manzo *et al.*, 2014). En algunos países la frecuencia es menor al 1% (Argentina, Bolivia, Costa Rica, México, Panamá y Perú), en otros países se sitúa entre el 1 y 3% (Belice, República Dominicana, Guatemala, Honduras y Guyana), mientras que Haití y Venezuela presentan las mayores prevalencias, con un 5.2% y 8.6%, respectivamente (Howes *et al.*, 2013).

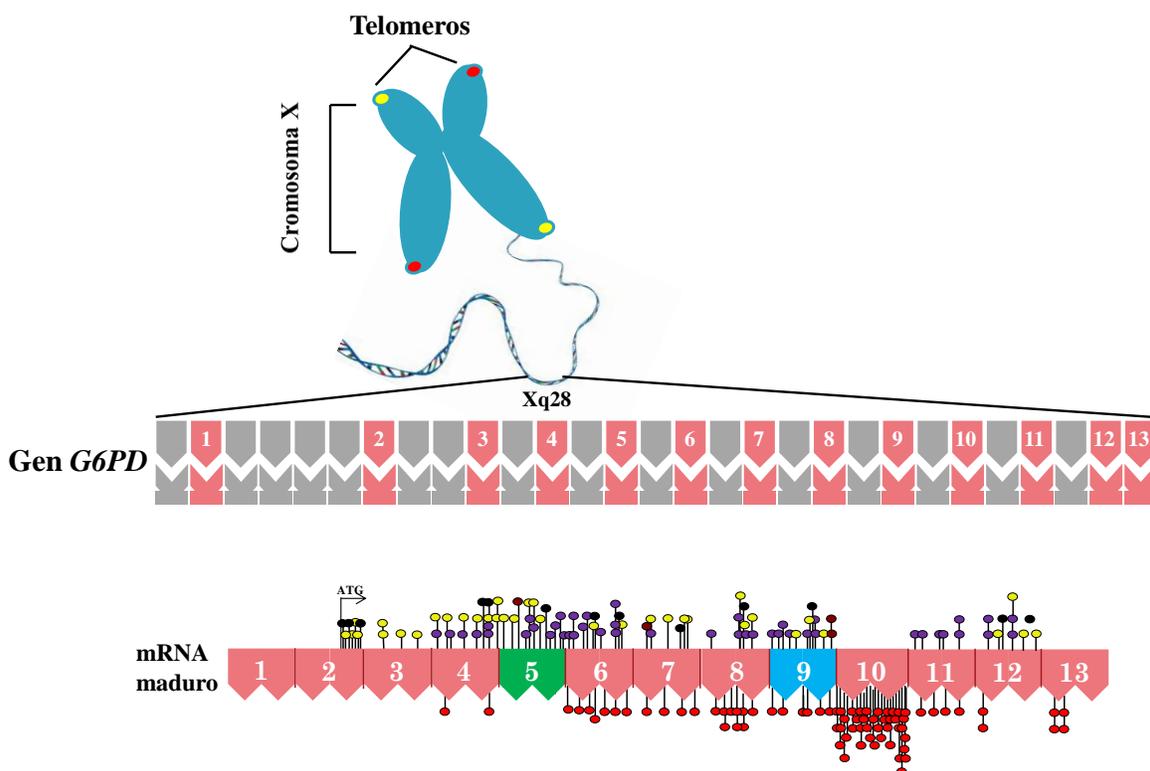
Por otro lado, en México, los estudios sobre la deficiencia de la enzima G6PD en México fueron iniciados por el Dr. Lisker empleando diversos análisis poblacionales, genéticos y clínicos (Lisker *et al.*, 1962). El desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido un diagnóstico certero de la enfermedad, además de conocer las mutaciones presentes en nuestro país y su asociación con la severidad del padecimiento (Beutler *et al.*, 1992). Vaca y colaboradores (2003) demostraron que la deficiencia de la G6PD en México a nivel de ADN es heterogénea y describieron la presencia de tres variantes polimórficas, previamente reportadas en poblaciones de África, Islas Canarias y España (Vaca *et al.*, 2002).

## **1.2 Genética de la G6PD**

El locus del gen *G6PD* se localiza en la parte distal del brazo largo del cromosoma X (Xq28), y contiene 13 exones, 16 intrones y con un tamaño aproximado de 18.5 kb en la secuencia completa (García-Magallanes *et al.*, 2014a). Interesantemente el primer exón, consta de 600 pb y nose traduce el nicio de la traducción (sitio AUG) se localiza en el nucleótido 115 del exón 2, el cual consta de 127 pb (Gómez-Manzo *et al.*, 2014). Así, el RNA mensajero (RNAm) resultante consta de 2269 nucleótidos, donde solo 1545 pb del gel codifican a un monómero de 515 aminoácidos (Figura 2).

Como se ha mencionado el gen de la *G6PD* debido a que está localizado en el cromosoma X, la herencia está ligada al sexo, con expresión del defecto en el varón homocigoto. Así, basta con que el varón tenga una afectación en el cromosoma X para presentar el fenotipo de la deficiencia, mientras que para que se presente una deficiencia en las mujeres es necesario que ambos cromosomas X presenten alguna mutación que afecte a dicho gen (Rinaldi *et al.*, 1976).

La deficiencia de G6PD se produce por varios mecanismos genéticos como deleciones distales, mutaciones puntuales y sustituciones. Todas las mutaciones se transcriben en enzimas con una reducción en la actividad residual, pues la deficiencia completa de la proteína G6PD es incompatible con la vida. Las mutaciones afectan la estabilidad estructural de la enzima, lo que funcionalmente lleva a una disminución de la actividad enzimática y en consecuencia a las múltiples variables mutantes de la G6PD que se han descrito (Bonilla *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Representación esquemática del gen de la *G6PD* ubicado en el cromosoma X. Los exones son representados como cuadros abiertos. Los círculos abiertos representan a las mutaciones que causan las variantes clase II y III. Círculos llenos representan mutaciones esporádicas de la variante severa Clase I. Elipses abiertos son mutaciones que causan las mutaciones Clase IV. Cuadros llenos representan mutaciones esporádicas. Tomado de Gómez-Manzo *et al.*, (2016a).

Las mutaciones que han sido reportadas en el gen *G6PD* afectan la secuencia codificante y resultan en una enzima deficiente. La mayor parte de las 217 mutaciones conocidas a nivel mundial, se debe a mutaciones “missense”, es decir, ocurre la sustitución de una base que permite el reemplazo del aminoácido (Gómez-Manzo *et al.*, 2016a). Raramente una segunda mutación está presente en el mismo gen. La región del promotor del gen de la *G6PD* ha sido ampliamente estudiada y se ha reportado que no presenta mutaciones (Cheng *et al.*, 1999). Los estudios de Cheng y colaboradores (1996), puntualizaron que las mutaciones que causan la anemia hemolítica crónica no esferocítica (Clase I) están agrupadas en el exón 10 (Figura 2); el cual codifica para el extremo carboxilo terminal de la enzima, entre la región de los aminoácidos 362 al 446; mientras que la mayoría de las mutaciones clínicamente menos agresivas se localizan en el extremo amino de la proteína. A nivel de estructura tridimensional de la proteína, el exón 10 codifica para una región que está involucrada en la dimerización de la proteína. Estas mutaciones parecen afectar la hidrofobicidad y las interacciones carga-

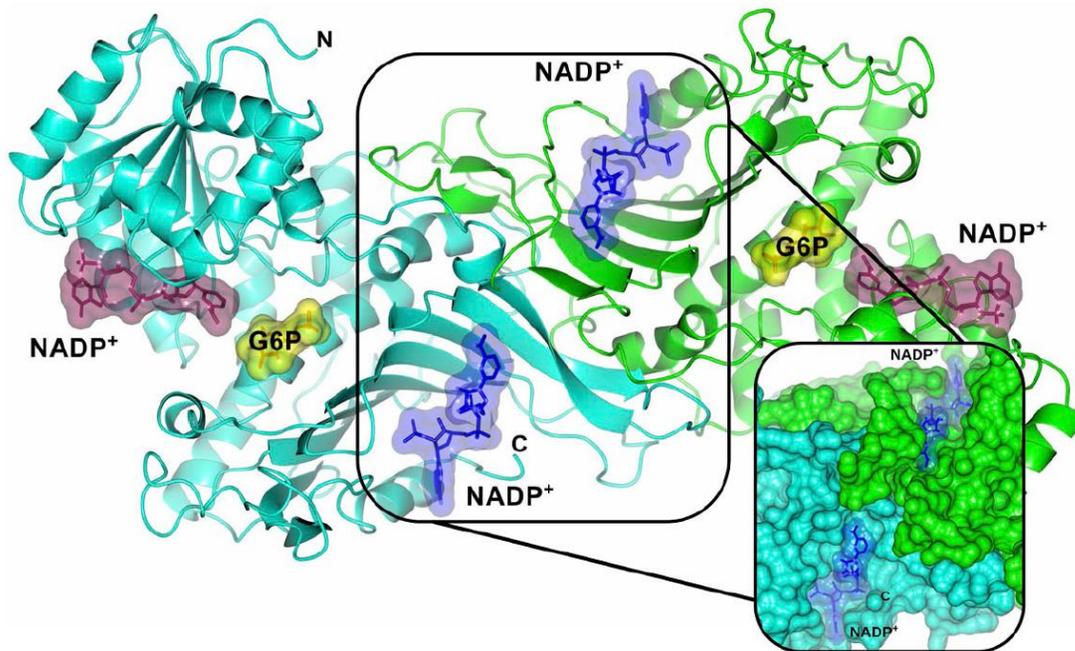
carga de los puentes salinos de la proteína, provocando el mantenimiento de la forma inactiva de la enzima (Franzé *et al.*, 1998).

### **1.3 Estructura de la G6PD**

La enzima G6PD contiene 515 aminoácidos por subunidad, con una masa molecular relativa de 59.25 kDa. La enzima activa está presente en forma de dímero y contiene una molécula de NADP<sup>+</sup> por monómero. El cambio de monómero inactivo a dímero catalítico requiere de la presencia de NADP<sup>+</sup> (Figura 3), el cual está unido a la enzima y participa como un sustrato de la reacción. Algunos estudios que han analizado la proteína indican que el sitio de unión de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADP<sup>+</sup>) está localizado cerca del extremo amino terminal y tiene un aminoácido altamente conservado en la posición 72 (Arginina), el cual juega un papel importante en la unión de la coenzima (Figura 3) (Gómez-Manzo *et al.*, 2017)

La estructura tridimensional del dímero de la G6PD humana fue modelada a partir de la estructura cristalográfica de la G6PD de *Leuconostoc mesenteroides*, posteriormente Au y colaboradores, (2000) reportaron la primera estructura cristalográfica de la G6PD humana determinada para la variante Canton. Un tetrámero conformado por dos dímeros, muy similar a *L. mesenteroides*, con dos importantes diferencias, la primera presentaba una molécula estructural de NADP<sup>+</sup> próxima a la interfase del dímero, y un enlace disulfuro intra-subunidad que restringe el segmento N- terminal. El NADP<sup>+</sup> estructural le confiere a la enzima estabilidad y como se reportó, no está presente en procariontes, además de su función estructural, actúa como una coenzima (Au *et al.*, 2000).

La estructura tridimensional de la G6PD contiene un total de 15 hélices  $\alpha$  y 15 hojas  $\beta$ , en la estructura del dímero las 2 subunidades están localizadas simétricamente (Figura 3) (Au *et al.*, 2000). La superficie de interfase está conformada esencialmente por la superficie de contacto entre las dos hojas antiparalelas de los dominios  $\beta + \alpha$ , unidas por puentes hidrofóbicos. Esta asociación resulta en una molécula muy grande ( $> 122 \text{ \AA}$ ) con dos subunidades de conformación similar (Rowland *et al.*, 1994).

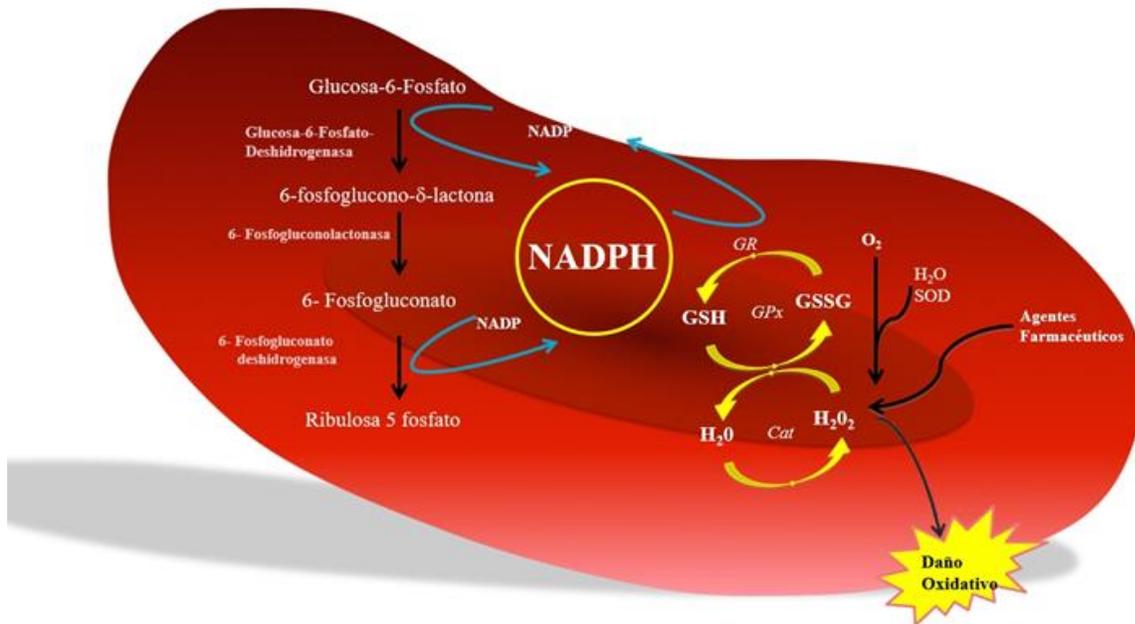


**Figura 3.** Estructura cristalográfica de la enzima G6PD silvestre humana. Se muestra el NADP<sup>+</sup> estructural (superficie molecular en color azul), NADP<sup>+</sup> catalítico (superficie molecular en color morado), así como el sustrato G6P (superficie molecular en color amarillo) en el dímero. Los dos monómeros son mostrados en azul claro y verde. Enmarcado a la derecha se encuentra un acercamiento de la interfase dimérica y ambos NADP<sup>+</sup> estructurales. Tomada de Gómez-Manzo *et al.* (2016a).

#### 1.4 Bioquímica de la G6PD

El NADPH es una molécula reductora que participa en diferentes rutas metabólicas de la célula, como la síntesis de los ácidos grasos, y el colesterol. El NADPH se genera mediante la oxidación de Glucosa-6- fosfato (G6P) por una vía alterna de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato. En la mayoría de las células, la vía de las pentosas fosfato tiene como objetivo primario la generación de NADPH y ribosa 5 fosfato; para el eritrocito, es la única forma de obtener este compuesto NADPH (Voet *et al.*, 2009). La primera reacción de esta

vía, es la conversión de Glucosa 6- fosfato a 6 fosfogluconolactona con reducción de  $\text{NADP}^+$  a NADPH (Figura 4). La enzima que cataliza dicha reacción es la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD).



**Figura 4.** Función de la enzima G6PD en la vía de las pentosas fosfato en los eritrocitos. El NADPH es producido por la acción de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) y 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD). El NADPH sirve como donador de protones para la generación del glutatión reducido, que es un ligando de la enzima catalasa. Cat = catalasa. GPx = glutatión peroxidasa. GR = Glutatión reductasa. G6PD = Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. 6PGD = 6-fosfogluconato deshidrogenasa. GSH = Glutatión reducido. GSSG = Glutatión oxidado,  $\text{H}_2\text{O}_2$  = Peroxido,  $\text{O}_2^-$  = Superóxido. Tomada y modificada de Gómez-Manzo *et al.*, (2016a)

En los eritrocitos, la función de esta primera reacción, es mantener los niveles adecuados de glutatión reducido (GSH) a partir de la oxidación del NADPH por la glutatión reductasa. Además, es un componente estructural de la enzima catalasa, pues en el momento que el eritrocito es afectado por especies reactivas de oxígeno (ERO), la peroxidasa utiliza un GSH como sustrato para convertir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y al glutatión reducido a glutatión oxidado (GSSG) (García-Magallanes *et al.*, 2014a). El GSH presente en los eritrocitos, forma parte vital del funcionamiento natural de la célula, pues al detoxificar el peróxido de hidrógeno evita un daño irreversible en la hemoglobina (Beutler y Yoshida, 1988), y además garantiza su función principal que es transportar oxígeno dentro de una vida media de 120 días (Eandi

*et al.*, 2011). Además, otro producto final de esta vía, es la ribosa 5- fosfato, componente estructural y funcional de moléculas de igual importancia como el DNA, RNA y ATP.

### **1.5 Deficiencia de la G6PD**

Las enzimopatías se refieren a la ausencia o decremento en la actividad de una enzima, pueden deberse a mutaciones genéticas que afectan la función de alguna proteína con actividad catalítica (Gómez-Manzo *et al.*, 2014). La deficiencia de la G6PD constituye el defecto enzimático patológico más común en los seres humanos, se trata también de uno de los trastornos con mayor heterogeneidad genética. La deficiencia de la esta enzima es provocada por mutaciones en el gen *G6PD*, obteniéndose así variantes de G6PD que puedan presentar afectaciones desde perder casi toda su capacidad catalítica hasta acelerar en gran medida su actividad, causando en cada portador de la deficiencia diferentes manifestaciones clínicas que pueden poner en riesgo su integridad física.

La mayoría de las variantes de G6PD tienen una sola mutación, sin embargo, no es el número de mutaciones lo que determina la gravedad de la deficiencia, sino la localización de las mutaciones en la estructura tridimensional de la enzima (Kotaka *et al.*, 2005). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la severidad de la enfermedad con base en las manifestaciones clínicas. La deficiencia de G6PD Clase I, se refiere a todas aquellas enzimopatías que muestran una deficiencia severa con anemia hemolítica no esferocítica. La deficiencia Clase II, agrupa a las deficiencias severas, con una actividad enzimática <10% de la actividad registrada para una enzima G6PD normal. La Clase III se refiere a una disminución moderada de la actividad de la G6PD, cuando su actividad oscila entre el 10 y el 60%, respecto a la normal. Finalmente, en la Clase IV se agrupan los casos con baja disminución en la actividad enzimática (60 al 100% de actividad) y la Clase V son aquellos casos en los que se presenta una actividad mayor respecto a la actividad normal (dos veces mayor a lo normal) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de la deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). (*Adaptada de WHO Working group, WHO, 1986*).

<b>Clase</b>	<b>Nivel de Deficiencia</b>	<b>Actividad enzimática</b>
<b>I</b>	Severa	Anemia hemolítica crónica no esferocítica
<b>II</b>	Severa	Menos del 10% de lo normal
<b>III</b>	Moderada	Del 10 al 60% de lo normal
<b>IV</b>	Suave	Del 60 al 100% de lo normal
<b>V</b>	Ninguna	Mayor del 100 de lo normal

### **1.6 Manifestaciones clínicas.**

La mayoría de los sujetos con deficiencia de la G6PD son asintomáticos a través de su vida. De manera general la enfermedad se manifiesta como una hemólisis aguda cuando los eritrocitos están en condiciones de estrés oxidante. Por lo tanto, la expresión clínica resulta de la interacción de las propiedades moleculares de cada variante de G6PD y de factores exógenos (Bonilla *et al.*, 2007). Además, si la deficiencia de G6PD es moderada, la anemia hemolítica (principal afectación por las deficiencias) es autolimitada porque solo son destruidos los eritrocitos viejos, pues los jóvenes tienen actividad enzimática normal o cercana a la normalidad y no son susceptible a hemólisis, salvo que se expongan a sustancia desencadenantes de estrés oxidativo. Sin embargo, las células jóvenes de las personas con grave deficiencia de G6PD presentan un mayor riesgo de hemólisis grave (Beutler y Yoshida, 1988). Se han descrito diferentes manifestaciones clínicas asociadas a la deficiencia de la G6PD que incluye:

***Hemólisis inducida por fármacos:*** Este padecimiento se desencadena luego de ser ingeridos ciertos fármacos, como: acetanida, ácido nalidixico, furazolidona, primaquina, etc. Dentro de los síntomas que presentan se encuentran: fiebre, orina de coloración negra, ictericia y anemia (Beutler, 1983; Viglietto *et al.*, 1990).

***Hemólisis inducida por infección:*** Esta causa es la más común de hemólisis en todos los pacientes con deficiencia de G6PD, la severidad de hemólisis se ve influenciada por factores de infecciones por virus de la Hepatitis A y B, Citomegalovirus, cuadros de neumonía y

fiebre tifoidea. A pesar de ser la causa más frecuente de hemólisis entre los afectados por la deficiencia, el mecanismo por el cual la infección induce la hemólisis no es conocido (Beutler, 1988).

**Favismo:** Ésta manifestación se caracteriza por la presencia de un cuadro de hemólisis aguda después de ingerir habas, sin embargo, no todos los individuos con deficiencia de G6PD presentan hemólisis después de la ingesta de habas. Los síntomas se desencadenan dentro de las 24 y 48 horas siguientes a la ingesta y los síntomas más comunes son náuseas, vómitos, malestar y vértigo (Mehta *et al.*, 2000). Los compuestos vicina e isuramilo, abundantes en las habas, se piensa que son los causantes de la respuesta hemolítica (Beutler, 1988).

**Ictericia neonatal y kernicterus:** La ictericia no es el resultado directo de la hemólisis sino una consecuencia de la inmadurez de las funciones hepáticas del neonato, debido a la deficiencia de esta enzima en el hígado (Kaplan *et al.*, 2011). Esta deficiencia lleva a la rápida lisis de los eritrocitos, tiene un pico de presentación entre el segundo y el tercer día de nacido. Puede llevar al kernicterus, el cual consiste en daño cerebral y de los nervios auditivos por niveles elevados de bilirrubinemia neonatal no conjugada. También puede llevar a discapacidad intelectual, parálisis cerebral, sordera y muerte.

**Anemia hemolítica crónica no esferocítica.** Las personas que son afectadas por la deficiencia agrupada en la Clase I, condicionan la presencia de anemia hemolítica no esferocítica (AHCNE), debido a que la baja actividad de la G6PD no puede mantener un aporte suficiente de NADPH para prevenir el estrés oxidativo generado por el metabolismo normal. Los pacientes que presentan ictericia neonatal y anemia hemolítica crónica requieren de transfusiones sanguíneas continuas (Mason *et al.*, 2007).

### **1.7 Estudios de la deficiencia de G6PD en México.**

Un estudio epidemiológico de la deficiencia de G6PD realizado en México, con un grupo de 4777 individuos de la población general de cuatro estados de las costas del Pacífico (Sinaloa, Nayarit, Colima y Guerrero), tres estados del Golfo de México (Tamaulipas, Veracruz y Yucatán), y tres estados del noroeste de nuestro país (San Luis Potosí, Coahuila y Durango); se reportó una prevalencia de 0.71%, se identificó su distribución geográfica y se determinó la presencia de 18 variantes de G6PD (Tabla 2). Recientemente, García-Magallanes y colaboradores (2014b) reportaron la presencia de una nueva mutante que fue nombrada

G6PD Mexico DF (A193G) en un estudio realizado en la región norte de México.

**Tabla 2.** \*Mutantes de G6PD encontradas en la población mexicana

Mutación Nombre	cDNA Nucleótido Sustitución	Codón	Amino Acido Sustitución	Exon	Clase
Tsukui	561_563del	188	Ser	6	I
Durham	713A > G	238	Lys → Arg	7	I
Zacatecas	770 G > T	257	Arg → Leu	7	I
Veracruz	1094 G > A	365	Arg → His	10	I
Guadalajara	1159C->T	387	Arg → Cys	10	I
Nashville	1178G > A	393	Arg → His	10	I
Yucatan	1285 A > G	429	Lys → Gly	10	I
Valladolid	406C > T	136	Arg → Cys	5	II
Santa-María	376A > G 542A > T	126 181	Asn → Asp Asp → Val	5, 6	II
San Luis Potosi	376 A > T	126	Asn → Tyr	5	II
<b>A+</b>	<b>376A &gt; G</b>	<b>126</b>	<b>Asn → Asp</b>	<b>5</b>	<b>III</b>
Vanua-Lava	383T > C	128	Leu → Pro	5	II
Viangchan	871G > A	291	Val → Met	9	II
Union	1360C > T	454	Arg → Cys	11	II
A-	202G > A 376A > G	68 126	Val → Met Asn → Asp	4,5	III
<b>A-</b>	<b>376 A&gt;G</b> <b>968 T&gt;C</b>	<b>126</b> <b>323</b>	<b>Asn → Asp</b> <b>Leu → Pro</b>	<b>5</b> <b>9</b>	<b>III</b>
Seattle	844G->C	282	Asp → His	8	III
México City	680G > A	227	Arg → Gln	7	III
<b>Nefza</b>	<b>968T &gt; C</b>	<b>326</b>	<b>Leu → Pro</b>	<b>9</b>	<b>III</b>
México DF	193 A > G	65	Thr → Ala	4	NR

(\*Tabla modificada de Vaca *et al.*, (2003). Las mutantes marcadas en negrita son las involucradas en éste estudio.

Las principales variante encontradas en México incluyen a la G6PD A<sup>-</sup>, G6PD Mexico City, G6PD Durham y G6PD Zacatecas. La G6PD A<sup>-</sup> es la variante más común, lo cual ha sido demostrado por análisis molecular de DNA de pacientes mestizos. Para el caso de México, estudios en sujetos mexicanos que presentan esta deficiencia han reportado que el 80% de los casos corresponden a la mutación A-202A/376G y que el 20% presentan la mutación A-376G/968C; con ancestría africana para éstas variantes (Vulliamy *et al.*, 1991; Beutler y Kuhl, 1990) por lo que es probable que ambas variantes (A-202A/376G and A-376G/968C) hayan sido importadas de África a México por medio de esclavos africanos o de inmigrantes españoles después de la colonización.

De las 217 mutaciones de la G6PD que han sido reportadas genéticamente a nivel mundial, solo 20 mutaciones han sido construidas de manera recombinante y caracterizadas funcional y estructuralmente. En este trabajo se contempla la construcción, clonación, expresión así como la caracterización funcional y bioquímica de dos mutantes sencillas (G6PD A+ y G6PD Nefza) que dan origen a una doble mutante polimórfica G6PD A- como lo propone este trabajo de tesis.

### **1.8 Variante G6PD A+**

La variante G6PD A+ es una mutante Clase III que presenta actividad residual entre el 60 y 100%, y no presenta manifestaciones clínicas aparentes asociadas con la anemia hemolítica aguda (WHO, 1989). Se caracteriza por una sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 376, lo cual, resulta de un cambio del aminoácido asparagina por aspártico en la posición 126 de la cadena polipeptídica. Dicha mutación se encuentra distante del sitio activo de la enzima (Figura 5). En la enzima silvestre, la asparagina 126 forma parte de una  $\alpha$ -hélice expuesta a un ambiente polar acuoso. La carga positiva de dicho aminoácido, está correctamente coordinado con el átomo de oxígeno negativo de asparagina 122 (Figura 5).

### **1.9 Variante Nefza.**

Esta variante se encontró después de analizar a 423 pacientes con hemólisis por ingestión de habas o consumo de fármacos, así como a bebés a los que se les realizó el análisis de tamiz neonatal. La variante G6PD Nefza fue encontrada descrita en un varón de 18 años con anemia hemolítica por consumir habas y se describió por vez primera en Túnez. (Benmansour *et al.*, 2013). Esta es una variante donde la mutación es causada por una sustitución en el nucleótido 968 timina por citosina en el exón 9, se cambia el aminoácido 323 Leucina por Prolina (Figura 5). Se agrupó en la Clase III con una actividad residual aproximadamente del 51% con un ensayo de movilidad electroforética (Benmansour *et al.*, 2013). Hasta la fecha, no se ha estudiado esta variante desde una perspectiva funcional y estructural.

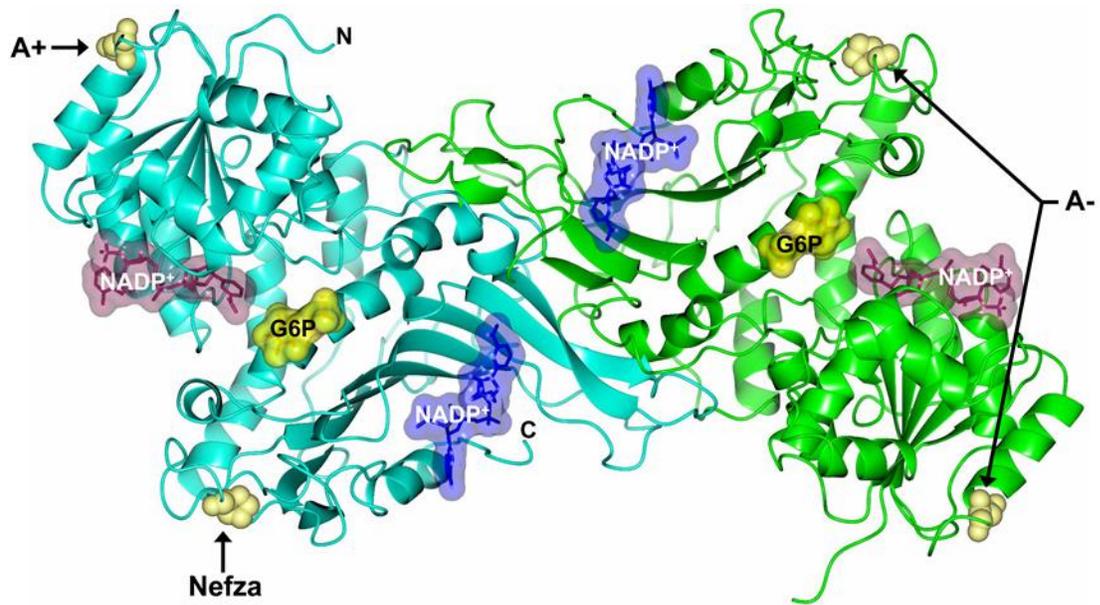
### **1.10 Variante A-**

Respecto a la doble mutante G6PD A- se han reportado dos tipos de mutantes pertenecientes a la variante A-: G202A/ A376G y A376G/T968C, con dos transiciones en los exones 4 y 5 siendo ésta última donde la mutación (por sustitución) de A por G en el nucleótido 376 cambia el aminoácido 126 Asn por Asp y una sustitución del nucleótido timina en la posición 968 por citosina, mutando el aminoácido leucina por prolina en la posición 323 (Bastidas *et*

*al.*, 2015) (Figura 5). La mutación que presenta la variable A- A376G/T968C es catalogada en la Clase III con un nivel de actividad catalítica del 10- 20% (Zhao *et al.*, 2010). En los pacientes se ha observado que ésta mutante se caracteriza por presentar episodios de hemólisis desencadenado por infecciones, drogas o alimentos. Esta variante no sólo tiene disminución de la actividad enzimática, sino también tiene baja estabilidad debido a defectos en el plegado de la proteína (Vulliamy *et al.*, 1988). Los principales afectados son varones de raza negra en Estados Unidos, los cuales se calcula que se presenta una frecuencia de entre el 20 a 25%. (Hirono y Beutler, 1988). Esto se asocia comúnmente con descendientes del continente Africano, así como del sur de Italia, España, Portugal y la península arábiga. La G6PD A- se considera una variante polimórfica (Fonseca *et al.*, 2005).

Excluyendo a los Estados Unidos, en América existen pocos estudios referentes a la G6PD A-, las investigaciones realizadas en México, Costa Rica, Cuba, Brasil y Uruguay demuestran que la variable A- es la más frecuente en estos países (Medina *et al.*, 1997).

Por otro lado, es importante mencionar que la deficiencia de G6PD (Variante A-) se ha asociado con un aumento en la resistencia a la infección por *Plasmodium falciparum* en la región subsahariana de África (Saunders *et al.*, 2005). Esto está respaldado por estudios *in vitro* que demuestran alteraciones en el crecimiento del parásito en eritrocitos deficientes en G6PD. Estudios controlados en el Este y Oeste de África proveen fuerte evidencia de que la deficiencia más común, que es la variante de G6PD A- está asociada a la reducción significativa en el riesgo de malaria grave tanto para mujeres heterocigotas como hombres homocigotos (Ruwende y Hill, 1988).



**Figura 5.** Estructura cristalográfica del dímero de la enzima G6PD humana. En la estructura del dímero de la G6PD humana (entradas PDB 2BHL y 2HB9) se indica la localización de las mutantes clase III Nefza (Leu323Pro), A+ (Asn126Asp) y A- (Asp126Asn + Leu323Pro) (esferas de color amarillo claro). NADP<sup>+</sup> estructural (azul), NADP<sup>+</sup> (morado) y G6P catalíticos son dibujados con superficies moleculares (amarillo). Se muestran los monómeros en azul claro y verde.

## **2. Objetivo General:**

- Analizar bioquímicamente dos mutantes sencillas G6PD Nefza y G6PD A+ que dan origen a una mutante doble G6PD A-.

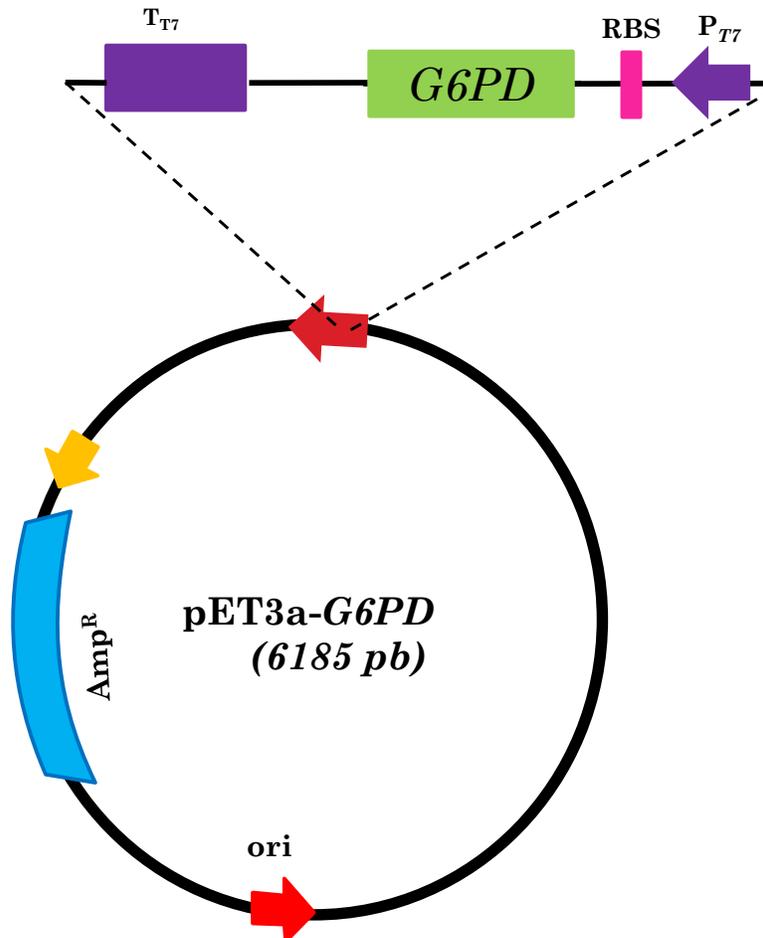
### **2.1 Objetivos particulares:**

- Realizar mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) para la obtención de dos mutantes sencillas G6PD A+ y G6PD Nefza, y una doble mutante G6PD A-.
- Realizar curvas de sobreexpresión heteróloga en *Escherichia coli* para las dos mutantes sencillas G6PD A+ y G6PD Nefza, así como la doble mutante G6PD A-.
- Purificar las proteínas recombinantes mediante métodos cromatográficos a través de columnas de afinidad e intercambio aniónico.
- Analizar funcionalmente cada variante a través de parámetros cinéticos, ensayos de termoinactivación y desnaturalización con clorhidrato de guanidina.
- Evaluar estructuralmente cada variante a través de ensayos de dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, fluorescencia extrínseca y estabilidad térmica.

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1 Construcción de las mutantes de G6PD por mutagénesis sitio dirigida.

Se generaron las tres variantes clínicas, G6PD A+ (nt A376G, Asn126Asp), G6PD Nefza (nt T968C, Leu323Pro) y la doble mutante G6PD A- (A376G + T968C, Asn126Asp + Leu323Pro) a partir del vector pET3a-G6PD (Figura 6) mediante mutagénesis sitio dirigida a través de fragmentos sobrelapados (Figura 7)



**Figura 6.** Vector de expresión pET-3a. El gen *G6PD* humano de 1545 pb se encuentra clonado entre los sitios de restricción *Bpu* I y *Nde* I, obteniendo un plásmido total de 6,185 pb. Ori: origen de replicación. P.amp: promotor del gen de la *ampicilina*. P T7: Promotor *T7*.

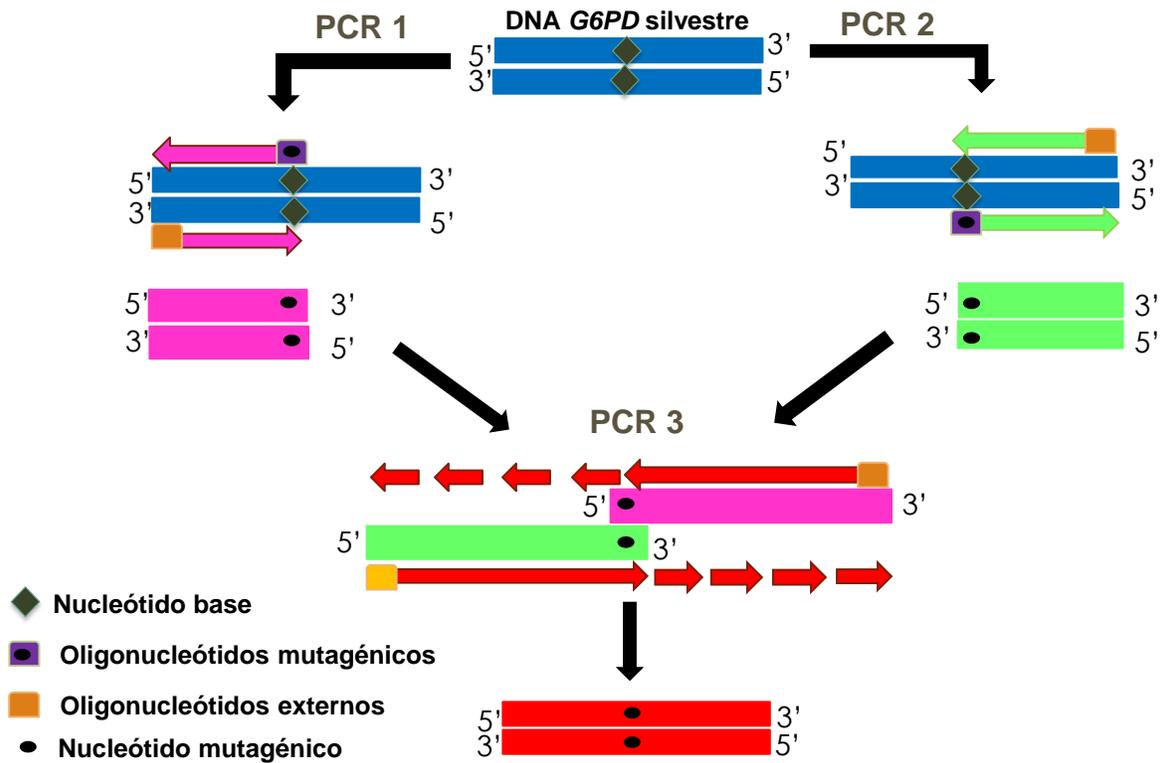
A partir del gen *g6pd* humano completo (acceso NM\_001042351.2), se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos sentido y antisentido para la obtención de las mutantes sencillas G6PD A+ y G6PD Nefza (Tabla 3). Los oligonucleótidos sentido y antisentido para la doble mutante G6PD A- no se muestran, debido a que la generación de ésta variante se dio a partir de usar los oligonucleótidos sentido y antisentido para la mutante G6PD A+ y se utilizó el plásmido con la mutación para la mutante G6PD Nefza como templado. La síntesis

de los oligonucleótidos fueron solicitados a la Unidad de Síntesis y Secuenciación, del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Las concentraciones de reactivos y condiciones de temperatura y ciclos empleadas en el PCR fueron de acuerdo a lo reportado por Ramírez-Nava *et al* (2017).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos para la obtención de las variantes. Con negritas se sobresalta el nucleótido mutado

<b>Cepa y vector.</b>	<b>Características relevantes o secuencia.</b>	<b>Fuente y/o referencia.</b>
Top-10	F <sup>-</sup> , DE(araD-araB)567, lacZ4787(del)::rrnB-3, LAM <sup>-</sup> , rph-1, DE(rhaD-rhaB)568, hsdR514	(Datsenko y Wanner, 2000)
BL21(DE3) $\Delta$ zwf::kan <sub>r</sub>	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) $\Delta$ zwf-777::kan.	(Gómez-Manzo <i>et al.</i> , 2014)
pETg6pd N126D	pET-3a lleva la secuencia codificante del gen <i>g6pd</i> con una mutación Asn126Asp en la proteína G6PD, Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pETg6pd L323P	pET-3a lleva la secuencia codificante del gen <i>g6pd</i> con una mutación Leu323Pro en la proteína G6PD, Amp <sup>R</sup>	Este estudio
pETg6pd N126D + L323P	pET-3a lleva la secuencia codificante del gen <i>g6pd</i> con una mutación Asn126Asp + Leu323Pro en la proteína, Amp <sup>R</sup>	Este estudio
<b>Oligonucleótidos mutagénicos</b>	<b>Secuencia</b>	
Asn126Asp sentido	5- AGCCACATGGATGCCCTCCAC -3'	Este estudio
Asn126Asp antisentido	5'- GTGGAGGGCATCCATGTGGCT -3'	Este estudio
Leu323Pro sentido	5'- TCCACCAACCCAGATGACGT -3'	Este estudio
Leu323Pro antisentido	5'- ACGTCATCTGGGTTGGTGGA -3'	Este estudio
<b>Oligonucleótidos externos</b>	<b>Secuencia</b>	
<i>NdeI</i>	5- CGACAGCCATATGGCAGAG-3'	Este estudio
<i>Bpu</i>	5'-TGCGCTGAGCTCAGAGCTT -3'	Este estudio

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron con el transiluminador UVP® con luz UV y el programa Launch Vision Works LS®, para determinar los carriles correspondientes a la amplificación de los 3 productos de PCR para cada mutante.



**Figura 7.** Esquema general de mutagénesis sitio dirigida por PCR a través de la técnica de fragmentos superpuestos. En la primera reacción de PCR 1 se amplifica el primer fragmento del ADN silvestre con el oligonucleótido externo (*NdeI*) y con el oligonucleótido antisentido mutagénico. En la segunda reacción de PCR, se amplifica con el oligonucleótido externo antisentido (*Bpu*) y el oligonucleótido sentido mutagénico. Al final, 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 plantillas y ambos oligonucleótidos externos *NdeI* y *Bpu*.

Los productos finales del PCR 3, se utilizaron para transformar células competentes *E. coli* Top-10. El procedimiento empleado en el proceso de transformación para cada mutante es descrito en la Figura 8. Las cajas Petri con medio Luria Bertani (LB) se incubaron a 37 °C aproximadamente por 12 horas. Si hubo una correcta transformación de las bacterias, éstas crecerán en un medio selectivo con ampicilina.



**Figura 8.** Procedimiento de transformación de células competentes *E. coli* Top-10 con las construcciones resultantes de la mutagenesis sitio dirigida por Quickchange conteniendo posiblemente la mutación deseada para cada variante de G6PD.

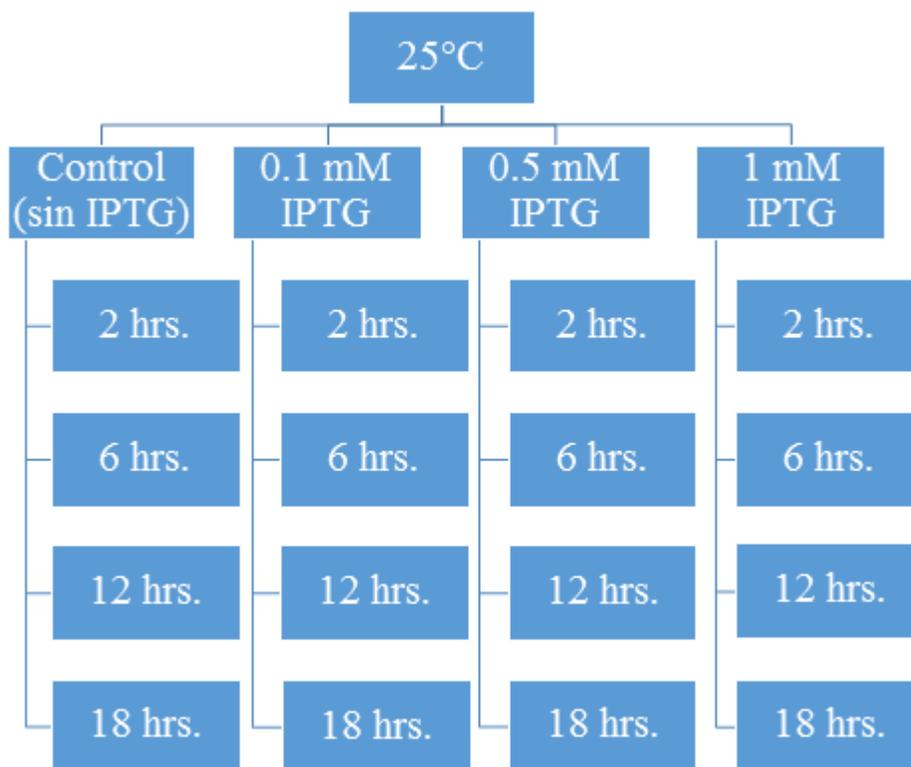
Las colonias positivas resultantes de cada una de las mutantes sencillas G6PD A+ (nt A376G, Asn126Asp), G6PD Nefza (nt T968C, Leu323Pro) y para la doble mutante G6PD A- (A376G + T968C, Asn126Asp + Leu323Pro) se realizaron inóculos con 30 mL de medio LB y ampicilina 100 µg/mL. Los cultivos fueron crecidos a 37 °C toda la noche y posteriormente se purificaron los plásmidos de cada una de las mutantes de G6PD de acuerdo a los procedimientos del Kit GeneJET Plasmid® (Thermo Scientific).

Para corroborar la mutación deseada y la fidelidad del gen *G6PD* se realizó la secuenciación de DNA bidireccional con oligonucleótidos internos sentido y antisentido (Tabla 3). Los plásmidos con las secuencias verificadas con las mutaciones deseadas fueron utilizados para transformar *E. coli* BL21(DE3) $\Delta_{zwf}::kan^r$ . El procedimiento de transformación fue el mismo que se realizó en la Figura 8. Las cajas Petri con medio LB al final de la transformación, se incubaron a 37 °C durante toda la noche. De las colonias positivas resultantes se inocularon tres colonias de cada mutante en 30 mL de medio LB conteniendo ampicilina y kanamicina a una concentración final de 100 µg/mL para cada antibiótico. Los tubos se mantuvieron en agitación a 37 °C por 12 horas. La presencia de actividad de G6PD es indicativo como selección positiva, ya que las células de *E. coli* BL21(DE3) $\Delta_{zwf}::kan^r$  no presentan actividad

endógena de G6PD debido a que el gen endógeno de *G6PD* está deletado. Los cultivos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y los botones celulares se suspendieron en 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis ( $K_2NPO_4$  50 mM y NaCl 50mM, pH 7.35,  $\beta$ - mercaptoetanol 0.1% y fluoruro de fenimetilsulfonilo 0.5 mM (PMSF) disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) 0.1%. Las bacterias fueron lisadas por sonicación, con 7 ciclos de 40 segundos cada uno, con un descanso de 2 minutos. El extracto crudo fue obtenido centrifugando a 14,000 rpm por 15 minutos y conservados a 4 °C. La actividad enzimática fue realizada como es descrito en la sección de actividad catalítica. Después de observar la presencia de actividad enzimática en cada una de las transformantes, estas fueron utilizadas para realizar los ensayos de sobreexpresión y encontrar las condiciones óptimas de crecimiento de cada mutante.

### **3.2 Sobreexpresión y purificación de las enzimas recombinantes de G6PD humana.**

Para conocer los mejores niveles de expresión para cada mutante de la G6PD, se realizó una curva de expresión en la que se varió la concentración de isopropil- $\beta$ -tiogalactosido (IPTG) como inductor y el tiempo de expresión tanto de la G6PD silvestre y las mutantes involucradas en este trabajo. Se inoculó 1 mL de cada una en 25 mL de medio LB conteniendo ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Las bacterias se crecieron a 37 °C en agitación, cuando se alcanzó una densidad óptica (D.O) de 1 a 600 nm, la temperatura fue cambiada a 25 °C y los cultivos se incubaron a diferentes concentraciones de IPTG y diferentes tiempos de expresión como se detalla en la Figura 9. Las células fueron concentradas a cada uno de los tiempos por medio de centrifugación a 4,000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se guardaron los botones celulares a -70 °C.



**Figura 9.** Ensayo de sobreexpresión para cada mutante de G6PD. Las mutantes de G6PD fueron incubadas a diferentes concentraciones de IPTG (0, 0.1, 0.5 y 1 mM) y tiempos de incubación (2, 6, 12 y 18 horas).

Después de obtener las condiciones de los mejores niveles de expresión de cada una de las mutantes de G6PD, se procedió a realizar cultivos de 2 L de medio LB conteniendo ampicilina 100 µg/mL. Los matraces se pusieron en agitación a 25 °C hasta alcanzar una D.O de 1 y posteriormente fueron inducidos a las mejores condiciones de expresión obtenidas para cada variante. Las células fueron concentradas por centrifugación a 4,000 rpm en la centrifuga Eppendorf 5810 R ® y almacenadas a -70 °C. Para la purificación de las mutantes de G6PD, las células fueron suspendidas en solución amortiguadora de lisis y rotas por sonicación. El lisado celular fue centrifugado a 12,000 rpm por 30 minutos en la centrifuga Eppendorf 5810 R ® descartando el precipitado y obteniendo el extracto crudo en el sobrenadante.

El procedimiento de purificación para todas las mutantes se realizó como fue previamente descrito por Gómez-Manzo *et al.*, (2014), el cual involucra dos precipitaciones diferenciales con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el empleo de columnas de afinidad de 2', 5'-ADP Sepharose 4B y de intercambio aniónico Q-Sepharose 4B (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las

precipitaciones diferenciales fueron realizadas de la siguiente manera: el extracto crudo de cada una de las variantes fue incubada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 0 a 25%. Después de 2 horas de incubación a 4 °C, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm en la centrífuga Eppendorf 5810 R® durante 30 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue sometido a una segunda precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 25 a 55%. Se incubaron por 2 horas a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos.

El precipitado obtenido se suspendió en 30 mL de amortiguador de equilibrio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM, pH 7.35) y fue cargado a la columna de afinidad 2'5 ADP 4B (GE Healtercare ®) previamente regenerada con el mismo amortiguador. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna (100 mL) hasta que la absorbencia a 280 nm fue cero. La proteína fue eluída de la columna con 100  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  contenido el mismo amortiguador de equilibrio. El eluído fue fraccionado en volúmenes de 5 mL en tubos de ensayo y a cada uno de ellos se le midió la actividad enzimática para G6PD. Las fracciones que presentaron actividad para G6PD fueron concentradas con centricon (Milipore ®) con membrana de corte de 30 kDa.

Las fracciones concentradas fueron cargadas a la columna de intercambio aniónico Q-Sepharose 4B (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) previamente equilibrada con solución amortiguadora de equilibrio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM, pH 7.35). La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna (50 mL) hasta que la absorbencia a 280 nm fue cero. Las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de 0 a 350 mM de NaCl contenidos en la solución de equilibrio. La elución fue separada en fracciones de 2 mL y a cada una de las fracciones se le midió la actividad enzimática de G6PD. Las fracciones que presentaron actividad para G6PD fueron concentradas con centricon (Milipore ®) con membrana de corte de 30 kDa. La pureza de las tres enzimas recombinantes se confirmó en geles de SDS-PAGE al 12%, los cuales fueron teñidos con azul Coomassie coloidal (R-250) (Sigma-Aldrich). La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Lowry modificado (Markwell et al. 1981) utilizando albúmina sérica de bovino como estándar.

### **3.3 Determinación de los parámetros cinéticos.**

La determinación de los parámetros cinéticos tanto de la G6PD silvestre y las tres variantes clínicas A+ (Asn126Asp), Nefza (Leu323Pro) y A- (Asn126Asp + Leu323Pro) se determinó espectrofotométricamente mediante el seguimiento de la reducción de NADP<sup>+</sup> a 340 nm (Gómez-Manzo *et al.*, 2014, 2015, 2016b). El ensayo de actividad estándar se realizó en una cubeta con un volumen final de 1 mL de reacción. La reacción se inició con la adición de 200 ng/mL de cada enzima. La mezcla de reacción estándar contenía solución amortiguadora de Tris-HCl 100  $\mu$ M pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, glucosa-6-fosfato 1 mM y NADP<sup>+</sup> 1 mM. Los datos de velocidad inicial se obtuvieron variando la concentración de uno de los sustrato (2.5 a 200  $\mu$ M), mientras que el segundo sustrato se fijó a una concentración de saturación. La velocidad inicial obtenida para cada concentración se utilizó para calcular la velocidad de formación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) ( $\mu$ mol/min/mg) utilizando el coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm ( $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Los parámetros cinéticos en estado estacionario,  $K_m$ ,  $k_{cat}$ , y  $V_{max}$  se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten mediante cálculos de regresión no lineal. Una unidad internacional (UI) de la actividad de G6PD fue la cantidad de enzima requerida para producir 1  $\mu$ mol de NADPH por minuto bajo las condiciones de ensayo.

### **3.4 Evaluación de la estabilidad de las proteínas**

#### **3.4 a) Ensayo de termoinactivación**

Los ensayos de termoinactivación han sido ampliamente utilizados para conocer la estabilidad catalítica de las enzimas con base en su actividad residual cuando son sometidas a diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup> como agente estabilizador. Para el análisis de inactivación térmica, el NADP<sup>+</sup> estructural se eliminó de la enzima purificada mediante intercambio de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7,35 y la concentración de la enzima se ajustó posteriormente a 0.2 mg/mL para cada variante. Las enzimas G6PD se incubaron con diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup> (0, 10, 100 y 500  $\mu$ M) y posteriormente se incubaron en un termociclador Maxygen<sup>®</sup> bajo un gradiente de temperaturas de 37 a 60 °C durante 20 minutos. Las muestras se enfriaron a 4 °C, posteriormente se determinó la actividad residual de la enzima y se expresó como un porcentaje de la actividad de la misma enzima incubada a 37 °C. Todas las pruebas de inactivación térmica se realizaron por triplicado.

### ***3.4 b) Estabilidad térmica seguido por dicroísmo circular***

La estabilidad térmica y la desnaturalización de la G6PD silvestre y de las tres mutantes clínicas G6PD A+, Nefza y A- fueron determinados siguiendo los cambios observados mediante la elipticidad molar a 222 nm en un intervalo de temperatura que osciló entre 20 y 90 °C con una velocidad de cambio de 1 °C / 2.5 minutos utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810® a través de una celda Peltier termostatazado. El NADP<sup>+</sup> estructural se eliminó de las enzimas purificadas como se describió anteriormente y la concentración de G6PD se ajustó a 0.8 mg/mL. A cada uno de los espectros se le extrajo el blanco (amortiguador de fosfato 10 mM). Los datos se ajustaron a la ecuación sigmoidea de Boltzman en el programa Origin®. La desnaturalización de cada proteína se evaluó obteniendo la *T<sub>m</sub>*, el cual fue un parámetro que indicó el punto medio de desnaturalización térmica de cada una de las proteínas; es decir, a esa temperatura representa que el 50% de la proteína se encuentra en estado desnaturalizado.

### ***3.4 c) Efecto del clorhidrato de guanidina (Gdn- HCl) sobre la estabilidad de las variantes de G6PD***

La estabilidad en la presencia o ausencia de Gdn-HCl se realizó para evaluar los cambios inducidos por las mutaciones en la enzima G6PD silvestre. Las enzimas purificadas libres del NADP<sup>+</sup> estructural, se ajustaron a una concentración de proteína de 0.2 mg/mL y a diferentes concentraciones de Gdn- HCl (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40 y 0.5 M) y se incubaron a 37 °C por 2 horas, posteriormente se midió la actividad residual a 340 nm en el espectrofotómetro Cary 50 Bio®. La actividad residual se expresó como un porcentaje de la actividad para la misma muestra medida a 25 °C sin Gdn-HCl. Todas las soluciones se prepararon y se diluyeron inmediatamente antes de su uso.

## **3.5 Caracterización espectroscópica**

### ***3.5 a) Análisis de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular (DC)***

Para evaluar el efecto de las mutaciones que dan origen a las variantes enzimáticas a nivel de la estructura secuenciaria de la proteína, se realizaron ensayos de dicroísmo circular (CD) en un espectropolarímetro (Jasco J-810 ®) con un paso constante de nitrógeno de alta pureza, equipado con un soporte de celda Peltier termostato. La determinación de la estructura secundaria se realizó en la región del UV lejano (190- 250 nm) a intervalos de 1 nm en una célula de cuarzo con una longitud de paso de 0,1 cm. Los ensayos se realizaron con una concentración de proteína de 0.8 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH

7.35. La determinación de la estructura secundaria se realizó en la región del UV lejano (190-250 nm). Un efecto en la estructura secundaria causada por dichas mutaciones se observó como un cambio en la absorción de las mutantes, con respecto a la absorción de la enzima silvestre medida en la elipticidad molar ( $\phi$ ) en espectros de 222 nm y 208 nm para las hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ , respectivamente. El espectro correspondiente al blanco (solución amortiguadora) se restó de los que contenían la proteína.

### **3.5 b) Análisis estructural por fluorescencia intrínseca y 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS)**

Para determinar si las mutaciones que dan origen a las variantes enzimáticas afectan la estructura terciaria de las proteínas, se realizaron análisis de los cambios conformacionales en la estructura terciaria tanto de la enzima G6PD silvestre y de las mutantes por fluorescencia intrínseca y su capacidad para unir 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS). Ambos ensayos se realizaron en un espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EE.UU.) equipado con una celda de cuarzo y una longitud de paso de 1 cm (Gómez-Manzo *et al.*, 2014). El ensayo de fluorescencia intrínseca se llevó a cabo utilizando una concentración de proteína para cada variante de 0.1 mg/mL en solución con amortiguador  $K_2HPO_4$  10 mM, pH 7.35, a 25 °C. Las muestras fueron excitadas a 295 nm y la emisión de la fluorescencia se obtuvo de 310 a 500 nm. Los ensayos de ANS se realizaron en solución amortiguadora  $K_2HPO_4$  25 mM, pH 7.35 a 25 °C utilizando una concentración de proteína de 0.4 mg/mL. Se midió la excitación del reactivo ANS a una longitud de onda de 395 nm en un rango de emisión de 400 a 600 nm con slits de excitación y emisión de 10 y 10 nm, respectivamente. Para ambos ensayos espectroscópicos, los espectros de los blancos (amortiguador  $K_2HPO_4$  10 mM, pH 7.35) sin proteína se restaron de las muestras experimentales que contenían la proteína respectiva.

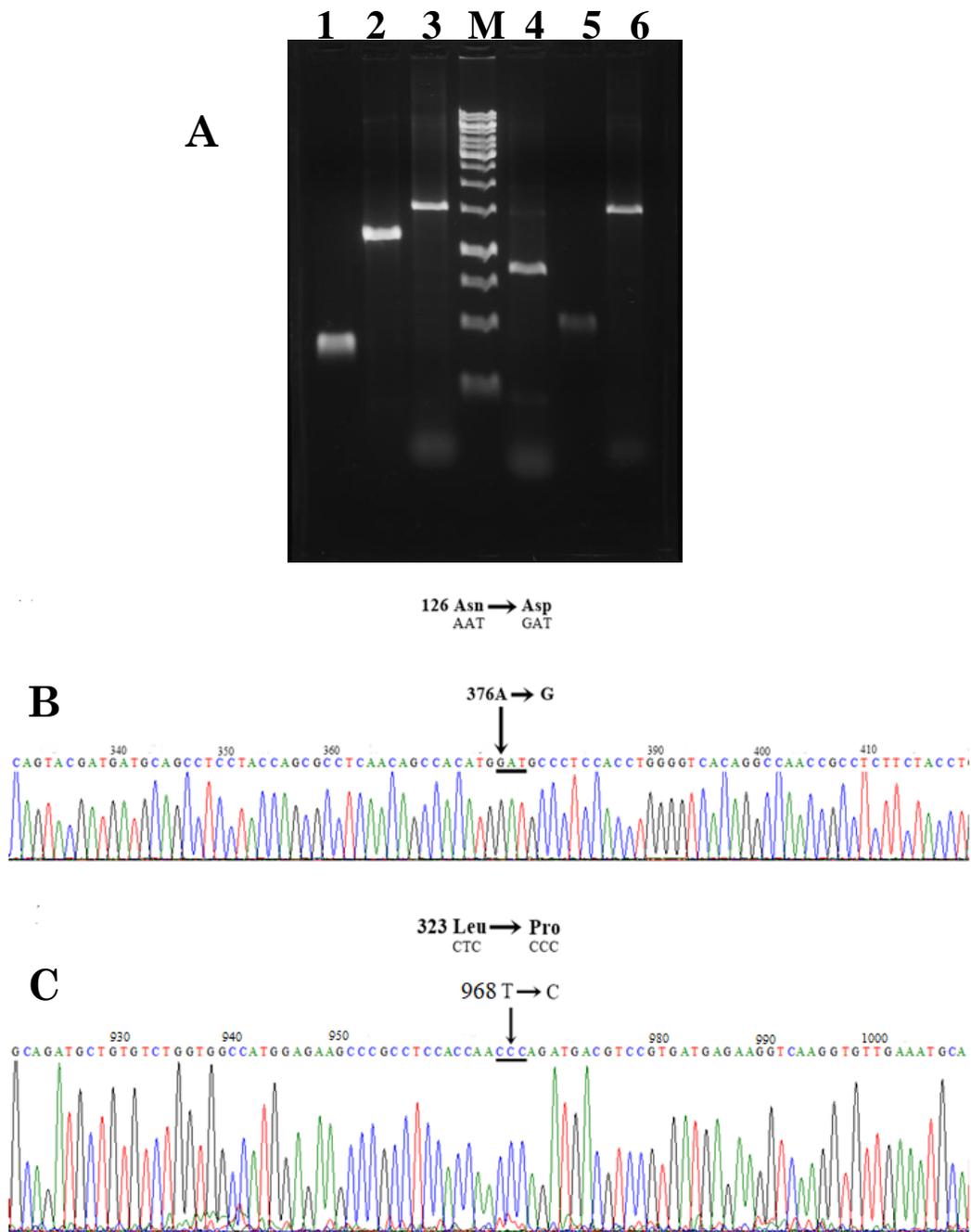
## 4. Resultados.

### 4.1 Mutagénesis dirigida por QuickChange.

Para la mutagénesis sitio dirigida se tomó como templado el plásmido pET-3a que contenía el gen de la G6PD silvestre. Se utilizaron oligonucleótidos mutagénicos sentido y antisentido (Tabla 3) para realizar la mutagénesis al templado en las reacciones de PCR 1 y PCR 2, mientras que para la PCR3, se utilizaron los templados mutagénicos con oligonucleótidos externos para llevar a cabo la extensión completa del gen mutante.

Los productos obtenidos de cada PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1%. Como se observa en la Figura 10A, se logró la amplificación del gen de la G6PD utilizando los oligonucleótidos mutagénicos y externos. Los productos de PCR 1 (376 pb), PCR 2 (1169 pb) y PCR 3 para la variante sencilla G6PD A+ se localizan en los carriles 1, 2 y 3 respectivamente. Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a los productos de PCR 1 (968 pb), PCR 2 (577 pb) y PCR 3 para la variante sencilla Nefza. Para ambas mutantes, el producto de PCR 3 fue de un tamaño de 1545 pb.

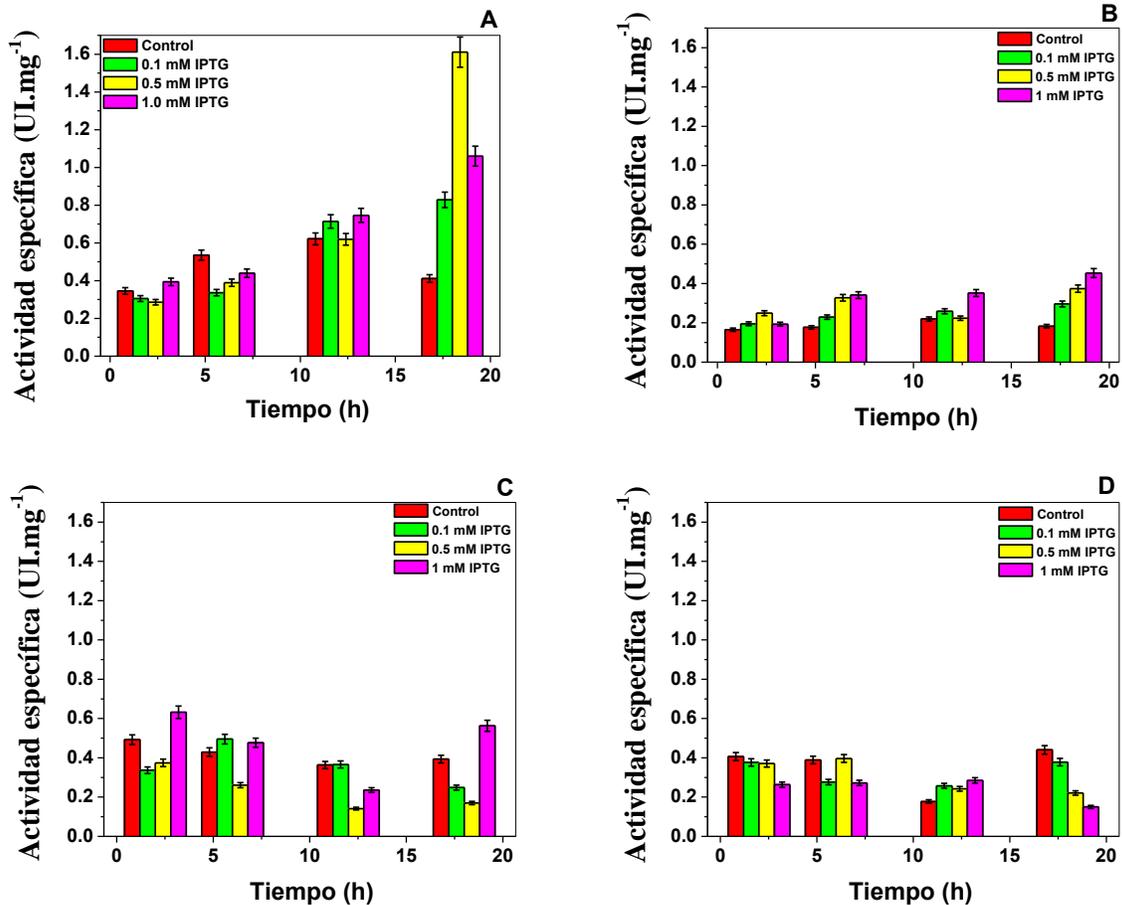
Los productos de PCR 3 se utilizaron para transformar células competentes *E. coli* TOP-10. Los plásmidos transformados se purificaron y se realizó un análisis de secuencia de DNA bidireccional de plásmidos para confirmar que se realizaron las mutaciones puntuales deseadas. En la Figura 10, se muestran los electroferogramas de la secuenciación de cada uno de los plásmidos para cada mutante de G6PD. Para la variante A+ (Asn126Asp) se muestra el cambio de adenina en la posición 376 por guanina (Figura 10B). El electroferograma para la variante Nefza (Leu323Pro) muestra el cambio en la posición 968 de una timina por una citosina. No se muestra el electroferograma de la doble mutante G6PD A- (A376G + T968C, Asn126Asp + Leu323Pro), debido a que se usó el plásmido de la variante G6PD Nefza como templado para la generación de la doble mutante G6PD A- (Figura 10C). Tras confirmar mediante la secuenciación la generación de las mutaciones deseadas, se transformaron células de expresión *E. coli* BL21(DE3) $\Delta zwf::kan^r$ .



**Figura 10.** Construcción de tres mutantes de G6PD. (A) Productos de PCR obtenidos mediante la técnica de fragmentos sobrelapados visualizados en un gel de agarosa 1% M: Marcador de DNA O'GeneRuler 1 Kb (Thermo Scientific). Carril 1: Fragmento 1 G6PD A+. Carril 2: Fragmento 2 G6PD A+. Carril 3: Amplificación completa del gen mutagénico para G6PD A+. Carril 4: Fragmento 1 G6PD Nefza. Carril 5: Fragmento 2 G6PD Nefza. Carril 6: Amplificación completa del gen mutagénico para G6PD Nefza. (B) Electroferograma de la mutante sencilla G6PD A+ (A376G, Asn→Asp). (C) Electroferograma de la mutante sencilla G6PD Nefza (T968C, Leu→Pro). En todos los casos se muestran las mutaciones con las correspondientes sustituciones de nucleótidos y aminoácidos.

#### **4.2 Sobreexpresión y purificación de las enzimas recombinantes de G6PD humana.**

Para producir grandes cantidades de proteína recombinante soluble, se determinaron las condiciones óptimas de expresión (tiempo de incubación con diferentes concentraciones de IPTG como inductor para la sobreexpresión) usando actividad específica como indicador. Se encontró que mientras la expresión de la G6PD silvestre fue inducida por IPTG en tiempo y concentración dependiente, todas las actividades específicas en el extracto crudo de las tres G6PDs mutantes fueron entre 50-80% respecto a la G6PD silvestre (Figura 11). Para las mutantes sencillas G6PD A+ (Asp126Asn) y G6PD Nefza (Leu323Pro) se observó que la mejor actividad específica fue de  $0.5 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$  y  $0.55 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente, utilizando IPTG 1 mM y 18 h de incubación (Figura 11B y C), lo que representó una disminución de 3 veces en la actividad específica con respecto a la enzima G6PD silvestre (Figura 11A). Para la doble mutante G6PD A- (Asn126Asp + Leu323Pro) se obtuvo una actividad específica de  $0.4 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$  (IPTG 0,1 mM y 18 h de incubación) (Figura 11D), lo que representó una disminución de 4 veces la actividad específica con respecto a la enzima G6PD silvestre. A pesar de que las mutaciones estudiadas se reportan como variantes de Clase III y se encuentran en diferentes partes de la estructura tridimensional de la proteína G6PD silvestre la actividad específica obtenida en el extracto crudo fue menor que la obtenida para la enzima silvestre G6PD ( $1.6 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) (Gómez-Manzo *et al.*, 2014) (Figura 11A).



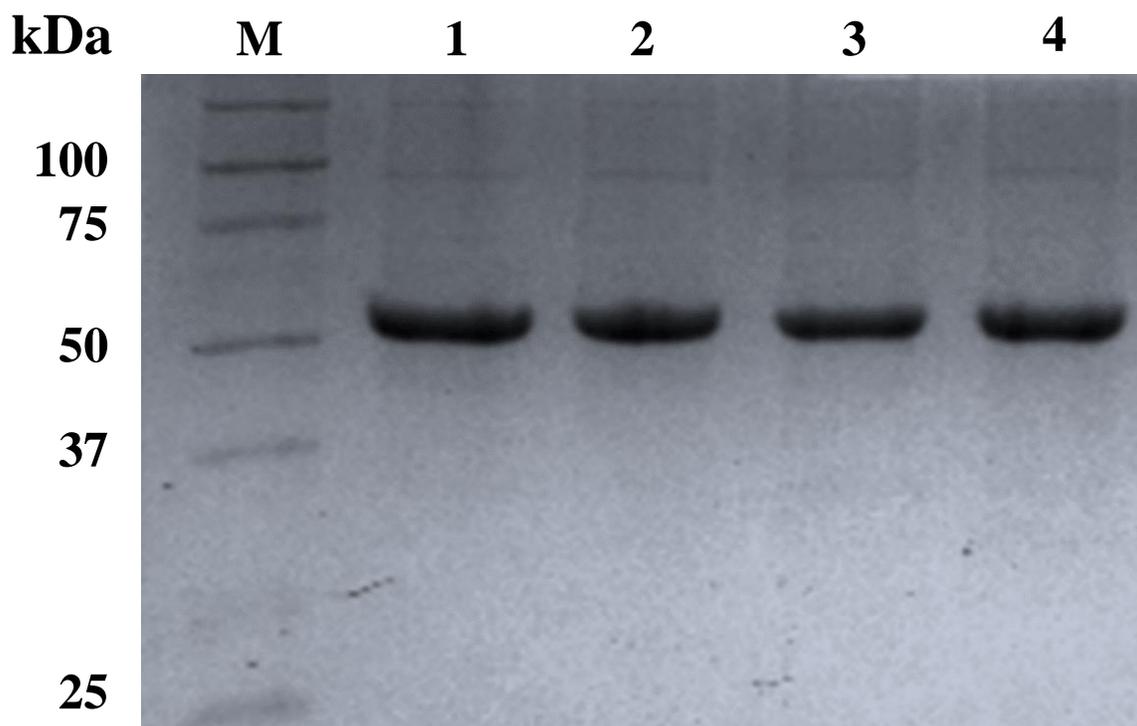
**Figura 11.** Curva de expresión de las variantes de G6PD en *Escherichia coli* BL21(DE3) $\Delta$ zwf::kan<sup>r</sup> utilizando diferentes concentraciones de IPTG (0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM) (A). Expresión de la enzima silvestre G6PD humana. Dos mutantes sencillas Clase III, (B) G6PD A+, (C) G6PD Nefza y (D) una doble mutante Clase III G6PD A-. La actividad específica fue usada como indicativa de los niveles de expresión de las proteínas recombinantes.

#### 4.3 Purificación de las proteínas recombinantes.

Para obtener una idea del efecto de las mutaciones sobre la función y estructura tridimensional sobre la enzima silvestre de G6PD, se purificaron las enzimas humanas recombinantes de G6PD (silvestre y mutantes) por afinidad e intercambio aniónico. Las enzimas purificadas se analizaron en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), donde se observa una banda única con una pureza del 96% (Figura 12), lo que nos permitió realizar tanto los ensayos funcionales y estructurales de la G6PD silvestre y de las tres mutantes de G6PD involucradas en este estudio.

Los resultados de la purificación se resumen en la Tabla 5; los pasos cromatográficos dan como resultado una concentración total de proteína pura que oscila entre 3.5 a 4.8 mg (por 2

litros de cultivo de *E. coli*), sin embargo la eficiencia de purificación para las tres mutantes de G6PD fue menor con respecto a la enzima silvestre. Para las mutantes G6PD A+, Nefza y A-, los valores de rendimiento de las proteínas purificadas fueron de 43, 28 y 24%, respecto a la enzima total en el extracto crudo.



**Figura. 12.** Purificación de las enzimas de G6PDs recombinantes humanas. SDS-PAGE de enzimas G6PD purificadas. M: Marcador de masa molecular Bio-rad (Broad Range). 1: Enzima silvestre. 2: Variante G6PD A+. 3: Variante G6PD Nefza 4: Variante G6PD A-. Cada carril se cargó con 10  $\mu$ g de proteína total y se visualizó usando coomassie azul brillante.

**Tabla 5.** Resumen de la purificación de las variantes enzimáticas de G6PD.

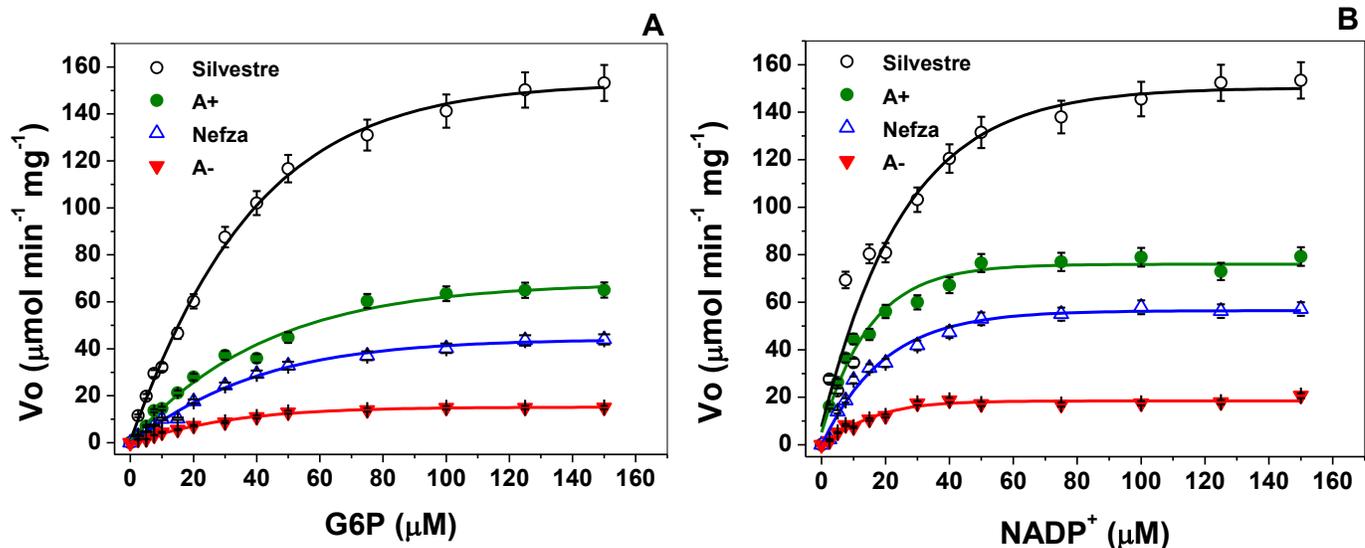
G6PD	Proteína total (mg)	Actividad específica (IU.mg <sup>-1</sup> )	Actividad total (IU)	Producción (%)
Silvestre	4.8	224	1075	61
A+	3.6	114	410	43
Nefza	3.5	62	218	28
A-	3.5	22	77	24

#### 4.4 Determinación de los parámetros cinéticos.

Para evaluar el efecto de las mutaciones en la eficiencia catalítica, los parámetros cinéticos de estado estacionario se analizaron para las tres variantes de G6PD y la enzima silvestre. Los valores iniciales de velocidad obtenidos a las concentraciones de sustrato (indicados en el eje de las abscisas) se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten mediante cálculos de regresión no lineal (Figura 13). Los parámetros cinéticos en estado estacionario se obtuvieron a partir de los gráficos y se resumen en la Tabla 2. El valor de  $K_m$  para la mutante Clase III G6PD A+ es aproximadamente dos veces mayor que la enzima silvestre G6PD ( $K_m\text{G6P}= 56.4\pm 5.5$ ,  $K_m\text{NADP}^+= 12.9\pm 1.4$   $\mu\text{M}$ , respectivamente) para ambos sustratos fisiológicos; mientras que la  $k_{cat}$  disminuyó cerca del 50% ( $114\pm 3.2$   $\text{s}^{-1}$ ). Para la mutante clase III G6PD Nefza, la afinidad se incrementó dos veces ( $K_m\text{G6P} = 50.4\pm 6.2$   $K_m\text{NADP}^+= 16.4\pm 1.6$   $\mu\text{M}$ , respectivamente) para ambos sustratos fisiológicos en comparación con la enzima G6PD silvestre (es decir,  $K_m\text{G6P} = 38\pm 4.1$ ,  $K_m\text{NADP}^+ = 6.1\pm 1.2$   $\mu\text{M}$ , respectivamente).

La afinidad para ambos sustratos fisiológicos en la doble mutante G6PD A- fue similar a la obtenida para la variante G6PD Nefza, y fue inferior respecto a la variante G6PD A+. Estos resultados sugieren que la única mutación de Leu→Pro 323 (G6PD Nefza) tiene una contribución importante a la pérdida de afinidad para ambos sustratos en la doble mutante G6PD A-.

No obstante, los mutantes de Clase III incluidos en este estudio, G6PD A+ ( $114\pm 3.2$   $\text{s}^{-1}$ ), G6PD Nefza ( $126\pm 2.8$   $\text{s}^{-1}$ ) y un doble mutante G6PD A- ( $35.8\pm 3$   $\text{s}^{-1}$ ) mostraron valores menores de constante catalítica ( $k_{cat}$ ) cuando se comparó con la G6PD silvestre ( $233$   $\text{s}^{-1}$ ). La doble mutante G6PD A- (Clase III) mostró una disminución dramática en la constante catalítica del 85%, mientras que ambas mutantes sencillas Clase III G6PD A + y Nefza presentaron una disminución del 50%, en relación con la enzima silvestre G6PD.



**Figura 13.** Curvas de saturación representativas de la G6PD silvestre y las mutantes para los sustratos G6P (A) y NADP<sup>+</sup> (B). Los datos de la velocidad inicial para cada punto fueron obtenidos de las velocidades iniciales variando una concentración del sustrato indicado en el eje de las abscisas con el segundo sustrato fijado a una concentración de saturación. Las velocidades iniciales se ajustaron a la ecuación de Michaelis- Menten mediante cálculos de regresión no lineal. Los datos representan tres experimentos independientes.

Estos datos confirman que las mutaciones puntuales sencillas y dobles, que provocan un cambio de aminoácido en la estructura primaria de las variantes enzimáticas de la G6PD afectan el comportamiento cinético y catalítico, disminuyendo los parámetros cinéticos respecto a la enzima silvestre. Es importante mencionar que los grados de disfunción enzimática detectados en las tres mutantes clínicas estuvieron de acuerdo con la gravedad de las manifestaciones clínicas, donde la única variante natural Clase III G6PD Nefza mostró antecedentes de anemia hemolítica debido al consumo de habas; mientras que en la doble mutante G6PD A- clasificado como una variante de clase III, los pacientes han mostrado episodios de hemólisis desencadenados por infecciones, drogas o alimentos.

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos correspondientes a la enzima silvestre G6PD y tres variantes de G6PD: A+, Nefza y A-.

Parámetros Cinéticos	G6PD-	Variantes		
	Silvestre	A+	Nefza	A-
$K_m$ G6P ( $\mu\text{M}$ )	38.4±4.1	56.4±5.5	50.4±6.2	33.83±3.5
$K_m$ NADP <sup>+</sup> ( $\mu\text{M}$ )	6.1±1.2	12.9±1.4	16.4±1.6	14.29±2.1
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	233±7.6	114±3.2	126±2.8	35.5±3
$k_{cat} / K_m$ G6P ( $\text{s}^{-1} / \mu\text{M}$ )	5.9±0.6	2.0±0.1	2.4±0.2	1.1±0.1
$k_{cat} / K_m$ NADP <sup>+</sup> ( $\text{s}^{-1} / \mu\text{M}$ )	37.3±3.1	8.7±0.7	7.5±0.6	2.5±0.2

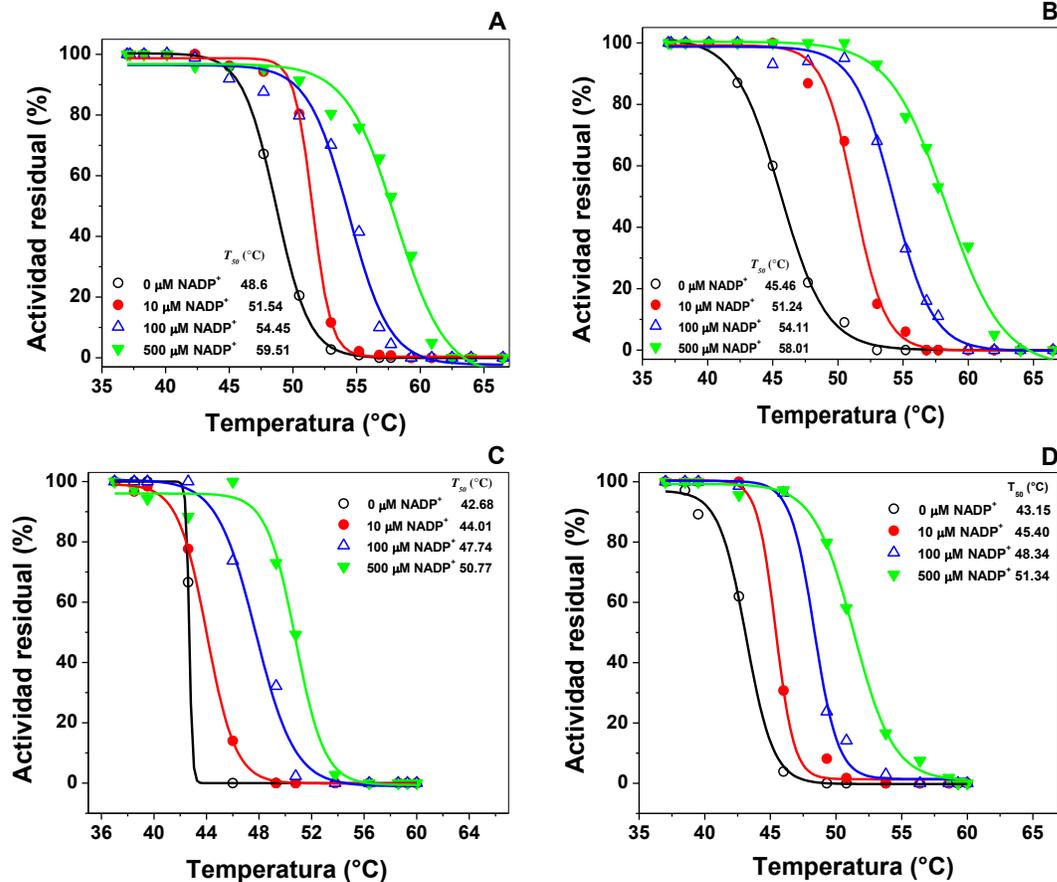
## 4.4 Evaluación de la estabilidad de las proteínas

### 4.4 a) Ensayo de termoinactivación

Los ensayos de inactivación térmica se han usado ampliamente para evaluar el efecto causado por la mutación puntual en la estabilidad del sitio activo de las mutantes de G6PD (Au *et al*, 2000; Kotaka *et al*, 2005 y Wang *et al*, 2008). La estabilidad del sitio activo de la G6PD silvestre y de las tres mutantes patológicos se analizó con diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup>. Se realizaron ensayos de inactivación térmica para las variantes de G6PD recombinantes en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup> y  $T_{50}$  (temperatura a la cual la enzima pierde el 50% de su actividad original después de la incubación durante 20 min) fueron determinadas.

La Figura 14 muestra los valores de  $T_{50}$  para las enzimas G6PD silvestre y las tres mutantes clínicas. En ausencia de NADP<sup>+</sup>, los valores de  $T_{50}$  fueron 48.6 °C y 45.6 °C para las enzimas G6PD silvestre y G6PD A+, respectivamente. Como era de esperarse, las mutantes G6PD Nefza y G6PD A- son las proteínas más termolábiles con valores de  $T_{50}$  de 42.6 °C y 43.1 °C, respectivamente; las cuales representan una disminución aproximadamente de 6 °C con respecto a los obtenidos para la G6PD silvestre (Figura 14A-D).

Además, también se realizaron ensayos de inactivación térmica en presencia de diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup> (0-500 μM) y se observó que en concentraciones crecientes de NADP<sup>+</sup>, los valores de  $T_{50}$  también aumentaron para los tres mutantes clínicas (Figura 14A-D). Independientemente de la localización de estas mutaciones en la estructura tridimensional de la proteína, se observó que los valores de  $T_{50}$  a 500 μM de NADP<sup>+</sup> para todas las enzimas fueron 12 °C más alto en comparación con los valores obtenidos sin NADP<sup>+</sup>. Sin embargo, la doble mutante G6PD A- fue la enzima menos estable porque sólo aumentó 8 °C cuando la concentración de NADP<sup>+</sup> fue incrementada. El hecho de que las mutantes presenten valores menores en la  $T_{50}$  con respecto a la enzima silvestre muestra que las mutaciones sí afecta la estabilidad térmica, lo que provoca una reducción en la catálisis, causando las manifestaciones clínicas que se presentan en los pacientes como una consecuencia directa de este comportamiento.



**Figura. 14.** Ensayos de inactivación térmica de las variantes recombinantes de G6PD en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup> (0μM, 10μM, 100μM y 500μM) (A) G6PD silvestre. (B) G6PD A+. (C) G6PD Nefza. (D) G6PD A-. En todos los ensayos se usaron 200 ng de proteína total. La actividad residual fue expresada como un porcentaje de la actividad de la misma muestra a 37 °C. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### 4.4 b) Estabilidad térmica de las enzimas G6PD humanas recombinantes

Para obtener información sobre los efectos de las mutaciones en la estabilidad global, determinamos los cambios estructurales en las variantes de G6PD en comparación con la enzima nativa mediante el análisis de diroísmo circular (CD) a 222 nm cuando se cambió la temperatura. Cuando la temperatura se incrementa, las proteínas muestran un proceso desnaturalización de dos estados, la temperatura a la que la mitad de la proteína está en estado desnaturalizado se le definió como *T<sub>m</sub>*.

Una proteína que presenta un valor mayor de *T<sub>m</sub>* indica que dicha enzima presenta una mayor resistencia a la desnaturalización por temperatura, que aquella cuyo valor en la *T<sub>m</sub>* es menor. Como se muestra en la Figura 15A, la *T<sub>m</sub>* para la enzima G6PD silvestre es de 59.5 °C. La desnaturalización térmica de las tres variantes clínicas de G6PD fue diferente, y en todos los

casos mostraron una  $T_m$  inferior cuando se comparó con la enzima nativa. La mutación en el aminoácido leucina 323 por prolina que da lugar a G6PD Nefza exhibió un valor de  $T_m$  de 51.7 °C, que representó 7.7 °C menos que el registrado para la enzima G6PD silvestre. La mutación en el aminoácido asparagina 126 por ácido aspártico (G6PD A+) mostró un valor de  $T_m$  de 56.1 °C, que representaba una enzima más estable cuando se compara con la G6PD Nefza. Finalmente es interesante observar que la doble mutante G6PD A- fue la enzima más térmicamente inestable que los dos mutantes sencillas (G6PD A + y Nefza), con un valor de  $T_m$  de 51.2 °C.

Estos resultados indican que las alteraciones en la estabilidad global de la proteína de G6PD se debieron a la presencia de la mutación en el residuo Leu323Pro (G6PD Nefza) y que la mutación en el aminoácido Asn126Asp (G6PD A+) no contribuyó significativamente a las alteraciones en la estabilidad global de la doble mutante G6PD A- (G6PD Nefza más G6PD A+).

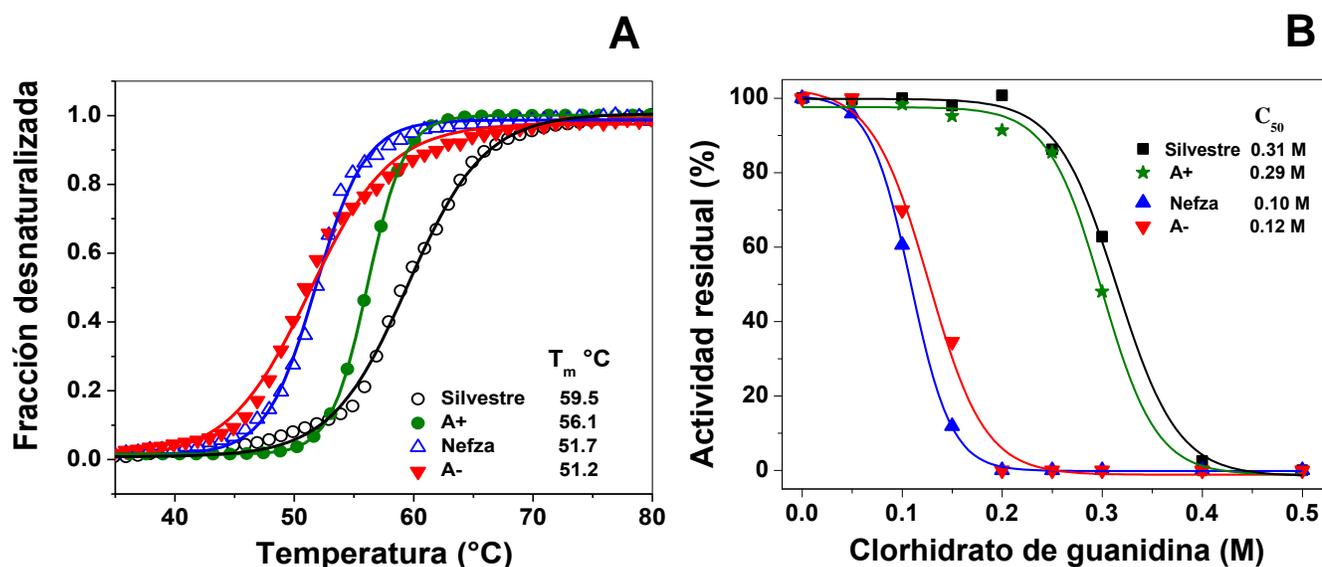
#### ***4.4 c) Estabilidad de las variantes de G6PD en presencia de clorhidrato de guanidina (Gdn- HCl)***

Para evaluar el efecto de las mutaciones en la estabilidad estructural de la enzima recombinante humana G6PD silvestre, se realizaron ensayos de inactivación en presencia o ausencia del clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl), el cual es un agente desnaturizante de proteínas. Este análisis de desnaturalización se ha utilizado para determinar la estabilidad conformacional ya que el agente desnaturizante altera la estructura terciaria de la proteína, por consiguiente, la actividad catalítica es perturbada (Gómez-Manzo *et al.*, 2016).

Como se muestra en la Figura 15B, la actividad residual de la enzima G6PD silvestre y las tres mutantes clínicas disminuyeron cuando la concentración de Gdn-HCl fue incrementada. Los valores de  $C_{1/2}$  (concentraciones de Gdn-HCl a las que las enzimas perdieron el 50% de la actividad original en 2 h a 37 °C) para cada mutante fueron determinadas. Los valores de  $C_{1/2}$  de Gdn-HCl determinados para las mutantes Clase III G6PD A- (Asn126Asp + Leu323Pro), Nefza (Leu323Pro) y A+ (Asn126Asp) fueron de 0.1, 0.12 y 0.2 M, respectivamente. Como era de esperarse, la enzima G6PD silvestre fue la proteína más estable en presencia de Gdn-HCl (0.31 M). Por otra parte, se observó que la mutante sencilla clase III G6PD A+ fue más resistente que la G6PD Nefza y G6PD A-, pero fue más susceptible que la G6PD silvestre. Sin embargo, la mutante sencilla y la doble mutante clase

III G6PD Nefza y A- fueron más susceptibles a Gdn-HCl, ya que perdieron aproximadamente el 100% de su actividad incluso después de incubar con 0.2 M de Gdn-HCl durante 2 h.

Es importante notar que la variante sencilla G6PD Nefza, presenta un comportamiento similar a la enzima G6PD silvestre; ya que la  $C_{1/2}$  de ambas es similar entre ellas. Con estos datos se puede inferir que la variante G6PD A+ por sí misma, no presenta en gran medida pérdida en la estabilidad comparada con la enzima G6PD silvestre; pero cuando la mutación T968C está presente y da origen a la doble mutante G6PD A-, se desnatura tres veces más rápido que la enzima G6PD silvestre. Estos resultados y los otros análisis funcionales descritos anteriormente sugieren que la mutante sencilla G6PD Nefza es probablemente la responsable principal de la pérdida de actividad catalítica y estabilidad estructural en la doble mutante G6PD A- y que las mutantes G6PD Nefza y G6PD A- fueron enzimas menos estables con una estabilidad conformacional disminuida en comparación con la enzima G6PD silvestre.



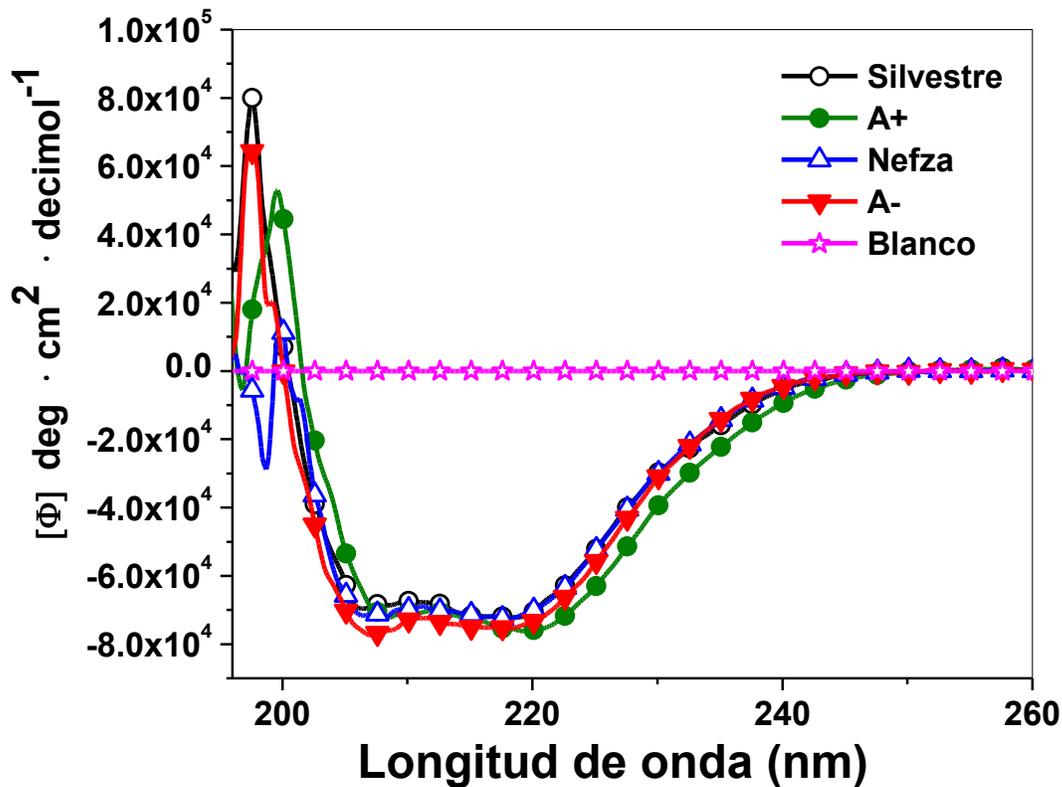
**Figura. 15.** Análisis de la estabilidad de las variantes recombinantes de G6PD. (A) Estabilidad térmica de las variantes de G6PD. Cambios en la señal a 222 nm en el DC fueron monitoreados a medida que la temperatura fue incrementando de 20 °C a 80 °C. (B). Análisis de estabilidad de las variantes de G6PD en presencia de clorhidrato de guanidina (Gdn- HCl). Todas las enzimas fueron incubadas a 0.2 mg/mL en amortiguador  $K_2HPO_4$  25 mM, pH 7.35 en presencia de la concentración indicada de Gdn-HCl por 2 horas a 37 °C y subsecuentemente la actividad residual fue medida. La actividad residual fue expresada como un porcentaje de la actividad para la misma muestra a 25 °C sin Gdn- HCl. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

## **4.5 Caracterización espectroscópica**

### **4.5 a) Análisis de las G6PD por Dicroísmo Circular (DC)**

Para determinar si la disminución en el rendimiento de la purificación, la disminución de la eficiencia catalítica y la inestabilidad estructural de todas las variantes enzimáticas se debieron a la alteración de la estructura secundaria de estas enzimas, se evaluó el efecto de estas mutaciones mediante análisis de dicroísmo circular (DC) en la región ultravioleta (190-260 nm).

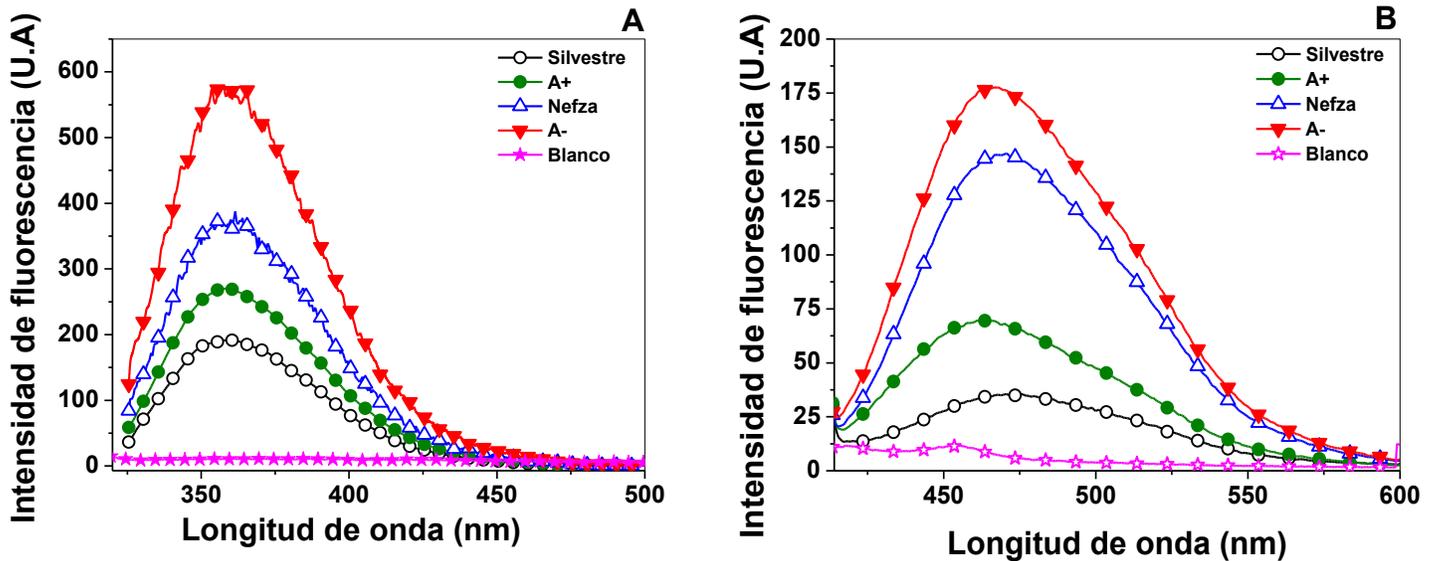
Como se muestra en la Figura 16, las estructuras secundarias de la G6PD silvestre y las tres mutantes de la proteína en la región UV lejana muestran picos de absorción mínimos a 208 y 220 nm, lo cual es consistente con la estructura  $\alpha$ - $\beta$  de la proteína (Au *et al.*, 2000). Tanto las dos mutantes sencillas G6PD A+ (Asn126Asp) y G6PD Nefza (Leu323Pro) y la doble mutante G6PD A- (Asn126Asp + Leu323Pro) muestran el mismo patrón de intensidad de espectros DC con respecto a la G6PD silvestre, lo que indica que las mutaciones no causan una alteración de la estructura secundaria de la enzima. La alteración de la actividad catalítica observada en la doble mutante G6PD A- (Asn125Asp + Leu323Pro) no se debe a alteraciones en la estructura secundaria de la proteína, pero probablemente se debe a cambios conformacionales a nivel global de la estructura tridimensional de la proteína.



**Figura 16.** Caracterización estructural de enzimas recombinantes de G6PD humana. Espectros de dicroísmo circular (DC) en la región UV lejana de las variantes de G6PD humana recombinantes. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los errores estándar fueron menores al 4%.

**4.5 b) Análisis estructural por fluorescencia intrínseca y 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS).**

Para evaluar si la pérdida de actividad tenía una correlación con la interrupción de la estabilidad estructural de la proteína, se evaluó la fluorescencia intrínseca y el análisis de 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS) de las tres variantes clínicas. Como se muestra en la Figura 17A, los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca para todas las variantes mostraron un aumento con respecto a la G6PD silvestre. La intensidad de fluorescencia intrínseca para G6PD A+ (Asn126Asp) se incrementó 1.6 veces en comparación con la enzima G6PD silvestre, mientras que la intensidad de fluorescencia para la clase III G6PD Nefza (Leu323Pro) y para la doble mutante G6PD A- (Asn126Asp + Leu323Pro) se incrementó tres y cinco veces con respecto a la G6PD silvestre. Este aumento en la intensidad de fluorescencia intrínseca sugirió modificaciones en el microambiente de los residuos de triptófano de un ambiente hidrofóbico a un medio hidrófilo en la estructura tridimensional de esta proteína.



**Figura 17.** Espectro de emisión de fluorescencia de las variantes de G6PD. **(A).** Espectro de fluorescencia intrínseca de la enzima silvestre humana G6PD y tres variantes G6PD A+, Nefza y A- en ausencia de NADP<sup>+</sup>. **(B).** Ensayos de fluorescencia extrínseca a través del fluoróforo ANS de la enzima silvestre y las tres variantes de G6P en ausencia de NADP<sup>+</sup>. Los valores obtenidos del amortiguador con ANS fueron sustraídos de los valores con proteína (estrellas color rosa). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Por último, para corroborar si los cambios observados en la desnaturalización térmica, la actividad residual y la fluorescencia intrínseca de las mutantes sencillas G6PD A+, G6PD Nefza y la doble mutante G6PD A- se debieron a alteraciones en la estabilidad global de la proteína, se realizaron ensayos de unión a ANS, el cual ha sido ampliamente utilizado para controlar los cambios conformacionales en las proteínas (Boonyuen *et al.*, 2017; Gómez-Manzo *et al.*, 2017). La unión de ANS a la proteína produce un aumento en la intensidad de fluorescencia y se considera como una sonda adecuada para monitorizar los cambios en los sitios hidrófobos enterrados y las interacciones electrostáticas de los residuos de proteína. Los resultados indican que el espectro de emisión de fluorescencia con ANS es 1.8 veces mayor para la doble mutante G6PD A- con respecto a la G6PD silvestre (Figura 17B); mientras que las mutantes sencillas G6PD A+ y G6PD Nefza mostraron un aumento de 1.2 y 1.4 veces de intensidad de fluorescencia respecto a la enzima G6PD silvestre.

Las alteraciones en el aumento de la intensidad de fluorescencia intrínseca y los ensayos de fluorescencia con ANS de las tres mutantes clínicas de G6PD (A+, Nefza y A-) indican que las mutaciones provocaron cambios conformacionales en la estructura tridimensional de las proteínas y que el ANS tenía acceso a sitios hidrofóbicos dentro de las variantes enzimáticas de G6PD.

## 5. Discusión

Se han realizado diversos estudios hematológicos a pacientes con diferentes episodios de anemia hemolítica en distintas regiones del mundo, donde se ha detectado que la G6PD es causante de diferentes manifestaciones clínicas: desde hemólisis aguda ocasional provocada por ingesta de alimentos o medicamentos, hasta el caso más grave de anemia hemolítica crónica no esferocítica. Si bien, no en todos los casos es provocado por la deficiencia de G6PD, la alta prevalencia de este padecimiento a nivel mundial (4.9%) hace que sea la segunda enzimopatía más recurrente a nivel mundial. Esta enfermedad no es provocada por una sola variante de G6PD, ya que se han descrito a nivel mundial 217 variantes originadas por mutaciones, las cuales, provocan cambios de aminoácidos en la cadena polipeptídica (Gómez-Manzo *et al.*, 2016a).

De la totalidad de variantes descritas apenas el 9% se ha caracterizado estructural y funcionalmente, aun cuando la deficiencia de la G6PD presenta una alta prevalencia. Dado lo anterior, es necesario revisar a cada variante en un medio *in vitro*, debido a que en la sangre hay una cantidad no establecida de eritrocitos nuevos y viejos. Estudiar las variantes de G6PD en un sistema *in vitro* permite dilucidar las características bioquímicas y estructurales propias de cada variante enzimática, obteniendo un panorama más amplio de las consecuencias que cada variante provoca en el metabolismo de las personas que presentan la deficiencia.

Es por eso que, en este estudio se construyeron, caracterizaron funcional y estructuralmente dos mutantes sencillas de G6PD: A+ (Asn126Asp), Nefza (Leu323Pro) y una doble mutante: G6PD A- (Asn126Asp + Leu323Pro), presentes en la población mexicana. Todas agrupadas en la Clase III con un nivel de actividad residual del 10-60% (WHO, 1989).

La construcción de las tres variantes comenzó generando la mutagénesis sitio dirigida en un vector de expresión pET-3a-*G6PD* aplicando la técnica de fragmentos sobrelapados (Figura 10) La correcta mutación de cada variante fue verificada a través de electroferogramas que muestran el sitio correcto de la mutación (Figura 10B-C). Las construcciones resultantes fueron utilizados para transformar células de expresión competentes *E. coli* BL21(DE3) $\Delta_{zwf}::kan^r$ . A fin de obtener la mayor cantidad de proteína posible, se realizaron curvas de expresión variando la cantidad de IPTG y tiempo de exposición al inductor a 25 °C.

Para obtener la mejor condición de expresión se determinó la actividad específica de cada condición y se observó que los valores de cada variante demuestran que aunque las mutaciones se localicen en diferentes regiones de la proteína, afectan la actividad específica de estas mutantes que fueron menores del 50% comparada con la enzima silvestre. Estos resultados están en concordancia con lo previamente reportado por Gómez-Manzo *et al.* (2014, 2015, 2016b) para la variante Clase III: Mexico City, variantes Clase II: Valladolid, Vanua- Lava, Santa María y variantes Clase I: Durham, Zacatecas y Yucatán.

Durante el análisis de la purificación de las proteínas, se obtuvo un grado de pureza alrededor del 96% (Figura 12), similar al obtenido por Wang *et al.* (2006), Huang *et al.* (2008) y Gómez-Manzo *et al.* (2014), cuando se purificaron las variantes de G6PD Wisconsin, Nashville, Plymouth, Mahidol, Yucatán, Nashville, Valladolid y Mexico City por los mismos pasos.

Como se observó, el rendimiento de purificación de la Clase III G6PD A+ fue muy similar al obtenido para la enzima G6PD silvestre; mientras que para la Clase III G6PD Nefza y G6PD A-, el rendimiento fue mucho menor (Tabla 5). A pesar de que estas mutaciones han sido reportadas como variantes de Clase III y el uso de condiciones óptimas para la expresión, las actividades específicas en el extracto crudo y los rendimientos de purificación entre ellas fueron diferentes. Los resultados sugieren que, aunque las mutaciones se localizaron en diferentes regiones de la estructura tridimensional y estaban alejadas del sitio activo o de la región del NADP<sup>+</sup> estructural, todas mostraron un efecto negativo sobre la expresión de G6PD. Este efecto podría estar relacionado con la baja de estabilidad de las proteínas mutantes afectando la actividad catalítica de la enzima.

Dentro de la caracterización funcional de las variantes de G6PD se observó que la disminución enzimática detectadas en las tres mutantes clínicas estuvieron de acuerdo con la severidad de las manifestaciones clínicas, donde la variante natural Clase III G6PD Nefza mostró antecedentes de anemia hemolítica debido al consumo de habas; mientras que en la doble mutante Clase III G6PD A- se reportó con episodios de hemólisis por infecciones, medicamentos o alimentos también han sido reportados (Adil *et al.*, 2012). Aunque la doble mutante G6PD A- ha sido clasificado como una mutante de Clase III de acuerdo con los parámetros hematológicos de los pacientes, la variante G6PD recombinante mostró una

pérdida de catálisis similar a los valores previos obtenidos para mutantes de clase I (Zacatecas, Durham, Nashville, Volendam y Andalus), que fue cerca del 75% con respecto a la G6PD silvestre (Boonuyen *et al.*, 2017; Gómez-Manzo *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2005) Sin embargo, estas mutantes de Clase I están relacionados con manifestaciones clínicas severas como CNSHA o con antecedentes de ictericia neonatal y crisis hemolítica como es el caso de la G6PD Zacatecas.

Estos datos confirman que la pérdida en la catálisis, junto a la baja afinidad para ambos sustratos fisiológicos, tienen un efecto en la fisiología de las células que están expuestas al estrés oxidativo por el metabolismo innato o agentes externos; pues al tener comprometido el principal proveedor que amortigua dicho estrés, se desencadena una serie de afecciones en las células que conllevan a las manifestaciones clínicas características de cada variante.

Dentro de la caracterización funcional de las proteínas se realizaron ensayos de termoinactivación (en presencia y ausencia de  $\text{NADP}^+$ ) para estudiar la estabilidad de las proteínas y concebir el impacto de las mutaciones en la actividad de la G6PD. El efecto protector del  $\text{NADP}^+$  no fue el mismo para todas las proteínas, siendo la variante A+ la que presentó valores similares al de la enzima silvestre cuando se compara la  $T_{50}$  en ausencia y presencia de  $\text{NADP}^+$ , reteniendo aproximadamente el 60% de la actividad residual (Figura 14). En cambio la variante Nefza y la doble mutante G6PD A- mantuvieron valores similares, siendo las variantes más termosensibles a la pérdida de actividad residual frente a la temperatura, con retenciones del 35 y 25% respectivamente. Es de hacerse notar que la variante sencilla G6PD A+ no pierde actividad residual considerablemente a comparación con la enzima G6PD silvestre, pero cuando se presenta otra mutación (Nefza) para dar origen a la doble mutante la actividad residual cae aún en un rango de temperatura muy corto; por lo que se infiere que el efecto de la mutación de G6PD Nefza sobre la variante G6PD A+ es aditivo. Es interesante notar que la estabilización dependiente de  $\text{NADP}^+$  observada en las tres variantes clínicas estudiadas en este trabajo fueron concordantes con el efecto protector de  $\text{NADP}^+$  que también se ha observado en las mutantes de G6PD Yucatán (Gómez-Manzo *et al.*, 2014), Mahidol (Huang *et al.*, 2008), Andalus (Wang *et al.*, 2005), Plymouth (Huang *et al.*, 2008) y Viangchan (Boonyuen *et al.*, 2016; Gómez-Manzo *et al.*, 2016b), a pesar de que estas mutaciones no se localizan cerca del sitio activo o del sitio de unión estructural de  $\text{NADP}^+$  en la enzima G6PD nativa. Las mutantes analizadas en este estudio mostraron el

efecto protector de  $\text{NADP}^+$ , que funciona como un estabilizador durante los ensayos de inactivación térmica. La enzima G6PD silvestre fue más estable que las variantes implicadas en este estudio, lo que indica que las mutantes sencillas de G6PD A+, Nefza y la mutante doble de G6PD A- fueron estructuralmente inestables en comparación con la enzima G6PD silvestre.

Otro ensayo para realizar la evaluación de las proteínas, fue determinando la estabilidad de las mutantes de G6PD en presencia de Gdn-HCl como agente desnaturizante (Gómez-Manzo *et al.*, 2016b; Verma *et al.*, 2016).

La proteína más estable en presencia de guanidina fue la enzima silvestre (Figura 15B), con un valor de  $C_{1/2}$  de 0.31 M; el cual está en concordancia con lo previamente reportado por Gómez-Manzo *et al.* (2016b) y Boonyuen *et al.* (2017). La mutante sencilla G6PD A+ mostró un comportamiento similar al de la enzima silvestre; mientras que para las mutantes G6PD Nefza y G6PD A- se observó que la pérdida de la actividad catalítica producto de la desnaturización se da a concentraciones muy bajas de guanidina (0.10 y 0.12 M, respectivamente), comportándose con valores de  $C_{1/2}$  similares a la mutante Clase I G6PD Zacatecas (Gómez-Manzo *et al.*, 2016b).

Estos resultados, junto con los otros análisis funcionales descritos anteriormente sugieren que la mutante sencilla G6PD Nefza es probablemente la principal responsable de la pérdida de actividad catalítica y estabilidad estructural en la doble mutante G6PD A- y que las mutantes G6PD Nefza y G6PD A- fueron enzimas poco estables con una disminuida estabilidad conformacional en comparación con la enzima G6PD silvestre.

Después de evaluar funcionalmente las enzimas, fue necesario revisar si las mutaciones cambian la estructura secundaria de la enzima, para lo cual empleando DC, se observó que las mutaciones no afectan la estructura secundaria de las variantes (Figura 16). Este resultado está en concordancia con lo obtenido por las variantes Nashville, Wisconsin (Wang *et al.*, 2006) Phymoun (Huang *et al.*, 2008), Mahidol (Tang *et al.*, 1994), Santa María (Gómez-Manzo *et al.*, 2015), donde las mutaciones en cada variante afecta otro aspecto que causa la deficiencia. La alteración en la actividad catalítica observada en la doble mutante G6PD A- no se debió a alteraciones en la estructura secundaria de la proteína, pero probablemente se

debió a cambios conformacionales a nivel global de la estructura tridimensional de la proteína.

También por DC fue posible seguir la desnaturalización térmica de las variantes (Figura 15A). La proteína más termoestable frente a la desnaturalización por temperatura fue la enzima silvestre ( $T_m$  59.50 °C), la proteína más sensible a la temperatura fue la doble mutante G6PD A-, con una  $T_m$  de 51.28 °C, aproximadamente 8 °C menos que la enzima G6PD silvestre. Este rango de disminución en la  $T_m$  es cercana a lo que se obtuvo para variantes Clase I como Nashville (Wang *et al.*, 2006), Durham (Gómez-Manzo *et al.*, 2015) y para la Clase II, G6PD Viangchan (Gómez-Manzo *et al.*, 2016). Este comportamiento también se puede extrapolar para la variante Nefza, debido a que presentó una disminución de  $T_m$  similar a lo obtenido para la doble mutante G6PD A-.

Nuevamente en éste ensayo se observa que la variante G6PD A+ fue la que presentó un valor de  $T_m$  similar a la enzima G6PD silvestre, lo que confirma que, a nivel estructural la mutación que origina a la variante Nefza (Leu323Pro), desestabiliza la estructura de la doble mutante G6PD A+ y la enzima G6PD silvestre.

Debido a que no se encontraron diferencias a nivel de estructura secundaria, se realizaron ensayos de fluorescencia intrínseca y extrínseca para revisar si las mutaciones tienen un cambio en la estructura terciaria.

Los datos obtenidos de ambos ensayos demuestran que el efecto de las mutaciones en la cadena polipeptídica se da a nivel de estructura terciaria, pues en los dos ensayos se obtuvieron intensidades de fluorescencia mayores que los emitidos por la enzima G6PD silvestre (Figura 19); por lo que las mutaciones exponen sitios hidrofóbicos, por lo tanto, las estructuras tridimensionales de las variantes de G6PD A+, Nefza y A- se encuentran en un estado parcial desplegado, que provoca todos los cambios funcionales respecto a la enzima silvestre, y por lo tanto las manifestaciones clínicas con las que se correlacionan. Variantes Clase II como Valladolid y Mexico City (Gómez-Manzo *et al.*, 2014); así como variantes Clase I G6PD Nashville (Wang *et al.*, 2006) y Durham (Gómez-Manzo *et al.*, 2015) que también mostraron una tendencia a aumentar el valor de fluorescencia intrínseca. Sin embargo las variantes G6PD Nefza y A- aumentan la intensidad de fluorescencia hasta cuatro veces respecto a la enzima G6PD silvestre.

En el caso de A+, ambos experimentos demuestran que la mutación que causa esta variante sólo conlleva un pequeño incremento de la fluorescencia si se compara con la variante G6PD Nefza y la doble mutante G6PD A-. Estos experimentos confirman que la mutación de la variante G6PD Nefza tiene un efecto aditivo cuando se combina con la variante G6PD A+, desestabilizando la estructura terciaria de la doble mutante G6PD A-, lo que conlleva al bajo desempeño visto en los ensayos funcionales, lo que en principio mantiene una relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

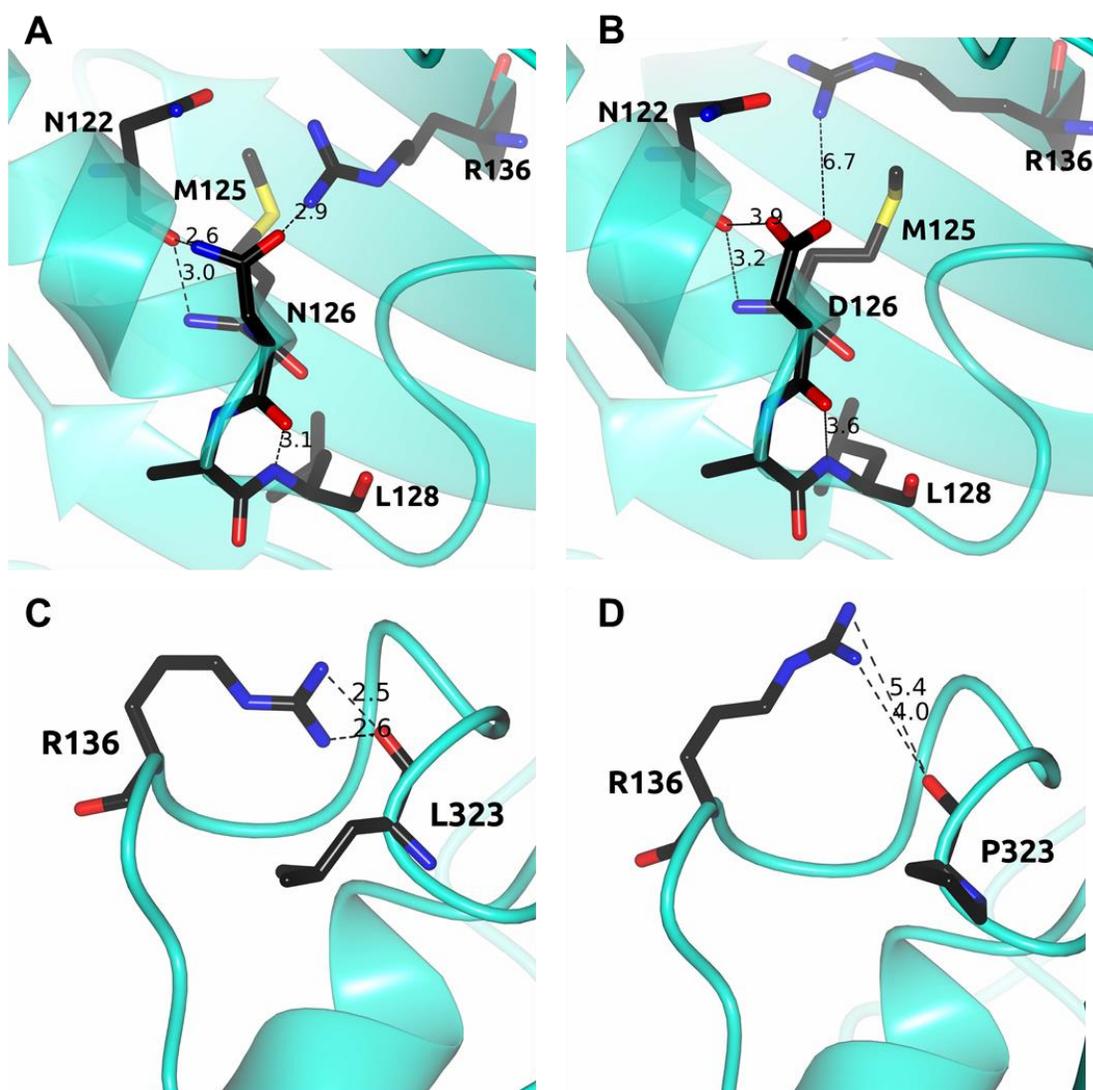
Finamente, para conocer como las mutaciones causan un cambio en la estructura de las variantes G6PD A+, Nefza y A-, se realizaron modelados computacionales para observar estos cambios. Los modelados han sido utilizados para entender la afectación de las mutaciones en las variantes G6PD Fukaya y Campinas (Wang y Engel, 2009); así como analizar si las mutaciones se encuentran cerca del NADP<sup>+</sup> estructural (Gómez-Manzo *et al.*, 2015).

El modelado para las variantes en este estudio explica, esencialmente, el cambio de aminoácido provocado por la mutación, que conlleva una pérdida de interacciones innatas con otros aminoácidos de la enzima silvestre, lo que desencadena la inestabilidad estructural de cada variante y posteriormente la baja funcionalidad de la enzima.

Se observa una fuerte interacción de 2.9 Å entre el Oxígeno de la cadena lateral de Asn126 con la cadena lateral de Arg136. Una interacción entre el nitrógeno de la cadena lateral de Asn126 y el oxígeno del grupo carbonilo de Asn122. Del mismo modo una interacción entre el oxígeno del grupo funcional carbonilo de Asn126 con el nitrógeno del enlace peptídico de Lys128 y por último, una cuarta interacción entre el oxígeno del grupo carbonilo de Asn122 y el nitrógeno del enlace peptídico de Met125 fueron observados en la enzima G6PD silvestre (Figura 20A).

Para la variante G6PD A+, cuando Asn126 fue reemplazada por Asp126 observamos que todas las interacciones que presentaba el aminoácido Asn126 con los aminoácidos previamente mencionados, se debilitan (incrementa la distancia de la interacción) (Figura 20B) provocando una flexibilización de la zona, lo cual, podría causar que esta variante pierda alrededor del 50% de actividad catalítica, aunque la mutación se encuentre lejos del sitio activo o del sitio de unión estructural del NADP<sup>+</sup>. Sin embargo, se puede afirmar con

los experimentos realizados que la afectación a nivel estructural y funcional no es demasiado grande, debido a su comportamiento cercano a la enzima silvestre que a las otras dos mutantes.



**Figura 18.** Comparación estructural entre la enzima G6PD humana (entrada PDB 2BH9) y los modelos de las variantes clase III A+ y Nefza. (A) Enzima G6PD silvestre. (B) mutación *in silico* Asn126Asp. (C) Enzima G6PD silvestre. (D) mutación *in silico* Leu323Pro. Residuos de aminoácidos son mostrados en cilindros negros. Distancias en Å.

Respecto a la variante Nefza, se observa un impedimento estérico, debido a que la mutación Leu323Pro, causa probablemente un cambio de dirección de la  $\alpha$ -hélice en la que encuentra la mutación. Se observa que la interacción entre el oxígeno de Leu323 con los dos átomos de hidrógeno de Arg330 (Figura 20C) se pierde cuando Leu323 fue mutado a Pro323 (Figura 20D); además de que esta mutación se encuentra cercana a las hojas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, que unen al

NADP<sup>+</sup> estructural y podría causar que estas mismas no se coordinen adecuadamente con este.

La localización de la mutante G6PD Nefza conlleva la pérdida de interacciones y probablemente sea la causa de la pérdida de actividad catalítica de esta variante, así como su baja estabilidad estructural lo cual está soportado por todos los experimentos; ya que a pesar de que no esté relacionado directamente con el sitio catalítico, sitio de unión al NADP<sup>+</sup> estructural ni la zona de interfase del dímero, afecta seriamente la estabilidad global de la proteína causando que, en conjunto con la variante G6PD A+, origine una doble mutante G6PD A- con un efecto aditivo en la estructura y función que desestabiliza dicha variante, ocasionando una manifestación clínica como episodios de hemólisis por infecciones, consumo de alimentos, medicamentos o drogas. A pesar, de que esta mutante sencilla G6PD Nefza se catalogue como una variante Clase III (Zhao *et al.*, 2010), bioquímicamente, la pérdida de actividad catalítica sugeriría incluirla en una clase II. Sin embargo, debido a que el rango de la clasificación para la Clase III es muy grande (10- 60% de actividad residual) se sigue incluyendo en esta clasificación.

La doble mutante G6PD A- presenta parámetros funcionales y estructurales bajos, por lo que se esperaría que dicha variante no se encuentre en gran frecuencia entre la población, sin embargo, se considera una variante polimórfica a nivel mundial (Fonseca *et al.*, 2005), siendo en México la variable más frecuente (Medina *et al.*, 1997), que junto a la variante G6PD Santamaría representan el 82% de la totalidad de la prevalencia en la población mexicana (García-Magallanes *et al.*, 2014a).

## 6. Conclusiones

- La sobreexpresión y purificación de las tres variantes clínicas de G6PD demuestran que las mutaciones afectan la actividad catalítica y el rendimiento en la purificación de las proteínas en comparación con la enzima silvestre.
- Los análisis funcionales de las tres variantes determinaron que presentan valores inferiores respecto a la enzima silvestre, relacionada con la pérdida de actividad catalítica y la estabilidad estructural.
- La evaluación estructural mostró que el cambio en la secuencia de aminoácidos afecta el ordenamiento nativo a nivel de la estructura terciaria, exponiendo más sitios hidrofóbicos respecto a la enzima silvestre.
- Se determinó que existe un efecto aditivo de la variante G6PD Nefza sobre la A+, que causa la baja estabilidad estructural y pérdida en la actividad catalítica de la doble mutante A-.

## 7. Referencias.

- Adil, M., Malahat, B., Cakir, R., Canim, S., Yesilkir, S., Yaman, S., Sefik, E., Nehir, O., Elcicek, S. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: A Method to Detect Primaquine-Induced Hemolysis *in vitro*. In Dehydrogenases; *INTECH*. 2012. 65-90.
- Au, SWN., Gover, S., MS, V., Adams, M. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Struct Fold Des*. 2000. (8): 293–303.
- Bastidas, G., Pérez, H., Vizzi, E. Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa: Características bioquímicas y moleculares. Prevalencia de la Deficiencia. *Archivos de Medicina*. 2015. 15(1): 138-150.
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. En: William, J., *et al*. Hematology. Cap. 58. McGraw-Hill, Inc. USA. 1983. pp. 561-574.
- Beutler, E., Yoshida, A. Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase: a catalog and future prospects. *Medicine*. 1988. (67): 311-334.
- Beutler E, Kuhl W. Linkage between a Pvu II restriction fragment length polymorphism and G6PD A-202A/376G: evidence for a single origin of the common G6PD A- mutation. *Hum Genet*. 1990. 85: 9-11.
- Beutler E, Westwood B, Prchal JT, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L. New glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations from various ethnic groups. *Blood*. 1992 80: 255-256
- Benmansour, I., Moradkhani, K., Moumni, I., Wajcman, H., Hafsia, R., Ghanem, A., Abbés, S., Préhu, C. Two new class III G6PD variants [G6PD Tunis (c.920A>C: p.307Gln>Pro) and G6PD Nefza (c.968T>C: p.323 Leu>Pro)] and overview of the spectrum of mutations in Tunisia. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 2013. (50): 110- 114.
- Bonilla, JF., Sánchez, MC., Chuaire, L. Glucosa- 6- fosfato deshidrogenasa (G6PD). Respuesta de los hematíes y otras células humanas a la disminución en su actividad. *Colombia Médica*. 2007. 38(1): 68- 75
- Boonyuen, U., Chamchoy, K., Swangsri, T., Junkree, T., Day, N., White, N., Imwong, M. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *Int. Jour. Of. Biol. Macr*. 2017. 104. 145- 156.
- Cheng, YS., Tang, TK., Hwang, MJ. Amino acid conservation and clinical severity of human glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *J. Biomed. Sci*. 1999. (6): 106–14.
- Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000.97. 6640–6645.

Eandi, S., García, N., Urtasun, C., Sciuccati, G., Díaz, L., Saviotto, V., Candás, A., Avalos, V., Cervio, C., Bonduel, M., Feliú A. Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Serie de casos clínicos. *Arch Argent Pediatr*. 2011. 109(4): 354-361.

Franzè, A., Ferrante, MI., Fusco, F., Santoro, A., Sanzari, E., Martini, G., Ursini, MV. Molecular anatomy of the human glucose 6-phosphate dehydrogenase core promoter. *FEBS Lett*. 1998. 437: 313–18.

Fonseca, D., Mateus, H., Silva, C., Contreras, N., Restrepo, C. Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Aspectos generales de la eritroenzimopatía más frecuente en el mundo. *Acta Médica Colombiana*. 2005. (30): 56-64.

García-Magallanes, N., Romo-Martínez., Luque-Ortega., F., *et al.* Panorama de la deficiencia de Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenada en México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 2014a. 1(2): 31-40.

García-Magallanes, N., Romo-Martínez, Luque-Ortega, F., Torres-Duarte, M., Arámbula-Meraz, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in northern Mexico and description of a novel mutation. *J. Genet*. 2014b. 93(2).

Greene, L. G6PD deficiency as protection against falciparum malaria: An epidemiologic critique of population and experimental studies. *Yearbook Phys. Anthropol*. 1993. 17(36): 153-160.

Gómez-Manzo, S., Terrón-Hernández, J., De la Mora-De la Mora, I., González-Valdez, A., Marcial-Quino, J., García-Torres, I., Vanoye-Carlo, A., López-Velázquez, G., Hernández-Alcántara, G., Oria-Hernández, J., Reyes-Vivas, H., Enríquez-Flores, S. The stability of G6PD is affected by mutations with different clinical phenotypes. *Int. J. Mol. Sci*. 2014. 15: 21179–21201.

Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Enríquez-Flores, S., De la Mora-De la Mora, I., González-Valdez, A., García-Torres, I., Martínez-Rosas, V., Sierra-Palacios E., Lazcano-Pérez, F., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R. Mutations of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Durham, Santa-Maria and A+ Variants Are Associated with Loss Functional and Structural Stability of the Protein. *Int. J. Mol. Sci*. 2015. 16: 28657–28668.

Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Serrano-Posada, H., Ortega-Cuellar, D., González-Valdez, A., Castillo-Rodríguez, RA., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and analysis of New Mutations around the World. *Int. J. Mol. Sci*. 2016a. 17. 2069.

Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Serrano-Posada, H., González-Valdez, A., Martínez-Rosas, V., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Castillo-Rodríguez, RA., Cuevas-Cruz, M., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R. Functional and biochemical characterization of three recombinant human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase mutants: Zacatecas, Vanua-Lava and Viangchan. *Int. J. Mol. Sci.* 2016b, 17. E787

Gómez-Manzo, S.; Marcial-Quino, J.; Ortega-Cuellar, D., Serrano-Posada, H., González-Valdez, A., Vanoye-Carlo, A., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Castillo-Villanueva, A., Reyes-Vivas, H. Functional and Biochemical Analysis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Variants: Elucidating the Molecular Basis of G6PD Deficiency. *Catalysts.* 2017. 7: 135; 1-17.

Hirono, A. y Beutler, F. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose 6 phosphate dehydrogenase variant A (-). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. 85(11): 3951-3954.

Howes, RE., Battle, KE., Satyagraha, AW., Baird, JK., Hay, SI. G6PD Deficiency: Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. *Adv. Parasitol.* 2013. (81): 133-201.

Huang, Y., Choi, MY., Au, S., Au, D., Lam, VM., Engel PC. 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. *Mol. Genet. Metab.* 2008. 93: 44–53.

Kaplan, M., Bromiker, R., Hammerman, C. Severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus: are these still problems in the third millennium? *Neonatology.* 2011. 100(4): 354-362.

Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., Au S., Lam, VM., Adams, MJ. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Cryst.* 2005. 61(5):495-504.

Lisker, R., Loria, A., Gonzalez, J., Guttman, S., Ruiz, G. Preliminary note on the incidence of abnormal hemoglobulins and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Mexican population. *Rev Fr Etud Clin Biol.* 1962. 7: 76-8.

Luzzatto, L. y Mehta, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. En: Scriver, C., Beaudet, A. *et al*, The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. (8<sup>va</sup> edición). New York. *Mc Graw Hill.* 2001. 4517-4553

Mason, PJ., Bautista, JM., Gilsanz, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood reviews.* 2007. 21(5): 267-83.

Markwell, MA., Haas, SM., Tolbert NE., Bieber, LL. Protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Methods Enzymol.* 1981. 72: 296–303.

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

Mehta, A., Mason, PJ., Vulliamy, T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clin. Haematol.* 2000. 13: 21-38.

Nkhoma, ET., Poole, C., Vannappagari, V., Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta- analysis. *Blood Cells Mol. Dis.* 2009. 42(3): 267-78.

Rowland, P., Basak, AK., Gover, S., Levy, HR., Adams, MJ. The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure.*1994. (2):1073-1087.

Ruwende, C. y Hill, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J. Mol. Med.* 1998. 76 (8): 581-588.

Ramírez-Nava, E.J., Ortega-Cuellar, D., Serrano-Posada, H., González-Valdez A., Vanoye-Carlo, A., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Hernández-Pineda, J., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin- Espinosa, R., Oria-Hernández, J., Reyes-Vivas., Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S. Biochemical Analysis of Two Single Mutants that Give Rise to a Polymorphic G6PD A- Doble Mutant. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18. 2244.

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

Rinaldi, A., Filippi G., Siniscalco, M. Variability of red cell phenotypes between and within individuals in an unbiased sample of 77 certain heterozygotes for G6PD deficiency in Sardinia. *Am. J. Hum. Gen.* 1976. 28 (5): 496-505.

Saunders, MA., Slatkin, M., Garner, C., Hammer, MF., Nachman, MW. The extent of linkage disequilibrium caused by selection on G6PD in humans. *Genetics.* 2005. (171): 1219-1229.

Tang, TK., Yeh, CH., Huang, CS., Huang, MJ. Expression and biochemical characterization of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: A system to analyze normal and mutant enzymes. *Blood.* 1994. 83: 1436–1441.

Vaca, G., Arámbula, A. y Esparza, A. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico: Overall results of a 7-year project. *Blood Cells Mol Dis.* 2002 28:436-444.

Vaca, G., Arámbuaila, A., Monsalvo, A., Medina, C., Nuñez, C., Sandoval, L., López-Guido, B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) mutations in Mexico: Four new G6PD variants. *Blood Cells Mol Dis.* 2003. 31:112-120.

- Verma, A., Chandra, S., Suthar, MK, Doharey, PK., Siddigi, MI., Saxena, JK. NADP<sup>+</sup> binding effects tryptophan accessibility, folding and stability of recombinant B. malayi G6PD. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. 85: 645–654.
- Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2009 pp: 1264.
- Viglietto G., Montanaro V., Calabro V., Vallone, D., D'Urso, M., Persico, MG., Battistuzzi, G. Common glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants from the Italian population: biochemical and molecular characterization. *Ann. Hum. Genet.* 1990. 54: 1-15.
- Vulliamy, TJ., D'Urso, M., Battistuzzi, G., Estrada, M., Foulkes, NS., Martini, G., Calabro, V., Poggi, V., Giordano, R., Town, M. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. (85): 5171-5175.
- Vulliamy, TJ., Othman, A., Town, M., Nathawani, A., Falusi, AG., Mason, PJ., Luzzato, T. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. *Proc Natl Acad Sci.* 1991. 88:8568-8571.
- Wajcman, H., Galactéros, F. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents. *C. R. Biol.* 2004. 327: 711-20.
- Wang, XT., Lam, VMS., Engel, P.C Marked decrease in specific activity contributes to disease phenotype in two human glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants, G6PDUnion and G6PDAndalus. *Hum. Mutat.* 2005. 26: 284–293.
- Wang, XT., Lam, VMS., Engel, PC. Functional properties of two mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase, R393G and R393H, corresponding to the clinical variants G6PDWisconsin and Nashville. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. 1762: 767–774.
- Wang, XT., Engel, P. Clinical mutants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase: Impairment of NADP<sup>+</sup> binding affects both folding and stability. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. 1792: 804–809.
- WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ.* 1986. 64: 601-611.
- Zhao X, Li Z, Zhang X. G6PD-MutDB: a mutation and phenotype database of glucose-6-phosphate (G6PD) deficiency. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2010. (1): 101-9.