



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**INFLUENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE UN
PUENTE SALINO INTERSUBUNIDAD SOBRE LA
ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA GLUCOSA-
6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE
Pseudomonas aeruginosa.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

**PRESENTA:
HERNÁNDEZ ALVA MARIO ISRAEL**

**DIRECTOR:
DR. ROBERTO VELASCO GARCÍA
COMITÉ TUTOR:
DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA
DRA. EDAENA BENITEZ RANGEL
DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO
DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS
MADRID**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE GRÁFICAS	4
ABREVIACIONES	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
ANTECEDENTES.....	10
OBJETIVOS	13
Objetivo General	13
Objetivos particulares.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Diseño y obtención de oligonucleótidos mutagénicos.....	14
Purificación de plásmido p-CALn-zwf	14
Mutagénesis de <i>zwf</i> por PCR	14
Transformación y selección de transformantes de <i>E. coli</i>	15
Confirmación de la mutación	15
Purificación de las mutantes L391E y Y410E	16
Sobreexpresión.....	16
Extracción.....	16
Purificación	17
Determinación de la pureza y la masa molecular de las mutantes, por medio de electroforesis desnaturalizante y no desnaturalizante en geles de poliacrilamida.....	17
Caracterización cinética de las mutantes L391E y Y410E	18
Determinación del cambio estructural ocasionado por la unión del sustrato y de K_d de los complejos enzima-G6P.....	18
Determinación de la estabilidad estructural de ambas proteínas.....	19
Desnaturalización por urea	19
Desnaturalización por exposición al calor	19
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	20
Sobreexpresión preliminar.....	21
Sobreexpresión y purificación	24
Caracterización cinética y determinación de la K_d	29
CONCLUSIONES.....	38
Proyecciones a futuro.....	39

BIBLIOGRAFÍA.....	40
-------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estrategias contra la infección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a múltiples antimicrobianos. Adaptado de Pang et al., 2019.	8
Tabla 2 Nombre y secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos utilizados para crear las variantes L391E y Y410E del gen <i>zfw</i> de <i>P. aeruginosa</i>	14
Tabla 3 Solución de revelación por actividad para gel no desnaturizante 1.....	18
Tabla 4 Solución de revelación por actividad para gel no desnaturizante 2.....	18
Tabla 5 Verificación de los residuos de aminoácidos modificados en las mutantes L391E y Y410E.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 El ciclo EDEMP.....	9
Figura 2 Estructura tetramérica de G6PDH de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con sus ocho puentes salinos remarcados.	11
Figura 3 Acercamiento a la región en donde se ubican los puentes salinos de dimerización en las G6PDHs de <i>Homo sapiens</i> (A) y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (B).	12
Figura 4 Acercamiento a uno de los sitios activos y a la región en donde se pretenden agregar puentes salinos de dimerización en la G6PDHPa.	12
Figura 5 Productos de la amplificación por PCR para mutagenizar el gen <i>zfw</i> inserto en el vector pCALn.....	20
Figura 6 Selección de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS transformadas con el vector pCALn que lleva inserto el gen <i>zfw</i> mutado..	21
Figura 7 . Sobreexpresión de la proteína PaG6PDH recombinante en algunas de las transformantes de <i>E. coli</i>	21
Figura 8 Acercamiento a la zona de mutagénesis accidental.....	24
Figura 9 Perfiles electroforéticos de las proteínas obtenidas en los diferentes pasos de purificación de L391E, Y410E, y la mutante doble Y410E/D232G.	25
Figura 10 Perfiles electroforéticos de proteína (A) y de actividad (B) de la Wt y de las mutantes L391E y Y410E de G6PDHPa purificadas.....	27
Figura 11 . Sitio en donde el residuo Glu391 de una de las subunidades de G6PDHPa, introducido por mutagénesis en G6PDHPa, podría repelerse por carga con Glu420 y Glu35 de la otra subunidad del dímero... ..	28
Figura 12 Sitio en donde se esperaría que el residuo Glu410 de una de las subunidades de G6PDHPa, introducido por mutagénesis sitio-dirigida, formara un puente salino con la Arg398 de la otra subunidad del dímero.	36

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Actividad relativa de G6PDHPa en células de E. coli transformadas con pCALn-zwf L391E (A) y pCALn-zwf Y410E (B).....	22
Gráfica 2 Perfil de elución (A) y espectro de absorción UV-visible (B) de la mutante Y410E purificada desde la colonia 2 transformante.....	27
Gráfica 3 Relación entre la concentración de proteína y la actividad de la mutante Y410E.	29
Gráfica 4 Curvas de saturación para determinar los parámetros cinéticos aparentes de la mutante Y410E de G6PDHPa.....	30
Gráfica 5 Curvas de saturación para determinar los parámetros cinéticos verdaderos de la mutante Y410E de G6PDHPa.....	31
Gráfica 6 Cambios conformacionales de las enzimas Wt y Y410E de G6PDHPa (A y B), provocados por diferentes concentraciones de G6P, y determinación de la Kd de los complejos proteína-G6P (C).	33
Gráfica 7 Cinética de inactivación de las enzimas silvestre y Y410E incubadas a 55 °C en ausencia y presencia de G6P 6.0 mM.	34
Gráfica 8 Actividad de la enzima Y410E incubada durante 24 h con diferente concentración de urea, en ausencia y presencia de G6P 6.0 mM.....	34
Gráfica 9 Curvas de saturación para determinar los parámetros cinéticos verdaderos de la mutante Y410E de G6PDHPa preincubada con G6P.....	37

ABREVIACIONES

ABREVIACIÓN	SIGNIFICADO
ANS	1-anilino-8-naftalenosulfonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
G6PDHs	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Homo Sapiens</i>
G6PDHm	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
G6PDHPa	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HEPES/TMA	Amortiguador de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico con hidróxido de tetrametilamonio
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
LB	Medio de Luria-Bertani
LB _A	Medio de Luria-Bertani con ampicilina
mL	Mililitro
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
WT	G6PDHPa silvestre

RESUMEN

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (G6PDHPa) (EC 1.1.1.363) es una enzima homotetramérica que participa en la vía de las pentosas fosfato del ciclo de EDMP, vía principal en el metabolismo central del carbono de la bacteria. Como nuevas estrategias terapéuticas contra la misma se propone el mencionado metabolismo, donde la G6PDHPa puede figurar como un punto de retroalimentación. Antes de las pruebas clínicas en aras de un tratamiento se debe conocer el funcionamiento de la proteína y los pormenores de su función y estructura. Los puentes salinos figuran como puntos de anclaje, rigidez y estabilidad entre monómeros y dímeros; se sabe que son importantes para el funcionamiento óptimo catalítico. A través de mutagénesis sitio dirigida proponemos la creación de puentes salinos interdiméricos, cambiando los residuos L391 y Y410, por ácido glutámico, con el fin de estudiar la influencia que podría tener la incorporación de algunos puentes salinos en la actividad, flexibilidad estructural y resistencia de esta enzima hacia la desnaturalización. En búsqueda de confirmar la expresión de las mutaciones, los plásmidos resultantes se secuenciaron evidenciando la mutante doble Y410E/D232G no prevista. La mutante L391E se encontró como dímero activo en una manera similar a otras G6PDH y se sugiere un estudio de difracción de rayos X para describir las interacciones que llevan a esta disociación; interinamente se utilizó el programa de predicción de estructuras AlphaFold 2 que muestra una repulsión del residuo cambiado con otros dos en la subunidad contigua, lo que descarta la formación del puente salino planeado. Por otro lado, la mutante Y410E mostró un aumento en la afinidad por el sustrato sin que esto mejorara la estabilidad respecto a la enzima silvestre frente al calor y urea, lo que sugiere que tampoco se logró el puente salino deseado, deducción reafirmada por la predicción llevada a cabo en el mismo programa.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, aerobio, motil con flagelo polar, catalasa y oxidasa positivo. Produce varios pigmentos tales como la picocianina, fluorescina y otros de color similar al óxido (Ryan *et al*, 2004). Se caracteriza por causar enfermedades graves en pacientes inmunocomprometidos, por lo que es uno de los patógenos nosocomiales de mayor distribución y peligrosidad registrados (Kerr y Snelling, 2009). Es capaz de producir biofilmes (Sauer *et al.*, 2002) y comunicarse célula a célula (Van Delden e Iglewski, 1998). Estas características, aunadas a la capacidad de resistencia contra especies reactivas de oxígeno, le permiten causar infecciones severas como otitis externa maligna, endoftalmitis, endocarditis, meningitis, neumonía, septicemia (Bodey *et al.*, 1983) infecciones en vías respiratorias, urinarias, piel, ojos, tejidos blandos y en raras ocasiones endocarditis bacteriana aguda. (Bush y Perez, 2018).

P. aeruginosa requiere de atención especial en el apartado de las infecciones hospitalarias debido a tres factores: a) se presenta en el 13.8% de todas estas infecciones con una incidencia aún más elevada en las áreas de cuidados intensivos, donde se ha reportado con hasta un 22.6% (Kim *et al.*, 2000). b) cuenta con un índice de mortalidad de los 21 días que ronda el 33.9% (Tumbarello *et al.*, 2011) y c) recientemente fue colocada en la Lista global de bacterias resistentes a antibióticos para guiar la investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos (Tacconelli y Magrini, 2017), debido al descubrimiento de cepas con resistencia a múltiples antibióticos, incluido el renombrado carbapenem (Giske *et al*, 2008).

Ante este último factor se han propuesto varias terapias novedosas:

ESTRATEGIA TERAPÉUTICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
INHIBICIÓN DE DETECCIÓN DE QUÓRUM	Prevención o reducción de la formación de biofilme, disminución de la virulencia bacteriana, bajo riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana	Espectro estrecho, efecto involuntario sobre bacterias beneficiosas
INHIBICIÓN DE LECTINA	Alta estabilidad, bajo riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana	Espectro estrecho debido a la expresión de más de un tipo de adhesina por bacterias
QUELACIÓN DE HIERRO	Disponibilidad de medicamentos aprobados por la FDA, administración fácil	Toxicidad

TERAPIA DE BACTERIOFAGOS	Replicación en el lugar de la infección, alta especificidad para atacar las bacterias sin efectos sobre la flora comensal, menos efectos secundarios, actividad bactericida contra bacterias resistentes a los antibióticos, fácil administración, entrega de agentes antimicrobianos a bacterias	Aclaramiento de fago después del tratamiento, impureza de los preparados de fago, mala estabilidad de los preparados de fago y falta de conocimiento sobre la acción del modo de fagos, resistencia bacteriana
ESTRATEGIA VACUNAL	Mejora de la inmunidad del huésped, prevención de infecciones	Baja eficiencia, sin vacuna autorizada
NANOPARTÍCULAS	Alta penetrabilidad en la membrana bacteriana, alteración de la formación de biofilme, múltiples mecanismos antimicrobianos, buenos portadores de antibióticos	Toxicidad
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	Actividad de amplio espectro, cinética de muerte rápida, bajos niveles de resistencia inducida, baja toxicidad para el huésped	Actividad hemolítica para células huésped, reducción de la actividad basada en la sensibilidad a la sal, suero y pH, susceptibilidad a la proteólisis, alto costo de producción
ANDAMIO ELECTROQUÍMICO	Alteración de biofilmes bacterianos, aumento de la penetración de antibióticos	Dificultad en la implantación a ensayos clínicos

Tabla 1 Estrategias contra la infección de Pseudomonas aeruginosa resistente a múltiples antimicrobianos. Adaptado de Pang et al., 2019.

Aún con las nuevas terapias en desarrollo, se ha propuesto un enfoque diferente con un blanco terapéutico nuevo: su metabolismo primario del carbono (Shapiro *et al.*, 2019), conocido por ser particularmente amplio y flexible, y por considerarse un blanco terapéutico cuyo potencial parece aún no haber sido explorado ni explotado con antibióticos de espectro reducido.

Esta bacteria, como todas las del género *Pseudomonas*, carece de la enzima fosfofructocinasa que es clave en la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (VEMP). Debido a esto, *P. aeruginosa* no tiene una VEMP funcional. En ella, el metabolismo de la glucosa se realiza a través de un conjunto de reacciones denominado ciclo EDMP (Figura 1), que fue inicialmente descrito para *P. putida* (Nikel *et al.*, 2015). En éste, se involucran enzimas de VEMP (que operan gluconeogénicamente), enzimas de la vía de las pentosas fosfato (VPP), y una pequeña vía metabólica denominada de Entner-Doudoroff (VED), que canaliza los productos de este ciclo al de Krebs.

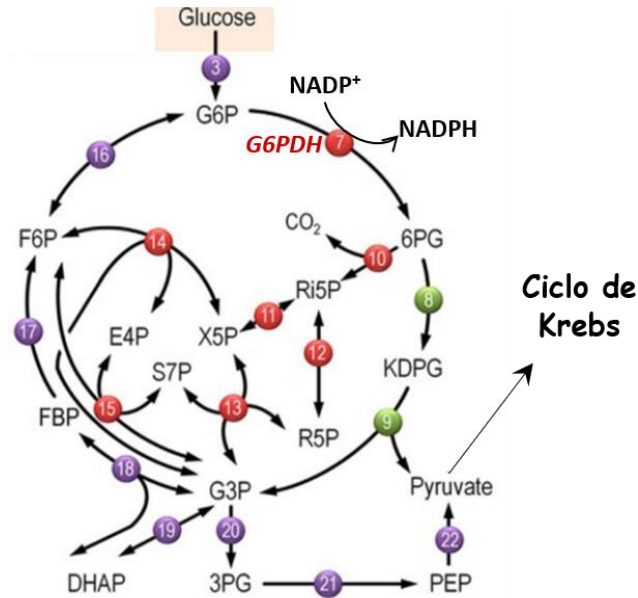


Figura 1 El ciclo EDMP (modificado de Nikel *et al.*, 2015). Las enzimas de VEMP se presentan en color morado, las de VPP en rojo y las de VED en verde.

En este ciclo, la G6PDH (EC 1.1.1.363) (con el número 7 en la Figura 1) se considera de gran importancia para las bacterias del género *Pseudomonas*, debido a que el NADPH que produce les permite enfrentar el estrés oxidativo (Ma *et al.*, 1998), además de ser esencial en múltiples reacciones anabólicas. A pesar del importante papel de esta enzima de *P. aeruginosa* (G6PDHPa), y de que empezó a estudiarse desde hace aproximadamente medio siglo, hasta el año 2018 sólo se habían publicado dos trabajos en los que se le purificó y se determinaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas (Lessie y Neidhardt, 1967; Ma *et al.*, 1998). En otra investigación más reciente, llevada a cabo en el laboratorio en el que se realizó esta tesis, se clonó el gen *zwf* que codifica para G6PDHPa y se purificaron mayores cantidades de la G6PDHPa recombinante (Acero-Navarro *et al.*, 2018); lo anterior permitió iniciar el análisis estructural de esta enzima y profundizar en su caracterización cinética (Benítez-Rangel *et al.*, 2020). La clonación de *zwf*, junto con el modelado estructural y la mutagénesis sitio-específica, han ayudado a identificar algunos residuos importantes para la unión de sustratos, la actividad catalítica y la estabilidad estructural de G6PDHPa. Aprovechando lo anterior, en el trabajo que aquí se presenta se pretendió obtener variantes estructuralmente más estables de esta enzima, a través de la incorporación de residuos que formarían nuevos puentes de hidrógeno entre sus subunidades.

ANTECEDENTES

En el laboratorio de osmorregulación de la Unidad de Morfología y Función, en donde se desarrolló esta investigación, recientemente se clonó el gen que codifica para G6PDHPa y se desarrolló un protocolo que permite purificar cantidades considerables de la proteína recombinante (35 mg/L de cultivo de la bacteria transformante) (Acero-Navarro, *et al.*, 2018). En esta última investigación también se demostró que G6PDHPa es un homotetrámero, que utiliza NAD⁺ y NADP⁺ como coenzimas (con una eficiencia catalítica cinco veces mayor por la última, respecto a la primera), que el ATP la inhibe y que une cooperativamente al sustrato glucosa-6-fosfato (G6P), pero no a las coenzimas.

De manera distinta, la G6PDH de *L. mesenteroides* (G6PDHLm) y la de humano (G6PDHs), que han sido las G6PDH's más estudiadas, poseen un comportamiento hiperbólico con ambos sustratos, pero mientras la primera es dimérica, la segunda existe en un equilibrio dímero-tetrámero que puede afectarse con el pH y la fuerza iónica (Cohen y Rosemeyer, 1969); el incremento en fuerza iónica y pH desplazan el equilibrio hacia el dímero, y la disminución en el pH hacia el tetrámero. La proteína de *L. mesenteroides*, como la de *P. aeruginosa*, posee similar afinidad por NAD⁺ y NADP⁺, mientras que la humana, como la de mamíferos en general, tiene preferencia por el NADP⁺ (Singh *et al.*, 2012).

Otra diferencia que se encontró entre G6PDHPa y G6PDHs, es la forma en que son estabilizadas estructuralmente: mientras que en la primera es el sustrato G6P el que la protege de la inactivación térmica y la desnaturalización por urea (Benitez-Rangel *et al.*, 2019), la enzima humana posee, además del NADP⁺ que utiliza como coenzima en cada subunidad, dos moléculas de NADP⁺ entre las subunidades de cada dímero, que estabilizan al tetrámero (Wang *et al.*, 2009).

En la búsqueda de otros factores estructurales que podrían ser importantes para la actividad y la estabilidad de G6PDHPa, y al no contar todavía con su estructura tridimensional, en el laboratorio donde se estudia esta proteína recientemente se obtuvo el modelo de la Figura 2, a partir de su secuencia de aminoácidos. En él se aprecian dos puentes salinos entre las subunidades de cada dímero, de dimerización, formados por los residuos E180 y K387, y cuatro entre los dímeros, de tetramerización, en los que se involucran los residuos E261 y K264.

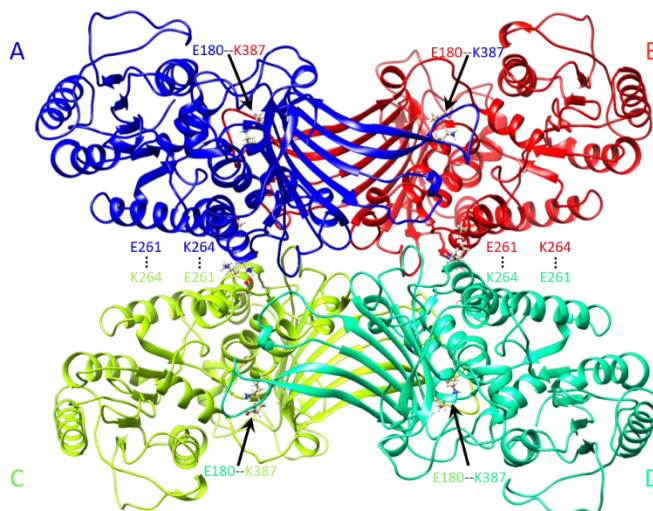


Figura 2 Estructura tetramérica de G6PDH de *Pseudomonas aeruginosa* con sus ocho puentes salinos remarcados.
Renderización realizada con Chimera 1.11.

Basándose en este modelo, y con ayuda de la mutagénesis sitio-específica, se obtuvieron diversas mutantes de G6PDHPa, en las que se modificaron los residuos E180 y E261. Los primeros resultados estructurales y cinéticos obtenidos con estas variantes sugieren que mientras los puentes salinos de tetramerización podrían ser importantes para la estabilidad a la enzima, los de dimerización, podrían involucrarse en el mecanismo cinético de G6PDHPa o en las interacciones alostéricas entre subunidades (datos pendientes de publicación). A pesar de estos resultados, se considera necesario investigar más sobre el papel que podrían jugar este tipo de enlaces en la función de la enzima.

Una comparación entre el modelo de la G6PDHPa y las estructuras ya conocidas de las G6PDHs y G6PDHLm, permite decir que mientras G6PDHPa exhibe solo dos puentes salinos de dimerización, la segunda presenta cuatro (Au *et al.*, 2000) y la tercera seis (Rowland *et al.*, 1994) (ver Figura3). Con la finalidad de investigar si el mayor número de puentes salinos de dimerización en estas dos últimas enzimas se relaciona con sus características cinéticas y de estabilidad estructural, decidimos crear las variantes L391E y Y410E de G6PDHPa, con el fin de crear, en cada una, un nuevo puente entre dímeros: cuatro en total por tetrámero.

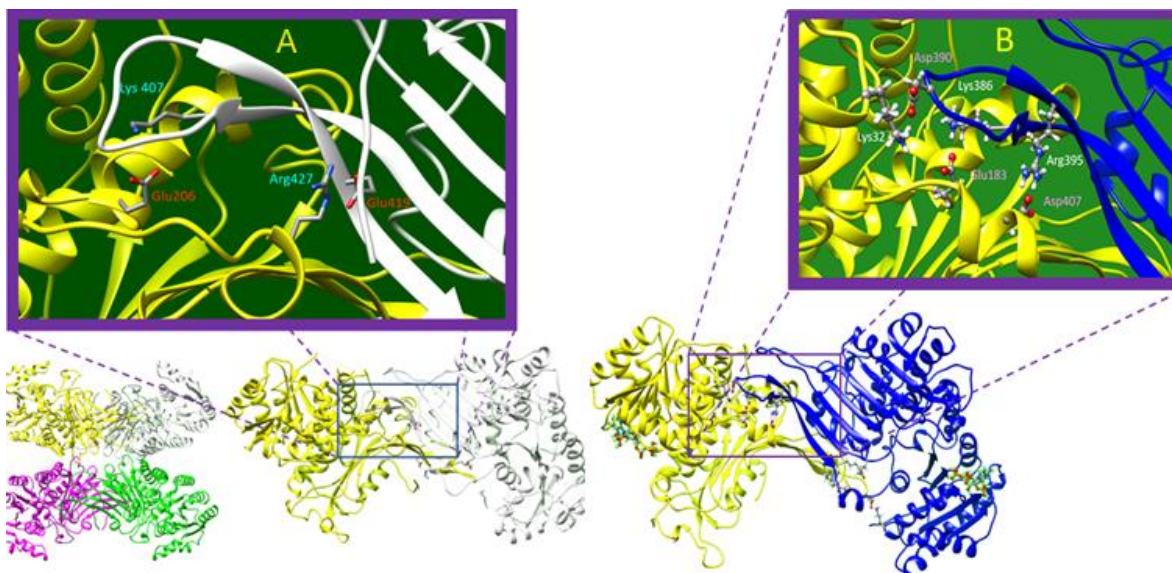


Figura 3 Acercamiento a la región en donde se ubican los puentes salinos de dimerización en las G6PDHs de Homo sapiens (A) y Leuconostoc mesenteroides (B). Renderización realizada con Chimera 1.11.

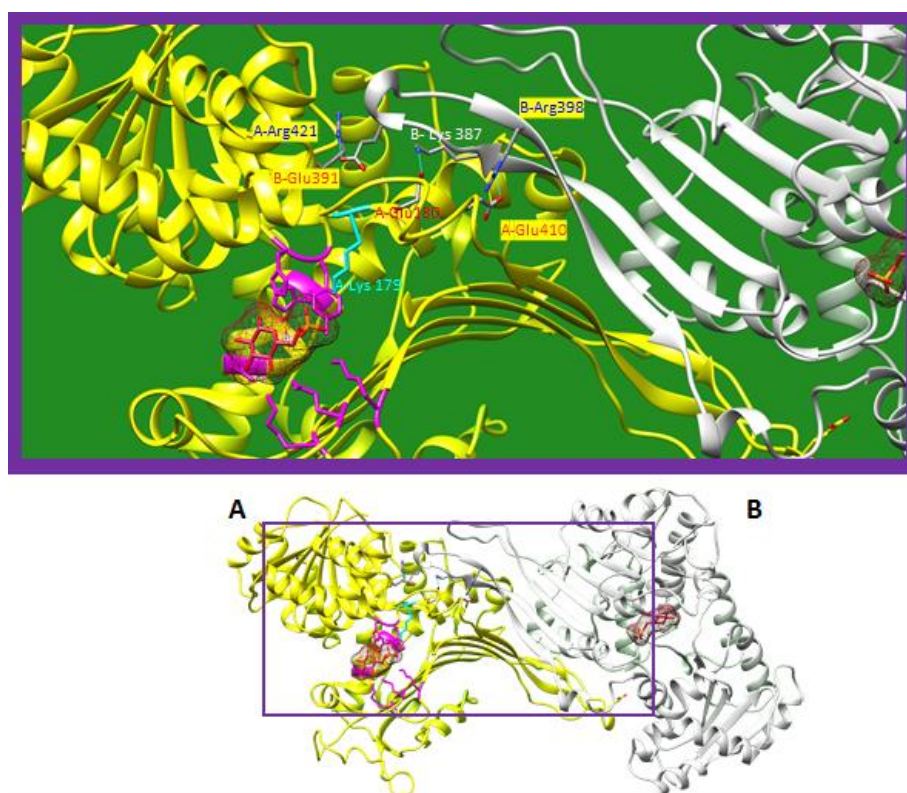


Figura 4 Acercamiento a uno de los sitios activos y a la región en donde se pretenden agregar puentes salinos de dimerización en la G6PDHPa. En color fucsia los residuos que interactúan con G6P, y en azul turquesa la Lys esencial K179. Contigua a este último se presenta E180, que forma el puente salino natural con K387 en la enzima silvestre. Con letras rojas y en recuadro amarillo los residuos que se pretende introducir para generar nuevos puentes. Renderización realizada con Chimera 1.11.

OBJETIVOS

Objetivo General

Investigar si la sustitución de los residuos leucina 391 y tirosina 410 por ácido glutámico puede generar puentes salinos entre subunidades del tetrámero y estudiar los cambios en la actividad y estabilidad estructural de la enzima G6PDHPa.

Objetivos particulares

- a) Diseñar y obtener las variantes L391E y Y410E de la enzima G6PDHPa.
- b) Purificar ambas proteínas.
- c) Caracterizarlas cinéticamente.
- d) Determinar su estabilidad estructural ante diferentes factores inactivantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y obtención de oligonucleótidos mutagénicos.

La secuencia del gen *zwf* que codifica para la G6PDHPa fue obtenida desde el sitio <http://www.pseudomonas.com/feature/show/?id=109179&view=sequence>. A partir de ésta se diseñaron los siguientes oligonucleótidos en la plataforma de Agilent (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>), cuya posterior síntesis estuvo a cargo de la empresa Integrated DNA Technologies (IDT).

NOMBRE	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO
L391EFOR	5'- CTTGCCCTCGCCCTGGTCCTTGGTCATC
L391EREV	5'- CCAGGGCGAGGGCAAGGGCATGCAATTG
Y410EFOR	5'- CCGCGTGCTCGGTCTCGGAAAACTC
Y410EREV	5'- GAGACCGAGCACGCGGCGCGGATTC

Tabla 2 Nombre y secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos utilizados para crear las variantes L391E y Y410E del gen *zwf* de *P. aeruginosa*

Purificación de plásmido p-CALn-zwf

El plásmido pCALn-zwf, que lleva inserto el gen *zwf* que codifica para G6PDHPa, fue purificado desde una cepa de *E. coli* previamente transformada con este vector (Acero-Navarro *et al.*, 2018), utilizando el AxyPrep Plasmid Midiprep Kit, de Axygen Biosciences y siguiendo las instrucciones del proveedor. La pureza y concentración del plásmido obtenido se determinó espectrofotométricamente, calculando la relación entre sus absorbancias a 260 y 280 nm y considerando que 1.0 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración aproximada de ADN de 50µg/mL. La presencia, pureza y tamaño del plásmido se confirmaron en un transiluminador con luz UV, después de separarse por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Mutagénesis de *zwf* por PCR

Las mutaciones en *zwf* se obtuvieron amplificándolo por PCR desde el vector pCALn-zwf. Para ello se utilizaron los pares de oligonucleótidos arriba descritos y la enzima Platinum SuperFi DNA Polymerase de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las condiciones de reacción de la PCR incluyeron 30 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 98°C, 30 seg de alineamiento a 64°C, 3.5 min de extensión a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. La reacción se inició agregando la polimerasa en la fase de desnaturalización del primer ciclo, para evitar la actuación de la enzima en la

temperatura donde trabaja de manera subóptima. Al término de la PCR los amplificadores fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, para cerciorarse de su pureza y de que poseyeran el tamaño esperado (aproximadamente 7.3 kb).

Transformación y selección de transformantes de *E. coli*

Se prepararon células competentes de la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* sometidas a un tratamiento con CaCl_2 100 mM, para después almacenarlas en alícuotas de 200 μL a -72°C , en presencia de 85 mM de CaCl_2 y 15% de glicerol. Para el procedimiento de transformación, tubos con células competentes fueron transferidos de -72°C a un baño de hielo, para agregar a cada uno 10 μL de cada uno de los amplificadores obtenidos durante la reacción de PCR. Después de 30 min de incubación en hielo, los tubos se trasladaron a una temperatura de 42°C durante 1 minuto, para luego regresarlos al hielo. Pasados 2 min se agregaron a cada tubo 500 μL de LB y se incubaron durante 60 min a 37°C con agitación. La selección de las células transformadas se realizó esparciendo 150 μL de cada tubo sobre la superficie de placas de LB_A , e incubando éstas a 37°C durante 20 h. En cada caso se utilizaron controles negativos sin antibiótico.

Habiendo obtenido colonias resistentes al antibiótico ampicilina, y con los plásmidos que en teoría llevarían las mutaciones deseadas en *zwf*, se cultivaron de manera independiente, en placas de LB_A , nueve colonias de cada una de las transformantes K391E y Y410E. Cuatro de ellas, escogidas al azar, fueron posteriormente crecidas en 3 mL de medio LB_A líquido para sobreexpresar las variantes de G6PDHPa. La sobreexpresión de las proteínas fue verificada a través de un incremento en su concentración, por SDS PAGE ((Laemmli, 1970), y en la actividad de G6PDH. Ésta última fue determinada por espectrofotometría a 30°C , siguiendo la aparición de NADPH a 340 nm y utilizando una mezcla de reacción estándar que contenía en 500 μL : G6P 2.0 mM, NADP^+ 0.5 mM, MgCl_2 5.0 mM y HEPES/TMA 50 mM, pH 8.0.

Confirmación de la mutación

Las colonias 8 y 9 de L391E, y 2 y 8 de Y410E fueron cultivadas en medio LB_A líquido para después purificar su plásmido pCALn-*zwf*, como se describió párrafos arriba. El gen *zwf* de estos plásmidos fue luego secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para corroborar la presencia de las mutaciones deseadas.

Purificación de las mutantes L391E y Y410E

Confirmadas las mutaciones, las proteínas de la colonia 9 de L391E, y de la 2 y 8 de Y410, fueron sobreexpresadas y purificadas utilizando el siguiente protocolo de Acero-Navarro y colaboradores (Acero-Navarro *et al.*, 2018)

Sobreexpresión

- Un matraz de 250 mL que conteniendo 80 mL de medio LB_A fue inoculado con una asada de la colonia seleccionada, para después incubarlo durante toda la noche en baño orbital a 37° C y 150 rpm.
- Al día siguiente se tomaron alícuotas de 22.5 mL del cultivo anterior para transferirlas a tres matraces de 2 L con 800 mL de medio LB_A. La turbidez de los cultivos fue monitoreada midiendo su absorbancia a 600 nm. Cuando cada cultivo alcanzó 0.5 uAbs, se les agregó 1.0 mL de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 80 mM, para después incubarlos por 46 h a una temperatura de 26°C y con una agitación de 150 rpm.

Extracción

- Las células fueron cosechadas centrifugando los 2400 mL del medio a 3,000xg durante 30 minutos, para después resuspender las pastillas en 300 mL de amortiguador de homogenización, que contenía Tris-HCl 50 mM, Tritón 0.5% y fenil-metil-sulfonil-fluoruro 0.2 mM, pH 7.8.
- Las células fueron rotas sonicando a 70 W por 1 minuto, manteniendo baja la temperatura con un baño de hielo.
- Se centrifugó a 10,000 g por 30 minutos a 4°C.
- Al sobrenadante se le añadió MgCl₂ para que la concentración final de éste fuese 20 mM, manteniéndosele durante 10 minutos en agitación con mosca magnética y en un baño de hielo.
- Se centrifugó el digerido a 10,000 g por 30 minutos a 4°C.
- Se resuspendieron las pastillas en 200 mL de amortiguador de limpieza que contenía Tris-HCl 50 mM, Tritón 0.5% y KCl 150 mM, pH 7.8.
- Se agregaron 300 unidades de trombina al resuspendido y se digirió en agitación magnética por 15 horas a 22°C.
- Se centrifugó el digerido a 8,000 rpm por 30 minutos a 4°C.

Purificación

- El sobrenadante del digerido se hizo pasar por una columna de la resina Q-Fast Sefarosa (50 mL), previamente equilibrada con seis volúmenes del amortiguador de equilibrio, que contenía HEPES/TMA 50 mM, EDTA 5 mM, KCl 150 mM y glicerol 5%, pH 8.0.
- Unida la proteína a la resina, ésta se lavó con otros seis volúmenes de amortiguador de equilibrio.
- Se eluyó la proteína de la columna con un gradiente continuo de 250 a 700 mM de KCl. La fracción del eluido que contenía la proteína fue seleccionada siguiendo su absorbancia a 280 nm.
- La proteína eluida fue concentrada en filtros Amicon Ultra-15, con un corte de 100 kDa, centrifugando a 3,500 rpm durante 25 minutos y a 4°C.
- Posteriormente la proteína fue desalada haciéndola pasar por columnas de Sephadex G-25 (Penefsky, 1977), previamente equilibradas con amortiguador Hepes/TMA 100mM, pH 7.0. La concentración de la proteína eluida se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm, considerando que el coeficiente de absorción molar de G6PDHPa es de $84,340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculado desde su secuencia de aminoácidos con un método previamente descrito (Gill y vonHippel, 1989).
- La enzima purificada y desalada fue luego diluida con el mismo amortiguador Hepes/TMA 100mM, pH 7.0, hasta una concentración de 1.8 mg/mL, para después almacenarla a 4 °C hasta su uso. Para los experimentos de estabilidad y actividad se diluyó de la misma manera hasta una concentración de 150 µg/mL.

Determinación de la pureza y la masa molecular de las mutantes, por medio de electroforesis desnaturizante y no desnaturizante en geles de poliacrilamida.

El grado de purificación logrado en las diferentes etapas del proceso de aislamiento de las proteínas, así como la masa molecular del monómero que las forma, fueron evidenciados separándolas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), utilizando un gel separador al 9%, según el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970), y tiñéndolas con azul de Coomassie R-250. Las proteínas purificadas también fueron separadas en dos geles de poliacrilamida al 6%, de un sistema de electroforesis no desnaturizante de una dimensión, utilizando un amortiguador de glicina 50 mM, pH 9.0 (Gallagher, 2001), para conocer el grado de purificación y la estructura cuaternaria de las

mutantes (dímero, tetrámero, etc.). En el primero de los geles las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie R-250, mientras que en el segundo solo se revelaron aquellas que poseen actividad de G6PDH dependiente de NADP⁺. Esto último se logró incubando el gel durante 5 min con la siguiente solución 1, y mezclando después la solución 2 con la primera. La reacción de tinción fue detenida retirando la mezcla de tinción del gel y lavando éste en repetidas ocasiones con agua destilada.

SOLUCIÓN 1

AGUA	9.2 mL
HEPES/TMA 400 Mm, pH 8	7.5 mL
GLUCOSA-6-FOSFATO 20 mM	3 mL
ACETATO DE MAGNESIO 1.0 M	0.3 mL

Tabla 3 Solución de revelación por actividad para gel no desnaturizante 1.

SOLUCIÓN 2

AGUA	9.7 mL
NADP⁺ 30 mM	0.3 mL
NITROAZUL DE TETRAZOLIO	20 mg
METOSULFATO DE FENAZINA	2 mg

Tabla 4 Solución de revelación por actividad para gel no desnaturizante 2.

Caracterización cinética de las mutantes L391E y Y410E

La caracterización cinética de las mutantes se realizó por espectrofotometría, siguiendo la aparición de NADPH a 340 nm y utilizando las condiciones y concentraciones de sustratos descritos en el trabajo ya mencionado (Acero-Navarro *et al.*, 2018).

Determinación del cambio estructural ocasionado por la unión del sustrato y de *K_d* de los complejos enzima-G6P.

Utilizando el ANS como fluoróforo afín a las zonas hidrofóbicas parcialmente expuestas de las proteínas (Guliyeva y Gasymov, 2020) se midió la fluorescencia inicial de este compuesto (10 mM) en presencia de 400 µg/mL de las mutantes Y410E y Y410E/D232E. Posteriormente se agregaron diferentes concentraciones de G6P para medir los cambios conformacionales que éstas provocan en la enzima y determinar la *K_d* de los complejos mutante-G6P.

Determinación de la estabilidad estructural de ambas proteínas

Para conocer si los cambios promovidos en los residuos L391 y Y410 afectan la estabilidad estructural de G6PDHPa, las mutantes purificadas fueron sometidas a incrementos en la temperatura y a desnaturalización con urea, en ausencia y presencia de 6.0 mM del sustrato G6P, que se sabe estabiliza la estructura de la enzima (Benítez-Rangel *et al.*, 2020). Para modificar la proteína con el sustrato, se le preincubó durante 24 horas a 4 °C y con la concentración de G6P mencionada. Después de los tratamientos con calor o con urea, la actividad residual de las enzimas fue medida en las condiciones y concentraciones de sustratos descritos en el estudio referido.

Desnaturalización por urea

- Se expuso la proteína (preincubada sin y con G6P) a diferentes concentraciones de urea donde se reposó por 24 horas a temperatura ambiente para alcanzar el equilibrio químico.

Desnaturalización por exposición al calor

- Se expuso la proteína (sin y con G6P) a diferentes temperaturas. Una vez que se determinó la temperatura crítica de desnaturalización se expuso a ella por diferentes lapsos.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se planteó como primer objetivo obtener las mutantes L391E y Y410E, para aumentar de dos a cuatro el número de puentes salinos que existen entre los monómeros de cada dímero que forman el tetrámero de G6PDHPa. La mutagénesis se realizó amplificando por PCR el gen *zwf* que codifica para esta enzima, y que anteriormente fuera clonado en el vector pCALn (Acero-Navarro *et al.*, 2018). Los productos obtenidos, utilizando oligonucleótidos mutagénicos para lograr las mutaciones deseadas (ver Materiales y Métodos), se muestran en la figura 5, y en la que se observa que los amplificados tienen el tamaño esperado, de aproximadamente 7300 pb (5,800 de pCALn más 1,500 de *zwf*).

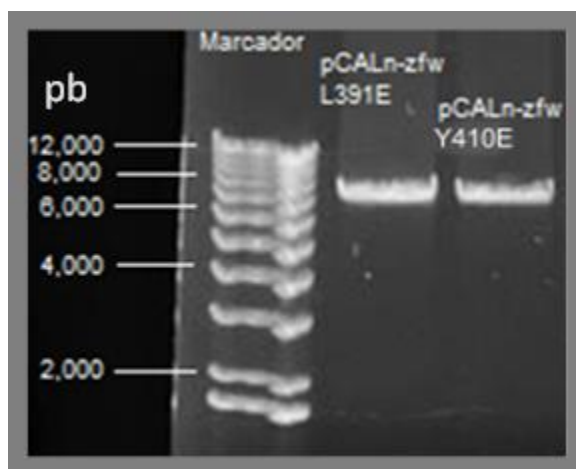


Figura 5 Productos de la amplificación por PCR para mutagenizar el gen *zwf* inserto en el vector pCALn. Gel de agarosa al 1% en el que se separaron electroforéticamente el marcador de tamaño 1 Kb Plus DNA Ladder, de invitrogen (primer carril), y los amplificados obtenidos por PCR con los oligonucleótidos mutagénicos L391E y Y410E (carriles 2 y 3, respectivamente). pb= pares de bases.

Confirmada la amplificación del plásmido pCALn con el gen *zwf* inserto, células competentes de la bacteria *E. coli* fueron transformadas con él por medio de un choque térmico de 42 °C. Las transformantes fueron luego seleccionadas con el uso de medio LB_A selectivo, ya que el vector pCALn contiene un gen que les confiere resistencia a la ampicilina (Figura 6). Posteriormente, nueve colonias de cada transformante fueron crecidas en placas de LB_A y almacenadas en refrigeración para su uso posterior.

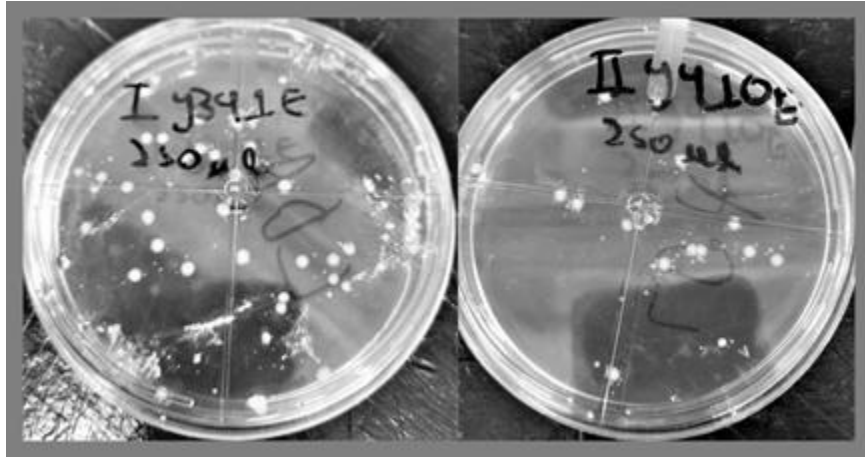


Figura 6 Selección de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con el vector pCALn que lleva inserto el gen *zwf* mutado. Placas de LBA con células transformadas con pCALn-*zwf* L391E (izquierda) y pCALn-*zwf* Y410E (derecha).

Sobreexpresión preliminar

Las bacterias de cuatro colonias de cada transformante (1, 2, 8 y 9) fueron crecidas por separado en 3.0 mL de LB_A líquido, para después tratar de inducir en ellas, con el compuesto IPTG (100 μM), la sobreexpresión de las enzimas recombinantes.

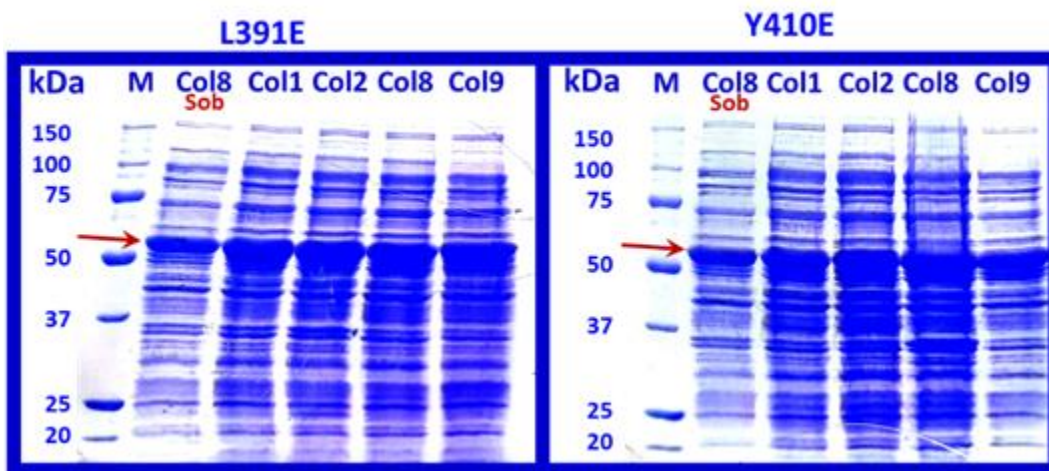
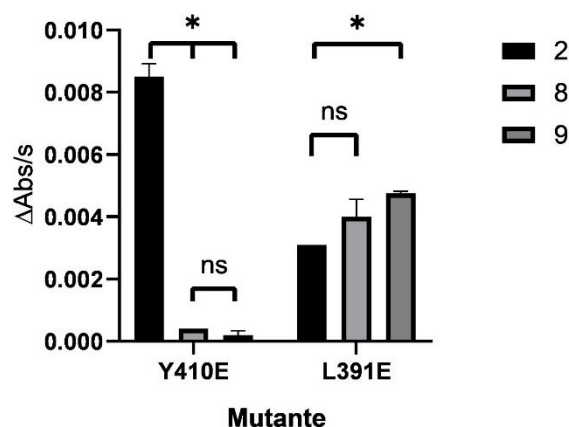


Figura 7 Sobreexpresión de la proteína PaG6PDH recombinante en algunas de las transformantes de *E. coli*. Geles de poliacrilamida al 9%, con SDS, en los que se separaron electroforéticamente las proteínas marcadoras de masa molecular (M) (cuya masa se indica a la izquierda en miles de Da (kDa)); las proteínas solubles de la colonia 8 (Col8 sob), y las del extracto celular de las colonias 1, 2, 8 y 9, transformadas con pCALn-*zwf* L391E (gel de la izquierda) o con pCALn-*zwf* Y410E (gel de la derecha). Las flechas señalan las proteínas sobreexpresadas, con una masa molecular superior a 50 kDa

Para verificar la sobreexpresión de las proteínas, las células fueron cosechadas por centrifugación, resuspendidas en amortiguador de muestra de Laemmli (Laemmli, 1970), y sometidas a ebullición en baño maría durante 8 min. Después de esto las proteínas totales de las bacterias de las cuatro colonias, así como las solubles de la 8 únicamente, fueron separadas por SDS-PAGE en los geles de la Figura 7. En estos se observa que todas las bacterias de cada transformante sobreexpresaron una proteína con una masa molecular aproximada de 56 kDa, que correspondería al monómero de G6PDHPa. De las cuatro que sobreexpresaron una proteína con masa molecular similar a la esperada para G6PDHPa, se seleccionaron al azar la 2, 8 y 9 de cada transformante, para medir su actividad de esta enzima. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la gráfica 1.



Gráfica 1 Actividad relativa de G6PDHPa en células de *E. coli* transformadas con pCALn-zwf L391E (A) y pCALn-zwf Y410E (B). La actividad de la enzima G6PDH fue determinada mezclando 5 μ L del extracto celular de las transformantes que se indican, con 495 μ L de la mezcla de reacción estándar descrita en Materiales y Métodos, y siguiendo el cambio de absorbancia (aparición de NADPH) a una longitud de onda de 340 nm.

Como se observa, las actividades de G6PDHPa de las tres colonias de la mutante L391E son similares, sin embargo, la colonia 2 de Y410E presenta una sustancial diferencia respecto a la actividad de las otras dos. Para saber si esto es debido a algún cambio distinto a la mutación deseada, se secuenció el gen *zwf* de las colonias 8 y 9 de L391E, y el de 2 y 8 de Y410E. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 5, en la que se comparan las regiones con cambios en las secuencias de aminoácidos de estas cuatro proteínas, respecto a la de la Wt de esta enzima.

A) PROTEÍNAS SECUENCIADAS DE LA MUTANTE Y410E

PROTEÍNA SILVESTRE	1	MPDVRVLPCT	LALFGALGDL	ALRKLFPALY	QLDRENLLHR	DTRVLALARD
	51	EGAPAEHLAT	LEQRLRLAVP	AKEWDDVVWQ	RFRERLDYLS	MDFLDPQAYV
	101	GLREAVDEL	PLVAYFATPA	SVFGGICENL	AAAGLAERTR	VVLEKPIGHD
	151	LESSREVNEA	VARFFPESRI	YRIDHYLGKE	TVQNLIARF	ANSLFETQWN
	201	QNHISHVEIT	VAEKVGIEGR	WGYFDQAGQL	R D MVQNHLQ	LLCLIAMDPP
	251	SDLSADSIRD	EKVKVLRAL	PIPAEQLASR	VVRGQYTAGF	SDGKAVPGYL
	301	EEEHANRSD	AETFVALRVD	IRNWRWSGVP	FYLRTGKRM	QKLSQIVIH
	351	KEPPHYIFAP	EQRSLISNRL	IIRLQPDEGI	SLQVMTKDQ	L GKGMQLRTG
	401	PLQLSFSET	Y HAARIPDAYE	RLLEVTQGN	QYLFVRKDEV	EFAWKWCDQL
	451	IAGWERLSEA	PKYPAGSWG	PVASVALVAR	DGRSWYGDF	
Y410E COLONIA 2	401	PLQLSFSET	E HAARIPDAYE	RLLEVTQGN	QYLFVRKDEV	EFAWKWCDQL
Y410E COLONIA 8	201	QNHISHVEIT	VAEKVGIEGR	WGYFDQAGQL	R D MVQNHLQ	LLCLIAMDPP
	401	PLQLSFSET	E HAARIPDAYE	RLLEVTQGN	QYLFVRKDEV	EFAWKWCDQL

B) PROTEÍNAS SECUENCIADAS DE LA MUTANTE L391E

PROTEÍNA SILVESTRE	1	MPDVRVLPCT	LALFGALGDL	ALRKLFPALY	QLDRENLLHR	DTRVLALARD
	51	EGAPAEHLAT	LEQRLRLAVP	AKEWDDVVWQ	RFRERLDYLS	MDFLDPQAYV
	101	GLREAVDEL	PLVAYFATPA	SVFGGICENL	AAAGLAERTR	VVLEKPIGHD
	151	LESSREVNEA	VARFFPESRI	YRIDHYLGKE	TVQNLIARF	ANSLFETQWN
	201	QNHISHVEIT	VAEKVGIEGR	WGYFDQAGQL	R D MVQNHLQ	LLCLIAMDPP
	251	SDLSADSIRD	EKVKVLRAL	PIPAEQLASR	VVRGQYTAGF	SDGKAVPGYL
	301	EEEHANRSD	AETFVALRVD	IRNWRWSGVP	FYLRTGKRM	QKLSQIVIH
	351	KEPPHYIFAP	EQRSLISNRL	IIRLQPDEGI	SLQVMTKDQ	L GKGMQLRTG
	401	PLQLSFSET	Y HAARIPDAYE	RLLEVTQGN	QYLFVRKDEV	EFAWKWCDQL
	451	IAGWERLSEA	PKYPAGSWG	PVASVALVAR	DGRSWYGDF	
L391E COLONIA 8	351	KEPPHYIFAP	EQRSLISNRL	IIRLQPDEGI	SLQVMTKDQ	E GKGMQLRTG
L391E COLONIA 9	351	KEPPHYIFAP	EQRSLISNRL	IIRLQPDEGI	SLQVMTKDQ	E GKGMQLRTG

Tabla 5 Verificación de los residuos de aminoácidos modificados en las mutantes L391E y Y410E. Se compara la secuencia aminoacídica de G6PDHPa silvestre, con la región en donde se encontraron cambios (en rojo y enaltecidos en amarillo) en las secuencias de las recombinantes de las colonias 8 y 9 de L391E (A) y 2 y 8 de Y410E (B).

Como se observa en esta figura, las proteínas de las colonias 8 y 9 de la mutante L391E son idénticas y presentan la modificación deseada, correspondiendo con la similitud en la actividad de G6PDH presentada en la tabla 8A. Por lo anterior se decidió continuar con el estudio de la proteína de la colonia 9 de esta mutante.

Por el otro lado, la proteína expresada por la colonia 2 de la mutante Y410E fue la única con la modificación deseada y activa. La enzima de la colonia 8, que presentó nula actividad, reveló una mutación adicional en el residuo 232, que originalmente pertenecía a un residuo polar positivo de ácido aspártico y cambió a glicina, que es la expresión mínima de un aminoácido, corto y no polar. Gracias a las renderizaciones llevadas a cabo en el programa Chimera 1.4, se observó que D232 interactúa en el sitio activo con el hidroxilo del carbono 3 del sustrato G6P (Figura 8). La nula actividad presentada por D232G sugiere que este aspártico es esencial para la unión del sustrato, y por ende para la función de la enzima.

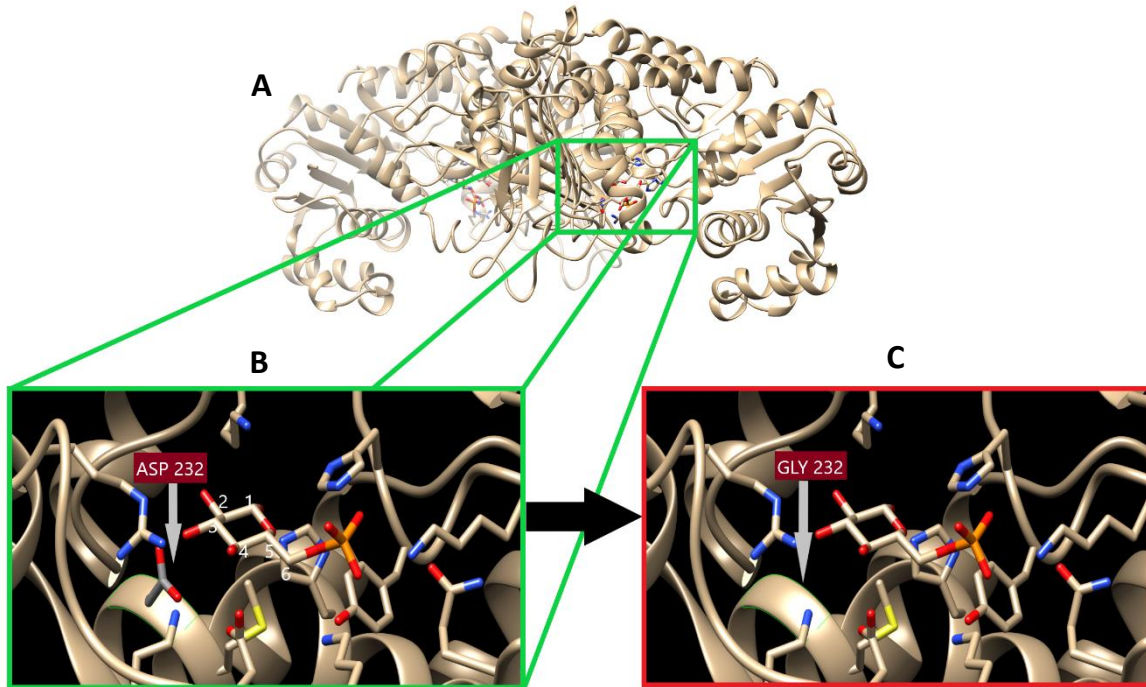


Figura 8 Acercamiento a la zona de mutagénesis accidental. **A.** Dímero de G6PDH de *Pseudomonas aeruginosa*. **B.** Sitio activo de G6PDHPa con énfasis en el residuo original D232. **C.** Sitio activo de G6PDHPa con énfasis en el residuo 232, ahora modificado a glicina. Modelo generado a partir de la estructura tridimensional de la G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*.

A pesar de los resultados obtenidos con esta mutante doble Y410E/D232G inactiva, se decidió purificarla, junto con las de las colonias 9 y 2 de L391E y Y410E, respectivamente.

Sobreexpresión y purificación

Los gels de la Figura 9 muestran los patrones proteicos obtenidos en las diferentes fases del proceso de purificación de las mutantes seleccionadas.

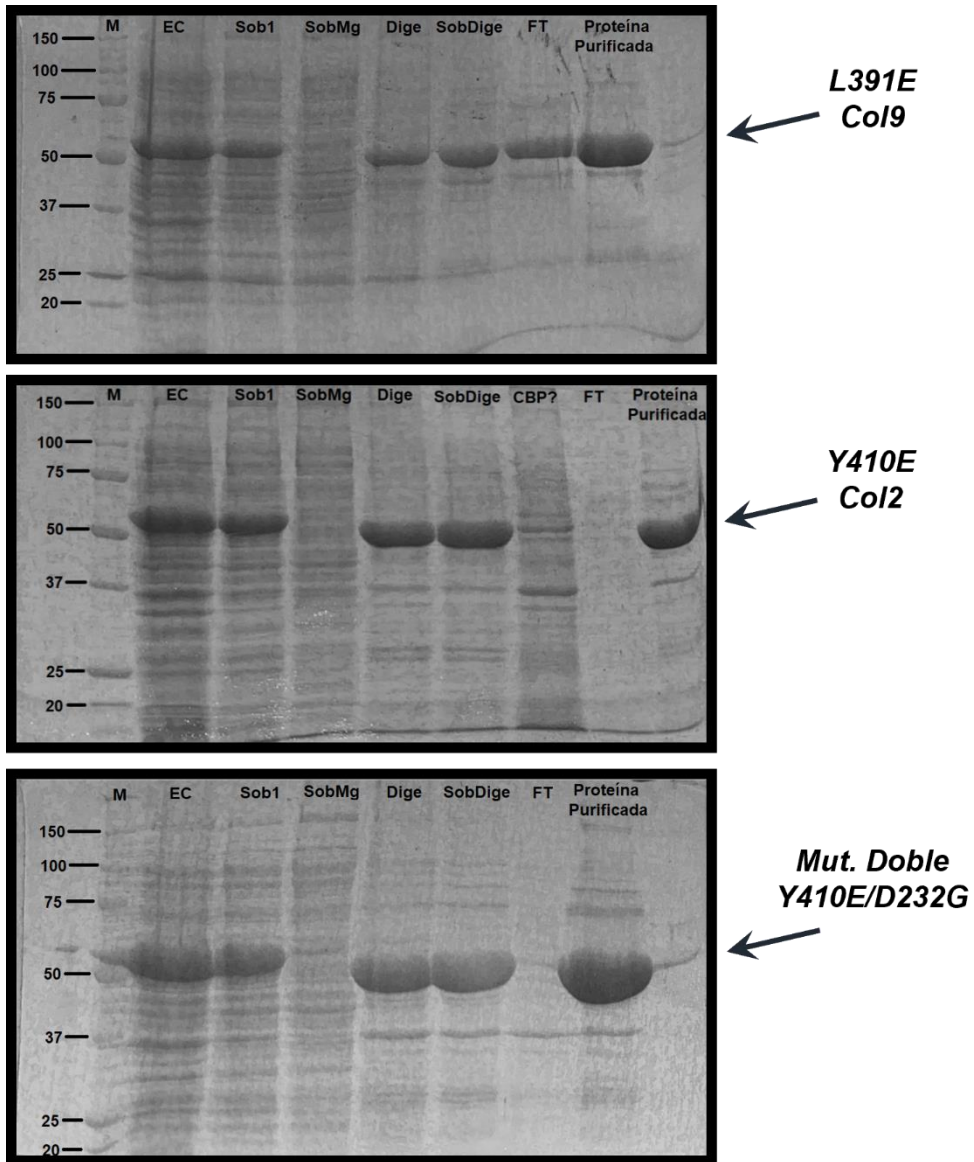


Figura 9 Perfiles electroforéticos de las proteínas obtenidas en los diferentes pasos de purificación de L391E, Y410E, y la mutante doble Y410E/D232G. Las proteínas obtenidas en cada paso de la purificación fueron separadas por SDS-PAGE (geles al 9%) y teñidas con azul de Coomassie. M, proteínas marcadoras cuya masa se indica a la izquierda, en miles de Da (kDa); EC, extracto crudo; Sob1, sobrenadante obtenido al centrifugar EC; SobMg, sobrenadante obtenido después de precipitar la proteína con acetato de magnesio; Dige, proteína obtenida después de liberarla del CBP con trombina; SobDige y CBP?, sobrenadante y precipitado obtenidos después de centrifugar el digerido con trombina; FT, Flow through o proteína que no se une a la resina Q-fast sefarosa.

De la figura 9 podemos resaltar lo siguiente: 1) que existe una considerable expresión de las enzimas recombinantes (EC); 2) que las tres enzimas permanecen solubles después de centrifugar el extracto celular (Sob1); 3) que la precipitación con $MgCl_2$ 20 mM es un paso esencial para separar un gran número de proteínas contaminantes (SobMg); 4) que la remoción del CBP de las tres recombinantes (con 27 residuos y 4 kDa), por acción de la trombina, queda demostrada al disminuir la masa molecular de éstas (Dige); 5) que dicha

remoción mantiene solubles las proteínas de nuestro interés (SobDige); 6) y por último, que en el último carril de los tres geles, además de la proteína de interés, la mayoritaria, hay otras contaminantes, sugiriendo que no se logra una purificación a homogeneidad. Sobre este punto cabe decir que, al igual que para estas mutantes, la enzima Wt se purifica con estas aparentes impurezas. Sin embargo, a través de un análisis por cromatografía de exclusión molecular y con MALDI-TOF ha quedado demostrado la alta pureza que se logra para esta enzima con el método utilizado (ver figuras suplementarias en Acero-Navarro et al., 2018). Aunado a lo anterior, los resultados de la Figura 10 y 11 apoyan lo antes dicho: las mutantes purificadas y eluidas de la resina de intercambio iónico en un pico como el de la gráfica 2 A (mostrado aquí solo para la mutante Y410E), tienen actividad de G6PDHPa y no presentan una evidente contaminación por otra proteína (geles sin SDS de la figura 10).

La figura 10 también muestra que, en este sistema de geles nativos, la mutante Y410E de la colonia 2 se presenta, como se ha evidenciado para la *silvestre* (Acero-Navarro et al., 2018), predominantemente activa como tetrámero, y en menor grado como octámero. La doble mutante (Y410E/D252G), en cambio, como ya se mencionó, presenta baja o nula actividad. La enzima L391E, por su parte, que eluyó de la resina Q-Fast Sefarosa en dos picos próximos (F1 y F2), se manifiesta predominantemente como dímero activo; una estructura que hasta ahora no se conocía para G6PDHPa. Este último resultado es diferente a lo que se esperaba cuando se diseñaron las mutantes para este estudio, en las que se pretendía introducir otro par de puentes salinos entre los monómeros de cada dímero, para estabilizar el tetrámero. En el caso de la mutante L391E se pretendía formar un puente entre este nuevo glutámico de una de las subunidades, con la R421 de la otra que forma el dímero (ver *figura 4*). Al respecto debe mencionarse que el diseño de estas mutaciones, y los oligonucleótidos para lograrlas, se realizaron basándose en un modelo estructural de G6PDHPa obtenido en la plataforma de Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>), meses antes de que se publicara en la revista Nature el lanzamiento del programa AlphaFold 2 (Jumper et al., 2021). Este último programa, realiza predicciones de la estructura de proteínas con una precisión mayor a la de cualquier otro conocido hasta ahora. Utilizándolo, recientemente obtuvimos otro modelo de la G6PDHPa, que se muestra en la Figura 14, en el que se observa que el glutámico E391, incorporado por mutagénesis, no forma el puente salino que se había predicho con el otro modelo, pero sí podría estar causando una repulsión con los residuos E35 y E420 de la otra subunidad, y ser la causa de la disociación del tetrámero en dímeros.

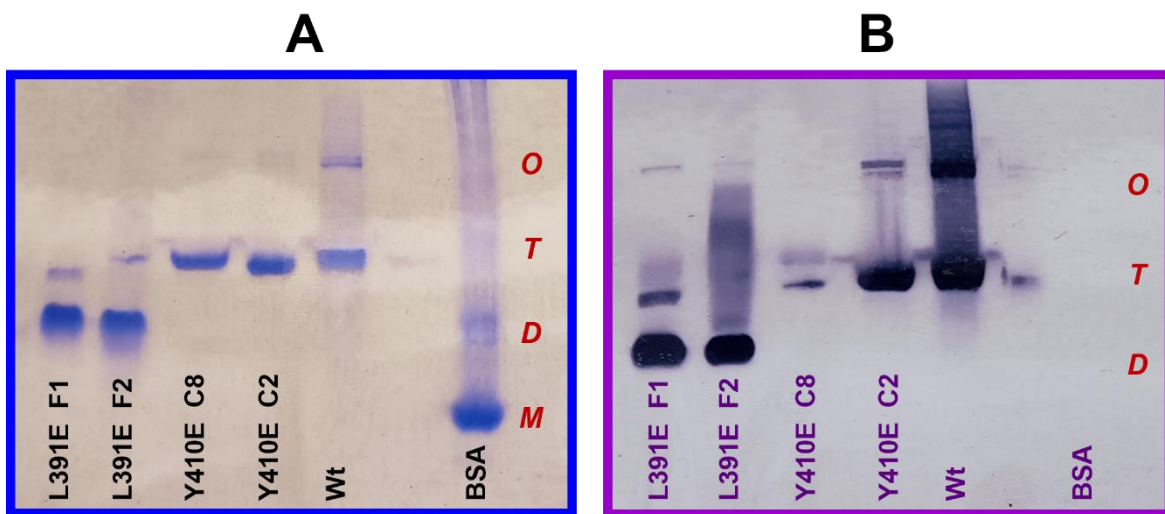
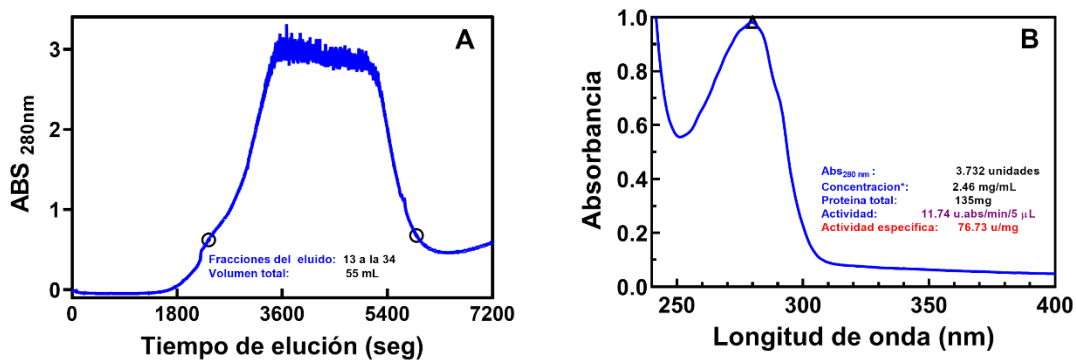


Figura 10 Perfiles electroforéticos de proteína (A) y de actividad (B) de la Wt y de las mutantes L391E y Y410E de G6PDHPa purificadas. Las enzimas (12 μ g) fueron separadas en un sistema de gels no desnaturante y teñidas con azul de Coomassie (A) o con azul de tetrazolio y metosulfato de fenazina, como se describe en Material y Métodos. Se utilizó albumina de suero de bovino (BSA) como proteína estándar de masa molecular, que se presenta como monómero (M), dímero (D), tetrámero (T) y octámero (O), y con una masa similar a la de G6PDHPa



Gráfica 2 Perfil de elución (A) y espectro de absorción UV-visible (B) de la mutante Y410E purificada desde la colonia 2 transformante. Después de juntar de la fracción 13 a la 34 del eluido de la resina Q-Fast sefarosa (correspondientes a la zona entre los círculos en el perfil de elución de A), la enzima fue diluida cuatro veces para determinar su concentración a partir de la absorbancia a 280 nm (marcada con un triángulo en B), y para medir su actividad específica.

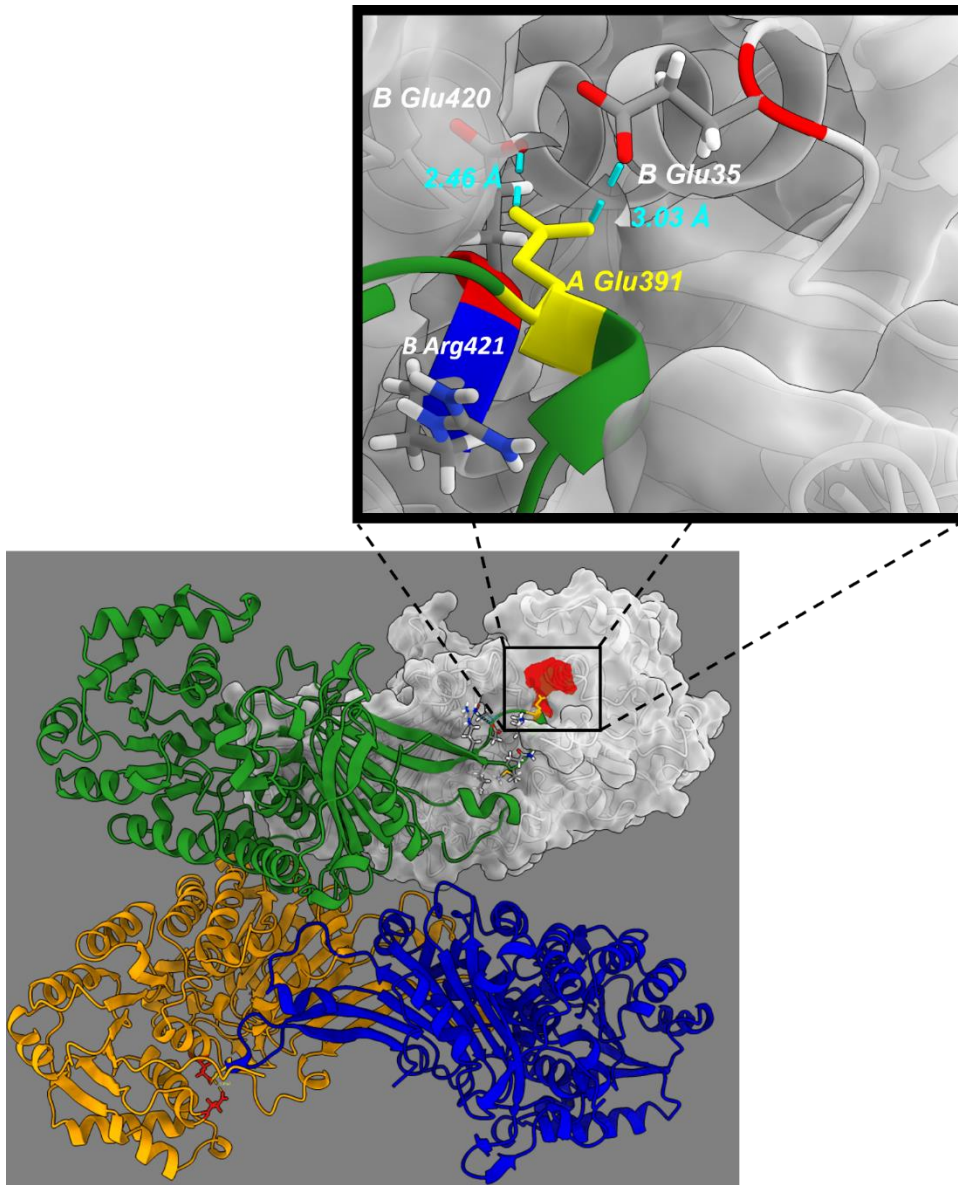
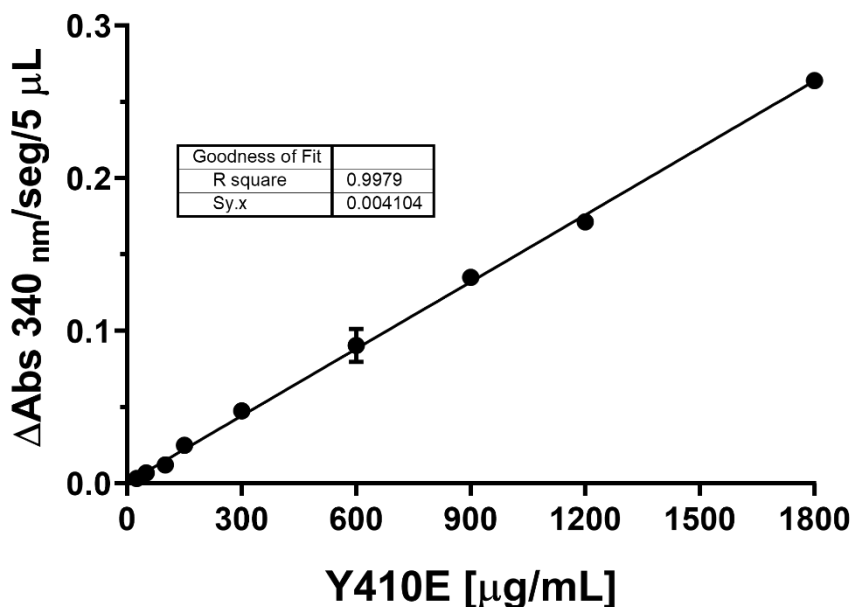


Figura 11 Sitio en donde el residuo Glu391 de una de las subunidades de G6PDHPa, introducido por mutagénesis en G6PDHPa, podría repelerse por carga con Glu420 y Glu35 de la otra subunidad del dímero. Modelo del tetrámero de G6PDHPa obtenido con AlphaFold 2 y renderización realizada con Chimera 1.4..

A partir de este punto, por motivos del alcance temporal del trabajo se decidió continuar únicamente con la mutante Y410E de la colonia 2, que llamaremos simplemente Y410E. Tanto la mutante doble Y410E/D232G, la inactiva, como la sencilla L391E, que se presenta como dímero, serán estudiadas en el futuro cercano, en otros esfuerzos y en este mismo laboratorio.

Caracterización cinética y determinación de la K_d .

Como ensayo inicial, se midió la relación entre la concentración de la proteína Y410E y su actividad (gráfica 3). La relación lineal entre estas dos variables, con un valor de correlación de 0.99, utilizando desde 10 hasta 1800 $\mu\text{g/mL}$ de esta mutante, sugiere que la mayor actividad de esta enzima no involucra cambios conformacionales o en la estructura cuaternaria de esta proteína.

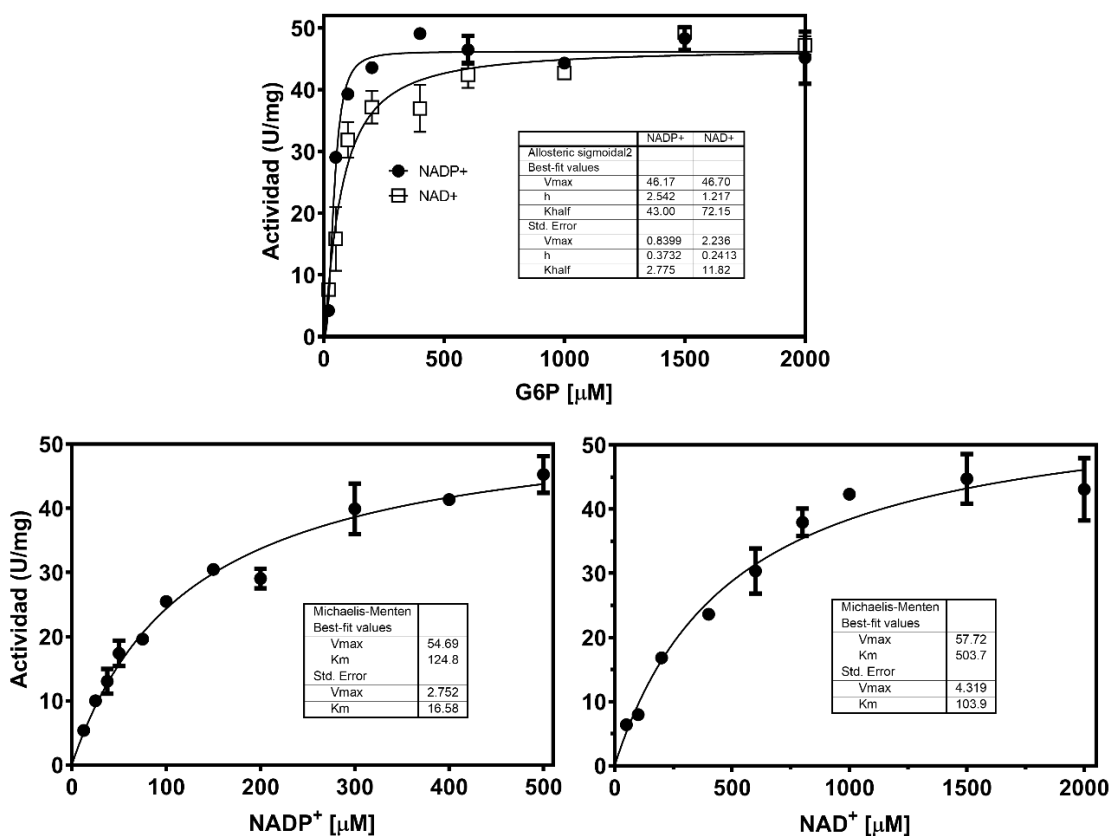


Gráfica 3 Relación entre la concentración de proteína y la actividad de la mutante Y410E.

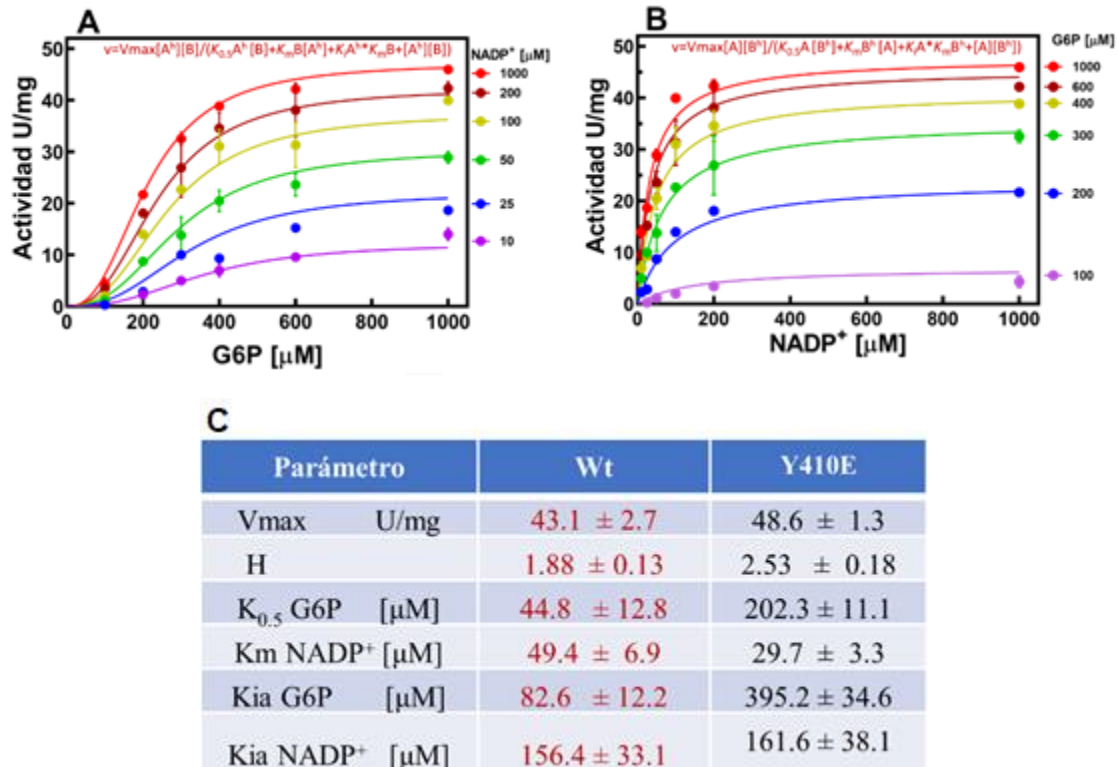
En el siguiente experimento realizado con Y410E, se saturó a la enzima con los diferentes sustratos (G6P, NADP^+ y NAD^+) para determinar sus parámetros cinéticos aparentes, que se muestran en el interior de cada figura de la gráfica 4. Los valores obtenidos indican que la mutación causada no afecta la naturaleza cooperativa de la enzima (número de Hill, o “h”), no modifica su velocidad máxima (V_{max}), ni su afinidad por el sustrato G6P (K_{half} o $K_{0.5}$). La afinidad por NADP^+ y NAD^+ , sin embargo, se ve reducida, cuando sus valores de K_m son hasta cuatro veces mayores para la primera y casi del doble para la segunda, respecto a la que posee la enzima Wt.

Se debe considerar, sin embargo, que en las enzimas bisustrato, como G6PDHPa, la interacción con el primer sustrato puede afectar su interacción con el segundo (Francis y Kohen, 2014), por lo que sus parámetros cinéticos verdaderos solo se obtienen con ensayos de cinética con ajuste global, como los que se muestran en la gráfica 5 para la

mutante Y410E (solo para la reacción dependiente de NADP⁺). Los ensayos de “cinética aparente”, variando la concentración de uno de los sustratos, y manteniendo fija la del otro, como el de la gráfica 4, permiten seleccionar las concentraciones de sustratos a utilizar en los de la “cinética verdadera”.



Gráfica 4 Curvas de saturación para determinar los parámetros cinéticos aparentes de la mutante Y410E de G6PDHPa. Las actividades enzimáticas (velocidad inicial) fueron obtenidas como se describe en Material y Métodos, con G6P como el sustrato variable, a concentraciones fijas de 0.5 y 3.0 mM de NADP⁺ y NAD⁺, respectivamente (A). En los experimentos de B y C se varió la concentración de las coenzimas NADP⁺ y NAD⁺, respectivamente, manteniendo constante la de G6P (1.0 mM). Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos. Los parámetros cinéticos aparentes (en el recuadro de cada gráfico) fueron calculados por regresión no lineal, ajustando los datos a la ecuación de Hill (A) o a la de Michaelis y Menten (B y C), mediante el programa Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, California, USA).

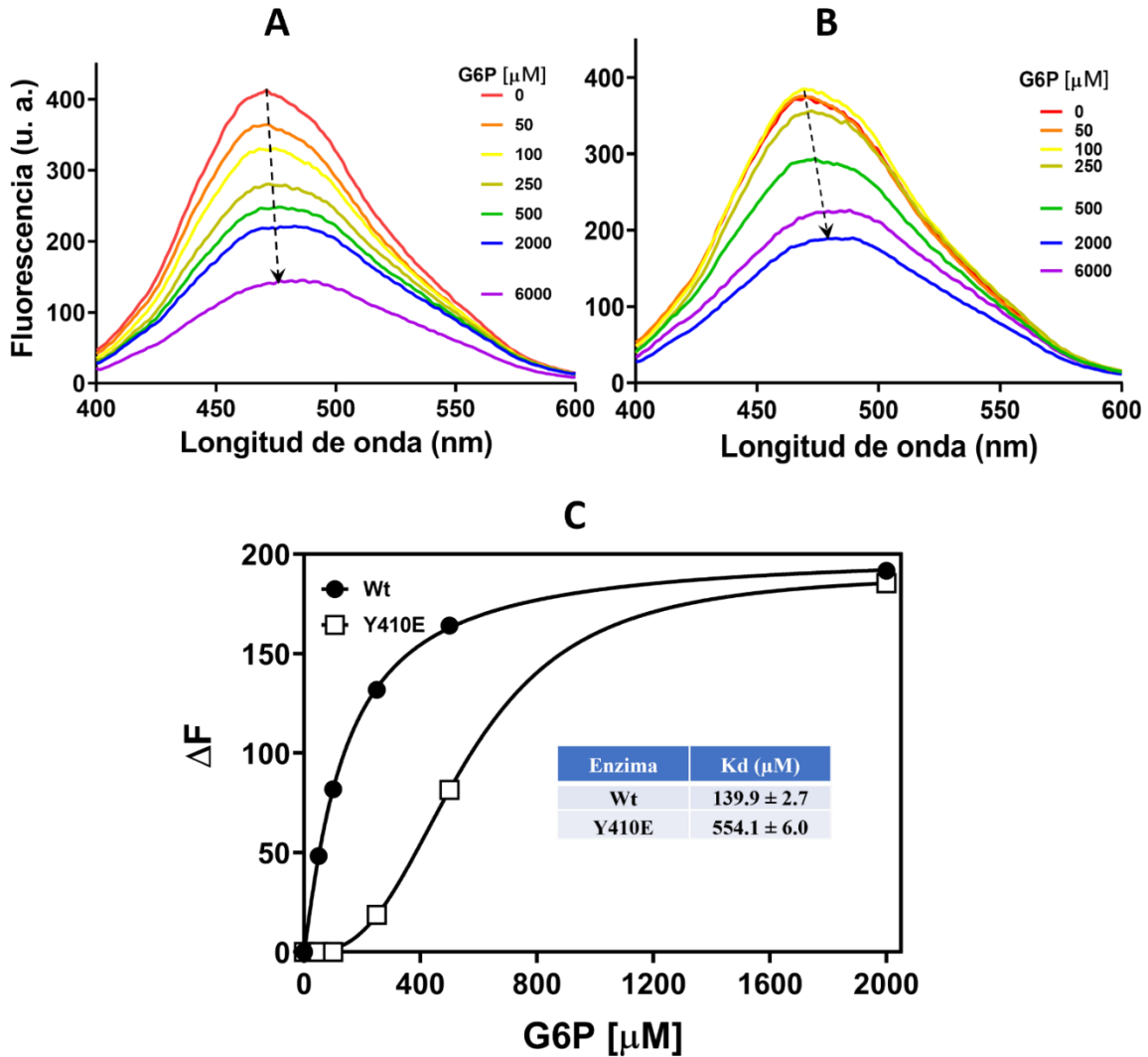


Gráfica 5 Curvas de saturación para determinar los parámetros cinéticos verdaderos de la mutante Y410E de G6PDHPa. Curvas de saturación con G6P a diferentes concentraciones constantes de NADP⁺ (A). Curvas de saturación con NADP⁺ a diferentes concentraciones de G6P (B). Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos. Los parámetros cinéticos verdaderos (última columna en C) fueron calculados por regresión no lineal, realizando un ajuste global de los datos a las ecuaciones para un mecanismo secuencial que se muestran en A y B, mediante el programa Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, California, USA). Estas ecuaciones consideran el número de Hill (h) para la unión de G6P, que se une cooperativamente a la enzima. Con fines comparativos en la segunda columna se muestran los parámetros de la Wt.

Los valores en la tabla de la gráfica 5 confirman lo encontrado en el ensayo de cinética aparente, respecto a que la mutante une cooperativamente a G6P, con un número de Hill superior al de la Wt, y que su Vmax no se modifica. Sin embargo, su afinidad de unión para G6P con el otro sustrato ya unido, es distinta a la que se encontró antes, pues mientras Y410E no presenta cambios en la unión de la coenzima, si acaso una pequeña disminución en su K_m, el valor de la K_{0.5} para G6P aumenta cuatro veces (de 49 a 202 μM). Coincidentemente entre los nuevos parámetros determinados con el ajuste global (K_{ia} para G6P y NADP⁺), que corresponden a las constantes de disociación pura de estos compuestos por la enzima (sin cosustrato unido), el valor para G6P también aumenta cerca de 5 veces (de 82 a 395 μM), mientras que el del NADP⁺ no se modifica para la mutante. El incremento en los valores de K_{0.5} y K_{ia} para G6P sugiere que la sustitución de Tyr por Glu afecta la afinidad de la enzima por este sustrato.

Relacionado con lo anterior, un estudio reciente demostró que la unión de G6P modifica la conformación de G6PDHPa y la hace estructuralmente más estable (Benítez-Rangel *et al.*, 2020). En dicha investigación también se propone que el sitio al que se une G6P para modificar y estabilizar a la enzima es el catalítico. Los cambios estructurales que provoca el sustrato en G6PDHPa pueden seguirse por espectrofluorometría utilizando el colorante ANS, ya que la fluorescencia de este compuesto es baja en un ambiente polar, pero aumenta al unirse a regiones hidrofóbicas parcialmente expuestas de las proteínas. Las gráficas A y B de la gráfica 6 muestran la emisión del ANS en presencia de las enzimas Wt y Y410E, respectivamente, y de diferente concentración de G6P. La disminución en dicha emisión, provocada por un incremento en la concentración del sustrato, así como el cambio en su máxima emisión hacia el rojo (marcado por flechas en las gráficas 6A y 6B) sugieren que la unión de G6P provoca una disminución en los sitios hidrofóbicos de las proteínas parcialmente expuestos.

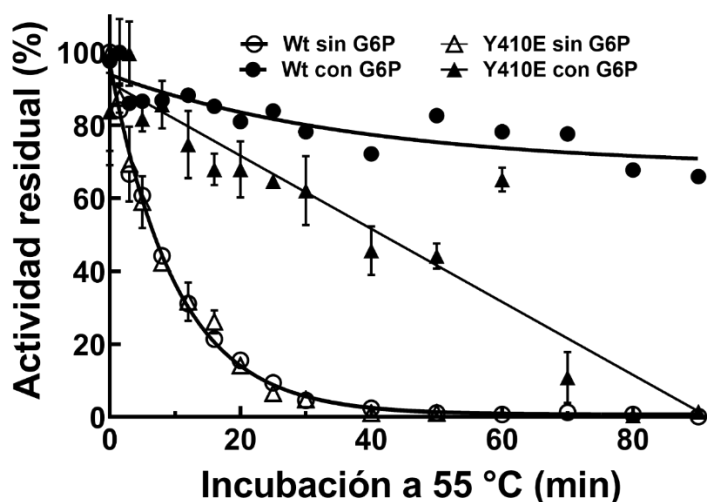
En la gráfica 6C se grafican los cambios en la emisión del ANS inducidos por las modificaciones estructurales que provoca la unión de G6P en las enzimas, que permiten calcular la K_d de los complejos proteína-G6P. En forma coincidente con los incrementos encontrados en la $K_{0.5}$ y K_{ia} de G6P, en el estudio cinético de Y410E (tabla de la gráfica 5), el valor de la K_d del complejo mutante-G6P también aumenta cuatro veces (de 140 a 554 μM), y el ajuste de los datos a una ecuación de unión específica con número de Hill arroja un valor de $H=2.8$ para esta proteína, contra 1.13 para la Wt. Estos resultados apoyan la idea de que la mutación Y410E afecta el sitio de unión para G6P en la enzima, y que éste es el mismo en donde dicha molécula actúa como sustrato y como ligando estabilizador de la proteína.



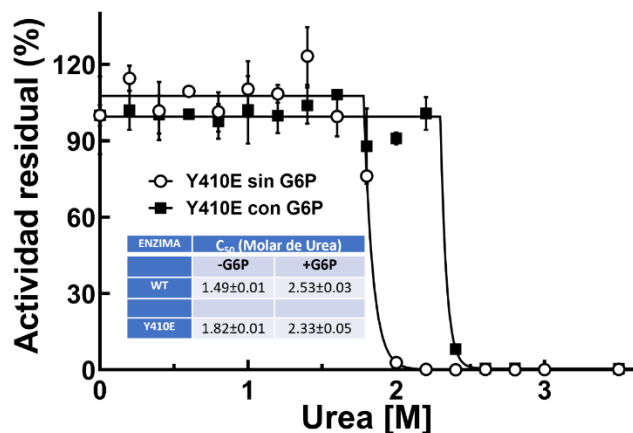
Gráfica 6 Cambios conformacionales de las enzimas Wt y Y410E de G6PDHPa (A y B), provocados por diferentes concentraciones de G6P, y determinación de la Kd de los complejos proteína-G6P (C). Espectros de emisión de fluorescencia del ANS que se une a la Wt (A) y a Y410E (B), en presencia de diferente concentración del sustrato G6P. C: Gráfico de los cambios en la fluorescencia del ANS (ΔF), obtenidos en A y B, en función de la concentración de G6P. Los valores de Kd mostrados en la tabla inserta fueron obtenidos ajustando los datos a la siguiente ecuación, mediante el programa Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, California, USA): $Y = V_{max} * Xh / (Kdh + Xh)$.

El siguiente objetivo consistió en probar la estabilidad de la mutante Y410E ante un agente físico, el calor (gráfica 7), y otro químico, la urea (gráfica 8). Simultáneamente se determinó el grado de protección que G6P brinda a la enzima frente a estos factores inactivantes. Para ello se seleccionó una concentración saturante de este sustrato, 6.0 mM, que también produce el máximo cambio conformacional de la proteína (gráfica 6). En cuanto a la inactivación por calor, en ausencia de G6P la mutante fue tan sensible como la Wt, mostrando un decaimiento exponencial, mientras que en su presencia Y410E no logra la

estabilidad que se consigue para esta última, inactivándose por completo y con un decaimiento casi lineal entre los 80 y 90 min de exposición a 55 °C.



Gráfica 7 Cinética de inactivación de las enzimas silvestre y Y410E incubadas a 55 °C en ausencia y presencia de G6P 6.0 mM. La actividad residual de las enzimas se midió como se describe en la sección de Material y Métodos. Las líneas representan el ajuste de los datos a la ecuación de un decaimiento exponencial. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos.



Gráfica 8 Actividad de la enzima Y410E incubada durante 24 h con diferente concentración de urea, en ausencia y presencia de G6P 6.0 mM. Con fines comparativos, la tabla inserta muestra la concentración de urea que provoca una disminución del 50% en la actividad inicial (C50) de las enzimas Wt y la mutante Y410E. La actividad residual se midió como se describe en la sección de Material y Métodos. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos

Referente a la inactivación por el agente caotrópico urea, la tabla de la gráfica 8 muestra que en ausencia de G6P la mutante es ligeramente más estable que la silvestre, pero que,

en su presencia, como sucedió ante el calor, el sustrato no logra la estabilidad que le proporciona a la última.

Debemos recordar que la sustitución de Tyr por Glu en la posición 410 de la G6PDHPa, intentaba introducir dos nuevos puentes salinos al interior de cada dímero (entre E410 y R398), y crear con ello una enzima estructuralmente más estable y resistente a los factores desnaturizantes probados. Sin embargo, los resultados obtenidos sobre tolerancia hacia el calor y hacia las altas concentraciones de urea muestran una enzima mutante con prácticamente la misma sensibilidad que la Wt, y aunque al igual que en esta última, la G6P también promueve una mayor estabilidad estructural en Y410E, no llega a la que posee la Wt. Considerando lo anterior, y con que se había obtenido un nuevo modelo de la enzima, con el programa AlphaFold 2, se realizó un nuevo análisis estructural para conocer si los puentes salinos esperados estaban presentes. La Figura 12 muestra una de las regiones de la proteína en donde se esperaba que E410 y R398 formaran uno de los enlaces mencionados; desafortunadamente, considerando la disposición espacial de estos dos residuos, sería difícil pensar que formen un puente salino.

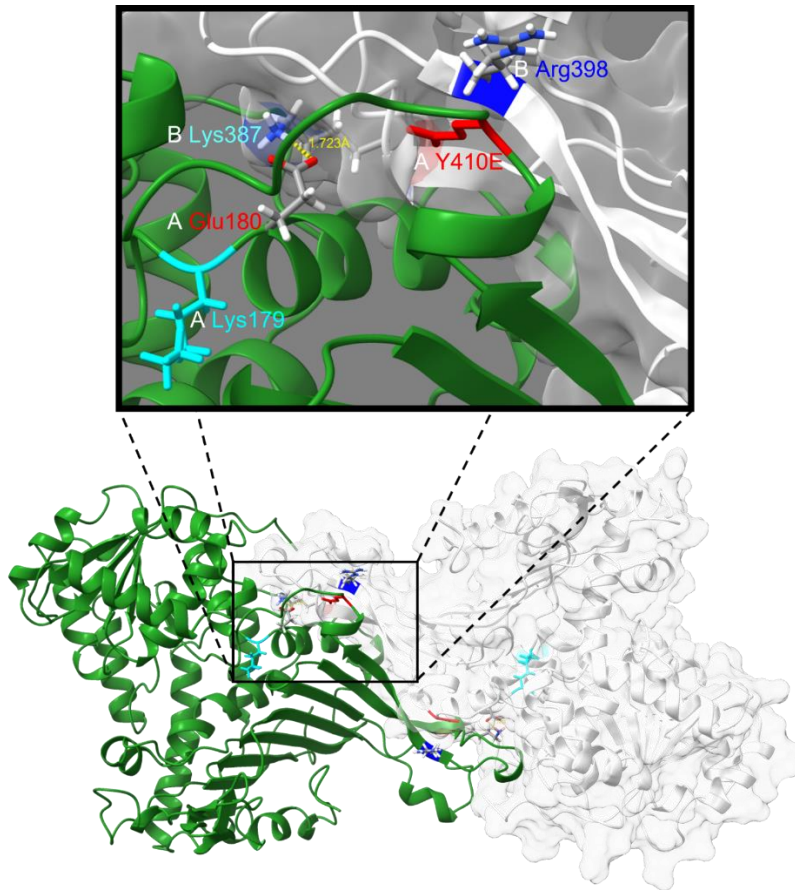
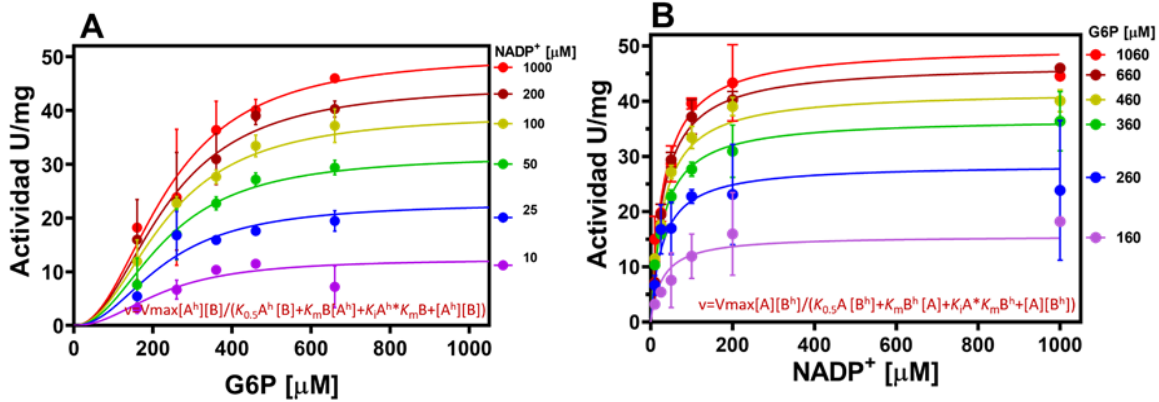


Figura 12 Sitio en donde se esperaría que el residuo Glu410 de una de las subunidades de G6PDHPa, introducido por mutagénesis sitio-dirigida, formara un puente salino con la Arg398 de la otra subunidad del dímero. Se muestra también la Lys 179, que es esencial para la catálisis, y los residuos Glu180 y Lys387, que forman un puente salino entre los monómeros del dímero. Modelo de G6PDHPa obtenido con AlphaFold 2 y renderización realizada con Chimera 1.4

Además, tomando en cuenta que en un estudio previo se demostró que la interacción de la G6PDHPa con el sustrato G6P modifica la estructura de la enzima (Benítez-Rangel *et al.*, 2020), también se determinaron los parámetros verdaderos de la Y410E preincubada con G6P (gráfica 9).



C

Parámetro	Wt	Y410E	Wt G6P	Y410E G6P
Vmax U/mg	43.1 ± 2.7	48.6 ± 1.3	36.1 ± 1.3	51.98 ± 2.8
H	1.88 ± 0.13	2.53 ± 0.18	1.9 ± 0.2	2.15 ± 0.3
K _{0.5} G6P [μM]	44.8 ± 12.8	202.3 ± 11.1	31.1 ± 3.7	237.0 ± 19.0
Km NADP ⁺ [μM]	49.4 ± 6.9	29.7 ± 3.3	30.2 ± 4.3	32.01 ± 4.6
Kia G6P [μM]	82.6 ± 12.2	395.2 ± 34.6	78.2 ± 12.3	221.5 ± 54.8
Kia NADP ⁺ [μM]	156.4 ± 33.1	161.6 ± 38.1	172.7 ± 66.3	27.7 ± 14.9

Gráfica 9 Curvas de saturación para determinar los parámetros cinéticos verdaderos de la mutante Y410E de G6PDHPa preincubada con G6P. Curvas de saturación con G6P a diferentes concentraciones constantes de NADP⁺ (A). Curvas de saturación con NADP⁺ a diferentes concentraciones de G6P (B). Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos. Los parámetros cinéticos verdaderos obtenidos para Y410E modificada por G6P (última columna en C) fueron calculados por regresión no lineal, realizando un ajuste global de los datos a las ecuaciones que se muestran en A y B, y como se menciona en el pie de la Figura 16. Con fines comparativos en la tercera columna se muestran los parámetros de la enzima mutante sin G6P, mientras que en la segunda y en la cuarta se presentan los de la Wt, preincubada sin y con G6P, respectivamente.

CONCLUSIONES

En la búsqueda de G6PDHPa estructuralmente más estable, se planteó obtener, purificar y caracterizar las mutantes sencillas L391E y Y410E. En teoría estas enzimas tendrían cuatro puentes salinos, en lugar de los dos que posee la enzima silvestre entre las subunidades que forman de cada uno de sus dímeros.

Durante la secuenciación de los genes modificados por PCR, además de las variantes buscadas se evidenció una tercera mutante, la doble Y410E/D232G, que resultó inactiva, lo que sugiere que el residuo D232 juega un papel esencial en la enzima. Al igual que las mutantes L391E y Y410E, esta doble mutante también fue purificada, y su futura caracterización podría ayudar a conocer el papel específico de este residuo.

La mutante sencilla L391E purificada resulta interesante al mostrarse mayoritariamente como dímero activo, una estructura cuaternaria que presentan otras G6PDHs, como la humana y la de algunas bacterias, como la de *L. mesenteroides*, pero que no había sido observada para la enzima de *P. aeruginosa*. El estudio de sus propiedades cinéticas y de estabilidad estructural de esta mutante permitirá conocer qué tan diferente es respecto a la silvestre, que es tetramérica. También, si se cristalizara y se obtuviera su estructura tridimensional por rayos X, podríamos saber de qué manera los cambios realizados en L391, que se localiza distante a la región en donde se unen los dímeros, provoca la disociación de estos. Por ahora, el modelo estructural obtenido con el algoritmo de inteligencia artificial AlphaFold 2, sugiere que el glutámico introducido en la posición 391 de una de las subunidades de G6PDHPa se repele con dos residuos, también ácidos, de la otra subunidad que forma el dímero, descartando la formación del puente salino entre E391 y R421, que fuera sugerido al inicio de este trabajo.

Con relación a la mutante Y410E, el estudio cinético y el de unión de G6P, como ligando que modifica la estructura de la enzima, indican que la mutación afecta la afinidad de la enzima por este sustrato. Junto con esto, el cambio del residuo aromático por el ácido origina una enzima que, a pesar de estabilizarse por G6P, en concentraciones saturantes de este compuesto no alcanza la estabilidad que logra la silvestre frente a los agentes desnaturizantes utilizados. Estos resultados también descartan la existencia de un puente salino entre E410 y R398 que pudiese conferirle mayor estabilidad, como se propusiera al inicio de la investigación, y el análisis del modelo estructural de G6PDHPa obtenido con AlphaFold 2, confirma esta idea.

Proyecciones a futuro

- Se recomienda obtener y caracterizar la mutante sencilla D232G para dilucidar el papel del residuo D232 en la función de la enzima.
- También, por las características estructurales mostradas por la mutante L391E obtenida en el presente estudio, se recomienda caracterizarla cinética y estructuralmente.
- Considerando la visión estructural errónea que, como aquí se constató, pueden generar algunos modelos estructurales, y a pesar de contar con el novedoso programa AlphaFold 2, se hace necesario intensificar los intentos para cristalizar G6PDHPa y obtener su estructura tridimensional por rayos X. Lo anterior ayudaría a conocer la forma en que las mutaciones aquí estudiadas afectan a la enzima, y a diseñar con certeza otras mutantes de G6PDHPa.
- Logrado lo anterior, y con el objetivo inicialmente propuesto en este trabajo, de obtener una enzima G6PDHPa con una mayor estabilidad estructural, se sugiere diseñar y estudiar mutantes que posean enlaces disulfuro entre unidades de los dímeros, y entre los dímeros mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acero-Navarro, K. E., Jiménez-Ramírez, M., Villalobos, M. A., Vargas-Martínez, R., Perales-Vela, H. V., & Velasco-García, R. (2018). Cloning, overexpression, and purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression and Purification*, 142, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.10.004>
- Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M., & Adams, M. J. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: The crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure (London, England: 1993)*, 8(3), 293-303. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00104-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00104-0)
- Benítez-Rangel, E., Rodríguez-Hernández, A., & Velasco-García, R. (2020). The substrate of the glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* provides structural stability. *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1868(2), 140331. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140331>
- Bodey, G. P.; Bolivar, R.; Fainstein, V.; Jadeja, L. (1983) Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Reviews of Infectious Diseases*, 5-2, 279–313.
- Boonyuen, U., Chamchoy, K., Swangsri, T., Junkree, T., Day, N. P. J., White, N. J., & Imwong, M. (2017). A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.002>
- Bush, M.; Perez, M. (2018) Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados. Consultado el 08 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>
- Cohen, P., & Rosemeyer, M. A. (1969). Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 8(1), 8-15. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00488.x>
- Francis, K., & Kohen, A. (2014). Standards for the reporting of kinetic isotope effects in enzymology. *Perspectives in Science*, 1(1), 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.009>
- Gallagher SR. One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001; Chapter 10 Unit 10.2B
- S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326,

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)

- Giske, C. G., Monnet, D. L., Cars, O., Carmeli, Y., & Resistance, on behalf of R.-A. on A. (2008). Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 813-821. <https://doi.org/10.1128/AAC.01169-07>
- Guliyeva, A. J., & Gasymov, O. K. (2020). ANS fluorescence: Potential to discriminate hydrophobic sites of proteins in solid states. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24, 100843. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100843>
- Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A. et al. *Nature* 2021, 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: A formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>
- Kim, J. M., Park, E. S., Jeong, J. S., Kim, K. M., Kim, J. M., Oh, H. S., Yoon, S. W., Chang, H. S., Chang, K. H., Lee, S. I., Lee, M. S., Song, J. H., Kang, M. W., Park, S. C., Choe, K. W., & Pai, C. H. (2000). Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. *American Journal of Infection Control*, 28(6), 454-458. <https://doi.org/10.1067/mic.2000.107592>
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680e685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lam, S. Y., Yeung, R. C. Y., Yu, T.-H., Sze, K.-H., & Wong, K.-B. (2011). A Rigidifying Salt-Bridge Favors the Activity of Thermophilic Enzyme at High Temperatures at the Expense of Low-Temperature Activity. *PLoS Biology*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001027>
- Lessie, T., & Neidhardt, F. C. (1967). Adenosine Triphosphate-Linked Control of *Pseudomonas aeruginosa* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 93(4), 1337-1345.
- Ma, J. F., Hager, P. W., Howell, M. L., Phibbs, P. V., & Hassett, D. J. (1998). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* zwf gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1741-1749. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1741-1749.1998>
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., & de Lorenzo, V. (2015). *Pseudomonas putida* KT2440 Strain Metabolizes Glucose through a Cycle Formed by Enzymes of the Entner-

- Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25920-25932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Penefsky, H. S. (1977). Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(9), 2891-2899.
- Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C. (Eds.). (2004). *Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases* (4th ed). McGraw-Hill.
- Rowland, P., Basak, A. K., Gover, S., Levy, H. R., & Adams, M. J. (1994). The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure (London, England: 1993)*, 2(11), 1073-1087. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(94\)00110-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(94)00110-3)
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
- Shapiro, J. A., Kaplan, A. R., & Wuest, W. M. (2019). From General to Specific: Can *Pseudomonas* Primary Metabolism Be Exploited for Narrow-Spectrum Antibiotics? *ChemBioChem*, 20(1), 34-39. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800383>
- Siddhartha Singh. (2012). Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4(1). <https://doi.org/10.5897/IJPPB11.045>
- Taconelli, E., Magrini, N. (2017). *GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS*. 7. WHO.
- Tumbarello, M., Repetto, E., Trecarichi, E. M., Bernardini, C., Pascale, G. D., Parisini, A., Rossi, M., Molinari, M. P., Spanu, T., Viscoli, C., Cauda, R., & Bassetti, M. (2011). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: Risk factors and mortality. *Epidemiology & Infection*, 139(11), 1740-1749. <https://doi.org/10.1017/S0950268810003055>
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551.

- Wang, X.-T., Chan, T. F., Lam, V. M. S., & Engel, P. C. (2008). What is the role of the second “structural” NADP⁺-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Science*, 17(8), 1403-1411. <https://doi.org/10.1110/ps.035352.108>
- Zhu, Y., Wu, Y., Luo, Y., Zou, Y., Ma, B., & Zhang, Q. (2014, noviembre 7). *R102Q Mutation Shifts the Salt-Bridge Network and Reduces the Structural Flexibility of Human Neuronal Calcium Sensor-1 Protein* (world) [Research-article]. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jp507936a>