



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA EN ESTADO ESTACIONARIO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

JIMÉNEZ RAMÍREZ MARIELLA

Director de Tesis: Dr. Roberto Velasco García



Cd. Mx. 2023



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.

Los experimentos de este trabajo fueron posibles gracias al apoyo financiero otorgado por el PAPIIT con clave IN216917.

Whether you think you can or you think you can't, you're right.

-Henry Ford.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Roberto Velasco, por ser un profesor dedicado y muy comprometido con los alumnos, que logró transmitirme el interés por las enzimas durante sus clases, que me abrió las puertas de su laboratorio y que me llevo de la mano en este proyecto. Gracias por la infinita paciencia, la comprensión y el apoyo durante la realización de este proyecto y todo el tiempo que tome para culminarlo.

A Kevin, por compartir conmigo parte de sus conocimientos y su trabajo en el laboratorio de osmorregulación.

A los profesores que fueron parte fundamental en mi formación como Bióloga y a mis sinodales por la disposición para revisar este trabajo y sus contribuciones que me permiten concluir esta etapa.

A mis compañeros de salón que se convirtieron en mis amigos y en especial a los que siguen siendo parte de mi vida (no ocupo poner nombres, ustedes saben quiénes son porque estarán leyendo esto); y a las personas que a lo largo de este camino me han aportado algo para mi formación profesional y sobre todo personal.

Agradezco infinitamente a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, por el apoyo, el amor y todos los recordatorios de que tenía la tesis pendiente. Gracias por creer en mí, por su incondicionalidad y gracias por ser siempre los pilares que me sostienen; son siempre mi recordatorio que: en esta vida yo ya gané. Los amo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos particulares	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. Purificación de la enzima.....	9
3.2. Caracterización cinética de G6PDHPaR.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. Purificación de la enzima.....	14
4.2. Caracterización cinética de G6PDHPaR.....	18
4.2.1. Inactivación térmica y estabilidad de la G6PDHPaR	26
4.2.2. Efecto del ATP y de diferentes iones sobre la actividad de la G6PDHPaR.	29
5. CONCLUSIONES.....	36
6. REFERENCIAS.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo EDEMP implicado en el catabolismo de la glucosa de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figura 2.- Reacción catalizada por la G6PDH en <i>P. aeruginosa</i>	5
Figura 3.- Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la G6PDH recombinante de <i>P. aeruginosa</i>	15
Figura 4.- Perfil de absorción de la G6PDH recombinante en la región UV del espectro..	16
Figura 5.- Determinación de pH óptimo para la actividad de la G6PDH recombinante de <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 6.- Determinación de la concentración de Mg ²⁺ óptima para la actividad de la G6PDHPaR.....	20
Figura 7.- Curva de saturación de la G6PDHPaR con NADP ⁺	21
Figura 8.- Curva de saturación de la G6PDHPaR con NAD ⁺	22
Figura 9.- Curvas de saturación de la G6PDHPaR con el sustrato G6P, utilizando NADP ⁺ o NAD ⁺ como coenzima..	23
Figura 10.- Gráfico de Arrhenius para las reacciones de G6PDHPaR dependientes de NADP ⁺ y de NAD ⁺	26
Figura 11.- Cinética de inactivación térmica de la G6PDHPaR..	27
Figura 12.- Efecto termoprotector del sustrato G6P en la actividad de la G6PDHPaR incubada a 55 °C..	28
Figura 13.- Efecto del ATP en la actividad de la G6PDHPaR dependiente de NADP ⁺ , en ausencia de MgCl ₂	30

Figura 14.- Determinación de la K_i para el ATP en la G6PDHPaR.	31
Figura 15.- Efecto del ion Mg^{++} en la inhibición de la G6PDHPaR por ATP.....	32
Figura 16.- Inhibición de la G6PDHPaR por 100 mM de diferentes sales de cationes monovalentes, en un medio con concentración subsaturante de G6P.....	33
Figura 17.- Inhibición de la G6PDHPaR por 100 mM de diferentes sales de cationes monovalentes, en un medio con concentración subsaturante de G6P.....	34
Figura 18.- Modelos estructurales del dímero de la G6PDHPa (A) y de sus inhibidores (B).	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tabla de purificación de la G6PDHPaR.....	17
Tabla 2.- Parámetros cinéticos aparentes de la G6PDHPaR.....	24
Tabla 3.- Parámetros cinéticos determinados para la G6PDHPaR en presencia de ATP.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín-5'-trifosfato
BSA	Albúmina Sérica de bovino
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
LBA	Luria-Bertani con Ampicilina
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (reducido)
NADP ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (reducido)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMEN

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa del patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (G6PDHPa) es una enzima constitutiva que participa en el ciclo EDEMP. Dicha enzima es anfibólica, debido a que durante la oxidación de la glucosa-6-fosfato puede reducir al NAD^+ o al NADP^+ . Sus productos, el NADH y el NADPH, pueden ser utilizados en reacciones catabólicas y anabólicas respectivamente, y la última, además, para combatir el estrés oxidativo que enfrenta la bacteria.

Poco se conoce de las características cinéticas, estructurales y reguladoras de G6PDHPa, sin embargo, considerando la relevancia médica de *P. aeruginosa*, por ser una de las primeras causas de infecciones intrahospitalarias, se considera necesario estudiar esta molécula, en la búsqueda de potenciales blancos terapéuticos para combatir la bacteria.

Como primer paso, en este estudio se presenta una metodología para purificar la enzima recombinante (G6PDHPaR), con la que se obtuvieron 39 mg de la proteína por litro de cultivo con un rendimiento del 61%. Se describen condiciones óptimas para su actividad y algunos de sus parámetros cinéticos aparentes. Se constata que el ATP es inhibidor competitivo de la enzima y se menciona el descubrimiento de otros compuestos que también la afectan. Finalmente, se demuestra que la G6PDHPaR es estabilizada estructuralmente por el sustrato G6P.

1. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria móvil con forma de bastón de aproximadamente 0.5-1 μm de diámetro y de 1.5-5 μm de largo, es un patógeno ubicuo, oportunista en seres humanos y bastante persistente en el medio ambiente (Peix *et al.*, 2009).

Posee mecanismos patogénicos causantes de un gran margen de infecciones, donde se ha calculado que es responsable aproximadamente del 10 a 15% de las infecciones nosocomiales mundiales (Paz *et al.*, 2019). Es considerada la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, la tercera causa de infecciones urinarias, la cuarta de infecciones de sitio quirúrgico y la séptima responsable de sepsis (Pereira *et al.*, 2015). Participa principalmente en las infecciones en individuos inmunocomprometidos, como los pacientes que sufren de SIDA, cáncer, quemaduras y es la primera causa de infecciones crónicas en pulmón en pacientes con fibrosis quística (FQ), donde destruye progresivamente los pulmones de los pacientes conduciendo a la insuficiencia respiratoria (Sabra *et al.*, 2002).

Su éxito en las infecciones pulmonares en pacientes con FQ se asocia a la sobreproducción de exopolisacáridos de las cepas mucoides que son secretoras de altos niveles de alginato (Govan y Harris, 1986), las cuales tienen la ventaja de estar parcialmente protegidas contra anticuerpos, fagocitosis, tratamientos con antibióticos (Govan y Harris, 1986; Hatch y Schiller, 1998; Greenber, 2000 y Sabra *et al.*, 2002) y con desinfectantes (McCarthy, 2015).

La presencia de estas cepas productoras de alginato se correlaciona con el

establecimiento de una infección pulmonar crónica (Govan y Nelson, 1992) ya que su exopolisacárido actúa como biopelícula manteniendo a las bacterias a salvo de cualquier forma de ataque, lo que hace que las infecciones que provoca sean difíciles de combatir. Casos estudiados de bacteriemia por *P. aeruginosa* reportan que no hay tratamiento o terapia que logre hacer frente con éxito a esta bacteria (MacGowan, 2008).

P. aeruginosa puede utilizar un amplio rango de fuentes de carbono para su crecimiento en diferentes condiciones ambientales (Stover *et al.*, 2000), posee mecanismos específicos de resistencia natural a compuestos dañinos (García y Ponce, 2003), y su gran versatilidad nutricional, que es característica de su familia, se ve reflejada en una gran cantidad de rutas catabólicas de diversos grados de complejidad (Ornston, 1971). Ejemplo de ello es su metabolismo de glucosa, ya que esta bacteria no posee la enzima 6-fosfofructocinasa para llevar a cabo el ciclo Embder-Meyerhof-Parnas de manera funcional. Por lo tanto, el catabolismo de la glucosa se lleva a cabo mediante una vía alterna.

La vía de Entner-Doudoroff en *P. aeruginosa* es la ruta central junto con la vía de las pentosas fosfato para llevar a cabo el metabolismo de glucosa-6-fosfato y gluconato-6-fosfato, a partir de glucosa dentro del ciclo EDEMP (*Fig. 1*) descrito para otras pseudomonas (Nikel *et al.*, 2015).

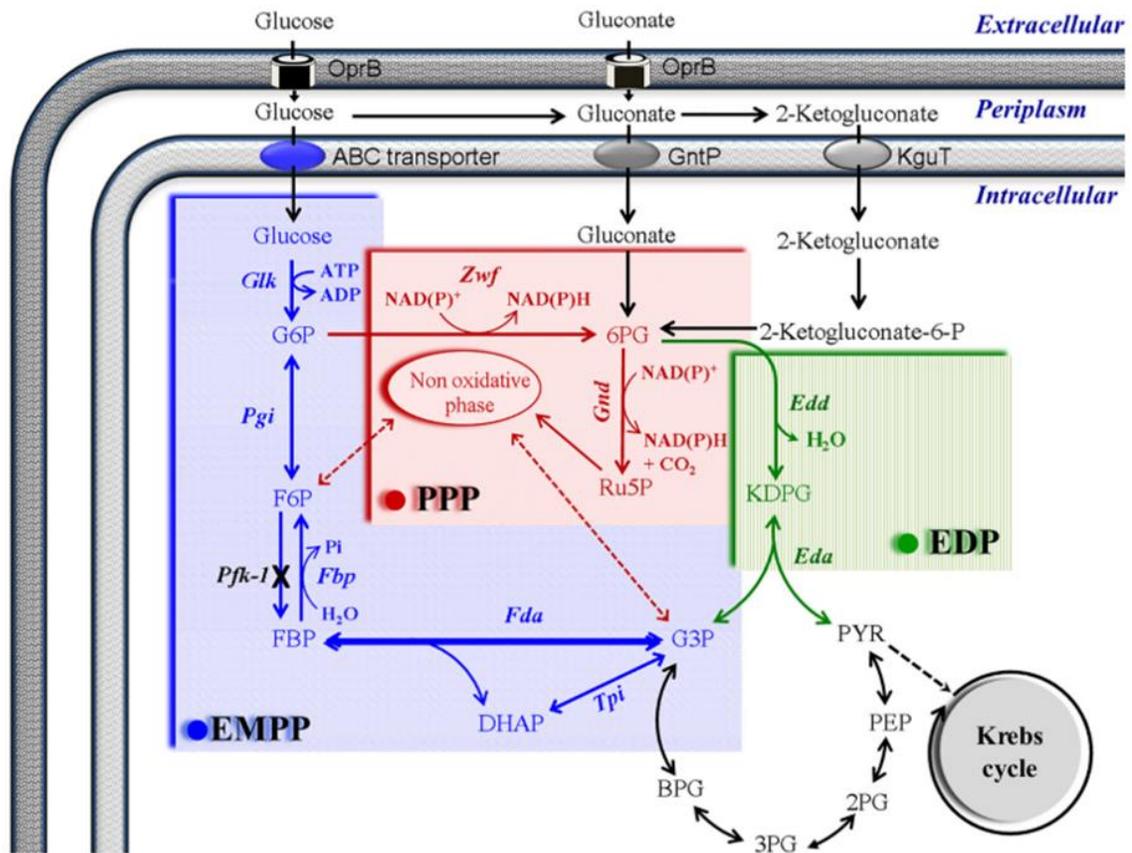


Figura 1.- Ciclo EDEMP implicado en el catabolismo de la glucosa de *P. aeruginosa*. La ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) se presenta sombreada en azul, la ruta de las pentosas fosfato (PPP) en rojo y en verde la ruta de Entner-Doudoroff (EDP). Los genes que codifican las enzimas participantes son *Glk*, glucocinasa; *Zwf*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *Gnd*, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; *Pgi*, glucosa-6-fosfato isomerasa; *Fbp*, fructosa-1,6-bifosfatasa; *Fda*, fructosa-1,6-bifosfato aldolasa; *Tpi*, triosafosfato isomerasa; *Edd*, 6-fosfogluconato deshidratasa, y *Eda*, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa. Los compuestos intermediarios son G6P, glucosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bisfosfato; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; G3P, gliceraldehído-3-P; BPG, 1,3-bifosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato, PYR, piruvato y KDPG, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. La ausencia de la enzima fosfofructoquinasa-1 (*Pfk-1*) en la ruta EMPP (de la cual carecen las *Pseudomonas*), se indica mediante una flecha tachada. Tomado de Benítez *et al.*, 2020.

La función principal de la vía Entner-Doudoroff es aportar piruvato a la célula (García y Ponce, 2003). Este intermediario metabólico es muy importante, puesto que gran parte del piruvato formado es utilizado para la biosíntesis de aminoácidos.

Dependiendo de las condiciones fisiológicas en *P. aeruginosa* la glucosa es convertida a gluconato-6-fosfato por vía oxidativa o fosforilativa. La vía oxidativa directa involucra la oxidación de la glucosa a gluconato y 2-cetogluconato en el periplasma por las enzimas glucosa y gluconato deshidrogenasas, respectivamente. De forma alterna, la vía fosforilativa requiere de la incorporación de la glucosa por un sistema inducible (Ma *et al.*, 1998; García y Ponce, 2003) y una vez que la glucosa está dentro del organismo es fosforilada por la glucocinasa y convertida a 6-fosfogluconolactona por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Fig. 2) (Singh *et al.*; 2012).

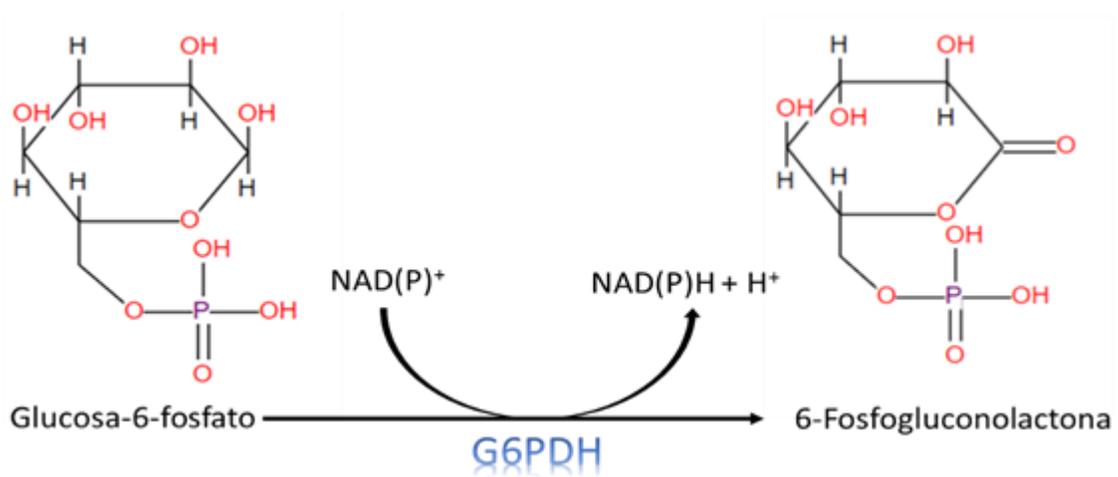


Figura 2.- Reacción catalizada por la G6PDH en *P. aeruginosa*. La Glucosa 6-fosfato es convertida a 6-fosfogluconolactona en el periplasma de la célula.

La G6PDH (EC 1.1.1.363) es considerada una enzima constitutiva crítica en el metabolismo redox de todas las células aeróbicas (Minucci *et al.*, 2009). La enzima

de *P. aeruginosa*, G6PDHPa, exhibe actividad con NAD^+ o NADP^+ (Hunt y Phibbs, 1983), y es el punto de ramificación para que la 6-fosfogluconolactona entre a vía de Entner-Doudoroff (Lessie y Neidhardt, 1967).

El hecho de que esta enzima trabaje con NAD^+ y NADP^+ es relevante para la bacteria, ya que en la reacción catalítica se genera la reducción a NADH y NADPH ; y como se sabe, el NADH proporciona el poder reductor para efectuar reacciones en el catabolismo, mientras que el NADPH se utiliza en rutas biosintéticas (Haghighi *et al.*, 2005).

García y Ponce (2003) sugieren que una manera de lograr el control de las infecciones provocadas por *P. aeruginosa* podría ser mediante la alteración de su metabolismo, afectando los diferentes transportadores de carbohidratos y aquellos procesos enzimáticos que confieren virulencia del microorganismo de manera específica.

La G6PDHPa es importante para la producción de alginato, que como ya se mencionó anteriormente, la producción de dicho polisacárido está relacionada con la virulencia de la bacteria. Estudios realizados en *P. aeruginosa* por Silo-Suh *et al.* (2005) demostró que el flujo de carbono a través de la enzima es importante para la producción de altos niveles de alginato, encontrando que cuando se modifica el gen codificante para la enzima, la producción de alginato se reduce hasta en un 90%.

También se ha demostrado que la G6PDHPa desempeña un papel importante contra el daño oxidativo, al actuar como generadora del poder reductor (NADPH) que requieren las enzimas que combaten las especies reactivas de oxígeno (Singh *et al.*;

2012). Ma *et al.* (1998) reportan que las mutantes de *P. aeruginosa*, que carecen del gen *zwf*, que codifica para la G6PDHPa, incrementan su sensibilidad al estrés oxidativo generado por metil viológeno.

En el laboratorio en donde se realizó el presente estudio, se clonó el gen *zwf* de *Pseudomonas aeruginosa* (*zwfPa*), que codifica para G6PDHPa, y se purificó a homogeneidad la enzima recombinante (Acero-Navarro, 2015); el rendimiento que se logra utilizando la metodología implementada es de aproximadamente 15 mg de la proteína pura a partir de 1 L de cultivo de la bacteria transformada. Lo anterior permitió iniciar la caracterización de la enzima: es un homotetrámero cuyas subunidades poseen 489 residuos, un peso molecular de 55.6 KDa y es anfibólica (utiliza como coenzimas NAD^+ y NADP^+). Ensayos preliminares también sugieren que presenta cooperatividad por el sustrato G6P, lo que podría indicar que la enzima es de tipo alostérica.

Considerando que la mayoría de las enzimas alostéricas determinan la velocidad de las vías metabólicas en las que participan, al estar sujetas a modulación por ligandos, en este trabajo se planteó realizar un estudio cinético de la enzima mencionada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar un estudio de la cinética en estado estacionario de la Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (G6PDHPaR).

2.2. Objetivos particulares

- 2.2.1. Obtener la G6PDHPaR con mayor rendimiento y pureza a los previamente logrados para esta enzima.
- 2.2.2. Determinar el pH y la concentración de Mg^{2+} óptimos para su actividad.
- 2.2.3. Identificar el comportamiento cinético (hiperbólico o sigmoide) que presenta esta enzima para el sustrato Glucosa-6-P y sus coenzimas NAD^+ y $NADP^+$.
- 2.2.4. Determinar sus parámetros K_m (o $K_{0.5}$) y K_{cat} , y su eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m).
- 2.2.5. Determinar la energía de activación para su reacción catalítica.
- 2.2.6. Conocer la estabilidad de la enzima frente al aumento de la temperatura y el efecto que sobre ésta tienen el sustrato G6P y sus coenzimas.
- 2.2.7. Conocer el efecto que tiene el ATP en su actividad.
- 2.2.8. Conocer el efecto de algunos iones monoatómicos (Mg^{++} , K^+ y Na^+) y poliatómicos (NH_4^+ , CH_3COO^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) en la actividad.
- 2.2.9. Si encontráramos que el ATP tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima, determinar el valor de su constante de inhibición (K_i).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Purificación de la enzima.

La purificación de la G6PDHPaR se realizó partiendo de la bacteria recombinante *E. coli* BL21(DE3)pLysS, que fue transformada en el laboratorio donde se realizó el presente trabajo, con el vector pCALn que tiene inserto el gen *zwfPa* (Acero-Navarro, 2015).

Para asegurar la activación fisiológica de las células, se realizó un pre-inóculo en medio líquido Luria-Bertani (LB) al cual se le adicionó ampicilina a una concentración final de 100µg/ml y se mantuvo bajo agitación continua (200 rpm) a 37 °C durante 12 horas. Posteriormente se inocularon 3 L de medio Luria-Bertani con Ampicilina (LBA) con el cultivo previo (21 ml/L) y se dejó crecer a 37 °C con agitación continua (150 rpm) por 160 min.

Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de ≈ 0.6 de absorbancia a 600 nm, se indujo la síntesis de la proteína por la adición de IPTG a una concentración final de 0.1 mM; posteriormente se bajó la temperatura hasta 22 °C y se incubó durante 48 h en agitación continua. Las células fueron cosechadas centrifugando el cultivo durante 20 min a 2740 xg y a una temperatura de 4 °C. Las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 220 ml de amortiguador de solubilización I (Tritón X al 0.5% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.8).

El resuspendido celular fue dividido en 4 partes iguales, que luego se atemperaron a 4 °C; manteniendo esta temperatura en todo momento, con un baño de hielo, las

células fueron rotas por sonicación en un sonicador Branson Sonifier 250, utilizando 4 ciclos de 30 segundos, con una potencia constante de 60 watts, y con descansos de dos min entre cada ciclo. El extracto celular fue centrifugado durante 30 min a 8600 xg, manteniendo la misma temperatura, para luego descartar la pastilla.

Al sobrenadante obtenido se le adicionó CaCl_2 a una concentración final de 15 mM, se le mantuvo con agitación durante 20 min a 4 °C, para después centrifugarlo a 8600 xg durante 20 min, a la misma temperatura. La pastilla obtenida se resuspendió en 200 ml de amortiguador de solubilización I (Tritón X al 0.5% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.8) que contenía 200 UI de trombina (para cortar el péptido de unión a calmodulina que se encontraba unido a la proteína expresada). Esta digestión se realizó a 22 °C durante 24 h, con agitación constante.

Posterior a la digestión se realizó precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% a 4 °C. Mientras se le agregaba la sal se mantuvo en agitación durante 10 minutos para después dejar reposar 50 minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 8600 xg, durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió en amortiguador de solubilización II (Tris-HCl 50 mM pH 7.0) y se volvió a centrifugar bajo las condiciones anteriores.

El sobrenadante se pegó a una columna Q-Sefarosa Fast previamente equilibrada con amortiguador de solubilización II. Después de lavar la columna con 200 ml del mismo amortiguador, la elución de la enzima se llevó a cabo con gradiente de KCl (0 a 700 mM) en amortiguador de solubilización II, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Durante la elución, se fueron colectando fracciones de aproximadamente 2 ml, a las que se les midió actividad para ubicar en cuáles de ellas se encontraba en mayor

concentración la G6PDH. Las fracciones que tenían la mayor actividad enzimática fueron reunidas para realizarles un barrido en el espectrofotómetro de 260 a 340 nm, lo que permitiría determinar su concentración con base a su absorción en 280 nm y su coeficiente de extinción molar, además de determinar su actividad específica. Posteriormente se adicionó glicerol a una concentración final de 20%. La enzima purificada en amortiguador de almacenamiento (Tris-HCl 50 mM, KCl \approx 300 mM y glicerol 20%) fue mantenida a una temperatura de -20 °C, para su posterior utilización.

Cabe mencionar que en cada paso de la purificación se guardó una alícuota (200 μ l), para posteriormente cuantificar su contenido proteico y corroborar el avance en el proceso de purificación de la enzima. La cuantificación se realizó utilizando el método de Bradford (1976), diluyendo previamente las muestras con amortiguador de solubilización II (1:5). Para la curva patrón se empleó BSA en un intervalo de 0.0 a 20.0 μ g de BSA.

Las proteínas obtenidas en cada paso de la purificación (10 μ L), junto con proteínas patrón de masa molecular Bio-Rad (Precision Plus Protein Unstained Standards, Cat. 161-0363), fueron separadas por SDS-PAGE, utilizando un gel separador al 9% (Laemmli, 1970). Posteriormente las proteínas se tiñeron con Azul de Coomassie.

3.2. Caracterización cinética de G6PDHPaR

Previo al análisis de su actividad, la enzima se concentró por centrifugación en tubos Amicon Regenerated Cellulose 50 KDa, para luego reemplazar el

amortiguador de almacenamiento por Tris-HCl 100 mM pH 7.0, utilizando columnas Penefski con Sephadex G-25, previamente equilibradas con dicho amortiguador (Penefsky, 1977).

La actividad de la G6PDH se determinó espectrofotométricamente, a 30 °C, siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm (formación de NADPH) que durante los primeros segundos provoca la adición de 1.2 µg de enzima a un volumen final de 0.5 ml de medio de reacción estándar (G6P 2.5 mM, NADP⁺ 0.6 mM, MgCl₂ 5.0 mM, en amortiguador Tris-HCl 100mM, pH 8.0).

Para determinar el pH y la concentración de Mg²⁺ óptimos para la enzima, se midió su actividad en un intervalo de 6.5 a 8.8 de pH en Tris-HCl 100 mM, y de 0 a 10 mM de Mg²⁺ en Tris-HCl 100 mM pH 8.0, en un medio que contenía NADP⁺ 0.6mM y G6P 2.5 mM, para ambos ensayos.

Las determinaciones del comportamiento y parámetros cinéticos de la enzima se realizaron a partir del análisis de las gráficas de actividad obtenidas variando la concentración del sustrato G6P y manteniendo constante la de la coenzima NAD⁺ o del NADP⁺; y viceversa. Los ajustes matemáticos se realizaron por regresión no lineal, utilizando los modelos matemáticos de Michaelis-Menten

$$Y = V_{max} * X / (K_m + X)$$

y de cinética sigmoide alostérica,

$$Y = V_{max} * X^h / (K_{prime} + X^h)$$

según fuera el caso.

Todas las representaciones gráficas se realizaron usando los paquetes de software GraphPad Prism, versión 5.0, los que también permitieron calcular los parámetros cinéticos mediante el ajuste de las respectivas ecuaciones.

Para determinar la energía de activación necesaria para que la enzima G6PDH lleve a cabo la reacción que cataliza, se midió su actividad en un medio de reacción con concentraciones saturantes de sustrato y coenzima (medio de reacción estándar), en temperaturas que iban de 5 hasta 45 °C. Los resultados de estos ensayos fueron luego graficados como el log de la actividad específica contra el recíproco de la temperatura absoluta utilizada (gráfica de Arrhenius), y la energía de activación determinada a partir de la pendiente de esta gráfica.

La estabilidad de la G6PDHPaR frente al aumento de la temperatura se determinó midiendo su actividad residual en el medio de reacción con concentraciones saturantes de sustratos, después de que ésta se incubó durante diferentes tiempos (a lo largo de 90 min, en amortiguador Tris-HCl 100mM pH 7.0 y con una concentración de enzima de 60 µg/mL) en 45, 50 y 55 °C.

Para conocer el efecto del ATP y de algunos iones en la actividad de la enzima se adicionó al medio de reacción cada uno de los compuestos mencionados en los objetivos, en concentraciones previamente reportadas para *P. aeruginosa* (Lessie y Neidhardt, 1967); en estos ensayos se utilizaron concentraciones saturantes y subsaturantes de los sustratos y la actividad se determinó espectrofotométricamente, como se mencionó párrafos arriba.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Purificación de la enzima.

El principal objetivo de esta investigación fue realizar un estudio cinético de la enzima G6PDH de *P. aeruginosa*. Sin embargo, para lograrlo, fue necesario purificarla realizando dos modificaciones principales a la metodología desarrollada previamente por Acero-Navarro (2015). La primera de ellas consistió en eliminar el CaCl_2 2.5 mM del amortiguador de homogeneización, en el que se observó que la G6PDHPaR era insoluble y precipitaba durante una primera centrifugación a 8,600 xg.

Al eliminar el CaCl_2 del amortiguador de homogeneización, se constató que la enzima G6PDH permanece soluble en el sobrenadante ("S", en el gel de poliacrilamida de la Fig. 3), y se observó que la adición de 15 mM de CaCl_2 provoca la precipitación de dicha enzima. Algo de notar es que esta condición fue reversible al resuspendérsele en un amortiguador con Tritón X al 0.5% ("Ca" en la Fig. 3), lo que constituye un importante paso en la purificación.

Siguiendo la metodología de Acero-Navarro (2015) la enzima G6PDHPaR presentaba un péptido unido a la calmodulina, por lo que una vez solubilizada fue digerida con trombina, induciendo la disminución de su masa molecular, debido a la liberación del péptido de unión (Fig. 3 "T").

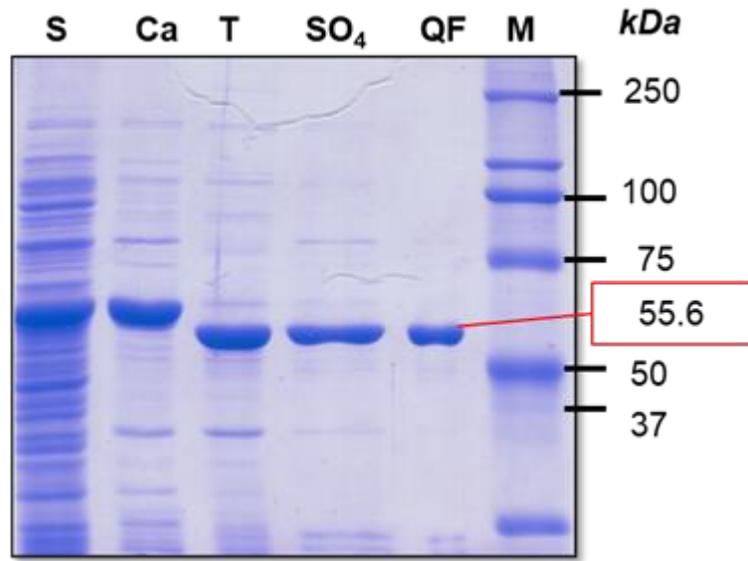


Figura 3.- Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la G6PDH recombinante de *P. aeruginosa*. S: sobrenadante del homogeneizado celular; Ca: proteína resuspendida después de la precipitación con CaCl_2 15 mM; T: digerido con Trombina; SO_4 : precipitación con Sulfato de Amonio 40%; QF: Elución de la columna de Q-Sepharosa Fast y M: marcador de masa molecular Bio-Rad.

La segunda modificación al procedimiento de purificación consistió en precipitar con 40% de sulfato de amonio (SO_4) la proteína digerida, con lo que se eliminaron algunas de las proteínas contaminantes.

Finalmente, el paso por la columna de intercambio iónico, Q-Sepharose Fast Flow (“QF”), permitió obtener la enzima de interés con un alto grado de pureza.

Tomando como referencia los valores de R_f de las proteínas marcadoras de masa molecular, se estima que la G6PDHPaR purificada tiene 55.6 KDa de masa molecular, lo que coincide con lo reportado por Ma *et al.* (1998).

Conforme la proteína fue eluyendo de la columna Q-Sepharose Fast Flow, en el último paso de la purificación, se seleccionaron y juntaron aquellas fracciones que presentaban actividad de G6PDH, para concentrar la proteína lo más posible.

A las fracciones reunidas se les realizó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda entre 260 a 340 nm (*Fig. 4*). El patrón de absorción obtenido con un pico en 280 nm, que es característico de la absorción de los residuos aromáticos, permitió determinar una concentración de **1.61 mg/mL** de la proteína purificada, de acuerdo con un método descrito (Gill y Von Hippel, 1989). Esta cantidad de proteína obtenida fue mayor al reportado por Acero-Navarro (2015), en donde él se reportó que la cantidad máxima de enzima obtenida fue de **15 mg/L** del cultivo. Esto permite decir que la metodología de purificación empleada en el presente trabajo logra un mayor rendimiento que la del antecedente directo, y que se buscaba mejorar.

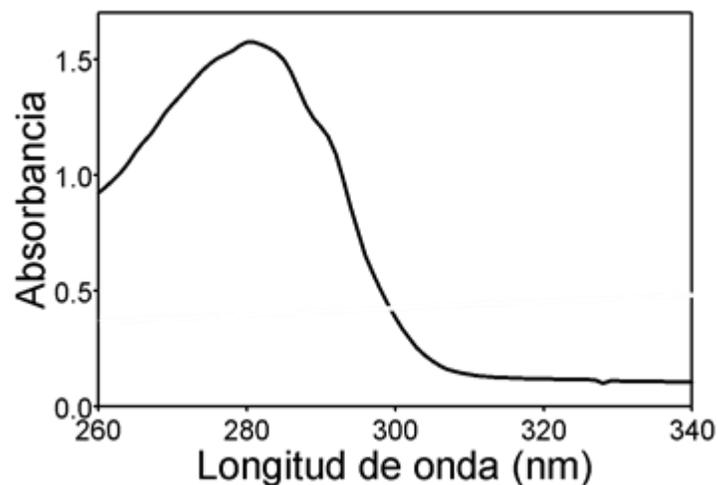


Figura 4.- Perfil de absorción de la G6PDH recombinante en la región UV del espectro. La absorbancia del eluido obtenido de la columna Q-Serafora fast fue medida en el intervalo de longitud de onda que se muestra.

Los datos obtenidos de la cuantificación de proteína con el método de Bradford (1976) de las alícuotas de cada paso del proceso de purificación, las absorciones a 280 nm de la proteína pura, junto con la determinación de su actividad de G6PDH están resumidos en la Tabla 1.

En ella podemos ver que al inicio de la purificación se tenía una actividad específica de 11.86 U/mg y al final se incrementó alrededor de seis veces, alcanzando un valor de 77.4 U/mg. La actividad específica es una medida importante dentro del proceso de purificación ya que es la relación entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína en la mezcla y su incremento es reflejo del proceso de purificación.

Tabla 1.- Tabla de purificación de la G6PDHPaR.

PASO DE LA PURIFICACIÓN	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (U*)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U*/mg)	PUREZA	RENDIMIENTO (%)
<i>SOBRENADANTE</i>	987.56	11,711.7	11.86	1	100
<i>RESUSPENSIÓN DE LA PRECIPITACIÓN CON CaCl₂</i>	420.68	8,576.5	20.39	1.72	73
<i>DIGERIDO CON TROMBINA</i>	274.50	12,615.8	46.08	3.89	107
<i>RESUSPENSIÓN DE LA PRECIPITACIÓN CON (NH₄)₂SO₄</i>	167.21	11,528.9	68.95	5.81	98
<i>ELUCIÓN DE LA RESINA Q-SEFAROSA</i>	92.75	7,182.3	77.4	6.52	61

*Unidad de enzima: cantidad de proteína que libera un μmol de producto en un minuto.

Otra medida importante es el rendimiento de la enzima, ya que nos indica la actividad que se mantiene o pierde después de cada uno de los pasos de la purificación, expresada en porcentaje, y en donde la actividad del extracto inicial representa el 100%.

Singh, *et al.* (2012) realizaron una recopilación de las propiedades de la G6PDH de diferentes especies. En dicho compendio se menciona el rendimiento obtenido durante la purificación de la enzima de 23 especies, y solo en 4 de estos estudios

se sobrepasa el 50%. Cabe resaltar que varios de ellos involucraron precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, un paso que fue realizado en la purificación de este trabajo.

Estudios elaborados con la G6PDH purificada desde otros organismos de la familia Pseudomonaceae, reportan un rendimiento del 30% para la proteína de *Pseudomonas multivorans* (Vander y Lessie, 1974), del 9% para la de *P. cepacia* (Cacciapuoti y Lessie, 1977); y del 29% para la de *P. aeruginosa* (Lessie y Neidhardt, 1967). El rendimiento del 61% obtenido en el presente trabajo es superior al de los demás, incluyendo el de Acero-Navarro en el 2015, en donde se obtuvo el 33.75% para la G6PDHPaR.

4.2. Caracterización cinética de G6PDHPaR

La búsqueda de las condiciones en las que las enzimas presentan su máxima actividad (como el pH, la temperatura, o la concentración de iones esenciales) es un paso importante para su posterior análisis *in vitro*.

El rango de pH en el que el estado nativo de una enzima es estable varía de una proteína a otra. Si bien la mayoría de ellas son más estables cerca del pH fisiológico del organismo al que pertenecen, algunas muestran una actividad máxima a valores de pH mucho más bajos o altos (Copeland, 2000); a ese valor de pH se le llama pH óptimo, y por encima o por debajo de él la actividad disminuye. Este efecto se debe a que, al ser moléculas de naturaleza proteica, la variación del pH cambia el estado de protonación de los aminoácidos que la conforman, y cuando dicho cambio es drástico, suele conducir a la desnaturalización de la proteína.

Estudios realizados en *Streptomyces aureofaciens* (Haghighi *et al.*, 2005), *Ctenopharyngodon idella* (Hu *et al.*, 2013) y *Zymomonas mobilis* (Scopes, 1997) reportan valores de pH óptimo en 8.0 para la actividad catalítica de la G6PDH. Debido a ello, para conocer el pH óptimo donde la G6PDHPaR tiene mayor actividad se realizaron mediciones donde el medio de reacción Tris 100mM HCl tenía valores de pH entre 6.8 a 8.8 (*Fig. 5*). Los resultados obtenidos muestran que, en amortiguador Tris-HCl 100 mM, el pH óptimo para esta enzima es de 8.0, y que en pH 6.8 y 8.8, su actividad es menor al 50%.

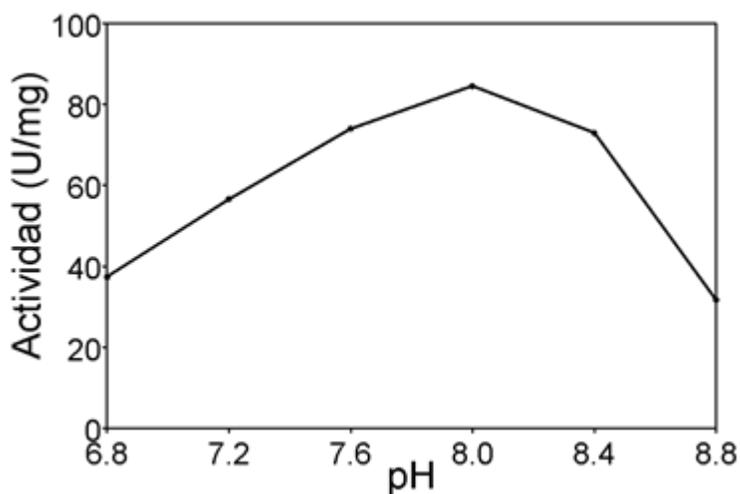


Figura 5.- Determinación de pH óptimo para la actividad de la G6PDH recombinante de P. auriginosa. La actividad se midió como se indica en Material y Métodos, en el medio de reacción estándar que contenía Tris-HCl 100 mM, con cada uno de los pHs que se muestran.

Otro factor importante para la actividad de algunas enzimas es la presencia de iones esenciales para su funcionamiento, ya que muchas de ellas incorporan cationes que estabilizan su conformación o que participan directamente en la reacción química catalizada (Copeland, 2000). Dichos cofactores inorgánicos suelen ser iones como el Ca^{2+} y Mg^{2+} (Hicks y Méndez, 1988; Aranda *et al.*, 2000).

Haghighi *et al.*, (2005) reportaron que la G6PDH de *Streptomyces aureofaciens* se ve favorecida en su actividad catalítica cuando se encuentra en presencia de Mg^{2+} . En este estudio se midió la actividad de la G6PDHPaR con concentraciones de $MgCl_2$ que iban de 0 a 10 mM (Fig. 6), encontrándose que la actividad máxima de la enzima se encuentra entre 3 y 5 mM de Mg^{++} . Como se demuestra más adelante, el otro ion de la sal utilizada, el Cl^- , resultó ser un inhibidor de la enzima, aunque a concentraciones superiores a las aquí utilizadas.

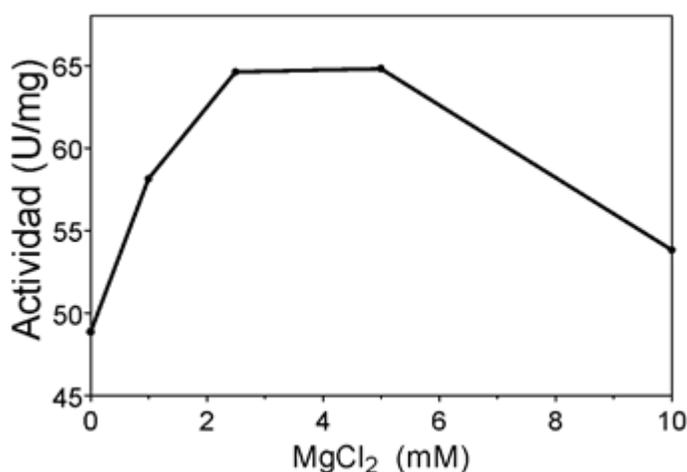


Figura 6.- Determinación de la concentración de Mg^{2+} óptima para la actividad de la G6PDHPaR. La actividad se midió como se indica en Material y Métodos, en el medio de reacción estándar con Tris 100mM HCl pH 8.0, y con las concentraciones de $MgCl_2$ que se muestran.

Los resultados anteriores de pH y Mg^{2+} óptimos para la actividad de la G6PDH recombinante, permitieron conformar el medio de reacción saturante para los ensayos de actividad enzimática posteriores: Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, $MgCl_2$ 5mM, G6P 6mM, y NAD^+ 4mM o $NADP^+$ 1mM, según fuera el caso.

Para conocer el comportamiento cinético de la G6PDH recombinante en presencia de sus coenzimas, se realizaron mediciones de su actividad manteniendo constante la

concentración de G6PDH (6.0 mM) y variando la concentración de NADP⁺ o de NAD⁺. Para la coenzima NADP⁺, se inició con una concentración de 25 μM y se aumentó gradualmente hasta alcanzar la saturación de la enzima. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Fig. 7, donde se observa que la saturación se alcanzó con una concentración cercana a 500 μM. El gráfico también nos permite apreciar el comportamiento cinético de nuestra enzima, y debido a que el ajuste de la recta corresponde a una hipérbola, se puede asumir que sigue al modelo de Michaelis-Menten.

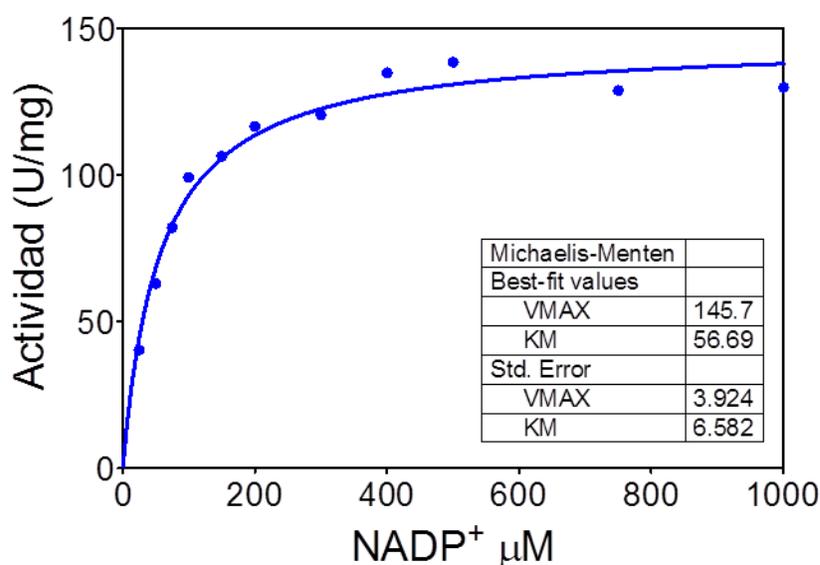


Figura 7.- Curva de saturación de la G6PDHPaR con NADP⁺. La actividad se midió como se indica en Material y Métodos, en un medio de reacción estándar modificado que contenía G6P 6.0 mM y concentraciones de NADP⁺ en un intervalo de 25 a 1000 μM. La reacción se inició al agregar 1.2 μg de la enzima al medio.

En cuanto a los ensayos para la coenzima NAD⁺, la concentración inicial fue de 100 μM, mientras que la saturación con esta coenzima se logró con una concentración cercana a 4000 μM (Fig. 8). Al igual que para el otro nucleótido, el mejor ajuste de los datos se logró con el modelo Michaelis-Menten.

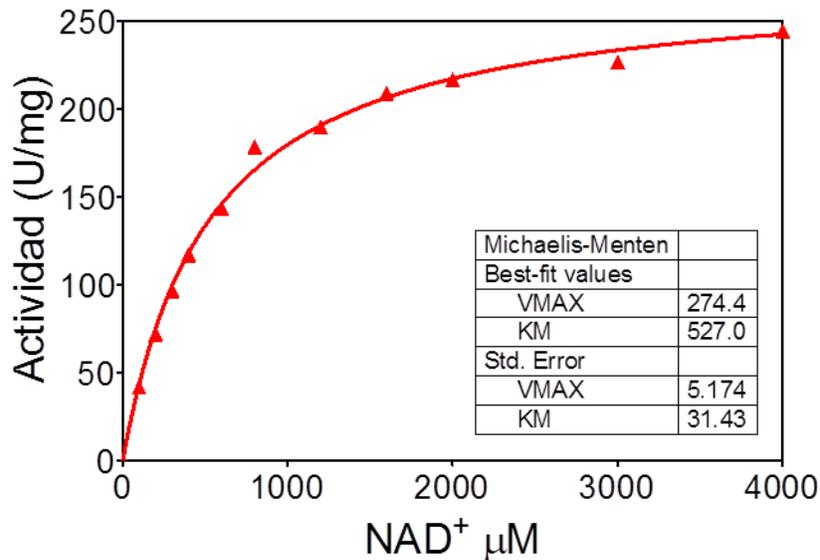


Figura 8.- Curva de saturación de la G6PDHPaR con NAD⁺. La actividad se midió como se indica en Material y Métodos, en un medio de reacción estándar modificado que contenía G6P 6.0 mM y concentraciones de NAD⁺ en un intervalo de 100 a 4000 μM. La reacción se inició al agregar 1.2 μg de la enzima al medio.

Dicho comportamiento es similar a lo obtenido con la G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* y *Zymomonas mobilis*, donde también se encontró que con en NADP⁺ se requiere menos concentración para alcanzar la saturación (Grove *et al.*, 1976; Scopes *et al.*, 1985), y a los experimentos descritos por Bassat y Golberg (1980), quienes trabajando con la G6PDH de *Pseudomonas C* reportan que la K_m es menor cuando utiliza la coenzima NADP⁺ (22μM) que el NAD⁺ (290μM).

Adicionalmente a esto, se realizaron los ensayos de actividad variando la concentración del sustrato G6P (de 0 a 6.0 mM), cuando la enzima trabaja con concentraciones saturantes de los nucleótidos (NADP⁺ 1mM y NAD⁺ 4 mM). El comportamiento cinético encontrado para el sustrato fue de tipo sigmoidea, lo que nos habla de una enzima de tipo alostérica con respecto a G6P (Fig. 9).

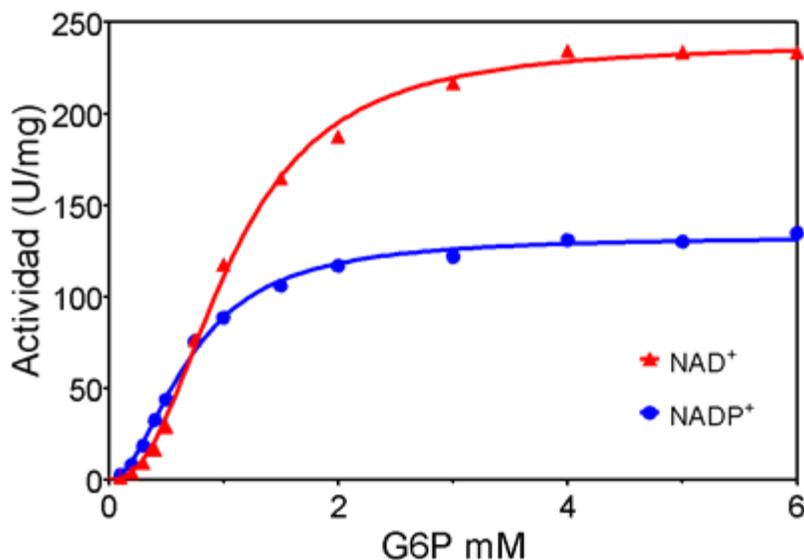


Figura 9.- Curvas de saturación de la G6PDHPaR con el sustrato G6P, utilizando NADP⁺ o NAD⁺ como coenzima. La actividad se midió como se indica en Material y Métodos, en un medio de reacción estándar modificado que contenía G6P en un intervalo de 0.1 a 6.0 mM, y una concentración de NADP⁺ o de NAD⁺ de 1.0 y 4.0 mM, respectivamente. La reacción se inició al agregar 1.2 μ g de la enzima al medio.

La Fig. 9 permite apreciar la velocidad máxima que alcanza la enzima G6PDH recombinante cuando trabaja con NAD⁺, respecto a cuando actúa con NADP⁺. En la Tabla 2, se muestran los valores de los parámetros cinéticos calculados a partir de los ajustes no lineales realizados para estos datos.

Con respecto a la K_m para cada uno de los sustratos (Tabla 2), observamos que la enzima G6PDH presentó un valor menor para NADP⁺ ($K_m = 56.7$), en comparación al NAD⁺ ($K_m = 527$), sugiriendo que esta enzima tiene mayor afinidad para el NADP⁺ en comparación al NAD⁺. De acuerdo con la revisión realizada por Singh *et al.* (2012), la velocidad de la reacción catalizada por la G6PDH varía con las condiciones de medición, el método de ensayo, la naturaleza del amortiguador y su pH. Por lo tanto, diversos autores han informado de amplias variaciones en los

valores de K_m y V_{max} . El valor de K_m para la glucosa-6-fosfato resulta ser mayor que para el $NADP^+$ excepto en algunos casos, como por ejemplo lo reportado en *Acetobacter hansenii* (Ragunathan y Levy, 1994).

Con relación al comportamiento anfibólico de la enzima (por trabajar con $NADP^+$ y NAD^+), y la mayor actividad alcanzada cuando utiliza NAD^+ son comparables con lo reportado en otros estudios realizados con *P. fluorescens* (Lessmann *et al.*, 1975), *P. multivorans* (Vander y Lessie, 1974) y *Azotobacter vinelandii* (Anderson y Anderson, 1995).

Tabla 2.- Parámetros cinéticos aparentes de la G6PDHPaR.

PARAMETRO	NAD ⁺	NADP ⁺
V_{max} (unidades/mg proteína)	238.2 ± 3.4	132.9 ± 1.87
K_m nucleótido (μM)	527.0 ± 31.4	56.7 ± 6.5
$K_{0.5}^{G6P}$ (μM)	1146.0 ± 67.41	498.7 ± 41.1
Hill ^{G6P}	2.378 ± 0.11	1.992 ± 0.10
K_{cat} (s ⁻¹)	1017.4	492.80
K_{cat}/K_m nucleótido (M ⁻¹ · s ⁻¹)	1.93 × 10 ⁶	6.4 × 10 ⁶
$K_{cat}/K_{0.5}^{G6P}$ (M ⁻¹ · s ⁻¹)	8.92 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶

Una de las características importantes al evaluar en una enzima recombinante es la similitud que tiene con respecto a la enzima modelo. En este trabajo se observó que los parámetros obtenidos por la enzima recombinante obtenida a partir del plásmido utilizado por Acero-Navarro, (2015) y los extractos obtenidos de *P. aeruginosa* (ATCC 7700) crecida en presencia de glucosa obtenidos por Lesslie y Neidhart (1967), son similares en su comportamiento, haciendo que la enzima recombinante empleada en este trabajo sea un gran modelo para estudios posteriores.

El valor de $K_{0.5}$ (que corresponde a la $[S]$ necesaria para alcanzar el 50% de V_{max} , en una representación gráfica sigmoidea) cuando la enzima utiliza $NADP^+$ como coenzima, es menor al obtenido cuando utiliza NAD^+ , por lo que podemos decir que la enzima es más afín por su sustrato G6P cuando trabaja junto con $NADP^+$. También se puede ver que la eficiencia catalítica (valores de K_{cat}/K_m) que tiene la enzima cuando trabaja con $NADP^+$, es mayor que cuando lo hace con NAD^+ .

Otro de los objetivos planteados en esta investigación consistió en determinar la energía de activación requerida por la reacción catalizada por la G6PDHPaR, en las condiciones *in vitro* estudiadas. La literatura nos indica que la energía de activación es aquella cantidad de energía empleada para que la enzima pueda transformar el sustrato en el estado de transición, que puede convertirse en producto (Copeland, 2000). La medición de este parámetro nos permite conocer la velocidad de una reacción; mientras menor sea dicho valor, *menor* la barrera de energía, más colisiones efectivas, y por lo tanto más rápida será la reacción, y viceversa.

Los resultados para determinar la energía de activación de la G6PDHPaR se muestran en el gráfico de Arrhenius (Fig.10), en la que se observa que la reacción catalizada por la enzima, cuando trabaja con $NADP^+$, es ligeramente más lenta que cuando el NAD^+ es cofactor. Resultados similares han sido reportados para la G6PDH de mamífero (Ulusu *et al.*, 2005 y Özer *et al.*, 2002).

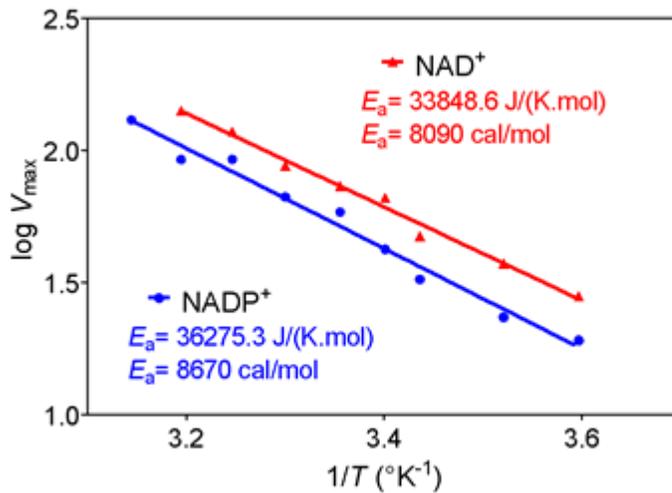


Figura 10.- Gráfico de Arrhenius para las reacciones de G6PDHPaR dependientes de NADP⁺ y de NAD⁺. Se grafica el log de la actividad enzimática obtenida a diferente temperatura, como se describió en Material y métodos, contra el recíproco de la temperatura absoluta utilizada.

4.2.1. Inactivación térmica y estabilidad de la G6PDHPaR

El incremento en la temperatura, utilizado en ensayos anteriores para determinar la energía de activación de la enzima, también puede tener un efecto negativo sobre las proteínas, al desnaturalizarlas e inactivarlas (Copeland, 2000). Para conocer la sensibilidad que presenta la G6PDHPaR hacia este factor, se le incubó a 45, 50 y 55 °C, y se midió su actividad residual a lo largo de 90 min de exposición a estas temperaturas (Fig. 11).

En la Fig. 11 se observa que después de 1 hora de exposición a 45 °C, la enzima se mantiene prácticamente sin cambios, mientras que a 50 °C ha perdido cerca del 50% de actividad, y la expuesta a 55 °C está inactiva. Experimentos realizados con la enzima inactivada en estas dos últimas temperaturas, 50 y 55 °C, en los que se le transfirió de la alta temperatura en que se encontraba, a 25 °C, mostraron que el proceso de inactivación fue irreversible (datos no mostrados).

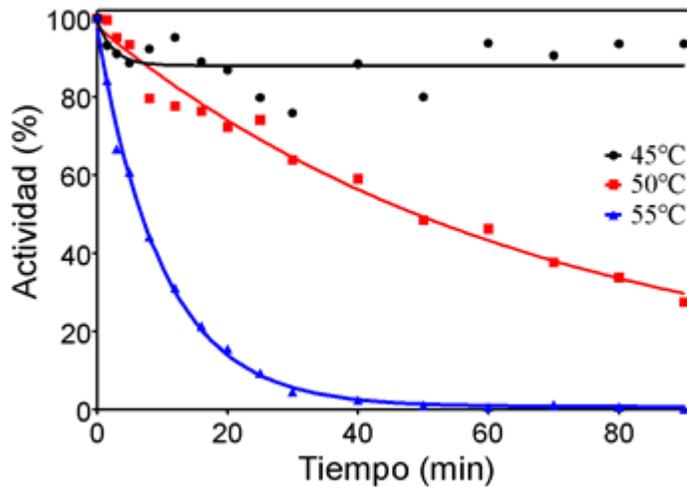


Figura 11.- Cinética de inactivación térmica de la G6PDHPaR. Después de exponer la enzima a las temperaturas y durante los tiempos que se indican, su actividad residual fue medida en un medio de reacción estándar, como se indica en Material y Métodos. El 100% de la actividad corresponde a la que presentó al inicio del experimento, previo a su incubación a las altas temperaturas.

En estudios realizados a otra deshidrogenasa de *P. aeruginosa*, la de la betaína aldehído, se encontró que por encima de los 40°C se inactiva totalmente (Velasco *et al.*, 1999), mientras que para la G6PDHPaR encontramos que a los 45°C se mantiene arriba del 80% de su actividad a lo largo de 90 min.

Wang *et al.*, (2008) demostró que en la G6PDH de organismos eucariontes existe una molécula de NADP⁺ estructural que estabiliza a la enzima y le confiere resistencia a la desnaturalización por temperatura. Sin embargo, no se tiene reporte de que la enzima bacteriana se estabilice por una molécula estructural similar. Kurlandsky *et al.* (1998), mencionan que la unión del NAD⁺, NADP⁺ y G6P a la G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*, que también es anfibólica, provoca cambios conformacionales que le permiten resistir en diferente grado la inactivación por urea y temperatura, y la proteólisis por tripsina.

En esta investigación se probó el efecto estabilizante de G6P saturante (6.0 mM) sobre la G6PDHPaR expuesta a una temperatura que previamente se demostró que la inactiva (55 °C) (Fig. 11). En la Figura 12 se observa que esta concentración del sustrato mantiene parcialmente activa a la enzima, y donde antes se veía una franca caída en la actividad, ahora se mantiene una actividad cercana al 70% durante un periodo prolongado.

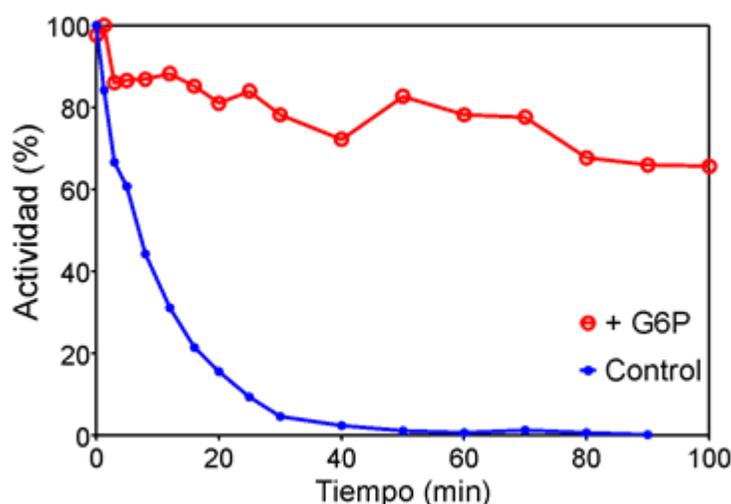


Figura 12.- Efecto termoprotector del sustrato G6P en la actividad de la G6PDHPaR incubada a 55 °C. Previo al experimento, la enzima (60 µg/m) fue incubada durante 30 min en ausencia (como control) y presencia de G6P 6.0 mM. Posteriormente, después de exponer la enzima a 55 °C durante los tiempos que se muestran, su actividad residual fue medida en un medio de reacción estándar, como se indica en Material y Métodos.

El papel termoprotector que tiene la G6P sobre la G6PDHPaR fue retomado en un trabajo posterior realizado en el mismo laboratorio, donde se continuó estudiando la G6PDHPaR (Benítez *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos refuerzan y complementan algunos de los encontrados aquí. En dicha investigación, además de confirmar que la enzima estabilizada por G6P tolera un incremento en la temperatura, también se demostró que es más estable ante la desnaturalización por urea y que

resiste la proteólisis con tripsina. La forma en que el sustrato proporciona dicha estabilidad es interesante, pues el análisis por espectrofluorimetría realizado en dicho estudio, utilizando el colorante 8-anilin-naftalen sulfonato (ANS), demuestra que dicha fortaleza es antecedida por un significativo cambio conformacional provocado por la unión de G6P al sitio activo; la similitud entre los valores de K_d y K_{ia} encontrados para esta molécula, en su papel como ligando estabilizante y como sustrato, respectivamente, apoya lo antes dicho (Benítez *et al.*, 2020).

4.2.2. Efecto del ATP y de diferentes iones sobre la actividad de la G6PDHPaR.

Otro de los objetivos planteados en este estudio, fue probar el efecto del ATP sobre la actividad de la G6PDHPaR, puesto que algunos autores reportan un efecto inhibitorio de este nucleótido que disminuye la afinidad por G6P en la enzima de *P. aeruginosa* (Lessie y Neidhardt, 1967), y en la de *Pseudomonas C* (Bassat y Goldberg, 1980).

El gráfico de la Fig. 13 muestra los resultados del ensayo en el que se midió la actividad de la enzima en función de la concentración del sustrato G6P, en ausencia y en presencia de dos concentraciones de ATP. En la Tabla 3 se presentan los parámetros cinéticos calculados desde este gráfico; en ésta destaca el incremento en los valores de la $K_{0.5}$ a mayor concentración de ATP, sugiriendo que se trata de un efecto tipo competitivo, puesto que afecta la unión del sustrato.

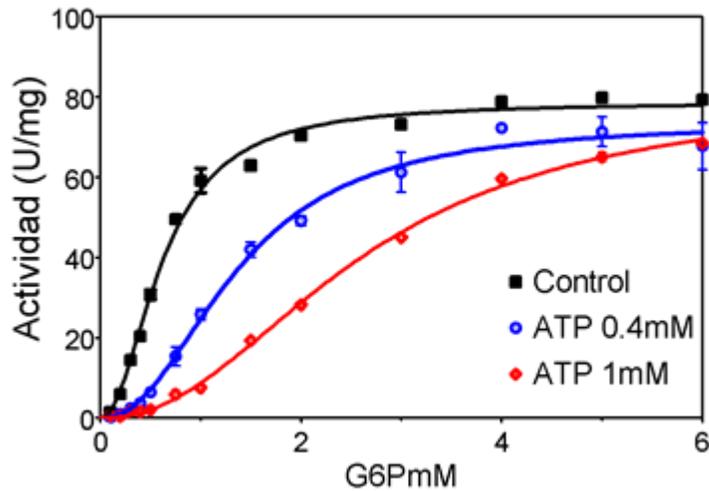


Figura 13.- Efecto del ATP en la actividad de la G6PDHPaR dependiente de NADP⁺, en ausencia de MgCl₂. Las curvas de saturación de la enzima con G6P fueron obtenidas en ausencia y presencia de las concentraciones de ATP que se indican en la gráfica, midiendo su actividad como se indica en Material y Métodos. El medio de reacción también poseía 0.5 mM de NADP⁺, pero carecía de MgCl₂. La reacción se inició al agregar 1.2 µg de la enzima al medio.

Tabla 3.- Parámetros cinéticos determinados para la G6PDHPaR en presencia de ATP.

	V_{max} (U/mg)	n_H	$K_{0.5}$ (mM)
Sin ATP	119.3 ± 1.8	2.05 ± 0.11	0.624 ± 0.019
0.4 mM ATP	112.0 ± 3.2	2.23 ± 0.19	1.365 ± 0.072
1.0 mM ATP	122.2 ± 3.1	2.19 ± 0.08	2.617 ± 0.084

La constante de inhibición (K_i) para el ATP, calculada a partir del gráfico de Dixon (Fig. 14), que relaciona el valor de $K_{0.5}$ obtenido para la enzima en presencia de diferente concentración del inhibidor, es de 0.3 mM. La comparación de este valor con el de la $K_{0.5}$ obtenido en ausencia del inhibidor, indica que bajo las condiciones utilizadas en el ensayo la enzima es más afín por el ATP que por la G6P.

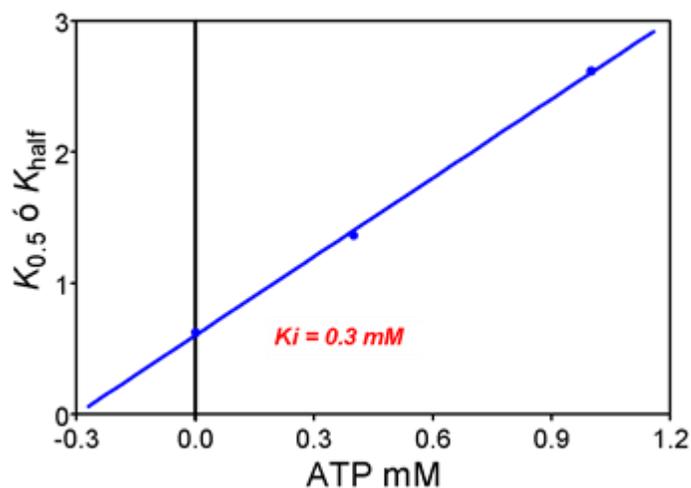


Figura 14.- Determinación de la K_i para el ATP en la G6PDHPaR.
 La gráfica se obtuvo con los valores de la primera y última columna de la Tabla 3.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Lessie y Neidhardt (1967), en el que se evaluó la actividad de G6PDH de *P. aeruginosa* en presencia de concentraciones similares de ATP a las empleadas por este trabajo, se detectó que la actividad enzimática con 0.4mM de ATP en su medio de reacción, el ATP disminuyó la afinidad aparente de la enzima por la glucosa-6-fosfato sin afectar significativamente la actividad de la enzima una vez saturada de sustrato, lo cual concuerda con lo reportado en la Tabla 3. Lo anterior apoya la idea de que la enzima recombinante posee las características cinéticas de la que fuera purificada directamente desde *P. aeruginosa*.

No se sabe exactamente cuál es la función de esta inhibición por ATP en la bacteria, pero los autores sugieren que podría relacionarse con un mecanismo de regulación *in vivo*, al estar presente en diferentes organismos (Lessie y Neidhardt, 1967; Bassat y Goldberg, 1980; Singh *et al.*, 2012, Ulusu *et al.*, 2005).

Tanto Lessie y Neidhardt (1967) como Bassat y Goldberg (1980) mencionan que el Mg^{++} neutraliza el efecto inhibitorio del ATP al neutralizar las cargas negativas de sus grupos fosfato. En la Fig. 15 vemos un ensayo donde se midió el efecto inhibitorio del ATP sobre la actividad de la G6PDHPaR, en ausencia y presencia de $MgCl_2$ 5mM. Como lo reportan los autores antes citados, la presencia del catión divalente aminora la inhibición por el ATP.

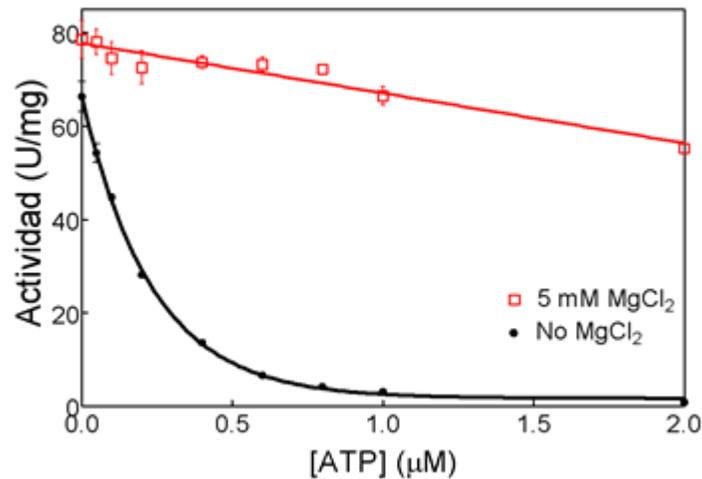


Figura 15.- Efecto del ion Mg^{++} en la inhibición de la G6PDHPaR por ATP. La actividad de la enzima se midió en el medio de reacción estándar conteniendo desde 0.0 hasta 2.0 mM del inhibidor ATP, en ausencia y presencia de 5.0 mM de $MgCl_2$.

Continuando con los objetivos de este estudio, también se planteó valorar la actividad de la enzima recombinante en presencia de otros iones. En la Fig. 17 podemos observar dicha actividad obtenida en un medio de reacción con concentración subsaturante de G6P, y en presencia 100 y 200 mM de sales de cloro de tres cationes monoatómicos (Na^+ , K^+ y Cs^+) y otro poliatómico (NH_4^+).

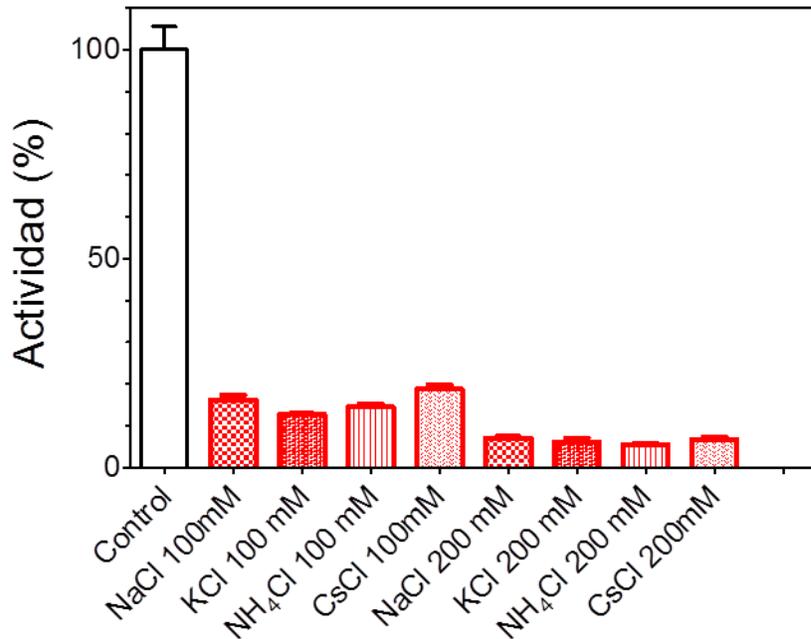


Figura 16.- Inhibición de la G6PDHPaR por 100 mM de diferentes sales de cationes monovalentes, en un medio con concentración subsaturante de G6P. El medio de reacción utilizado fue una modificación del estándar, que además de contener las sales que se mencionan en el gráfico, tenía una concentración 0.625 mM de G6P. La actividad considerada como 100% fue la del control, que se determinó en ausencia de sales.

Se distingue que las sales probadas afectan significativamente y en el mismo grado la actividad de la enzima, teniendo en común que son cloruros. Esto sugiere que es el anión Cl⁻ el causante directo de la inhibición. En la fig.17, vemos un ensayo similar al anterior, pero en donde se probó el efecto de 100 mM de sales de cuatro diferentes aniones (cloruros, acetatos, fosfatos y sulfatos de Na⁺, K⁺ y HN₄⁺) sobre la actividad de la G6PDHPaR. Al igual que en el ensayo anterior el medio de reacción contenía una concentración subsaturante de G6P.

El efecto inhibitorio sobre la actividad, observado con los cloruros (Fig. 17), se vio sobrepasado por el de los fosfatos y sulfatos, que provocaron que la actividad de la enzima fuera casi nula. Las sales de acetato probadas, en cambio, afectaron en

menor medida la actividad de la enzima recombinante.

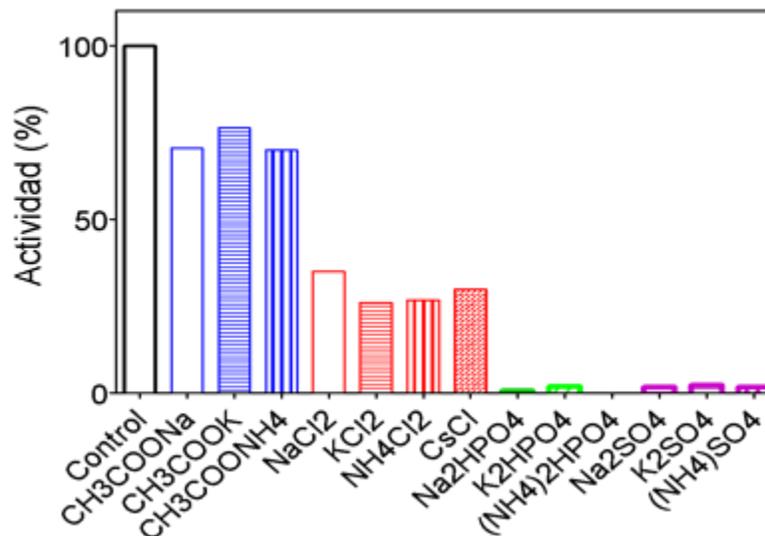


Figura 17.- Inhibición de la G6PDHPaR por 100 mM de diferentes sales de cationes monovalentes, en un medio con concentración subsaturante de G6P. El medio de reacción utilizado fue una modificación del estándar, que además de contener las sales que se mencionan en el gráfico, tenía una concentración 0.625 mM de G6P. La actividad considerada como 100% fue la del control, que se determinó en ausencia de sales.

El efecto inhibitorio del ATP y de los principales aniones que inhiben a la enzima (PO_4^{2-} y SO_4^{2-}), se explica más fácilmente al observar su estructura y el sitio activo de una de las subunidades del dímero de la enzima G6PDHPa (Fig. 18).

Considerando el sitio activo de G6PDHPa, que presenta la carga positiva de la Lisina 179 (K179), a la que de manera natural se une el fosfato de G6P, así como las cargas negativas de los inhibidores sulfato y fosfato, y de la “cola fosfatada” del ATP, podemos suponer que dicho residuo (K179) es el sitio al que se unen dichos compuestos, impidiendo que el sustrato forme el complejo E-S y se realice la catálisis.

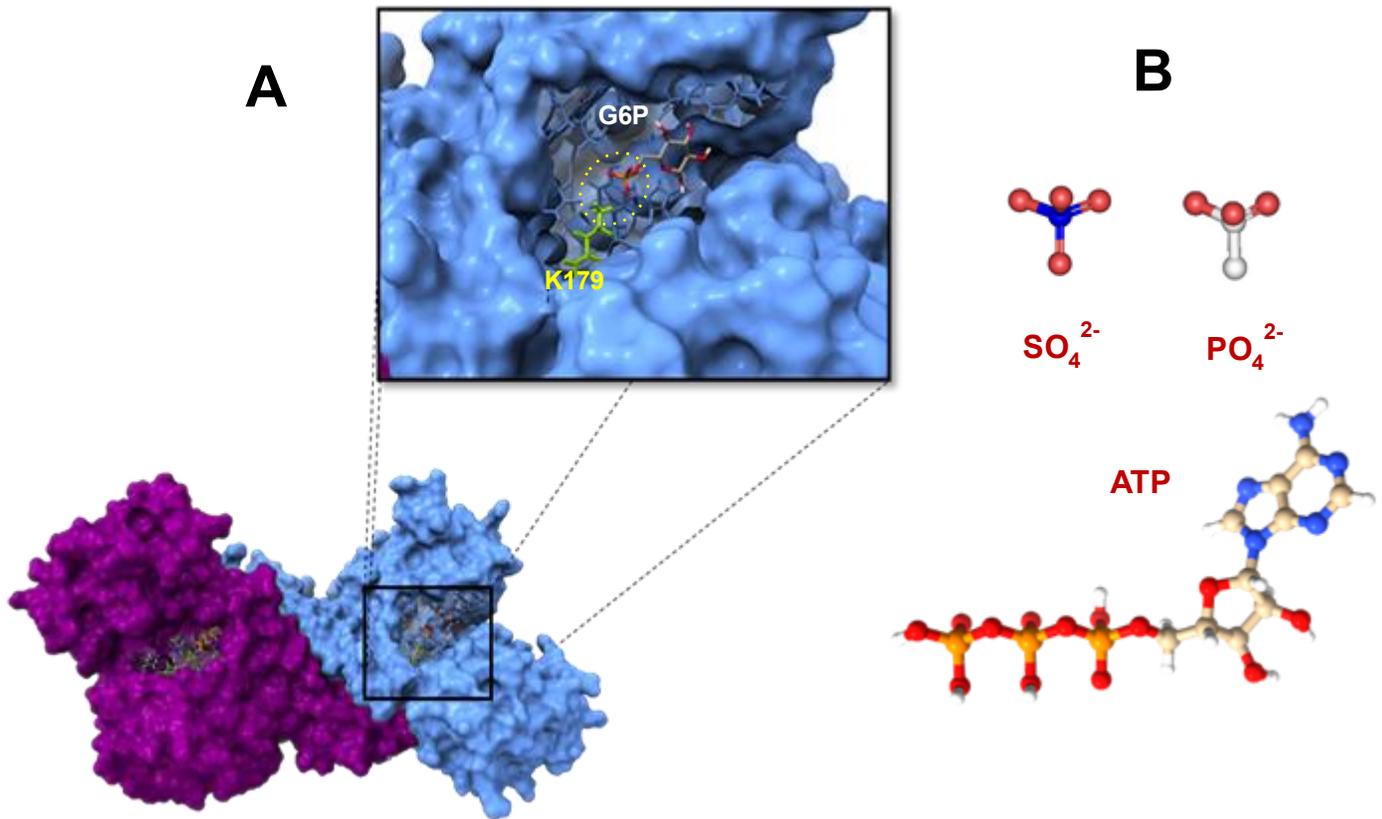


Figura 18.- Modelos estructurales del dímero de la G6PDHPa (A) y de sus inhibidores (B). La ampliación permite ver como la G6P (en café, rojo y blanco) interactúa con algunos residuos del sitio activo de la enzima. En amarillo se presenta la lisina esencial K179, que une el fosfato del sustrato y es esencial para la catálisis. El modelo de la enzima fue obtenido desde el sitio de AlphaFold 2 en internet y renderizado con el programa Chimera.

Lo mencionado anteriormente da pie a plantear otros estudios que continúen lo iniciado por éste y por un trabajo previo (Acero-Navarro, 2015), en cuanto a la caracterización estructural, funcional y fisiológica de la G6PDH de *P. aeruginosa*, una enzima que podría ser importante en la regulación del metabolismo de esta bacteria de importancia médica, y por ende, un potencial blanco de sustancias que podrían ayudar a controlar las infecciones que provoca.

5. CONCLUSIONES

-Se estandarizó una metodología que permite purificar hasta 38.6 mg de la enzima G6PDHPaR por litro de cultivo de bacteria transformante, con un rendimiento de 61%. Este es un logro significativo, ya que, con la metodología de nuestro antecedente directo, se purificaban 18.4 mg/L de esta proteína, y con un rendimiento de 33.8%.

-Se buscaron condiciones para la actividad óptima de la enzima recombinante, como el pH y la concentración de Mg^{++} , lo que también permitió determinar sus parámetros cinéticos aparentes.

-Se comprobó que el ATP compite por el mismo sitio al que se une la G6P, y se estableció que diversos aniones, entre los que destacan el fosfato y el sulfato, también la inhiben.

-Las características cinéticas de la enzima recombinante, así como su respuesta hacia el ATP como inhibidor, son similares a las de la purificada desde *P. aeruginosa*, indicando que no se modifica durante los procesos de sobreexpresión y purificación.

-La recombinante purificada es estructuralmente estabilizada por la unión de G6P.

6. REFERENCIAS

- Acero-Navarro, K. E. 2015. Clonación, sobreexpresión y purificación de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. pp 62.
- Anderson, B.M. y Anderson, C.D. 1995. Purification and characterization of *Azotobacter vinelandii* glucose-6-phosphate dehydrogenase: dual coenzyme specificity. *Archives of biochemistry and biophysics* 321: 94-100.
- Aranda P., Planells E. y Llopis J. (2000). Magnesio. Scientific communication: art o techique? *Ars Pharmaceutica*, 41 (1); 91-100.
- Bassat B. A. y Goldberg, I. 1980. Purification and properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (NADP⁺/NAD⁺) and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase (NADP⁺/NAD⁺) from Methanol-Grown *Pseudomonas C.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 611: 1-10.
- Benítez-Rangel E., Rodríguez-Hernández A. y Velasco-García R. 2020. The substrate of the glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* provides structural stability. *BBA - Proteins and Proteomics* 1868. 140331.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-257.
- BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System. Disponible en: <https://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=1.1.1.363>
- Cacciapuoti A. F. y Lessie T. G. 1977. Characterization of the fatty acid-sensitive Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of*

- bacteriology* 132 (2): 555-563.
- Copeland A. R. 2000. ENZYMES. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Second Edition. pp.390.
 - García Ortega A. M. y Ponce Rivas E. (2003). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biotecnología Aplicada*. 20 (2):85-94.
 - Gill S.C., von Hippel P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 182: 319–326.
 - Govan, J. R. W., and G. S. Harris. 1986. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiological Sciences*. 3:302–308.
 - Govan, J. R. W., and J. W. Nelson. 1992. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *British Medical Bulletin*. 48:912–930.
 - GraphPad version 5.00. Disponible en: www.graphpad.com.
 - Greenberg, E. P. 2000. Bacterial genomics. Pump up the versatility. *Nature* 406, 947–948.
 - Grove T. H., Ishaque A. y Levy H. R. 1976. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177: 307-316.
 - Haghighi B., Aghatabar A. M. y Shahsavari G. H. 2005. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*: ligand-induced conformational change. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A*. 29 (A1): 71-78.
 - Hatch, R. A., and N. L. Schiller. 1998. Alginate lyase promotes diffusion of

- aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 974–977.
- Hicks J. J. y Méndez J. D. (1998) Bioquímica e inmunología. Capítulo 6. Enzimas.
 - Hu W., Zhi L., Zhuo M. Q., Zhu Q. L., Zheng J. L., Chen Q-Liang, Gong Y., Liu C. X. 2013. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and inhibition effects of several metal ions on G6PD activity in vitro. *Fish Physiology Biochemistry* 39: 637–647.
 - Hunt, H.C. y Phibbs Jr., P.V. 1983. Regulation of Alternate Peripheral Pathways of Glucose Catabolism During Aerobic and Anaerobic Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2(154): 793-802.
 - Kurlandsky S. B., Hilburger A. C. y Levy H. R. 1998. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*: Ligand-induced Conformational Changes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 264(1): 93-102.
 - Laemmli, U. K. 1970. Most commonly used discontinuous amortiguador system for SDS electrophoresis. *Nature* 227: 680-685.
 - Lessmann, D., Schimz, K.L. y Kurz, G. 1975. D-Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Entner-Doudoroff Enzyme) from *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Biochemistry* 59: 545-559.
 - Lessie, T. y Neidhardt, F. C. 1967. Adenosine Triphosphate-Linked Control of *Pseudomonas aeruginosa* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 93(4): 1337-1345.
 - 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.
- MacGowan P. A. 2008. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, Suppl. 2, ii105–ii114.
 - McCarthy, K. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and implications for therapy. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 36: 44- 55.
 - Minucci A., Giardina B., Zuppi C. y Capoluongo E. 2009. Critical Review. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, When and Why? *IUBMB Life*, 61(1): 27–34.
 - 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. *Journal Biological Chemistry*. 290 (43): 25920–25932.
 - Ornston L. N. 1971. Regulation of catabolic pathways in *Pseudomonas*. *Bacteriological reviews* 35 (2): 87-116.
 - Özer N., Bilgi C. y Ögus I.H. 2002. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *The international journal of biochemistry and cell biology* 34: 253-262.
 - Paz Zarzal, V. M., Mangwani Mordani, S., Martínez Maldonado, A., Álvarez Henández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180-189.
 - Peix A, Ramírez-Bahena M. H., Velázquez E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetic and Evolution*;

- 9(6): 1132-47.
- Penefsky, H. S. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. 252:2891–2899.
 - Pereira S.G., Rosa A.C., Cardoso O. (2015). Virulence factors as predictive tools for drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*; 6 (7): 679-83.
 - Ragunathan S. y Levy H.R. 1994. Purification and Characterization of the NAD-preferring glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2): 360-366.
 - Sabra W, Kim EJ, Zeng AP. (2002). Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology (Reading)*. 148 (Pt 10):3195-3202.
 - Scopes R. K. 1997. Allosteric control of *Zymomonas mobilis* glucosa-6-phosphate dehydrogenase by phosphoenolpyruvate. *Biochemical Journal* 326: 731–735.
 - Scopes R. K., Testolin V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K. y Algar, E.M. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6- phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Journal* 228(3): 627-634.
 - Silo-Suh, Laura, Suh, S.-J., Phibbs, P.V. y Ohman, D.E. 2005. Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the Cystic Fibrosis Lung Environment Can Include Deregulation of *zwf*, Encoding Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 187(22): 7561-7568.
 - Singh S., Anand A. y Srivastava P. K. 2012. Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 4: 1-19.

- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F.S. L., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K.-S., Wu Z., Paulsenk I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E. W., Lory S. y M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Velasco-García, R. Mujica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. y Muñoz-Clares, R.A. 1999. Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 181(4): 1292-1300.
- [UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers](#). Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. *Protein Sci.* 2021 Jan;30(1):70-82.
- Ulusu N. N., Tandogan B., Tezcan F. E. 2005. Kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from lamb kidney Cortex. *Biochimie* 87: 187-190.
- Vander W. J. C. y Lessie T. G. 1974. Purification and Characterization of the *Pseudomonas multivorans* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Active with Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Journal of Bacteriology*. 120 (3): 1033-1042.
- 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.