

UCH-FC  
DOC-BMCN  
042  
C.1

**Impacto metabólico de la producción de NADH en la  
vía de las pentosas en *Escherichia coli***

## **Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología  
Molecular, Celular Y Neurociencias**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Karel Olavarria Gamez**

**Octubre, 2012**

**Director de Tesis:**

**Dr. Ricardo Mauricio Cabrera Paucar**

**Co-Director de Tesis:**

**Dr. Juan Carlos Letelier Parga**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**Karel Olavarria Gamez**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de Octubre del 2012.

Director de Tesis:

Dr. Ricardo M. Cabrera Paucar .....

Co-Director de Tesis

Dr. Juan C. Letelier Parga .....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Victoria Guixé (Presidenta) .....

Dr. Jaime Eyzaguirre .....

Dr. Tulio Núñez .....

Dr. Mauricio González .....

Dr. Francisco Chávez .....

DEDICATORIA

..

A mis padres

A los que están presos por luchar por un mundo mejor

A los optimistas

## AGRADECIMIENTOS

- A mis tutores, por ser grandes científicos, incansables trabajadores y valiosísima fuente de inspiración.
- A mi familia, que siempre ha esperado de mi lo mejor, pero siempre me ha apoyado en lo peor.
- A Ediane Amorim, porque con ella todo es *pa'lante y pa'riba*.
- A mis amigos, que han sustituido a los hermanos que no tuve. A Gustavo, Omar, Mavibemar, Ariadna, Miguel, Mycelis, Karen, Denis, Mariela, Analía, Maité, Damián, Ángel, Vieri, María, Joel.
- A mis compañeros del Doctorado y demás colegas que me han enseñado y ayudado tanto. En especial a Mauricio Báez, Rodrigo Muñoz, Diego Valdés, Matías Fuentealba, Álvaro Banderas, Adam Feist, Jessica de Ingeenis, Douglas Taylor, Oleg Kurnasov y Xiaoqing Li.
- A B.Ø. Palsson, A. Osterman y R. Garrat que me abrieron las puertas de sus magníficos laboratorios.
- Al personal técnico, funcionarios y secretarias que hacen una gran labor pocas veces reconocida.
- A los fondos otorgados por instituciones de Chile, Uruguay y Brasil que han sido decisivos para mi formación.
- Al equipo femenino de voleibol de Cuba y a Irakere, que han mostrado que negros, mujeres y pobres también pueden llegar a lo más alto.
- A Elegguá

## INDICE DE MATERIAS

### INTRODUCCION 1

### MATERIALES Y METODOS 11

- Obtención de los plásmidos necesarios para la expresión y purificación de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> ..12
- Purificación de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> ..15
- Estudios cinéticos de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> ..19
- Obtención de las cepas recombinantes ..23
- Monitoreo de las curvas de crecimiento y obtención de muestras de células y de medio de cultivo ..25
- Actividades específicas de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> en los extractos celulares provenientes de las diferentes cepas en estudio ..27
- Determinación de las concentraciones de glucosa y acetato en el medio de cultivo ..28
- Medición de los flujos intracelulares mediante la cuantificación de los isotopómeros de la histidina ..29
- Análisis del balance de los flujos ..32
- Tratamiento estadístico de los datos experimentales ..34

### RESULTADOS 40

- Estudios de velocidad inicial con la enzima EcG6PDH ..40
- Curvas de progreso de las reacciones catalizadas por la EcG6PDH ..45
- Una solución analítica para el estudio de la inhibición competitiva por producto ..49
- Inhibición por NADH de la enzima EcG6PDH ..51
- Sensibilidad de la actividad de la EcG6PDH al cociente redox NAD(P)/NAD(P)H ..54
- Caracterización cinética de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> ..60
- Predicciones con el FBA del efecto sobre el crecimiento y la distribución de los flujos del cambio en la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ..61
- La sustitución de la enzima EcG6PDH por la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> provoca cambios en las tasas de crecimiento y modificaciones inesperadas en los flujos metabólicos ..63
- La especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa determina el impacto sobre el crecimiento del flujo por la vía de las pentosas ..69

## DISCUSION 77

- Sobre la importancia de los estudios cinéticos realizados ..80
- Un enfoque más integral de la especificidad por cofactor de una deshidrogenasa ..82
- LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> es una enzima con las propiedades deseadas ..85
- Desde la ingeniería de enzimas al estudio del metabolismo ..87
- Aplicaciones y limitaciones del FBA en este estudio ..89

## CONCLUSIONES 98

## BIBLIOGRAFIA 99

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1: Representación de las vías centrales del metabolismo en *Escherichia coli*. ..3
- Fig. 2: Comportamiento de las constantes cinéticas principales para el cofactor NADP a diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa-6-fosfato (G6P). ..44
- Fig. 3: Comportamiento de las constantes cinéticas principales para el cofactor NAD a diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa-6-fosfato (G6P). ..45
- Fig. 4. Inhibición de la EcG6PDH por parte del producto NADPH. ..48
- Fig. 5. Velocidades iniciales de reacciones catalizadas por EcG6PDH con y sin presencia de NADH. ..52
- Fig. 6: Modelación de la producción de NADPH y NADH por parte de la enzima EcG6PDH para diferentes valores de la razón NAD(P)/NAD(P)H. ..59
- Fig. 7. Actividades específicas de las diferentes formas de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa registradas en los extractos celulares provenientes de las cepas en estudio. ..64
- Fig. 8: PCR cuantitativo del locus *zwf*. ..70
- Fig. 9: Variables analizadas para investigar el costo reducido sobre el crecimiento del uso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. ..74
- Fig. 10: Costos reducidos del uso de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> dadas diferentes tasas de consumo de glucosa y diferentes porcentajes de partición entre la glicólisis y la vía de las pentosas. ..75
- Fig. 11: Costos reducidos del uso de la enzima nativa EcG6PDH dadas diferentes tasas de consumo de glucosa y diferentes porcentajes de partición entre la glicólisis y la vía de las pentosas. ..76
- Fig. 12: Modelación de la variación de diferentes flujos según la tasa de consumo de oxígeno. ..93

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1: Parámetros cinéticos de la enzima EcG6PDH. ..42
- Tabla 2: Estimados de las constantes cinéticas de EcG6PDH obtenidos por diferentes métodos. ..49
- Tabla 3: Inhibición de la EcG6PDH por el producto NADH. ..52
- Tabla 4: Datos bioquímicos y fisiológicos de *E. coli* recopilados de la literatura citada. ..58
- Tabla 5: Estimados de los parámetros cinéticos de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>. ..61
- Tabla 6: Razón entre las actividades específicas con NAD<sup>+</sup> y NADP registradas en extractos celulares provenientes de la cepa NAD-G6PDH. ..62
- Tabla 7: Resultados de la modelación a priori de los flujos metabólicos y las tasas de crecimiento esperadas para las cepas carentes del gen *pgi*. ..68
- Tabla 8: Valores experimentales de las variables fisiológicas estudiadas obtenidos en las cepas carentes del gen *pgi*. ..71
- Tabla 9: Flujos metabólicos internos estimados mediante el análisis de variabilidad de los flujos (FVA) en las cepas carentes del gen *pgi*. ..71
- Tabla 10: Valores experimentales de las variables fisiológicas estudiadas obtenidos en las cepas silvestre, *inact-G6PDH* y NAD-G6PDH. ..72
- Tabla 11: Flujos metabólicos internos estimados mediante el análisis de variabilidad de los flujos (FVA) para el resto de las cepas en estudio. ..72



## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

- EcG6PDH: enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli*
- LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>: enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* modificada para que en sus residuos 46 y 47 aparezca un residuo de ácido aspártico.
- LmG6PDH<sup>R46EQ47ED16G</sup>: idéntica a LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> pero además en el residuo 16 aparece una glicina.
- FBA: Flux Balance Analysis, en español podría traducirse como Análisis del Balance de los Flujos.
- pgi: gen codificante para la enzima fosfo-gluco-isomerasa
- zwf: gen codificante para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

## RESUMEN

Para estudiar la importancia metabólica de la selectividad por el NADP de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli* (EcG6PDH), 1) se estudiaron las propiedades cinéticas de la EcG6PDH utilizando NAD y NADP como cofactores y 2) se sustituyó la secuencia cromosomal codificante para aminoácidos de la EcG6PDH por la secuencia codificante para aminoácidos de una enzima homóloga pero específica para NAD.

Con la inserción del gen *zwf* de *E. coli* en un vector diseñado para lograr altos niveles de expresión y facilitar la purificación por afinidad, fue posible obtener la enzima EcG6PDH en suficiente calidad y cantidad para hacer ensayos cinéticos.

Se realizaron mediciones de la velocidad inicial con y sin presencia del producto NADPH. Para evadir algunos problemas metodológicos asociados a la medición de la velocidad inicial de la reacción catalizada por la EcG6PDH se desarrolló una solución analítica para la ecuación integrada que describe la evolución temporal de la concentración de sustrato, considerando la inhibición por el producto. La solución encontrada permitió obtener estimados de  $K_M$ ,  $k_{cat}$  y  $K_i$  con el análisis global de varias curvas de progreso. La solución analítica propuesta se utilizó para estudiar, por primera vez, la inhibición por producto de la enzima EcG6PDH por parte del NADH.

Se obtuvo una expresión matemática simple que calcula la producción relativa de NADH y NADPH en función de los cocientes redox NAD(P)/NAD(P)H. Dicha expresión utiliza los parámetros cinéticos determinados para la EcG6PDH y otros datos experimentales obtenidos de la literatura.

Mediante simulaciones de dinámica molecular fue posible hipotetizar que los residuos 46 y 47 de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* son muy importantes para la unión del NADP al sitio activo de esta enzima de preferencia dual. Se diseñó entonces una estrategia de cambio de especificidad basada en la introducción de residuos de carga negativa en esas posiciones. Se generó la doble mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>, se purificó, y se determinaron sus parámetros cinéticos mediante el monitoreo de curvas de progreso. Se observó que la doble mutante tenía una clara preferencia por NAD con respecto al NADP. Se obtuvo también una forma inactiva de la enzima (LmG6PDH<sup>D16GR46EQ47E</sup>), incapaz de catalizar la reacción ni con NAD ni con NADP.

Mediante recombinación homóloga se sustituyó la secuencia cromosomal codificante para aminoácidos de la EcG6PDH por la secuencia codificante para aminoácidos de la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>. Dicha sustitución se llevó a cabo tanto en la cepa silvestre MG1655 como en una cepa isogénica carente del gen codificante para la fosfo-glucosa-isomerasa ( $\Delta pgi$ ). La sustitución por la forma inactiva de la enzima se realizó solamente en la cepa silvestre. Las cepas recombinantes obtenidas y sus correspondientes cepas parentales

fueron estudiadas en condiciones de crecimiento aeróbico con glucosa como única fuente de carbono. Se monitorearon las tasas de crecimiento, de captación de glucosa y de producción de acetato. Para determinar el porcentaje de glucosa procesado por la rama oxidativa de la vía de las pentosas, bacterias de las cepas con el gen *pgi* fueron alimentadas con una mezcla de glucosa no marcada con glucosa uniformemente marcada con Carbono 13, y se cuantificó, mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, la abundancia relativa de los isotómeros de la histidina proveniente de las proteínas.

La modelación computacional de la distribución de los flujos se realizó mediante un análisis del balance de los flujos con el programa COBRA v2.0 y el modelo *in silico* de *E. coli* iAF1260. Dicha metodología fue utilizada tanto para predecir cuál sería la distribución de los flujos tras la sustitución de la enzima EcG6PDH por la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> como para estimar la distribución real de los flujos, utilizando como restricciones el porcentaje de partición de la glucosa entre la glicólisis y la vía de las pentosas, la tasa de consumo de glucosa, la tasa de producción de acetato y la tasa de crecimiento. La modelación predijo que la introducción de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa NAD-preferente en lugar de la enzima nativa provocaría un aumento en la tasa de crecimiento en la cepa  $\Delta pgi$ , pero si *pgi* está presente el reemplazo provocaría el no uso de la rama oxidativa de la vía de las pentosas y con ello una ligera merma en la tasa de crecimiento.

Mediante ajustes globales, se estimaron los parámetros cinéticos de la enzima EcG6PDH para los sustratos G6P, NADP y NAD. La dependencia de los parámetros cinéticos con la concentración de los co-sustratos y el patrón observado de inhibición por NADPH permitieron descartar un mecanismo ping-pong y apoyaron la hipótesis de un mecanismo aleatorio bajo el supuesto de equilibrio rápido, o un mecanismo ordenado con el cofactor entrando primero al sitio activo, bajo la suposición de estado estacionario.

Al estimar también el valor de los parámetros cinéticos para las reacciones cuando el NAD es el aceptor de los electrones, se pudo calcular el cociente entre las constantes de especificidad para uno y otro cofactor y determinar que la preferencia por NADP sobre NAD de la EcG6PDH es de alrededor de 400 veces. Según el cociente de las constantes de especificidad, LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> es 167 veces más específica por NAD que por NADP, con lo cual se logró una enzima cuya especificidad por NAD es del mismo orden que la especificidad por NADP de la EcG6PDH.

La evaluación de la expresión matemática que relaciona la actividad de la EcG6PDH con los cocientes redox NAD(P)/NAD(P)H mostró que la actividad de esta enzima es mucho más sensible a variaciones en las concentraciones fisiológicas de NADP(H) que a las variaciones en las concentraciones fisiológicas de NAD(H).

Por otra parte, la sustitución de la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> modificó las tasas de captación de glucosa, de producción de acetato y los flujos metabólicos. En la cepa  $\Delta pgi$  con la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> la tasa

de crecimiento aumentó 44% con respecto a su cepa parental, pero es un 36% del valor registrado en la cepa silvestre. Este resultado apoya la hipótesis esbozada por otros autores de que existe un límite cinético en la cantidad de glucosa que puede ser catabolizada a través de la vía de las pentosas.

Contrario a las predicciones generadas con el modelo *in silico*, en presencia del gen *pgi*, la sustitución de la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> disminuyó el porcentaje de flujo por la vía de las pentosas pero no se hizo cero. Inesperadamente también, la tasa de consumo de glucosa disminuyó y provocó una caída de 44% en la tasa de crecimiento. Esta cepa mutante con la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> no excretó acetato.

En la cepa donde se sustituyó la EcG6PDH por la forma inactiva de la enzima la tasa de crecimiento cayó solamente un 16% con respecto a la cepa silvestre y no se detectó flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas. Sus tasas de crecimiento y de excreción de acetato fueron similares a las observadas por otros autores para la cepa  $\Delta zwf$ , confirmando que la proteína LmG6PDH<sup>D16GR46EQ47E</sup> es incapaz de permitir el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas.

Para entender por qué la respuesta regulatoria ante la existencia de flujo a través de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> fue la disminución de la entrada de glucosa, se exploró el costo reducido sobre el crecimiento del flujo a través de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (fuera NAD o NADP dependiente) para todas las configuraciones posibles de entrada de glucosa

entre 1 y 10 mmol\*gDW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>, repartiéndose entre la glicólisis y la vía de las pentosas desde 0 hasta 98%. Las simulaciones computacionales mostraron que las tasas de captación de glucosa y el porcentaje de flujo por la vía de las pentosas observados corresponden a valores que maximizan el impacto positivo sobre el crecimiento (si está la enzima nativa EcG6PDH) o minimizan el impacto negativo sobre el crecimiento (si está la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>) del flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas. El análisis integrado de los resultados aquí obtenidos muestra que EcG6PDH es una enzima altamente específica por NADP, y esta alta especificidad es una característica clave para el ingreso y la distribución de la glucosa en *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

To study the metabolic importance of the NADP-selectivity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* (EcG6PDH), 1) the kinetic properties of EcG6PDH were studied using both NAD and NADP and 2) the chromosomal sequence codifying for the aminoacids of the EcG6PDH was replaced by the sequence codifying for aminoacids from a NAD-preferring homologous enzyme.

After the insertion of gene *zwf* from *E. coli* in a plasmid designed to obtain high-expression levels and facilitate the affinity-based purification, it was possible to obtain the enzyme EcG6PDH in an enough quantity and suitable quality to perform kinetic assays.

Initial rates measurements were taken with and without the addition of the product NADPH. To overcome some methodological problems arising during the initial rates estimations with the enzyme EcG6PDH, it was developed an analytical solution for the integrated equation describing the time-dependent changes in the concentration of the substrate, which considered the product inhibition. The obtained solution allowed the estimation of  $K_M$ ,  $k_{cat}$  and  $K_i$  in a single global fitting procedure for a group of progress curves. The proposed solution was used to study, for the first time, the product inhibition of EcG6PDH by NADH.



A simple mathematical expression was obtained to calculate the relative production of NADH and NADPH depending on the redox quotients NAD(P)/NAD(P)H. This expression employed the kinetic parameters estimated for the EcG6PDH plus another experimental data obtained from the literature.

By molecular dynamics simulations it was possible to hypothesize that the residues 46 and 47 of the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* are very important for the NADP binding to the active site of this dual-preferring enzyme. Therefore, a strategy to accomplish the cofactor preference shift was designed based on the introduction of residues with negative charge in these positions. The double mutant LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> was obtained, purified, and the kinetic parameters were determined by progress curves analysis. It was observed that the double mutant had a clear preference for NAD respect to NADP. An inactive form of the enzyme (LmG6PDH<sup>D16GR46EQ47E</sup>) was obtained, which was unable to catalyze the reaction neither with NAD or NADP.

The chromosomal sequence codifying for the aminoacids of the EcG6PDH was replaced by the sequence codifying for aminoacids of the LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> by homologous recombination. This replacement was done both in the wild type strain MG1655 and in an isogenic strain lacking the gene codifying for the enzyme phospho-gluco-isomerase ( $\Delta pgi$ ). The substitution for the inactive form of the enzyme was done, using the same method, only in the wild type parental. The parental and recombinant strains

were studied while growing in aerobic conditions with glucose as the sole carbon source. Growth rates, glucose uptake rates and acetate excretion rates were monitored. To assess the percentage of glucose oxidized by the oxidative branch of the pentose-phosphate pathway, bacteria from the strains bearing the gene *pgi* were fed with a mixture of non-labeled glucose and glucose uniformly labeled with  $C^{13}$ , and the relative abundances of the different isotopomers of the histidine coming from the proteins were quantified by gas chromatography-mass spectrometry.

The flux distribution computational modeling was accomplished by a flux balance analysis with the software COBRA v2.0 and the *E. coli in silico* model iAF1260. This methodology was useful both for prediction of the distribution of the fluxes after the enzymatic replacement and for calculation of the actual fluxes constraining the solutions with the data of flux partition between the glycolysis and the pentose-phosphate pathway, the glucose uptake rates, the acetate excretion rates and the growth rates. The flux balance analysis predicted that the replacement of the native EcG6PDH by a NAD-preferring homologue implied an increase in the growth rate in the strain  $\Delta pgi$ , but if *pgi* is present then the replacement implied the blockage of the flux through the oxidative branch of the pentose-phosphate pathway and consequently a slight diminution in the growth rate.

The kinetic parameters of the enzyme EcG6PDH with the substrates G6P, NAD and NADP were estimated by a global fitting procedure. The dependence of the kinetic parameters on the concentration of the respective

co-substrate, and the pattern of inhibition observed after the addition of NADPH allowed to discard a ping-pong mechanism and support the hypothesis of a random mechanism under the establishment of a rapid-equilibrium, or a mandatory mechanism with the cofactor being the first substrate to enter in the active site under the supposition of steady state.

Having the kinetic parameters for the reactions where NAD is the acceptor of the electrons; it was possible to calculate the quotient between the specificity constants for the cofactors and estimate that the actual preference of EcG6PDH for NADP over NAD is around 400 times. According to the quotient between the specificity constants, LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> is 167 times more specific for NAD than for NADP, therefore, the double mutant has a specificity for NAD of the same order of magnitude that the specificity of the native enzyme for NADP.

The evaluation of the mathematical expression relating the activity of EcG6PDH with the redox quotients NAD(P)/NAD(P)H showed that the activity of this enzyme is much more sensitive to the variations of NADP(H) in the physiological range than to the variations of NAD(H) in its physiological range.

On the other hand, the substitution of the EcG6PDH by the LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> modified the glucose uptake rates, the acetate excretion rates and the metabolic fluxes. In the strain  $\Delta pgi$  with the enzyme LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> the growth rate increased 44% respect to the parental strain, but still grew with a growth rate 36% smaller than the wild type growth

rate. This latter result support the hypothesis, stated by another authors, of a kinetic limitation in the amount of glucose that it is possible to catabolize through the pentose-phosphate pathway.

Against the *in silico* generated predictions, in the presence of the gene *pgi*, the substitution of the EcG6PDH by the LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> diminished the percentage of the flux through the pentose-phosphate pathway but was not zero. Also unexpectedly, the glucose uptake rate diminished and provoked a fall of 44% in the growth rate. This strain did not produce acetate.

In the strain where EcG6PDH was replaced by the inactive form of the enzyme, the growth rate dropped only 16% respect to the wild type strain and no flux was detected through the oxidative branch of the pentose-phosphate pathway. The observed growth rate and the acetate excretion rates were similar to the corresponding values in the strain  $\Delta zwf$  observed by another authors, which confirmed that the protein LmG6PDH<sup>D16GR46EQ47E</sup> was unable to sustain the flux through the oxidative branch of the pentose-phosphate pathway.

To understand why the regulatory response to the non-blockage of the flux through the mutant enzyme LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> was the diminution in the glucose uptake rate, it was calculated the reduced cost on the growth rate of the flux through the glucose-6-phosphate dehydrogenase (NAD or NADP dependent) for all the possible configurations considering glucose uptake rates between 1 and 10 mmol\*gDW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>, splitted between the glycolysis and the pentose-phosphate pathway from 0 to 98%. The computational

simulations showed that the observed glucose uptake rates and the observed percentages of partition between the glycolysis and the pentose-phosphate pathway were values who maximize the positive impact on the growth rate (case the native EcG6PDH was present) or minimize the negative impact on the growth rate (case the mutant LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> is present) of the flux through the oxidative branch of the pentose-phosphate pathway.

The integral analysis of the here obtained results showed that the EcG6PDH is a highly NADP-specific enzyme, and this high specificity is a key trait for the glucose uptake and distribution in *Escherichia coli*.

## INTRODUCCION

En los organismos heterótrofos, la entrada de nutrientes a la célula permite el ingreso de sustancias con alto poder reductor. Este poder reductor genera un potencial electroquímico entre los aceptores iniciales y los aceptores finales de los equivalentes de reducción. Este potencial impulsa los procesos celulares de transferencia de energía, biosíntesis y regulación del medio interno. Los aceptores iniciales principales son moléculas fabricadas por el propio metabolismo: el NAD y el NADP, las cuales al reducirse forman el NADH y el NADPH respectivamente.

El potencial de óxido-reducción intracelular de los pares NAD(H) y NADP(H) no es igual, pese a que su potencial de óxido-reducción estándar es idéntico, porque si bien casi todo el NAD(H) se encuentra en la forma oxidada, casi todo el NADP(H) se encuentra en su forma reducida (Reich y Sel'kov, 1981). El mantenimiento de estos potenciales de óxido-reducción intracelulares son los que permiten, en última instancia, el mantenimiento de los procesos que permiten la vida.

Pese a su similitud estructural, el NADH y el NADPH tienen funciones metabólicas segregadas: el NADH generalmente se reoxida a NAD en procesos que implican la síntesis de ATP; mientras que el NADPH generalmente se reoxida a NADP al entregar poder reductor en los procesos de biosíntesis y en

la defensa antioxidante. En el caso de *Escherichia coli*, la producción del NADH y el NADPH también ocurre de manera segregada: se considera que en las reacciones catalizadas por las deshidrogenasas de las vías centrales en esta bacteria se produce casi exclusivamente uno u otro tipo de cofactor (Fuhrer y Sauer, 2009) (Fig. 1). Sin embargo, *en esta bacteria no se ha realizado una cuantificación rigurosa de las especificidades por uno u otro cofactor de todas las enzimas deshidrogenasas presentes en las vías centrales*. Dada esta segregación en los puntos de producción de NADH y de NADPH, el mantenimiento de los diferentes potenciales de óxido-reducción intracelulares para los pares NAD(H) y NADP(H) depende, en gran medida, de cómo se regule la magnitud de los flujos metabólicos por las vías centrales. Por lo tanto, la especificidad por cofactores de las deshidrogenasas puede ser un factor importante en la regulación de los flujos metabólicos.

Los principales avances para comprender la regulación de los flujos metabólicos a través de las vías centrales en *E. coli* se han logrado con la observación del efecto de la eliminación de las enzimas involucradas en la partición del flujo a nivel de la glucosa-6-fosfato y de las enzimas transhidrogenasas. Una de estas mutantes es la cepa carente de la enzima fosfo-gluco-isomerasa ( $\Delta pgi$ ). En esta mutante toda la glucosa asimilada tiene que ser catabolizada por la rama oxidativa de la vía de las pentosas, pasando por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa, lo cual genera una cantidad de NADPH excesiva con respecto al resto de los precursores que se necesitan para renovar los componentes de la biomasa. Este es uno de los

motivos por los cuales esta cepa tiene una tasa de crecimiento 76% menor que la cepa silvestre (Sauer y cols., 2004). Las principales evidencias de que existe

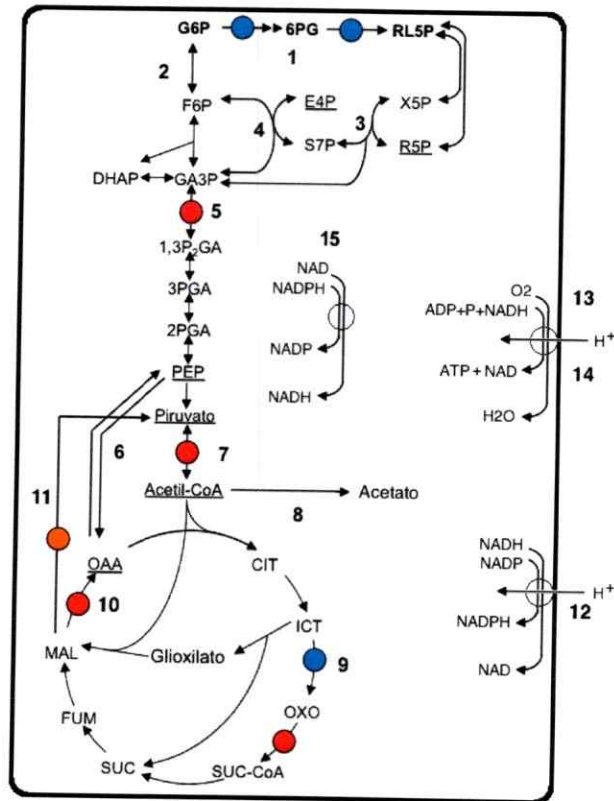


Fig. 1: Representación de las vías centrales del metabolismo en *Escherichia coli*. 1) Rama oxidativa de la vía de las pentosas; 2) parte alta de la glicólisis; 3) y 4) rama no oxidativa de la vía de las pentosas; 5) parte baja de la glicólisis; 6) entrada de carbono al Ciclo de Krebs desde el fosfo-enol-piruvato; 7) nodo del piruvato; 8) producción de acetato; 9) Bifurcación entre el Ciclo de Krebs y el Ciclo del glioxalato; el malato puede convertirse en oxala-acetato (10) o en piruvato (11). Se representan también la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (13 y 14). Se destacan en rojo las enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD y se destacan en azul las deshidrogenasas dependientes de NADP. En el caso de la enzima málica, destacada en color naranja, existen dos isoenzimas, una dependiente de NAD y otra dependiente de NADP. Otras dos enzimas importantes en la generación de NADH y NADPH son las transhidrogenasas pntAB (12) y UdhA (15) que transfieren equivalentes de reducción



entre moléculas de NAD y NADP.

un exceso de NADPH cuando la glucosa es la única fuente de carbono son: 1) si a la cepa mutante  $\Delta pgi$  se le añade la mutación  $\Delta UdhA$ , la cepa doble mutante es inviable cuando la glucosa es la única fuente de carbono (Sauer y cols., 2004), y 2) la sobre-expresión de la transhidrogenasa UdhA en la cepa  $\Delta pgi$  mejora de la tasa de crecimiento desde  $0.22 \text{ h}^{-1}$  hasta  $0.27 \text{ h}^{-1}$  (Canonaco y cols., 2001). Estos resultados muestran que la tasa de crecimiento de la cepa  $\Delta pgi$  puede mejorar si algunos equivalentes de reducción son transferidos desde el NADP(H) hacia el NAD(H) pero que aun así, la tasa de crecimiento tendrá un valor lejos del que se observa para la cepa silvestre ( $0.67 \text{ h}^{-1}$ ). Canonaco y cols. (2001) sugirieron que la cepa  $\Delta pgi$  no creció con una tasa mayor a  $0.27 \text{ h}^{-1}$ , pese a la sobre-expresión de la UdhA, debido a la existencia de un límite cinético en la capacidad de procesar glucosa por la vía de las pentosas, pero la sobre-expresión de UdhA no necesariamente garantiza que la proteína esté completamente activa. Por lo tanto, *es interesante encontrar otra evidencia, independiente de sobre-expresar la UdhA, que sea consistente, que apoye o que descarte la hipótesis de la existencia de un límite al flujo por la vía de las pentosas.*

Por otra parte tenemos que la eliminación del gen *zwf*, codificante para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, bloquea el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas, provocando que dos enzimas dejen de aportar NADPH durante el crecimiento aeróbico utilizando glucosa como única fuente

de carbono. No obstante, la tasa de crecimiento de la mutante  $\Delta zwf$  disminuye solamente un 20% con respecto a la cepa silvestre, ya que la transhidrogenasa pntAB compensa parcialmente la producción de NADPH (Sauer y cols., 2004). Curiosamente, la mutante simple  $\Delta pntAB$  tiene un impacto sobre el crecimiento mayor que la mutante  $\Delta zwf$ , ya que su tasa de crecimiento disminuye un 33% con respecto a la cepa silvestre (Sauer y cols., 2004). Este resultado llama la atención ya que la actividad pntAB implica la entrada de protones al citoplasma, que para ser removidos de allí se requiere la hidrólisis de ATP. Por esta razón, si los flujos metabólicos fuesen tales que se maximizara la tasa de crecimiento, no se utilizaría la transhidrogenasa pntAB para generar NADPH, y por ende su eliminación no afectaría negativamente el crecimiento. Por lo tanto, *no queda claro por qué la eliminación del gen pntAB tiene un efecto mayor sobre el crecimiento que la eliminación del gen zwf*. Esto se puede deber a la capacidad de la transhidrogenasa de producir más NADPH que la rama oxidativa de la vía de las pentosas, o a la capacidad de la pntAB de simultáneamente reoxidar NADH y producir NADPH.

Si bien el estudio de los mutantes donde se eliminan ciertas enzimas ha aportado mucho a la comprensión de la dinámica de la entrada y la distribución de la glucosa en *E. coli*, la interrupción de ciertos flujos en dichas mutantes no permite conocer la posible importancia que tiene la co-generación de precursores anabólicos y cofactores reducidos en proporciones definidas por la estequiometría de las reacciones. En otras palabras, no permite conocer la

importancia de la especificidad por cofactores de las deshidrogenasas como elemento regulador del metabolismo en *E. coli*.

Existen evidencias de que la especificidad por cofactor de las deshidrogenasas es un elemento regulador importante en varias especies. En la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 existen dos formas de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa: una específica por NAD y que actúa solamente en la glicólisis, y otra de especificidad dual que actúa tanto en el Ciclo de Calvin como en la gluconeogénesis (Koksharova y cols, 1998). En la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, simbiote que vive en las raíces de la alfalfa, existen dos variantes de la enzima málica: una de ellas es dependiente de NAD y es esencial para la fijación de nitrógeno, mientras que la otra forma, dependiente de NADP, mostró características regulatorias diferentes y fue incapaz de reemplazar a la forma específica por NAD en su papel esencial en la fijación de nitrógeno (Mitsch y cols., 2007). En *E. coli* se han identificado dos formas de la enzima málica con estructura, especificidad y regulación metabólicas diferentes (Bologna y cols., 2007).

Un aspecto menos estudiado es el efecto sobre los flujos metabólicos de cambiar la especificidad por cofactor de una deshidrogenasa. Solamente se conocen dos trabajos publicados donde se haya sustituido una deshidrogenasa por otra cuya selectividad es diferente y paralelamente se hayan medido los flujos metabólicos (Marx y cols., 1999; Martínez y cols., 2008). En el trabajo de Marx y colaboradores (1999), tras la sustitución de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP de *Corynebacterium glutamicum* por su homóloga NAD-

dependiente de *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, el porcentaje de glucosa catabolizada a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato pasó de 76,3% a 22,7%; mientras que en el caso del trabajo de Martínez y colaboradores (2008), la sustitución de la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa dependiente de NAD de *E. coli* por su homóloga dependiente de NADP de *Clostridium acetobutylicum*, provocó que el porcentaje de glucosa oxidada a través de la rama oxidativa de la PPP pasara de 30% a 5,7%. Estos resultados muestran que los flujos de carbono se redistribuyen tras un cambio en la selectividad de una deshidrogenasa para lograr un nuevo balance entre la producción de intermediarios y de cofactores. Sin embargo, en ambos trabajos los genes codificantes para las enzimas con especificidades diferentes fueron introducidas en plásmidos bajo el control de promotores no nativos por lo cual *la expresión de las enzimas heterólogas fue ciega a los mecanismos endógenos de regulación de la expresión*. En el caso del estudio de Martínez y colaboradores (2008), además de la introducción de la enzima con especificidad cambiada, se introdujeron genes codificantes para las enzimas de una ruta heteróloga que requiere consumir NADPH para la síntesis de su producto final. Si bien esta estrategia permitió estudiar el impacto de un cambio en la demanda por cofactores en la distribución de los flujos metabólicos, *impidió ver el efecto aislado del cambio de especificidad sobre la distribución de los flujos*. Zhu y cols. (2005) estudiaron la importancia de la especificidad por NADP de la isocitrato deshidrogenasa en *E. coli* generando una cepa en la cual la oxidación del isocitrato es catalizada por una enzima dependiente de NAD. El gen nativo

codificante para la isocitrato deshidrogenasa fue reemplazado por el gen codificante para la enzima mutante mediante recombinación homóloga, por lo cual se mantuvieron los elementos nativos de control de la transcripción. Tras observar una pequeña merma en la tasa de crecimiento de la cepa mutante cuando el acetato fue la única fuente de carbono, y establecer una asociación entre la presencia/ausencia de la enzima isocitrato liasa (esencial para el Ciclo del glioxalato) y la especificidad por NADP/NAD de la isocitrato deshidrogenasa en 46 especies procariotas, concluyeron que la especificidad por NADP de la isocitrato deshidrogenasa es una adaptación de las especies que realizan el Ciclo del glioxalato para crecer más cuando el acetato es la única fuente de carbono. Estos resultados apuntan hacia una relación entre la topología de las vías centrales del metabolismo y la especificidad por cofactor de las deshidrogenasas presentes. Este trabajo implicó una tarea cuidadosa para modificar el sitio activo de la isocitrato deshidrogenasa hasta lograr revertir su especificidad por cofactor y un elegante diseño experimental para estudiar el efecto de la modificación genética realizada, *sin embargo no midieron los flujos metabólicos*.

Si bien se han realizado estudios donde se ha modificado la especificidad por cofactor de deshidrogenasas de la glicólisis y del Ciclo de Krebs, *no se han publicado estudios del impacto de un cambio similar en alguna de las dos deshidrogenasas de la vía de las pentosas*. Como se planteó anteriormente, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EcG6PDH), cuyo gen codificante es el *zwf*, no es una enzima esencial para este organismo. Sin embargo, los resultados de

varios estudios cinéticos sugieren que es una enzima altamente específica por NADP (Sanwal, 1970; Banerjee y Fraenkel, 1972; Fuhrer y Sauer, 2009), pero los datos cinéticos publicados son insuficientes para sostener categóricamente esta afirmación.

Las dos publicaciones enfocadas en la caracterización cinética de la EcG6PDH son de comienzos de los años 70's del siglo XX y son trabajos con limitaciones importantes (Sanwal, 1970; Banerjee y Fraenkel, 1972). Sanwal (1970) trabajó con una preparación no pura de enzima, y aunque Banerjee y Fraenkel (1972) lograron obtener enzima pura, no hicieron una caracterización cinética rigurosa porque no era el objetivo de su investigación. Solamente fueron determinados algunos parámetros cinéticos aparentes, y la inhibición por producto solo fue analizada superficialmente. La capacidad de utilizar NAD fue estudiada solo de manera superficial. La regulación alostérica de la EcG6PDH mediante la inhibición por NADH fue propuesta por Sanwal (1970), sin embargo pocos años después se publicaron evidencias de que sus resultados fueron espurios debido a la ocurrencia de un artefacto óptico denominado "stray light" (Cavalieri y Sable, 1973). *Sorprendentemente, en varias bases de datos de gran prestigio (BRENDA, ECOCYC) aparece la inhibición no competitiva por parte del NADH como el mecanismo principal de regulación de la actividad de esta enzima.* Orthner y Pizer (1974) buscaron, infructuosamente, un posible inhibidor alostérico probando con al menos ocho compuestos.

Por lo tanto, además de cuantificar rigurosamente cuál es la preferencia por cofactor de la EcG6PDH, un experimento clave para probar si su especificidad

por NADP es una propiedad importante para la regulación de los flujos metabólicos es sustituir esta enzima por una homóloga específica por NAD y observar los efectos metabólicos de este cambio.

Para ello en esta investigación se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Estudiar la influencia de la selectividad por cofactores de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la magnitud del flujo a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas en *Escherichia coli*.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar cinéticamente a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *E. coli* teniendo en cuenta la selectividad por los cofactores NAD y NADP.
- 2) Medir las modificaciones en los patrones de expresión y los flujos metabólicos tras la sustitución de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *E. coli* por una enzima homóloga cuya selectividad por NAD sea mayor que la de *E. coli*.
- 3) Comparación de los resultados observados con una predicción realizada mediante el Análisis de Balance de los Flujos.

## MATERIALES Y METODOS

Dos obstáculos debían ser superados para cumplir los objetivos de esta investigación:

- 1) Establecer un protocolo de purificación y conservación de la enzima EcG6PDH, y conseguir las condiciones adecuadas para medir su capacidad catalítica tanto con NAD como con NADP.
- 2) Obtener una enzima con actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pero específica por NAD.

Los procedimientos para superar el primer problema son ampliamente discutidos en las siguientes secciones.

Con respecto al segundo obstáculo, no se conocen homólogos naturales de la EcG6PDH que sean altamente preferentes por el NAD, y no se dispone de ninguna estructura cristalina de la EcG6PDH que ayude a identificar cuáles son los determinantes estructurales de la interacción de esta enzima con el NAD y el NADP. Para resolver este problema se estudiaron, mediante técnicas de dinámica molecular, las interacciones de la enzima homóloga de preferencia dual presente en la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* con los cofactores NAD y NADP. Esta enzima ha sido profundamente estudiada tanto estructural (Cosgrove cols., 2000) como cinéticamente (Olive cols., 1971; Cosgrove cols., 1998), por lo cual era un punto de partida que brindaba mucha información



relevante. Las técnicas de dinámica molecular revelaron que los residuos Arginina 46 y Glutamina 47 eran importantes en la interacción del NADP con el sitio activo de la enzima. Basándose en esa información se decidió reemplazar ambos residuos por residuos de ácido glutámico, ya que la introducción de cargas negativas puede repeler al grupo fosfato del NADP. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con Matías Fuentealba, estudiante de la Maestría en Biología de nuestra Facultad y colega del laboratorio.

*Obtención de los plásmidos necesarios para la expresión y purificación de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>*

A partir del plásmido pETG6PDH (Giró cols., 2006) donado por la Doctora Adriana Krapp de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, y que contenía la secuencia codificante para los aminoácidos de la EcG6PDH y otros aminoácidos adicionales, se obtuvo el plásmido pETG6PDH\*. En este plásmido resultante quedó insertada la secuencia codificante para aminoácidos de la EcG6PDH, más 6 residuos de histidina seguidos por otros 6 residuos (que constituyen la secuencia de reconocimiento para la proteasa trombina), más diez aminoácidos adicionales hasta el extremo N-terminal. Esta secuencia codificante quedó bajo el control de un promotor reconocible por la ARN polimerasa ADN dependiente del fago T7 (T7pol).

Por otro lado recibimos también la donación, por parte del Doctor Michael Cosgrove de la Universidad de Siracusa, Estados Unidos de América, del

plásmido pET25a-LmG6PDH que porta la secuencia codificante para aminoácidos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* silvestre (LmG6PDH). Dicha secuencia codificante fue cortada y clonada en el vector pTEV (Rocco cols., 2008) para incluir en la secuencia de la proteína un sitio de corte para la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus) seguida de una región espaciadora y una cola de residuos de histidina. El plásmido resultante recibió el nombre de pTEV-LmG6PDH. En dicho plásmido la secuencia codificante para la LmG6PDH quedó bajo el control de un promotor específico para la T7pol, y tras la traducción se obtiene una forma de la enzima fusionada con una cola de residuos de histidina que facilitan su purificación utilizando el principio de afinidad por Níquel de la histidina, y entre la cola de histidina y la secuencia codificante para los aminoácidos originales de la proteína posee un sitio de corte para la proteasa TEV. La presencia de una secuencia blanco para la proteasa TEV permite la eliminación de la cola de histidinas antes de la realización de los ensayos enzimáticos. Otra ventaja adicional de este método de purificación es que la proteasa TEV es producida en nuestro laboratorio, a diferencia de la trombina con la que se corta la EcG6PDH clonada el plásmido pETG6PDH\*, que hay que comprarla. La proteasa TEV fue purificada en nuestro laboratorio desde el plásmido pRK793 (Addgene Inc., USA) y posee también una cola de histidinas que facilita su separación de la proteína sustrato después de efectuada la digestión proteolítica.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que prefiere NAD sobre NADP (LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>) fue obtenida a través del reemplazo, mediante mutagénesis

sitio-dirigida, de los residuos Arginina 46 y Glutamina 47 por residuos de ácido glutámico en la secuencia codificante para los aminoácidos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides*.

La mutagénesis sitio-dirigida fue realizada tanto en el plásmido pET25a-LmG6PDH como en el pTEV-LmG6PDH. De esta manera, la forma de la enzima mutante fusionada con la cola de histidina y el sitio de corte para la proteasa TEV fue utilizada para los estudios cinéticos mientras que la forma mutante que tiene el mismo número de residuos que la forma nativa de la enzima fue utilizada para la sustitución de la copia cromosomal de la secuencia codificante para la EcG6PDH mediante recombinación homóloga (ver detalles más adelante).

Una versión inactiva de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* (tanto con NAD como con NADP) se obtuvo con la sustitución del residuo Aspártico 16 por un residuo de Glicina en la forma LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>. Esta forma inactiva (LmG6PDH<sup>R46EQ47ED16G</sup>) fue utilizada para reemplazar la copia cromosomal de la EcG6PDH y obtener una cepa en la cual hay transcripción y traducción desde el locus *zwf* pero con un fenotipo flujómico similar a la cepa  $\Delta zwf$ , carente del gen.

Para la sustitución de la copia cromosomal de la EcG6PDH se construyeron plásmidos en los cuáles las secuencias codificantes para la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> y para la LmG6PDH<sup>R46EQ47ED16G</sup> fueron acopladas al cassette FRT-Kan<sup>R</sup>-FRT proveniente del plásmido pKD13 (Wanner y Datsenko, 2000).

Un listado completo de los plásmidos utilizados en esta investigación aparecen en el Anexo 1.

#### Purificación de las enzimas *EcG6PDH* y *LmG6PDH*<sup>R46EQ47E</sup>

Células de *E. coli* de la cepa BL21 DE-3 *Tet<sup>r</sup>* fueron transformadas con los plásmidos pETG6PDH\* y pTEV-LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>, y crecidas aeróbicamente con agitación vigorosa en el medio Luria-Bertani a 37 °C. Se indujo la sobre-expresión de las enzimas de interés adicionando Isopropil tio-galactósido (IPTG) (USBiological) hasta una concentración de 1 mM cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó las 0.4-0.5 UA. Después de 4 horas de inducción, la biomasa fue precipitada por centrifugación durante 10 minutos, a 2000 g, a 4 °C, en una centrífuga Eppendorf 5810R.

Las células fueron resuspendidas en un volumen que representaba un 10% del medio de cultivo de un tampón Tris (Merck) 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck) 10 mM PMSF (Calbiochem) 1 mM pH 8.2, y se liberó el contenido intracelular por sonicación utilizando un sonicador Branson 450 a una amplitud de sólo 15% de su potencia total para minimizar el sobrecalentamiento del extracto. Tras la sonicación, el extracto fue centrifugado a aproximadamente 80000 g, a 4 °C, por 30 minutos, en una ultracentrífuga Beckman L5-50B.

En el caso de la purificación de la *EcG6PDH*, el sobrenadante fue inoculado en una columna de intercambio iónico HiTrap Q HP (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón Tris 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM NaCl 40 mM pH 8.2. Las

proteínas fueron extraídas de la columna utilizando un flujo continuo de Tris 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8.2 con concentración creciente de NaCl desde 40 mM hasta 1 M. Las fracciones enriquecidas en actividad EcG6PDH fueron suplementadas con imidazol hasta 40 mM e inoculadas en una columna HisTrap cargada con níquel (GE Healthcare). De esta segunda columna la proteína de interés fue extraída utilizando un flujo constante de Tris 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8.2 con concentración creciente de imidazol desde 40 mM hasta 600 mM. Después de este paso se obtiene una solución de la enzima con más de 95% de pureza.

Esta muestra de proteína prácticamente pura fue suplementada con CaCl<sub>2</sub> 10 mM y se le añadió trombina sólida hasta alcanzar una proporción molar 1:36 de proteasa:EcG6PDH. La reacción de proteólisis procedió durante 4 horas a 37°C en el mismo tampón suplementado con CaCl<sub>2</sub> previamente desgasificado. Después de la proteólisis la mezcla de reacción fue suplementada con β-mercapto etanol 10 mM para prevenir la oxidación de la EcG6PDH. Para separar las moléculas de enzima cortadas de las no cortadas, la mezcla de reacción fue re-inoculada en una columna HisTrap. La mezcla de moléculas cortadas (que no se adhieren a la columna HisTrap) y trombina se inocula en una columna HiTrap Q HP de donde son extraídas utilizando un flujo continuo de Tris 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8.2 con concentración creciente de NaCl desde 40 mM hasta 1 M. La segregación en diferentes fracciones de las dos proteínas fue confirmada con mediciones en las fracciones de la actividad específica y la absorbancia a 280 nm. Para chequear la pureza de la enzima se aplicaron

aproximadamente 20 microgramos de la misma en un gel de acrilamida SDS-PAGE. Paralelamente, la eficacia de la proteólisis fue chequeada mediante western blot utilizando el kit Ni-NTA HRP Conjugate Qiagen 34530.

Durante todo el procedimiento de purificación la actividad enzimática fue evaluada monitoreando la formación de NADPH cuando alícuotas de las fracciones que contenían enzima eran añadidas a la siguiente mezcla de reacción: Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NADP 0.4 mM, G6P 2 mM pH 8.0. La formación del NADPH fue monitoreada por el aumento de la absorbancia a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible con temperatura controlada a 25 °C.

Después del corte proteolítico se obtiene una forma de EcG6PDH con 12 aminoácidos extras en su extremo N terminal. Las propiedades cinéticas similares a las publicadas con formas silvestres de la enzima (Sanwal, 1970; Banerjee y Fraenkel, 1972) demuestran que los aminoácidos adicionales no modifican drásticamente las propiedades cinéticas de la enzima.

Para el caso de la purificación de la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>, las condiciones en las que se manipula cada columna son idénticas a las utilizadas en la purificación de la EcG6PDH pero para la eliminación de la cola de histidinas se utilizó la proteasa TEV con su propia cola de histidinas. El sobrenadante obtenido tras sonicación y ultra-centrifugación se inocula en la columna HiTrap Q HP. A continuación las fracciones enriquecidas en la proteína de interés fueron inoculadas en la columna HisTrap cargada con níquel y como resultado una preparación altamente pura de la enzima de interés fue obtenida utilizando un

gradiente de imidazol.

A continuación se procedió al corte proteolítico de la cola de poli-histidina con la proteasa TEV. Para ello se dializan las fracciones enriquecidas en la proteína de interés contra el tampón 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, EDTA 1 mM. La adición de EDTA tiene como propósito capturar a los iones de níquel que escapan de la columna HisTrap y que inhiben a la proteasa TEV. Para realizar la digestión se añadió la proteasa TEV en una cantidad tal que la relación másica sustrato:proteasa sea de 100:1 y se añadió el agente reductor TCEP a una concentración final de 1 mM. La digestión se llevó a cabo a 25 °C durante una hora. La adición del agente reductor  $\beta$ -mercapto-etanol provoca la precipitación de la proteasa TEV, por lo cual debe evitarse su presencia durante la proteólisis.

La mezcla de digestión fue inoculada nuevamente en la columna HisTrap cargada con níquel pero esta vez fue rescatada la proteína no retenida en la columna, que corresponde a la fracción donde fue efectiva la digestión proteolítica. Las colas de histidina y las moléculas de la proteasa TEV quedan retenidas en la columna. La pureza de la proteína obtenida fue verificada en gel de acrilamida-SDS-PAGE.

Las preparaciones de enzimas puras obtenidas tras la elución de las respectivas últimas columnas se concentraron hasta alcanzar como mínimo 1 mg/ml en el propio tampón de elución y se almacenaron a -20 °C tras la adición de 50 % (v/v) de glicerol (TCL, Chile).

## *Estudios cinéticos de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>*

Después de ser pesados y disueltos en agua desionizada, los sustratos fueron neutralizados hasta pH 7.0, y titulados mediante el monitoreo espectrofotométrico de la reacción hasta llegar al equilibrio. Para esto se añadieron los co-sustratos correspondientes a una concentración al menos 20 veces mayor que la del sustrato que estaba siendo titulado. Esto garantizó que, según el valor de la constante de equilibrio ( $K=6.02 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ , Glaser y Brown (1955)), más del 99.9% del sustrato a titular se convirtiera en producto. Para acelerar la llegada al equilibrio químico se añadieron unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* comercial en una cantidad tal que su aporte a la absorbancia es despreciable. La concentración fue estimada midiendo la variación en la absorbancia a 340 nm tras completarse la reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar aparente para el NAD(P)H de  $5186 \text{ UA M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , previamente estimado para nuestras condiciones experimentales (Tris 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, pH=8.0 y 25°C). Los sustratos así preparados fueron conservados a -20 °C y utilizados para los ensayos cinéticos en el plazo de dos semanas después de la preparación. En el caso de la preparación de los cofactores reducidos NADH y NADPH, estos fueron disueltos directamente en el tampón de reacción (que tiene un pH ligeramente básico), su concentración se determinó directamente por espectrofotometría, y se emplearon en el lapso de 6 horas tras su preparación.

La fiabilidad de las estimaciones de velocidad de un proceso enzimático



depende de la calidad de la determinación de la concentración de enzima. Para garantizar una mejor repetibilidad, la concentración de enzima se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm de la muestra dializada utilizando como blanco el mismo tampón de diálisis (Tris 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercapto etanol 10 mM, pH=8.0 y 25 °C). A partir de la composición aminoacídica, y asumiendo que todos los residuos de cisteínas están reducidos, se calculó que la EcG6PDH tiene un coeficiente de extinción molar de 86860 UA M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Utilizando el mismo procedimiento, se determinó que la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> tiene un coeficiente de extinción molar de 69790 UA M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La concentración de proteína fue determinada también utilizando un reactivo comercial Quick Start Bradford (Biorad) obteniéndose resultados similares.

La cantidad de enzima a utilizar en cada ensayo también fue cuidadosamente estandarizada. Para el caso de las mediciones de velocidad inicial es crítico que la cantidad de sustrato consumida durante el tiempo de medición de la velocidad no sea superior al 5 % (Segel, 1975) y mejor aun si está por debajo del 1 % (Cornish-Bowden, 1995). Para las mediciones de curvas de progreso de la reacción es importante saber por cuánto tiempo es estable la enzima en las condiciones de ensayo y minimizar la cantidad de producto formado antes de comenzar el monitoreo de la reacción. Para lograr estas condiciones a menudo es necesario trabajar con una concentración de enzima baja, pero la excesiva dilución de la enzima atenta contra su estabilidad. Por lo tanto, es necesario determinar cuál es el compromiso adecuado entre dilución de la enzima y estabilidad de la misma. Se abordó este problema utilizando un test que evalúa

la estabilidad de la enzima durante la catálisis a diferentes concentraciones de la misma (Selwyn, 1965). Se determinó que, cuando la concentración de los sustratos es baja, si la concentración de las enzimas en estudio está por debajo de 2 nM, ésta puede inactivarse parcialmente durante la medición. Para la mayoría de los casos, las mediciones de velocidad inicial de la EcG6PDH con NADP se realizaron con una concentración de enzima de 2 nM mientras que, cuando el cofactor fue el NAD, se empleó una concentración de enzima de 8 nM.

En el caso de las curvas de progreso, para las reacciones catalizadas por la EcG6PDH, se utilizó 2.5 nM de enzima si el cofactor involucrado era el NADP y entre 100 y 120 nM si el cofactor utilizado era el NAD. Para las curvas de progreso de las reacciones catalizadas por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>, cuando se estudiaron las reacciones en presencia del NAD, se utilizó una concentración de enzima de 10 nM; y se utilizó la enzima a 200 nM si el cofactor presente fue el NADP.

Para los ensayos cinéticos se dializó y diluyó la enzima en el tampón Tris 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercapto etanol 10 mM, pH=8.0 y 25 °C. Con la enzima dializada y los sustratos preparados según se explicó anteriormente, se procedió a realizar las mediciones de velocidad inicial. El tampón para las mediciones cinéticas fue Tris 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8.0 a 25 °C. La reacción se desencadenó en todos los casos con la adición de la glucosa-6-fosfato. Se tomaron precauciones para que la concentración total de los cofactores reducidos no implicara valores de absorbancia mayores que 2.0 U.A.

para evitar el artefacto óptico denominado "luz extraviada" (Cavalieri y Sable, 1973).

Para los experimentos de medición de velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato se utilizaron mezclas de reacción con diez concentraciones de NADP cubriendo el rango entre los 8  $\mu\text{M}$  y los 600  $\mu\text{M}$  combinadas con ocho concentraciones del co-sustrato glucosa-6-fosfato entre los 120  $\mu\text{M}$  y 2.1 mM. Para el caso del cofactor NAD se exploraron también diez concentraciones cubriendo el rango entre los 1.9 mM y los 35.3 mM combinadas con ocho concentraciones de glucosa-6-fosfato entre 1 mM y 12 mM. También se midieron controles a concentración cero de cada uno de los sustratos. De cada tratamiento se realizaron al menos cuatro réplicas.

Para estudiar la inhibición por NADPH se realizaron mediciones de velocidad inicial contra concentración de sustrato con 12 concentraciones diferentes de los sustratos variables (de 15 a 1300  $\mu\text{M}$  para el NADP; de 30 a 3000  $\mu\text{M}$  para la glucosa-6-fosfato), a concentración fija y saturante del co-sustrato correspondiente (1300  $\mu\text{M}$  de NADP, 3000  $\mu\text{M}$  para glucosa-6-fosfato), en presencia de seis concentraciones diferentes de NADPH (de 25 a 200  $\mu\text{M}$ ) más los respectivos controles sin NADPH. De cada tratamiento se realizaron tres ó cuatro réplicas.

En los estudios de curvas de progreso hasta el equilibrio se analizó simultáneamente las señales de varias reacciones donde se utilizaron los cofactores NAD o NADP a diferentes concentraciones, a una concentración del

co-sustrato glucosa-6-fosfato de 12 mM, lo cual es más de 20 veces superior a la concentración más alta empleada para el cofactor (400  $\mu$ M). Esto garantizó las condiciones adecuadas para considerar los procesos catalíticos monitoreados como "pseudo-mono-sustrato" (Goudar cols., 1999; Gutierrez y Danielson, 2006) y que prácticamente todo el sustrato se convirtiera en producto, según el valor de la constante de equilibrio. Las reacciones fueron desencadenadas con la adición del azúcar y ocurrieron en un tampón Tris 100 mM pH 8.0 MgCl<sub>2</sub> 10 mM a 25 °C. La formación del producto se monitoreó por espectrofotometría observando las variaciones en la absorbancia a 340 nm. La señal de absorbancia fue convertida en una señal de concentración de NAD(P)H utilizando el coeficiente de extinción aparente determinado para nuestras condiciones.

#### *Obtención de las cepas recombinantes*

Para la construcción de las cepas recombinantes se utilizó una variante del método descrito por Wanner y Datsenko (2000). El objetivo fue reemplazar la secuencia cromosomal codificante para aminoácidos de la EcG6PDH por la secuencia codificante para aminoácidos de la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> o de la LmG6PDH<sup>R46EQ47ED16G</sup>, conservando intactos todos los elementos de regulación de la expresión nativos. Para ello se generaron, mediante PCR, unas moléculas de ADN lineal cuyos extremos son homólogos a los flancos de la secuencia codificante para aminoácidos de la EcG6PDH y que contienen la

secuencia LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>-FRT-Kan<sup>R</sup>-FRT o la secuencia LmG6PDH<sup>R46EQ47ED16G</sup>-FRT-Kan<sup>R</sup>-FRT provenientes de los plásmidos construidos. De esta manera, se utilizó el método de Wanner y Datsenko para sustituir la secuencia codificante original por la secuencia codificante para el gen de interés (knock-in) en lugar de simplemente eliminar la secuencia codificante para un gen (knock-out).

Las cepas parentales fueron:

1. silvestre: MG1655 K12 (ATCC 47076)
2.  $\Delta pgi$ : MG1655 K12 (ATCC 47076)  $\Delta pgi$ .

Y se obtuvieron las siguientes tres cepas recombinantes:

3. NAD-G6PDH: MG1655 K12 (ATCC 47076)  $\Delta zwf::zwf^{\Delta mG6PDHR46EQ47E}$
4. inact-G6PDH: MG1655 K12 (ATCC 47076)  $\Delta zwf::zwf^{\Delta mG6PDHR46EQ47ED16G}$
5.  $\Delta pgi$ -NAD: MG1655 K12 (ATCC 47076)  $\Delta pgi \Delta zwf::zwf^{\Delta mG6PDHR46EQ47E}$ .

El éxito de las manipulaciones genéticas fue verificado por la secuenciación de los *loci* cromosomales de los genes *pgi* y *zwf* en las cinco cepas estudiadas. Se chequeó la sensibilidad de las cepas obtenidas a los antibióticos Ampicilina y Kanamicina para verificar que los plásmidos auxiliares utilizados en el proceso de recombinación no estaban presentes en las cepas resultantes. Por último en los extractos celulares se midió la actividad específica de las enzimas fosfogluco-isomerasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (utilizando NAD y NADP) para confirmar las respectivas eliminaciones y/o sustituciones.

*Monitoreo de las curvas de crecimiento y obtención de muestras de células y de medio de cultivo*

Las cepas en estudio fueron cultivadas aeróbicamente, a 37 °C, en medio mínimo suplementado con glucosa añadida por filtración hasta alcanzar una concentración de 4 g/L. La composición del medio mínimo, por cada litro de agua desionizada fue:

- 7.52 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 3.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.5 g  $\text{NaCl}$
- 2.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Además, fueron esterilizados por separados y añadidos para completar el litro:

- 1 ml 0.1 M  $\text{CaCl}_2$
- 1 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$
- 0.6 ml 100 mM  $\text{FeCl}_3$
- 2 ml de solución de vitaminas (se filtran como forma de esterilizar)
- 10 ml de solución de elementos traza.

La solución de vitaminas contiene por cada 50 ml:

- 25 mg biotina
- 25 mg cianocobalamina
- 25 mg niacina
- 25 mg de pantotenato de calcio
- 25 mg de cloruro de piridoxina
- 25 mg de cloruro de tiamina.

La solución de elementos traza contiene por cada 1 L:

- 0.18 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.12 g  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.12 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 0.18 g  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ .

Durante la manipulación de las cepas previa a los experimentos cuyos

resultados se informan, se utilizó el medio Luria-Bertani, tanto en su forma líquida como combinado con agar para solidificarlo.

En todos los experimentos se partió de colonias aisladas previamente sobre LB-agar, y crecidas en 50 ml de medio mínimo previo a la inoculación en los frascos donde se desarrollaron los experimentos.

Durante los experimentos se tomaron muestras del medio de cultivo cada media hora (células más medio extracelular). Se midió la densidad óptica a 600 nm de las muestras utilizando agua como blanco, se separó el medio extracelular de las células mediante la filtración con membranas con poros de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cuando la densidad óptica llegó a aproximadamente 1.0 U.A. se obtuvieron también muestras de células. Se monitoreó la hora a la que fue recogida cada muestra para calcular las tasas de crecimiento.

Las muestras de medio extracelular fueron inmediatamente guardadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de analizarlas. Las muestras de células se obtuvieron por centrifugación a 5000 g, durante 5 minutos, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se incluyó un paso de lavado con NaCl 0.9% (w/v) en el caso de las muestras tomadas para el análisis de isotopómeros, o con Tris 100 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM NaCl 5 mM pH 8.0 para las muestras tomadas para el análisis de la actividad específica de las enzimas fosfo-gluco-isomerasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En caso de no ser utilizadas de manera inmediata, las células precipitadas y lavadas se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

*Actividades específicas de las enzimas EcG6PDH y LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> en los extractos celulares provenientes de las diferentes cepas en estudio*

Las células frescas provenientes de los cultivos, o precipitadas y guardadas a -20 °C, se resuspendieron en 5-10 ml de Tris 100 mM pH 8.0 MgCl<sub>2</sub> 5 mM NaCl 5mM frío y se centrifugaron a 5000 g, 5 minutos, a 4 °C. Antes de romper las paredes bacterianas por sonicación, se resuspendió la biomasa en el mismo tampón pero suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). El procedimiento de sonicación se realizó en frío para disminuir la desnaturalización de proteínas por exceso de calor. Las suspensiones obtenidas fueron ultra-centrifugadas a 60000 g, por 15 minutos, a 4°C. Después de este paso se descarta el precipitado y se rescata el sobrenadante el cual es mantenido en hielo.

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se estimó mediante el monitoreo de la formación de NAD(P)H por espectrofotometría a 340 nm. Las reacciones acontecieron en las mismas condiciones del tampón de resuspensión pero suplementado con los sustratos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa a diferentes concentraciones según el caso.

Para la medición de la actividad fosfo-glucó-isomerasa se realizó un ensayo acoplado con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides*. El principio consiste en que la formación de la glucosa-6-fosfato a partir de la fructosa-6-fosfato depende de la presencia de la enzima fosfo-glucó-isomerasa.



La mezcla de reacción fue 0.5 mM NADP, 1 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* comercial (Sigma) y 2 mM de fructosa-6-fosfato en el mismo tampón de resuspensión de las células (Salas cols., 1965). La actividad también se estimó mediante el monitoreo de la formación de NADPH por espectrofotometría a 340 nm.

La concentración de proteínas en los extractos celulares fue estimada utilizando el reactivo Quick Start Bradford (Biorad) utilizando soluciones previamente cuantificadas de albúmina del suero bovina como estándares de concentración conocida.

#### *Determinación de las concentraciones de glucosa y acetato en el medio de cultivo*

Las muestras de medio extracelular fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) utilizando la columna de intercambio iónico para carbohidratos y ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (BioRad) operando a 65°C y un detector de índice de refracción (HP 1047A, Detector IR HP, Hewlett Packard). La fase móvil utilizada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM desgasificado a una velocidad de 0.5 ml/min.

Las concentraciones de glucosa y acetato fueron cuantificadas por comparación con estándares de concentración conocida previamente analizados en similares condiciones. Ningún otro compuesto orgánico fue detectado en cantidades apreciables de manera consistente.

### *Medición de los flujos intracelulares mediante la cuantificación de los isotopómeros de la histidina*

Cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono, todas las biomoléculas son formadas a partir de los átomos de carbono provenientes de la glucosa. Dentro del conjunto de los biopolímeros, las proteínas son las que se forman a partir de un mayor número de precursores. Estos precursores se forman en diferentes puntos de las vías centrales del metabolismo. La química orgánica de las rutas de biosíntesis de los aminoácidos es bien conocida, por lo cuál es posible rastrear la ruta de los diferentes átomos de carbono provenientes de una molécula de glucosa si estos poseen una marca distintiva. El método por excelencia para distinguir átomos de un mismo elemento es el uso de isótopos. Entonces, si se suministran moléculas de glucosa con diferente composición isotópica, es de esperar que aparezcan poblaciones de aminoácidos con diferentes patrones de marcación. Las moléculas de una misma sustancia cuya única diferencia entre sí es la composición isotópica de sus átomos se denominan isotopómeros.

Por lo tanto, si se cuenta con un método para suministrar una mezcla adecuada de moléculas de glucosa cuyos átomos de carbono son de diferentes isótopos, hidrolizar las proteínas, separar los distintos aminoácidos y distinguir cuantitativamente las diferentes poblaciones de isotopómeros de cada aminoácido, se puede, en principio, cuantificar el aporte relativo de las

diferentes vías catabólicas a los conjuntos de precursores anabólicos.

Para determinar el porcentaje de glucosa que es oxidado por la rama oxidativa de la vía de las pentosas en *E. coli* se puede utilizar como única fuente de carbono una mezcla de moléculas de glucosa tal que algunas tengan sólo átomos de  $C^{13}$  y otras sólo tengan átomos del isótopo más abundante del carbono ( $C^{12}$ ). Las moléculas de ribosa que se forman a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas tendrán una distribución diferente de átomos pesados que las que se forman por la vía no oxidativa. El origen de dicha diferencia yace en que la ribosa formada por la rama no oxidativa es el producto de las reacciones catalizadas por las transaldolasas y las transcetolasas, en las cuales se mezclan fragmentos provenientes de moléculas con átomos de  $C^{13}$  con fragmentos provenientes de moléculas de glucosa convencional, mientras que las ribosas formadas a partir de moléculas de glucosa oxidadas por la rama oxidativa son moléculas que conservan intacto su esqueleto de 5 átomos de carbono, todos de un mismo isótopo. En *E. coli* la ribosa, sea proveniente de una rama u otra de la vía de las pentosas, es el precursor de la histidina, y aporta a la síntesis de este aminoácido un bloque de 5 átomos de carbono que apenas sufre modificaciones. Cuantificando las poblaciones de los diferentes isotómeros de histidina se puede estimar cuánta glucosa fue oxidada por la rama oxidativa de la vía de las pentosas.

Para estimar el porcentaje de glucosa que es oxidada a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas se crecieron bacterias de las cepas silvestre, NAD-G6PDH e inact-G6PDH en medio mínimo suplementado con moléculas de

glucosa cuyos átomos de carbono son del isótopo  $C^{13}$  (U- $C^{13}$ -glucosa) mezcladas con moléculas de glucosa convencional en una proporción 20:80. Las muestras de biomasa provenientes de 1 ml de cultivo a una densidad óptica de 1.0 U.A. fueron resuspendidas en 0.1 ml de HCl 6 M y transferidas a viales de cristal. Estos viales a su vez fueron colocados dentro de un frasco especial que permitió la extracción del aire atmosférico y su sustitución por nitrógeno. Para efectuar la hidrólisis ácida de las proteínas, los frascos fueron transferidos a un horno a 105°C durante 18 horas. El HCl residual fue retirado por evaporación y la biomasa hidrolizada fue resuspendida en 200  $\mu$ l de una mezcla de tetrahidrofurano y N-ter-butil-dimetilsilil-N-metil-trifluoro-acetamida en proporción 1:1 y transferida a un horno a 80°C por una hora. Tras este paso las muestras fueron filtradas previo a su inyección en el espectrómetro de masa/cromatógrafo de gases (GC-MS). Se inyectaron 0.5  $\mu$ l de cada muestra a una temperatura de 250°C. En el receptáculo la temperatura fue de 130°C por 4 minutos y subió hasta 230°C a una velocidad de 4°C/min para luego ascender hasta 280°C a 20°C/min donde se mantuvo por 2 minutos. La fase móvil empleada fue una corriente de helio a 50 cm/s. La columna empleada fue la Shimadzu SHRXI-5ms 15 m x 0.25 mm x 0.25 m. La temperatura de interfase cromatógrafo de gases/espectrómetro fue de 300°C, la temperatura de la fuente de iones fue 200°C y el voltaje de ionización fue de 70 eV. El espectrómetro de masas fue configurado para barrer el rango de relaciones carga- masa ( $m/z$ ) desde 50 hasta 600.

Después de la corrida en el GC-MS se analizaron los registros para identificar el

pico correspondiente a la histidina. Se tomaron los datos correspondientes a los fragmentos de masa creciente (según crezca el número de átomos de  $C^{13}$  incorporados, los isotopómeros van siendo de masa cada vez mayor). Los vectores correspondientes a las abundancias relativas de cada isotopómero fueron corregidos para considerar la abundancia natural de los átomos de  $C^{13}$  y la probabilidad de tener átomos pesados de otros elementos presentes en los agentes derivatizantes. Una vez obtenidos los vectores corregidos, se calculó el porcentaje de glucosa catabolizada por la rama oxidativa de la vía de las pentosas siguiendo el método descrito por Portnoy y cols. (2010).

#### *Análisis del balance de los flujos*

Esta metodología ha sido descrita y ejemplificada en un gran número de publicaciones (ver Orth y cols., 2010 para una buena explicación con abundantes ejemplos). El principio fundamental es que el conjunto de transformaciones metabólicas intracelulares y el conjunto de intercambios de sustancias posibles entre la célula y su medio, dada una dotación de enzimas y transportadores, puede representarse como una matriz de  $n$  reacciones y  $m$  metabolitos ( $n \times m$ ). Cada  $n$ -ésima fila de esta matriz representa una reacción, y cada elemento de esa fila representará la participación del  $m$ -ésimo metabolito en esta reacción. Los valores pueden ser negativos (si el metabolito es consumido), cero (si el metabolito no participa) o positivos (si el metabolito es generado) y su valor entero representa la cantidad estequiométrica en la que

participa en la reacción. El universo de estados posibles, dada esta red de transformaciones, es restringido a partir de datos experimentales previamente recogidos para el organismo en cuestión y por lo datos experimentales concretos obtenidos por el investigador para su circunstancia particular de estudio. Así, por ejemplo, un conjunto de reacciones que pueden ocurrir en *E. coli* en condiciones aeróbicas, no acontecen cuando no hay oxígeno presente. Otra premisa importante es que, bajo condiciones de estado estacionario, las velocidades de producción de cada metabolito se igualan a las velocidades de degradación de los mismos, por lo cual las concentraciones de los metabolitos son constantes, y el ritmo de transformación de los metabolitos se vuelve independiente de las propiedades cinéticas de las enzimas.

Una vez delimitadas las restricciones del sistema, es posible calcular cuál es la distribución óptima de los flujos para maximizar o minimizar una función objetivo dada (generalmente se utiliza la formación de biomasa). Ha sido demostrado que, mientras más restricciones son consideradas, más restringido es el universo de flujos que pueden satisfacer un valor máximo de la función objetivo (Chen y cols., 2011).

En nuestro caso utilizamos la tasa de asimilación de glucosa, la tasa de excreción de acetato y el porcentaje de flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas para restringir las soluciones posibles, y a partir de definir la formación de biomasa como objetivo, calculamos esquemas de flujos metabólicos posibles con los que se alcanza un valor de formación de biomasa máximo. Este análisis fue realizado con el programa COBRA 2.0.3

(Schellenberg y cols., 2011) y el modelo *in silico* de *E. coli* iAF1260 (Feist y cols., 2007).

El análisis del balance de flujos fue utilizado también para discutir teóricamente algunas situaciones que no fueron evaluadas experimentalmente pero que sirvieron para discutir los resultados.

### *Tratamiento estadístico de los datos experimentales*

En el caso de los estudios cinéticos, se realizaron ajustes estadísticos globales de los datos obtenidos a diferentes concentraciones de sustratos, inhibidor y enzima utilizando el programa *Dynafit* (versión 3.28) (Kuzmič, 1996).

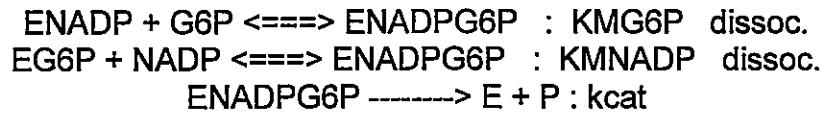
Con el programa *Dynafit* es posible comparar varios mecanismos químicos que podrían explicar los resultados y estadísticamente decidir cuál de ellos explica mejor las observaciones realizadas. Para el caso del estudio de las velocidades iniciales en ausencia del producto inhibidor, los mecanismos comparados fueron:

- ordenado donde el nucleótido es el primer sustrato que se une a la enzima
- ordenado donde el azúcar es el primer sustrato que se une a la enzima
- unión aleatoria de cualquiera de los dos sustratos a la enzima
- ping-pong donde el azúcar es el primer sustrato que se une a la enzima

En todos estos casos se asumió que se establece un equilibrio rápido en los procesos de asociación entre las diferentes formas de la enzima y los sustratos.

Cada mecanismo se describe mediante una simbología simple, por ejemplo, el mecanismo aleatorio se describe así:





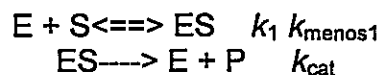
Ks, KMG6P y KMNADP son los nombres que internamente *Dynafit* maneja para las constantes de disociación (justamente se escribe la palabra *dissoc.* para indicarle al programa que son constantes de disociación). El paso de formación del producto es asociado a una constante de velocidad para un proceso de primer orden denominada *kcat*.

A partir de esta representación, *Dynafit* es capaz de generar la ecuación de velocidad correspondiente y encontrar, mediante el método de los mínimos cuadrados, qué valores deben tener las constantes cinéticas para que el modelo describa los datos experimentales.

Para el caso del estudio de la inhibición por parte del producto NADPH, se compararon los modelos de inhibición competitiva, no competitiva, acompetitiva y mixta.

Para el caso de las curvas de progreso, se comparó el modelo michaeliano simple y un modelo un poco más complejo donde se introduce la inhibición por producto.

El modelo michaeliano simple se describe de la siguiente forma:



donde  $k_1$ ,  $k_{\text{menos1}}$  y  $k_{\text{cat}}$  son las constantes de velocidad.

A partir de esta representación esquemática el programa *Dynafit* genera y resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales que describe la evolución

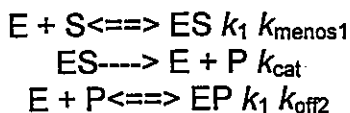


temporal de cada una de las especies involucradas, excepto para el complejo ES cuya concentración se considera invariable en el tiempo (se asume estado estacionario). Se genera entonces automáticamente el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned} d[E]/dt &= -k_1[E][S] + k_{\text{menos1}}[ES] + k_{\text{cat}}[ES] \\ d[S]/dt &= -k_1[E][S] + k_{\text{menos1}}[ES] \\ d[ES]/dt &= k_1[E][S] - k_{\text{menos1}}[ES] - k_{\text{cat}}[ES] \\ d[P]/dt &= k_{\text{cat}}[ES] \end{aligned}$$

y se resuelve numéricamente  $d[P]/dt$  buscando iterativamente con qué valores de las constantes se logra una distancia mínima entre el modelo teórico y los datos experimentales.

Para el caso de la inhibición por producto, los procesos químicos involucrados se describen esquemáticamente de la siguiente manera:



Nótese que convenientemente se asignó un mismo valor de constante de velocidad ( $k_1$ ) para caracterizar la unión del producto P y del sustrato S a la enzima libre. Esta constante de velocidad depende fundamentalmente de los coeficientes de difusión del sustrato o del producto en el solvente y, tratándose de que el sustrato y el producto son compuestos químicamente muy similares, se asume que tiene el mismo valor. En cualquier caso, a nosotros nos interesan las constantes cinéticas más que las constantes de velocidad, y las constantes cinéticas son combinaciones matemáticas, más o menos complejas, de las constantes de velocidad. Por ejemplo:

$$K_M = (k_{\text{menos1}} + k_{\text{cat}})/k_1 \text{ y } K_i = k_{\text{off2}}/k_1.$$

Para el caso de la inhibición por producto el programa generó y resolvió el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} d [E]/dt &= -k_1[E][S] + k_{\text{menos1}}[ES] + k_{\text{cat}}[ES] - k_1[E][P] + k_{\text{off2}}[EP] \\ d [S]/dt &= -k_1[E][S] + k_{\text{menos1}}[ES] \\ d [ES]/dt &= k_1[E][S] - k_{\text{menos1}}[ES] - k_{\text{cat}}[ES] \\ d [P]/dt &= k_{\text{cat}}[ES] - k_1[E][P] + k_{\text{off2}}[EP] \\ d [EP]/dt &= k_1[E][P] - k_{\text{off2}}[EP] \end{aligned}$$

Adicionalmente, *Dynafit* comparó estadísticamente los ajustes logrados con cada modelo utilizando el criterio de información de Akaike (AIC, siglas de *Akaike Information Criteria*) (Kuzmič, 2009) gracias a lo cuál fue posible comparar insesgadamente modelos con diferentes cantidades de parámetros ajustables.

Dado que el otro producto que se forma (6-fosfo-gluconolactona) es inestable, y que la glucosa-6-fosfato estaba al menos 20 veces más concentrada que la 6-fosfo-gluconolactona, para el caso del estudio de las curvas de progreso no se consideró la reacción reversa en ninguno de los modelos a comparar.

Paralelamente al procesamiento de los datos con métodos numéricos, ampliamos la solución analítica descrita por Schnell y Mendoza (1997) para un sistema enzimático michaeliano simple al caso de la inhibición competitiva por parte del producto, y se confirmó la exactitud de la solución propuesta contrastándola con los datos experimentales. Para poder ajustar globalmente los datos provenientes de experimentos realizados con diferentes concentraciones de sustrato y/o enzima a la solución analítica propuesta fue necesario implementar el uso del programa *gfit* (Levin y cols., 2009) el cual

utiliza funciones ya incluidas en el paquete de programación *MATLAB* y encuentra los valores de los parámetros ajustables que minimizan la distancia entre las curvas proyectadas por el modelo y los datos experimentales.

Tanto el programa *gfit* como el *Dynafit* permiten dar estimados iniciales a los parámetros y ver *a priori* del procedimiento de ajuste estadístico cuan cercana estaría la solución generada con los estimados iniciales de los datos experimentales. Se recomienda dar valores iniciales a los parámetros tales que proyecten curvas similares a las experimentales, lo cual indica que se comienza el procedimiento de ajuste con valores cercanos a los valores que se obtendrán tras ejecutar el método de mínimos cuadrados. De esta manera se disminuye la probabilidad de obtener valores de ajuste sub-óptimos. Ambos programas entregan los valores de mejor ajuste acompañados de intervalos de confianza.

Los otros datos que fueron analizados estadísticamente fueron las tasas de crecimiento, de consumo de glucosa y de producción de acetato. Estas tasas, al igual que los flujos metabólicos, suelen expresarse en unidades de  $\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{gDW}^{-1}$  donde gDW representa 1 gramo de biomasa seca.

Para transformar los datos de absorbancia de los cultivos medidos a 600 nm en unidades de peso seco se utilizó el factor de conversión  $0.45 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{U.A.}^{-1}$  previamente determinado para nuestras condiciones experimentales.

En condiciones de estado estacionario metabólico se cumple que:

$$DW(t) = DW_0 e^{kt}$$

donde  $DW_0$  es el peso seco inicial,  $k$  es la tasa intrínseca de crecimiento y  $t$  es el tiempo. Esta expresión puede manipularse para convertirla en la recta:

$$\ln DW(t) = kt + \ln DW_0$$

Cada curva de crecimiento puede "linealizarse" de esta forma, y por lo tanto, los conjuntos de curvas de crecimiento de cada cepa pueden compararse estadísticamente con un análisis de covarianza (ANCOVA) donde se contrasta la hipótesis de nulidad de diferencias entre las pendientes (tasas de crecimiento) de las diferentes cepas.

Para los metabolitos detectados en los filtrados extracelulares en estado estacionario se cumple que:

$$[\text{metabolito}](t) = (\text{tasa específica de consumo/excreción}) \cdot (DW(t)/k) + [\text{metabolito}]_0$$

que también tiene una forma lineal por lo cual puede emplearse el ANCOVA para comparar estadísticamente las pendientes, las cuales corresponden con las tasas de consumo de glucosa o de producción de acetato.

Además del ANCOVA se realizó una prueba de comparaciones múltiples para comparar par a par las tasas determinadas para cada cepa. Tanto los ANCOVA como las comparaciones múltiples se realizaron con el programa *MATLAB*.

## RESULTADOS

La pregunta general de esta investigación es: ¿Qué pasa con el metabolismo si, de alguna manera, una reacción de las vías centrales que genera NADPH es convertida en una reacción productora de NADH? Para hacerla más concreta nos enfocamos en la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual es generalmente considerada como productora de NADPH.

Para una comprensión más cabal de la importancia metabólica de la especificidad por cofactor de la EcG6PDH fue necesario cuantificar más rigurosamente esta propiedad. Por ello se desarrolló un método de purificación de esta proteína con el cual se obtuvo una muestra homogénea de la misma. Con esta preparación homogénea se realizaron mediciones de actividad enzimática para determinar los parámetros cinéticos principales para los sustratos y determinar el tipo y el grado de inhibición por parte de los productos NADPH y NADH.

### *Estudios de velocidad inicial con la enzima EcG6PDH*

Los ajustes globales de los datos cinéticos permiten, en un sólo análisis integrado, estimar los valores de las constantes cinéticas que mejor explican las propiedades de la enzima en estudio en un conjunto amplio de circunstancias

experimentales. Por ejemplo, se puede determinar el valor de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) y de las constantes michaelianas ( $K_M$ ) para la glucosa-6-fosfato y el NADP a partir de analizar simultáneamente los valores de velocidad inicial contra concentración de sustratos obtenidos variando las concentraciones del NADP a diferentes concentraciones fijas de la glucosa-6-fosfato. Es decir, el conjunto de datos son las velocidades iniciales obtenidas para diferentes combinaciones de concentración de los dos sustratos, y todos estos datos son ajustados simultáneamente en un sólo procedimiento de ajuste estadístico para buscar qué valores de las constantes cinéticas explican el comportamiento observado en todas las circunstancias estudiadas. Así se obtuvieron los estimados para las constantes cinéticas involucradas que explican el comportamiento cinético de la enzima para cualquier combinación de concentraciones de los sustratos (Tabla 1). Desde luego, es casi seguro que para ciertos valores extremos de concentración de los sustratos, los parámetros obtenidos no sean adecuados para explicar la velocidad que se registrará.

El estudio de las velocidades iniciales según aumentaba la concentración de un sustrato a concentración fija del respectivo co-sustrato mostró comportamientos hiperbólicos para todas las combinaciones ensayadas, tanto con NAD como con NADP. Para cada una de las curvas individuales se calculó el valor de velocidad máxima aparente ( $V^{app}$ ) y de la constante de Michaelis aparente ( $K_M^{app}$ ) utilizando el modelo michaeliano simple.

Dentro de los rangos de concentraciones estudiados se observó que, al aumentar la concentración de glucosa-6-fosfato, aumentaron hiperbólicamente

las  $V^{app}$  y disminuyeron hiperbólicamente las  $K_M^{app}$  para los cofactores (Fig. 2 y Fig. 3). La misma dependencia se observó para los parámetros cinéticos aparentes de la glucosa-6-fosfato cuando aumentó la concentración de los cofactores. Se puede apreciar con claridad que la curva que describe el comportamiento de la  $K_M$  aparente para el NADP tiende a un valor asintótico alrededor de  $8 \mu\text{M}$  mientras que la  $K_M$  aparente del NAD tiende a un valor alrededor de  $5 \text{ mM}$ . Hasta donde conocemos, *esta es la caracterización cinética de la EcG6PDH que mayor rango de concentraciones de sustrato ha explorado y es la primera vez que se realizan observaciones sistemáticas con el NAD como co-sustrato de la reacción*. Es importante notar que la principal diferencia entre las constantes cinéticas para los cofactores NAD y NADP está en los valores de  $K_M$ , donde la diferencia es de casi tres órdenes de magnitud, mientras que las velocidades máximas variaron mucho menos (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros cinéticos de la enzima EcG6PDH. Estimados obtenidos mediante el ajuste global de las velocidades iniciales registradas a diferentes concentraciones de glucosa-6-fosfato y el respectivo cofactor. Los valores de  $k_{cat}$  están expresados en  $\text{s}^{-1}$  mientras que el resto de los valores están en  $\mu\text{M}$ .

NADP			glucosa-6-fosfato	
$k_{cat}$	$K_M$	$K_i$	$K_M$	$K_i$
$174 \pm 2$	$7.5 \pm 0.8$	$19 \pm 4$	$174 \pm 11$	$440 \pm 100$
NAD			glucosa-6-fosfato	
$k_{cat}$	$K_M$	$K_i$	$K_M$	$K_i$
$288 \pm 5$	$5090 \pm 400$	$29700 \pm 4000$	$1245 \pm 115$	$7260 \pm 880$

El patrón de comportamiento de las constantes cinéticas aparentes con respecto a la concentración de los respectivos co-sustratos es consistente tanto con un mecanismo cinético ordenado bajo la suposición de estado estacionario como con un mecanismo aleatorio bajo la suposición de equilibrio rápido. Por lo tanto, sin otros experimentos no es posible distinguir entre estos dos mecanismos. Como no se pueden realizar experimentos de inhibición con el segundo producto, la 6-fosfo-gluconolactona, no podemos probar cuán bien se ajustan los resultados a un mecanismo ordenado bajo la suposición de estado estacionario. La 6-fosfo-gluconolactona es inestable a los valores de pH en los cuales la enzima registra su actividad máxima. A pH 7.8 y 25 °C la constante de primer orden del proceso de degradación de la 6-fosfo-gluconolactona es de  $0.0033 \text{ seg}^{-1}$  (Schofield y Sols, 1976). La degradación es un proceso lento en comparación con la velocidad de catálisis pero la inestabilidad hace inmanejable el estudio de la inhibición por este producto a través de mediciones velocidad inicial convencionales. Otro factor que complica estudiar la inhibición por parte de la 6-fosfo-gluconolactona es que esta sustancia no está disponible comercialmente.

La similitud estructural entre el producto NADPH y el sustrato NADP provoca que el primero sea capaz de unirse a la enzima libre y por lo tanto inhibir el proceso de catálisis. El estudio sistemático de la inhibición por este producto sirve para dar algunas luces sobre el mecanismo de catálisis y para estimar cuán inhibida puede estar la enzima *in vivo* por parte del NADPH, sustancia que también es generada en otras reacciones metabólicas.



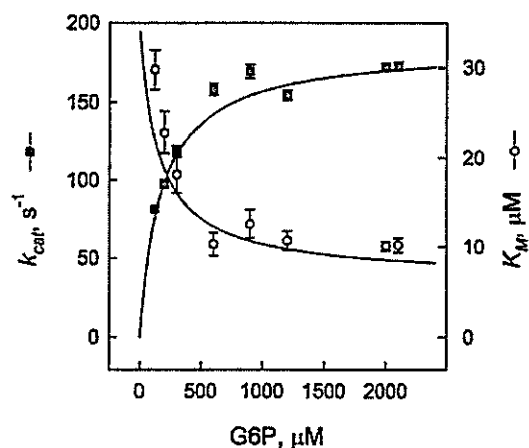


Fig. 2: Comportamiento de las constantes cinéticas principales para el cofactor NADP a diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa-6-fosfato (G6P). Los puntos representan el valor medio obtenido en cada experimento individual variando al concentración del cofactor a una concentración fija de G6P, las barras representan la desviación estándar dentro de cada experimento individual, y las curvas representan la variación de las constantes cinéticas según varía la concentración del co-sustrato G6P según el ajuste global de todos los experimentos.

En la Figura 4 se muestran los gráficos de Lineweaver-Burk para los experimentos de inhibición por NADPH. Para el caso en que el NADP fue el sustrato variable se observó que el modelo más explicativo fue el de inhibición mixta (Tabla 2), sin embargo, el efecto del NADPH como efector alostérico podría ser irrelevante en las condiciones fisiológicas dado el valor estimado para la constante de inhibición no competitiva ( $K_{iu} = 2090 \pm 460 \mu\text{M}$ ). Por esta razón consideramos que la inhibición competitiva tendría un efecto metabólico más relevante. Para el caso en que la glucosa-6-fosfato fue el sustrato variable se observó que el modelo más explicativo fue el de inhibición competitiva (Tabla

2). El estudio de la inhibición por NADH se llevó a cabo a través del monitoreo de curvas de progreso por razones que se exponen más adelante.

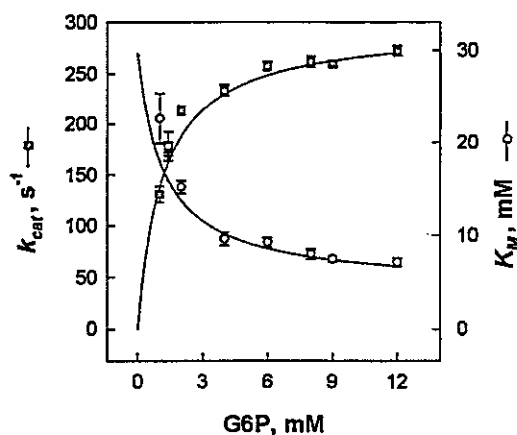


Fig. 3: Comportamiento de las constantes cinéticas principales para el cofactor NAD a diferentes concentraciones del co-sustrato glucosa-6-fosfato (G6P). La simbología representa lo mismo que lo mostrado en la Figura 2, pero nótese como las concentraciones de G6P aquí están en el rango milimolar.

#### *Curvas de progreso de las reacciones catalizadas por la EcG6PDH*

Paralelamente a las mediciones de velocidad inicial se implementó la medición y análisis estadístico de curvas de progreso para superar algunos problemas metodológicos en la medición de las constantes cinéticas.

Dado el valor estimado para la concentración mínima de enzima estable, y los aparatos de medición disponibles, a concentraciones de NADP por debajo de 15  $\mu$ M, nos resultaba imposible obtener una medición de velocidad sin que ya se hubiera consumido más de un 10 % del sustrato. Además, teníamos un

problema de sensibilidad: dado el valor de la  $K_M$  para el NADP obtenido en las primeras estimaciones, para realizar un estudio más riguroso de los parámetros cinéticos midiendo las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato, era necesario medir algunos valores de velocidad inicial a concentraciones de NADP por debajo de  $10 \mu\text{M}$ . Si la concentración de NADP está por debajo de  $10 \mu\text{M}$ , la concentración del producto formado a medir durante la etapa de velocidad inicial (menos de un 5% de sustrato consumido) es muy pequeña, y por ende su señal es muy baja. Si por ejemplo, se intenta medir la velocidad inicial con  $3 \mu\text{M}$  de NADP, la cantidad de producto formado cuando se ha transformado un 10% del sustrato genera una absorbancia de aproximadamente 0.002 U.A., aun con un paso óptico de 1 cm. Esa señal es muy baja para el nivel de sensibilidad de los espectrofotómetros con los cuales contamos. Es posible implementar otro tipo de mediciones más sensibles pero que limitan los estudios en gran escala ya que serían caros y/o lentos (por ejemplo, fluorescencia o radiactividad). Además, mejorar la sensibilidad de la detección del NADPH no resuelve la inactivación de la enzima, la cual de cualquier forma habría que usar a muy bajas concentraciones para lograr medir la velocidad inicial en un tiempo operativo razonable.

Otra limitación de los estudios de velocidad inicial contra concentración de sustrato se evidenció a la hora de estudiar la inhibición por NADH de la EcG6PDH. La concentración de NADH necesaria para hacer estudios de inhibición utilizando la espectrofotometría habían sido la causa de los errores

atribuidos a Sanwal (1970). Para evitar esa circunstancia implementamos la medición de las curvas de progreso de la reacción. Esta metodología permitió el estudio de la inhibición por NADH de la EcG6PDH y la estimación de los parámetros cinéticos de la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>.

La constante de inhibición estimada para el NADPH a través de los estudios de velocidad inicial de la EcG6PDH sugería que la inhibición de la catálisis por parte de este metabolito sería no despreciable aun en bajas concentraciones (Tabla 2), por lo cual se contempló la inhibición por producto dentro de los mecanismos posibles. Para el caso del NADH, las curvas de progreso fueron una alternativa efectiva para determinar su efecto como inhibidor de la catálisis, superando el problema del artefacto "luz extraviada".

La ecuación diferencial que describe la evolución temporal de la concentración de sustrato para un proceso enzimático mono-sustrato, irreversible, y con inhibición por producto, fue planteada por primera vez por Huang y Niemann en 1951:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{V_{\max} s(t)}{K_M \left(1 + \frac{s_o - s(t)}{K_i}\right) + s(t)}$$

donde  $s(t)$  es la concentración de sustrato en el tiempo  $(t)$ ,  $s_o$  es la concentración inicial de sustrato, y  $V_{\max}$ ,  $K_M$  y  $K_i$  son las constantes cinéticas. El valor de dichas constantes cinéticas fue estimado mediante métodos numéricos y mediante el ajuste a una solución analítica no descrita con anterioridad (Tabla 2).

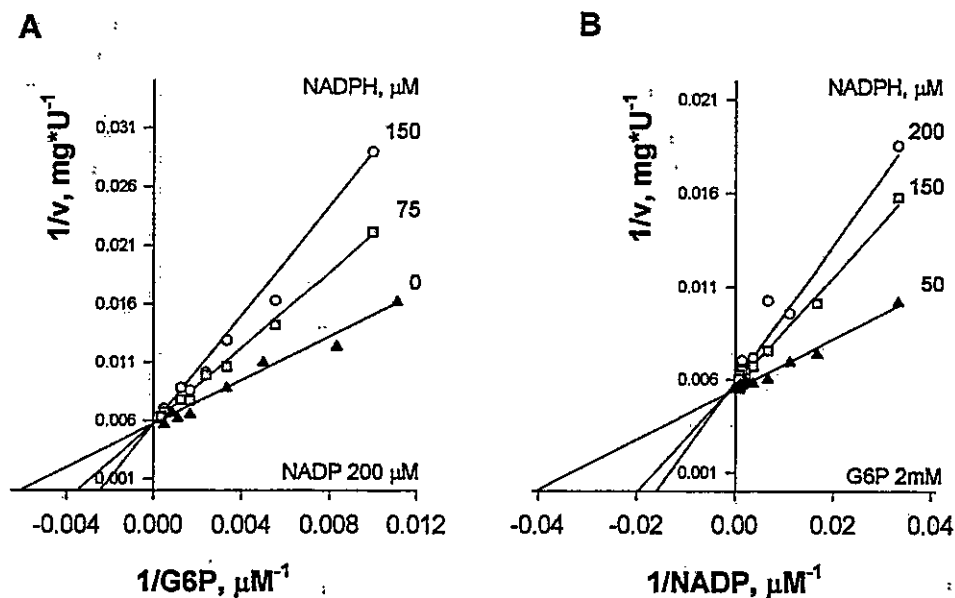


Fig. 4. Inhibición de la EcG6PDH por parte del producto NADPH. (A) Se realizaron ajustes globales no lineales de los datos de velocidad inicial obtenidos en varios experimentos individuales con concentraciones diferentes del inhibidor NADPH, variando la concentración de glucosa-6-fosfato (G6P) a la concentración fija de NADP que se indica en el gráfico. (B) Representación análoga a la que está en (A) esta vez para los experimentos en los que se varió la concentración de NADP a la concentración fija de G6P que se indica en el gráfico. Los resultados se representan, siguiendo la metodología gráfica de Lineweaver-Burk, como los valores inversos de las velocidades iniciales contra los valores inversos de las concentraciones del sustrato variable para visualizar con mayor claridad los patrones de inhibición. Se representan solamente tres curvas por experimento para no sobre-cargar las figuras. Los puntos representan los valores medios de tres o cuatro réplicas que se midieron para cada combinación de concentraciones de sustratos e inhibidor.

Tabla 2: Estimados de las constantes cinéticas de EcG6PDH obtenidos por diferentes métodos.

La  $k_{cat}$  se expresa en  $s^{-1}$ , las demás variables se expresan en  $\mu M$ .

Método	NADP como sustrato variable			glucosa-6-fosfato como sustrato variable		
	$k_{cat}$	$K_{MNADP}$	$K_{icNADPH}$	$k_{cat}$	$K_{MG6P}$	$K_{ic}$
Velocidades iniciales con NADPH presente	$176 \pm 1$	$5.3 \pm 0.8$	$14 \pm 2$	$165 \pm 2$	$163 \pm 9$	$101 \pm 9$
Curvas de progreso (Solución analítica)	$152 \pm 1$	$4.5 \pm 0.5$	$19.0 \pm 2.3$			
Curvas de progreso (Solución numérica)	$158 \pm 1$	$6.2 \pm 0.1$	$24.4 \pm 0.5$			

*Una solución analítica para el estudio de la inhibición competitiva por producto*

Inspirados en el trabajo de Schnell y Mendoza (1997) quienes encontraron la solución analítica a la ecuación integrada de Michaelis-Menten, obtuvimos la solución analítica para la expresión diferencial de la velocidad de un proceso enzimático mono-sustrato, irreversible y con inhibición por producto.

Manipulando algebraicamente la ecuación planteada por Huang y Niemann, se obtuvo:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{V_{max}}{\frac{K_M}{s} \left(1 + \frac{s_o}{K_i}\right) + \left(1 - \frac{K_M}{K_i}\right)}$$

y se realizaron sustituciones de algunos términos constantes:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{V_{max}}{\frac{a}{s} + b}$$

Integrado y manipulando algebraicamente:

$$\ln \frac{sb}{a} + \frac{sb}{a} = \ln \frac{s_0 b}{a} + \frac{s_0 b - V_{\max} t}{a}$$

Aplicando en la ecuación anterior la sustitución:

$$\omega(x) = \frac{sb}{a}$$

y teniendo en cuenta la forma de la función trascendental Omega:

$$\ln \omega(x) + \omega(x) = \ln x$$

se pudo escribir:

$$\ln x = \ln \frac{s_0 b}{a} + \frac{s_0 b - V_{\max} t}{a}$$

¿Qué valor de  $x$  satisface esta igualdad?

$$x = \frac{s_0 b}{a} \exp \frac{s_0 b - V_{\max} t}{a}$$

Por lo tanto:

$$\omega\left(\frac{s_0 b}{a} \exp \frac{s_0 b - V_{\max} t}{a}\right) = \frac{sb}{a}$$

Para simplicidad en la notación sustituimos  $V_{\max}$  por  $V$ .

Despejando  $s$  y revirtiendo las sustituciones iniciales de  $a$  y  $b$ :

$$s = \left( \left( K_M \left( 1 + \frac{s_0}{K_{ic}} \right) \right) / \left( 1 - \frac{K_M}{K_{ic}} \right) \right) \times \omega \left( \left( 1 - \frac{K_M}{K_{ic}} \right) \times \frac{s_0}{\left( K_M \left( 1 + \frac{s_0}{K_{ic}} \right) \right)} \times \exp \frac{\left( -V + \left( 1 - \frac{K_M}{K_{ic}} \right) s_0 \right)}{\left( K_M \left( 1 + \frac{s_0}{K_{ic}} \right) \right)} \right)$$

que es una expresión analítica que describe la variación temporal en la concentración del sustrato en un proceso enzimático mono-sustrato, irreversible y con inhibición por producto.

Es evidente que si no existe inhibición por producto ( $K_i \rightarrow \infty$ ), esta expresión se transforma en la solución encontrada por Schnell y Mendoza (1997):

$$s(t) = K_M \omega \left( \frac{s_0}{K_M} \exp \frac{-vt + \omega}{K_M} \right)$$

#### *Inhibición por NADH de la enzima EcG6PDH*

Uno de los estudios cinéticos realizados con la EcG6PDH fue publicado por Sanwal (1970). En ese trabajo él planteó que el NADH actuaba como inhibidor alostérico de la catálisis de la EcG6PDH con NADP. Tres años después fue demostrado que su observación era espuria y que se debía al artefacto denominado "luz extraviada" (Cavalieri y Sable, 1973). El efecto del NADH como inhibidor no competitivo de la EcG6PDH fue descartado pero no se había realizado ningún estudio acerca de cuál puede ser el efecto del NADH como inhibidor competitivo.

Como la  $K_M$  para NAD es cercana a los 5 mM, si asumimos una  $K_i$  para NADH del mismo orden de magnitud, las concentraciones de NADH necesarias para, mediante un estudio de velocidades iniciales en presencia del inhibidor, cuantificar los efectos sobre la  $K_M$  aparente son tan altas que imposibilitan



monitorear la reacción espectrofotométricamente porque aparecería el artefacto de luz extraviada.

Tabla 3: Inhibición de la EcG6PDH por el producto NADH. Estimados de las constantes cinéticas obtenidos en los experimentos de inhibición por NADH utilizando la metodología menos común del estudio de las curvas de progreso. La  $k_{cat}$  se expresa en  $s^{-1}$ , las demás variables se expresan en  $\mu M$ .

Método	Parámetros cinéticos		
	$k_{cat}$	$K_{MNAD}$	$K_{iNADH}$
Curvas de progreso (Solución analítica)	$240 \pm 12$	$3389 \pm 177$	$2119 \pm 72$
Curvas de progreso (Solución numérica)	$257 \pm 12$	$3638 \pm 171$	$2101 \pm 66$

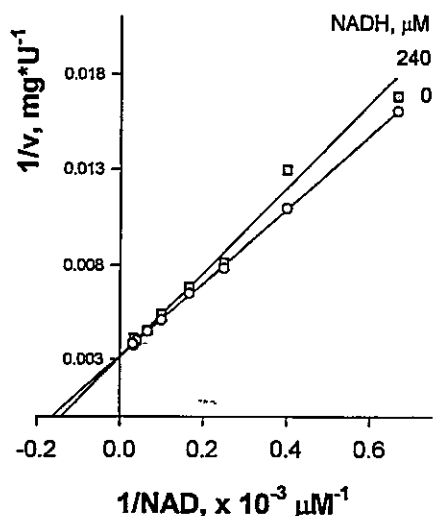


Fig. 5. Velocidades iniciales de reacciones catalizadas por EcG6PDH con y sin presencia de NADH. Representación siguiendo la metodología gráfica de Lineweaver-Burk de los resultados del experimento en que se miden las velocidades iniciales con y sin presencia de NADH a una concentración inicial por debajo del umbral en que se manifiesta el artefacto óptico "stray light" ( $240 \mu M$ ). La velocidad máxima se conserva pero hay un corrimiento en la pendiente que indica un cambio en la  $K_M$  aparente.

Sin embargo, la pregunta de cuál es el efecto del NADH como inhibidor competitivo es relevante para nuestra investigación en la medida en que se quería conocer cuál es la actividad de la EcG6PDH ante diferentes concentraciones de los cofactores NAD(H) y NADP(H).

Utilizando 18 combinaciones diferentes de sustrato y enzima se ajustaron globalmente las curvas de progreso. En los ensayos se utilizó una concentración de glucosa-6-fosfato de 12 mM para garantizar la saturación del sitio para la glucosa-6-fosfato y asegurar un avance de 99.9 % de la reacción en la dirección de la formación de NADH. Los parámetros cinéticos estimados por curvas de progreso se pueden apreciar en la Tabla 3.

Para confirmar que el valor de  $K_i$  para NADH estimado a través de las curvas de progreso es correcto se realizó un ensayo de velocidad inicial utilizando NADH en la mezcla de reacción a una concentración sin riesgo de artefacto de luz extraviada pero suficientemente alta para provocar un cambio notable en la  $K_M$  aparente del NAD. Se tomó el valor de  $K_M$  para NAD obtenido con la metodología de velocidad inicial y el valor de  $K_i$  para NADH determinado por curvas de progreso, y utilizando la expresión de inhibición competitiva,  $K_M^{app} = K_M(1 + I/K_i)$  donde  $I$  es la concentración de inhibidor competitivo, se predijo la  $K_M^{app}$  para el NAD en presencia de 240  $\mu$ M de NADH. Se predijo que su valor debería estar entre 5000 y 5800  $\mu$ M teniendo en cuenta la incertidumbre en los estimados de  $K_M$  y  $K_i$  para NAD y NADH respectivamente. En la Figura 5 se representa el resultado del experimento de velocidades iniciales con y sin presencia de 240  $\mu$ M de NADH. Se estimó una  $K_M$  aparente para NAD de 5960

$\pm 380 \mu\text{M}$ , valor que se solapa con el rango predicho. Hasta donde conocemos, es la primera vez que se informa un valor de  $K_i$  para el NADH para la enzima EcG6PDH.

Tras obtener la  $K_M$  para NAD y la  $K_i$  para NADH se pudo realizar un análisis más completo de la selectividad por cofactores de la EcG6PDH.

#### *Sensibilidad de la actividad de la EcG6PDH al cociente redox NAD(P)/NAD(P)H*

El siguiente paso de esta investigación fue elaborar un modelo para estimar la producción de NADH y NADPH por parte de la EcG6PDH basado en el conocimiento de las propiedades cinéticas de esta enzima.

En el estado estacionario metabólico la producción de estos cofactores en la reacción catalizada por la EcG6PDH está dada por el flujo que haya a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas, y la especificidad de la enzima que esté presente, sin embargo, tener un modelo cinético es útil para:

- conociendo las concentraciones de los sustratos y la actividad específica de la enzima EcG6PDH en un extracto celular, es posible estimar el flujo máximo posible que puede haber por la vía de las pentosas.
- estimar la producción relativa de NADH y NADPH.
- estimar la producción local potencial de la enzima en situaciones de estado no estacionario.

Rohwer y cols. (2006) obtuvieron una expresión cinética *genérica* para procesos enzimáticos bi-sustrato bi-producto asumiendo el establecimiento de un equilibrio rápido en la unión entre la enzima, los sustratos y los productos, así

como la unión de estos a la enzima de forma aleatoria. Cuando se aplica dicha ecuación *genérica* para la EcG6PDH se obtiene:

$$v = \frac{\left(1 - \frac{6PGcna * NADPH}{K_{eq} * NADP * G6P}\right) * \left(\frac{V_{max} * G6P * NADP}{K_{MNADP} K_{MG6P}}\right)}{\left(1 + \frac{NADP}{K_{MNADP}} + \frac{NADPH}{K_{iNADPH}}\right) * \left(1 + \frac{G6P}{K_{MG6P}} + \frac{6PGcna}{K_{iGcna}}\right)}$$

donde 6PGcna es la concentración de la 6-fosfo-gluconolactona, G6P es la concentración de la glucosa-6-fosfato, NADP y NADPH representan las concentraciones de estos nucleótidos,  $K_{eq}$  es la constante del equilibrio termodinámico y el resto de los parámetros son las constantes de disociación de los equilibrios que se establecen entre la enzima y las otras especies moleculares involucradas en la reacción.

Se hicieron dos consideraciones. La primera fue llamar R al cociente redox NADP/NADPH. La otra fue considerar que la concentración de la 6-fosfo-gluconolactona *in vivo* es despreciable en comparación con los otros metabolitos involucrados. Esta aproximación claramente no es cierta y se han descrito ejemplos de acumulación de 6-fosfo-gluconolactona en cepas de interés biotecnológico con alto flujo por la vía de las pentosas (Aon y cols. 2008). No obstante considerando que:

- la 6-fosfo-gluconolactona solamente se genera en la vía de las pentosas;
- la enzima que hidroliza a la 6-fosfo-gluconolactona (6-fosfo-gluconolactonasa, E.C. 3.1.1.31) tiene una actividad específica en los extractos al menos 20 veces mayor que la de EcG6PDH (7 U/mg *versus* 0.381 U/mg) y una  $k_{cat}$  2.6 veces más rápida que la de EcG6PDH (780 U/mg  $M_w = 37$  kDa vs 180 U/mg  $M_w = 56$  kDa) (Zimenkov y cols., 2005);
- que la 6-fosfo-gluconolactona puede descomponerse espontáneamente a  $\gamma$ -6-fosfo-gluconolactona o a 6-fosfo-gluconato. En este último caso, el

metabolito formado es sustrato de la 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa, y la actividad de esta enzima favorece la transformación de 6-fosfo-gluconolactona en 6-fosfo-gluconato;

- la 6-fosfo-gluconolactona es un compuesto inestable en solución acuosa y no disponible comercialmente, por lo cual no se conocen trabajos donde se haya caracterizado cuánto inhibe a la EcG6PDH u otra enzima homóloga;

se decidió despreciar la concentración de la 6-fosfo-gluconolactona. Entonces,

la ecuación anterior se simplifica y manipulando algebraicamente se obtiene:

$$v = \frac{\left(\frac{V_{\max} * G6P * R}{K_{MNADP} * K_{MG6P}}\right)}{\left(\frac{1}{NADPH} + \frac{R}{K_{MNADP}} + \frac{1}{K_{INADPH}}\right) * \left(1 + \frac{G6P}{K_{MG6P}}\right)}$$

$$v = \frac{\left(\frac{V_{\max} * G6P * R}{K_{MNADP} * K_{MG6P}}\right)}{\left(\frac{1}{NADPH} + \frac{R}{K_{MNADP}} + \frac{1}{K_{INADPH}}\right) + \left(\frac{G6P}{K_{MG6P} * NADPH}\right) + \left(\frac{R * G6P}{K_{MNADP} * K_{MG6P}}\right) + \left(\frac{G6P}{K_{INADPH} * K_{MG6P}}\right)}$$

$$v = \frac{V_{\max} * G6P * R}{\left(\frac{K_{MNADP} * K_{MG6P}}{NADPH} + K_{MG6P}R + \frac{K_{MNADP} * K_{MG6P}}{K_{INADPH}}\right) + \left(\frac{K_{MNADP} * G6P}{NADPH}\right) + \left(\frac{K_{MNADP} * R * G6P}{K_{MNADP}}\right) + \left(\frac{K_{MNADP} * G6P}{K_{INADPH}}\right)}$$

$$v = \frac{V_{\max} * G6P * R}{R * (K_{MG6P} + G6P) + K_{MG6P} * \left(\frac{K_{MNADP}}{NADPH} + \frac{K_{MNADP}}{K_{INADPH}}\right) + G6P * \left(\frac{K_{MNADP}}{NADPH} + \frac{K_{MNADP}}{K_{INADPH}}\right)}$$

$$v = \frac{V_{\max} * G6P * R}{(K_{MG6P} + G6P) * \left(\frac{K_{MNADP}}{NADPH} + \frac{K_{MNADP}}{K_{INADPH}} + R\right)}$$

Dado que el modelo cinético propuesto establece una relación matemática entre el cociente redox NAD(P)/NAD(P)H y la actividad de la EcG6PDH, se procedió a evaluar si la actividad calculada con los parámetros cinéticos aquí determinados eran consistentes con los datos de flujo metabólico previamente publicados. Considerando valores publicados para la actividad específica de la EcG6PDH en los extractos celulares, la concentración de glucosa-6-fosfato y la proporción

proteína:peso seco, se calculó la actividad EcG6PDH con el modelo cinético desarrollado. Se utilizaron las constantes cinéticas aquí obtenidas y se evaluó para valores de NAD(P) y NAD(P)H previamente publicados (Tabla 4). Se consideró que las constantes  $K_{MNADP}$  y  $K_{MG6P}$  varían con la concentración de glucosa-6-fosfato y de NADP respectivamente según la ecuación descrita para un mecanismo aleatorio bajo la suposición de equilibrio rápido o para un mecanismo ordenado bajo la suposición de estado estacionario:

$$K_m^{app} = \frac{K_{iA} K_{mB} + K_{mA} b}{K_{mB} + b}$$

Con las concentraciones de NADP (170  $\mu\text{M}$ ) y NADPH (220  $\mu\text{M}$ ) obtenidas por Lundquist y Olivera (1971), se estimó una producción de 2844  $\mu\text{mol NADPH gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Por otra parte, utilizando los valores de concentración de NAD (900  $\mu\text{M}$ ) y NADH (400  $\mu\text{M}$ ) obtenidos por esos mismos autores, se estimó una producción de 187  $\mu\text{mol NADH gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Por lo tanto, el cociente entre las producciones de NADPH y NADH en condiciones fisiológicas sería de alrededor de 15, que es un valor claramente diferente de la razón entre las constantes de especificidad:  $(174/7.5)/(288/5088) \approx 410$ .

Adicionalmente, se construyó una curva de producción de NAD(P)H/unidad de biomasa/unidad de tiempo contra el cociente  $R=\text{NAD(P)}/\text{NAD(P)H}$  y se analizó la producción relativa de NADH y NADPH considerando los valores termodinámicamente posibles que puede tomar R en las condiciones fisiológicas (Fig. 6). Es importante notar que la actividad cambia notablemente

dentro del rango de R analizado para el cofactor NADP, mientras que para el NAD la actividad no varía mucho. Esto sugiere que la producción de NADPH desde la EcG6PDH podría variar mucho de manera local durante la transición de un estado metabólico estacionario a otro, por ejemplo, si hay una demanda puntual alta por NADPH para la defensa contra el estrés oxidativo.

Tabla 4: Datos bioquímicos y fisiológicos de *E. coli* recopilados de la literatura citada.

Variable	Valor	Referencia
Actividad específica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en extractos celulares	0.381 U/mg (BW25113)	Zhao y cols., 2004
	0.19 U/mg (MG1655)	Nicolás y cols., 2007
Proporción de proteínas en el peso seco	Proteínas constituyen 55% del peso seco	Ingraham y cols., 1983
concentración de glucosa-6-fosfato intracelular	801 $\mu\text{M}$	Lowry y cols., 1971
NADP	170 $\mu\text{M}$	Lundquist y Olivera, 1971
	210 $\mu\text{M}$	Brumaghim y cols., 2003
NADPH	21 $\mu\text{M}$	Bennett y cols., 2009
	220 $\mu\text{M}$	Lundquist y Olivera, 1971
	24 $\mu\text{M}$	Brumaghim y cols., 2003
NAD	120 $\mu\text{M}$	Bennett y cols., 2009
	900 $\mu\text{M}$	Lundquist y Olivera, 1971
	230 $\mu\text{M}$	Brumaghim y cols., 2003
NADH	2600 $\mu\text{M}$	Bennett y cols., 2009
	400 $\mu\text{M}$	Lundquist y Olivera, 1971
	700 $\mu\text{M}$	Brumaghim y cols., 2003
Flujo metabólico a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas	83 $\mu\text{M}$	Bennett y cols., 2009
	417-1460 $\mu\text{mol gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ (20-70% de toda la glucosa que es consumida, en dependencia de la tasa de crecimiento)	Kayser y cols., 2005

Con la ecuación *ad hoc* obtenida se tiene una medida cuantitativa de la especificidad por cofactor más integradora que el cociente entre las constantes

de especificidad, ya que incluye la inhibición por producto, aspectos termodinámicos y el efecto de la concentración del co-sustrato.

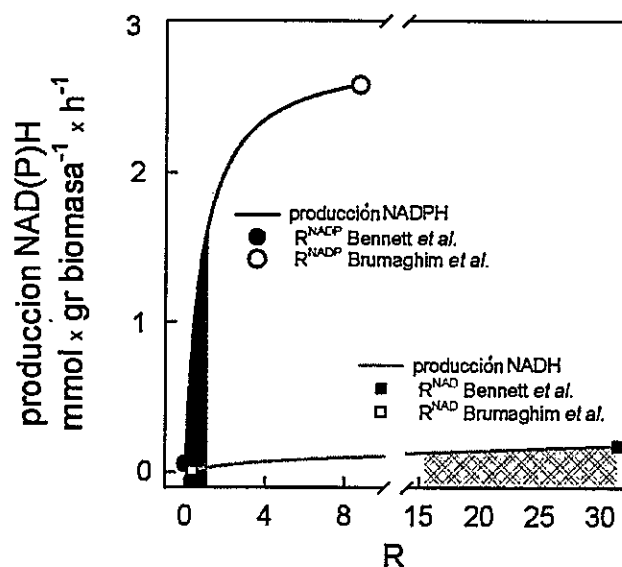


Fig. 6: Modelación de la producción de NADPH y NADH por parte de la enzima EcG6PDH para diferentes valores de la razón NAD(P)/NAD(P)H. Los valores de R se generaron con las concentraciones reportadas por Brumaghim y cols. (2003) y Bennett y cols. (2009). Se aumentó linealmente la concentración de las formas oxidadas de cada nucleótido desde el valor más bajo al valor más alto encontrado entre los dos reportes. Simultáneamente se aplicó una disminución lineal en la concentración de las formas reducidas, de esa manera crece el valor de la razón R. Los valores de  $R^{NADP}$  y  $R^{NAD}$  informados por dichos autores se representan con puntos. Las áreas sombreadas corresponden a los rangos para  $rR^{NADP}$  (gris oscuro) y  $rR^{NAD}$  (gris claro) donde es termodinámicamente factible que ocurran las reacciones metabólicas en el sentido en que es posible el metabolismo, según lo determinado por Henry y cols. (2007).



### Caracterización cinética de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>

Se estimaron los valores de  $K_M$  y  $k_{cat}$  para NAD y NADP de la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> mediante curvas de progreso a una concentración de glucosa-6-fosfato de 12 mM. Los valores obtenidos muestran que dicha enzima es claramente preferente por NAD en esas condiciones (Tabla 5). Para saber si dicha preferencia podía cambiar significativamente a otras concentraciones de glucosa-6-fosfato más cercanas a las condiciones fisiológicas, se midió la actividad específica glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de un extracto celular proveniente de la cepa NAD-G6PDH, con NAD y NADP, a diferentes concentraciones de glucosa-6-fosfato (Tabla 6). Aunque no se realizó una caracterización cinética tan minuciosa como la realizada para la EcG6PDH, hay resultados suficientes para plantear que LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> es un homólogo de EcG6PDH con una clara preferencia por NAD y sus propiedades cinéticas indican que puede ser funcional en las condiciones intracelulares.

Por lo tanto, la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> tiene las características cinéticas adecuadas para sustituir a la EcG6PDH y observar el efecto de la producción de NADH en la vía de las pentosas de *Escherichia coli*.

Tabla 5: Estimados de los parámetros cinéticos de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>.

$K_{MNADP}$	$170 \pm 75 \text{ mM}$
$K_{catNADP}$	$840 \pm 10 \text{ sec}^{-1}$
$K_{icNADPH}$	$>10^2 \text{ mM}$
$K_{MNAD}$	$1600 \pm 22 \text{ }\mu\text{M}$
$K_{catNAD}$	$1380 \pm 610 \text{ sec}^{-1}$
$K_{icNADH}$	$11.8 \pm 1 \text{ mM}$
$(K_{catNADP}/K_{MNADP})/(K_{catNAD}/K_{MNAD})$	<b>0.006</b>

*Predicciones con el FBA del efecto sobre el crecimiento y la distribución de los flujos del cambio en la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*

Las simulaciones realizadas antes de las manipulaciones genéticas indicó que el cambio en la especificidad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa conduciría a "cero flujo" por la rama oxidativa de la vía de las pentosas. Es decir, según la modelación realizada, el fenotipo "flujómico" de la cepa con una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa específica para NAD sería idéntico al de una cepa sin glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Desde el punto de vista de la optimización de la distribución de los flujos para lograr el máximo crecimiento, el uso de la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> en lugar de la EcG6PDH provocaría un déficit de NADPH y un exceso de NADH, que para ser compensado requeriría de la acción de la transhidrogenasa pntAB. Pero el uso de la vía de las pentosas implicaría también la pérdida de una molécula de CO<sub>2</sub> por cada molécula de glucosa que ingresa a la vía dada la descarboxilación

catalizada por la 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa. Entonces, además de requerirse la acción de la pntAB (que implica la entrada al citoplasma de protones que dejan de utilizarse para generar ATP), se perdería carbono por descarboxilación. Por ello la solución más óptima, si el objetivo es formar biomasa, es no utilizar la rama oxidativa de la vía de las pentosas modificada y generar el NADPH faltante vía pntAB. Por lo tanto, la distribución de los flujos metabólicos y la tasa de crecimiento predichas para la cepa NAD-G6PDH eran iguales a lo previsto para una cepa  $\Delta zwf$ , en la cual hay alta actividad pntAB pero no se pierde el  $\text{CO}_2$  en la reacción catalizada por la 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa.

Tabla 6: Razón entre las actividades específicas con NAD y NADP registradas en extractos celulares provenientes de la cepa NAD-G6PDH. En todas las combinaciones de concentraciones de glucosa-6-fosfato y nucleótidos ensayadas la actividad con NAD fue mayor que con NADP.

glucosa-6-fosfato		nucleótidos		
		400 $\mu\text{M}$	1 mM	3 mM
250 $\mu\text{M}$	47.5	49.7	34.1	
3 mM	16.5	33.7	23.7	

Para contrastar esa predicción computacional con los resultados experimentales necesitábamos generar una cepa  $\Delta zwf$ , o mejor aun, una cepa con una variante inactiva de la enzima. La proteína mutante LmG6PDH<sup>D16GR46EQ47E</sup> mostró una

actividad despreciable tanto con NAD como con NADP, por lo cual fue utilizada para la obtención de una cepa "control" sin actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En caso de que la predicción de "cero flujo" fuera cierta, era necesario descartar que la ausencia de flujo se debiera al malfuncionamiento de la enzima mutante que prefiere NAD. Para controlar esto se decidió adicionalmente efectuar el reemplazo de EcG6PDH por LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> en una cepa isogénica a la silvestre pero carente de la enzima fosfo-glucosomerasa. La fosfo-glucosomerasa cataliza la transformación de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. Sin la fosfo-glucosomerasa el primer segmento de la glicólisis queda interrumpido, forzando a que toda la glucosa sea catabolizada a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas. Por lo tanto, en las cepas  $\Delta pgi$  las respectivas variantes de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (sea la nativa EcG6PDH o la mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>) se convierten en proteínas esenciales si se utiliza glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo, los resultados obtenidos con las mutantes  $\Delta pgi$  resultaron ser más importantes que lo que se esperaba para un control de funcionalidad.

*La sustitución de la enzima EcG6PDH por la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> provoca cambios en las tasas de crecimiento y modificaciones inesperadas en los flujos metabólicos*

Las actividades específicas registradas en los extractos celulares permitieron

confirmar el éxito del procedimiento de recombinación homóloga ya que fue posible comprobar que la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> está activa en las cepas NAD-G6PDH y  $\Delta pgi$ -NAD (Fig. 7). También mostró que la sustitución de la secuencia codificante para aminoácidos de la enzima EcG6PDH por la secuencia codificante para aminoácidos de la proteína LmG6PDH<sup>D16GR46EQ47E</sup> provoca la pérdida de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en los extractos, tanto con NAD como con NADP (Fig. 7).

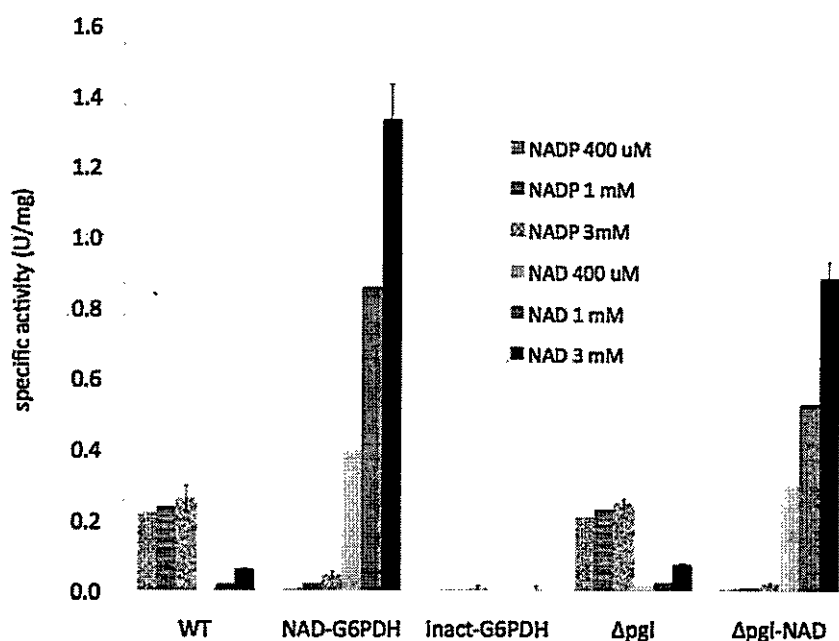


Fig. 7. Actividades específicas de las diferentes formas de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa registradas en los extractos celulares provenientes de las cepas en estudio. Como se indica en el gráfico, se utilizaron los nucleótidos NAD y NADP a varias concentraciones. El co-sustrato glucosa-6-fosfato se utilizó a una concentración de 3 mM. La altura de la columna indica el valor promedio y las barras de error indican la desviación estándar. Los resultados muestra claramente que la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> se traduce correctamente, y que la sustitución de la enzima nativa por la mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47ED16G</sup> suprime la actividad tanto con NAD como con NADP.

Una vez confirmado el éxito del procedimiento de recombinación a través de la secuenciación de los *loci* cromosomales y del registro de la actividad específica en los extractos, se realizaron experimentos en los cuales se monitoreó la tasa de crecimiento, el consumo de glucosa y la producción de acetato, tanto en las cepas parentales como en las cepas mutantes.

En correspondencia con las observaciones realizadas por otros investigadores (Canonaco y cols., 2001; Charusanti y cols., 2010), la cepa  $\Delta pgi$  crece mucho más lentamente que la cepa silvestre. Se ha postulado que este fenotipo en la cepa  $\Delta pgi$  es consecuencia de un desbalance entre la tasa de generación de NADPH y la tasa de formación de los demás precursores anabólicos (Canonaco y cols., 2001). Este desbalance puede ser parcialmente compensado con la sobre-expresión de la transhidrogenasa UdhA, la cual transfiere equivalentes de reducción desde el NADPH al NADH (Canonaco y cols., 2001). Utilizando la modelación con FBA se reprodujeron los resultados de Canonaco y cols. (2001) y se previó que la sustitución de la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> mejoraría la tasa de crecimiento sin necesidad de sobre-expresar la transhidrogenasa UdhA al sustituir una fuente de producción de NADPH por una fuente de NADH (Tabla 7).

Como puede apreciarse en la Tabla 8, con la sustitución de la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> en la cepa  $\Delta pgi$ , la tasa de crecimiento aumentó desde 0.15 h<sup>-1</sup> hasta 0.23 h<sup>-1</sup>, acompañada de un incremento proporcionalmente mayor en el consumo de glucosa. No se detectaron cantidades apreciables de acetato ni

de ningún otro producto de fermentación en el medio extracelular. De esta manera, la supervivencia de la cepa  $\Delta pgi$ -NAD cuando se utilizó glucosa como única fuente de carbono mostró que la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> es funcional en las condiciones intracelulares y al parecer no provoca efectos tóxicos en el contexto  $\Delta pgi$ .

Las tasas de asimilación de glucosa de las cepas  $\Delta pgi$  y  $\Delta pgi$ -NAD fueron utilizadas como restricción para el cálculo de los flujos metabólicos mediante FBA. La tasa de crecimiento calculada por el programa para la cepa parental  $\Delta pgi$  ( $0.11 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ ) es similar al valor experimental observado ( $0.145 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que la cepa  $\Delta pgi$ -NAD creció a  $0.231 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$  que es muy cercano a lo esperado según la modelación con FBA ( $0.235 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ ). Los posibles flujos metabólicos internos que satisfacen a la tasa de consumo de glucosa y a la tasa de crecimiento registradas se calcularon mediante un análisis de variabilidad del flujo (Orth y cols., 2010) Tabla 9). Los resultados con las cepas carentes de fosfo-glucó-isomerasa muestran que la sustitución de la enzima EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> provocó, en concordancia con lo esperado según la modelación, una mejoría de la tasa de crecimiento.

En el caso de las cepas donde sí está presente el gen *pgi*, el estudio de las curvas de crecimiento y la medición directa de los flujos metabólicos reveló un resultado diferente a lo predicho por el modelo computacional. Para la cepa silvestre la tasa de crecimiento ( $0.64 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ) estuvo por debajo de lo previsto por el modelo ( $0.70 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ), lo cual se explica fundamentalmente por la

excreción de acetato en los experimentos, ya que esto implica menos carbono disponible para ser incorporado a la biomasa (Tabla 9). Según la medición experimental de la proporción de los isotopómeros de la histidina, el porcentaje de glucosa catabolizada por la rama oxidativa de la vía de las pentosas fue de 22 %, menos de la mitad de lo predicho mediante la modelación (48 %). Por lo tanto, la producción de NADPH por la rama oxidativa de la vía de las pentosas fue menor de lo que se esperaba para un crecimiento aeróbico óptimo usando glucosa como única fuente de carbono.

En el caso de la cepa *inact-G6PDH*, la tasa de crecimiento observada ( $0.53 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ) también estuvo por debajo de lo calculado para un crecimiento óptimo ( $0.61 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ) considerando la tasa de consumo de glucosa observada, y al igual que en la cepa silvestre, se registró una producción de acetato imprevista en los cálculos para un crecimiento óptimo. Otros autores (Sauer y cols., 2004) han observado en la cepa  $\Delta zwf$  tasas de crecimiento similares ( $0.52 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ ) a las aquí observadas para la cepa *inact-G6PDH*, lo cual indica que esta última es fenotípicamente similar a la cepa  $\Delta zwf$ .

El reemplazo de la *EcG6PDH* por la *LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>* provocó una disminución de un 44 % en la tasa de consumo de glucosa acompañada de una merma proporcional en la tasa de crecimiento (Tabla 10). A diferencia de lo previsto en la modelación *a priori*, el cambio en la especificidad por cofactor de la *G6PDH* no cerró el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas pero sí disminuyó a la mitad en términos porcentuales con respecto a la cepa



silvestre (Tabla 11). En términos absolutos, la sustitución de la enzima EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> implicó, como promedio, una disminución del flujo por la vía de las pentosas desde 1.80 mmol\*gDW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup> hasta 0.45 mmol\*gDW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>.

Tabla 7: Resultados de la modelación *a priori* de los flujos metabólicos y las tasas de crecimiento esperadas para las cepas carentes del gen *pgi*. Fijando el flujo por la transhidrogenasa UdhA en 1.82 mmol mmolgDW<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> se reproduce la tasa de crecimiento obtenida por Canonaco y cols. (2001), lo cual indicaría el topé máximo de flujo por esta enzima en la condición silvestre. Para simular los resultados de sobre-expresión de la UdhA se fijó el valor del flujo por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, con el propósito de simular la "limitación cinética" propuesta por estos autores para explicar por qué pese a que se sobre-expresa UdhA no se consigue alcanzar la tasa de crecimiento de silvestre. Fijando el flujo por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el mismo valor, y dejando libre el flujo por la transhidrogenasas UdhA, es posible prever una mejoría parcial en la tasa de crecimiento, sin necesidad de sobre-expresar la UdhA, si se sustituye la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>.

	$\Delta pgi$	$\Delta pgi + \uparrow UdhA$	$\Delta pgi - NAD$
tasa de crecimiento	0.16 h <sup>-1</sup>	0.27 h <sup>-1</sup>	0.27 h <sup>-1</sup>
flujo por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (mmolgDW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2.3	= 3.46	= 3.46
flujo por la transhidrogenasa UdhA (mmolgDW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	= 1.82	3.87	0.47

De todas maneras, llama la atención el hecho de que el pequeño flujo observado a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas modificada tiene un impacto mayor sobre la tasa de crecimiento que el no uso de esta vía.

La cepa modificada es incapaz de "silenciar" la expresión de la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> (Fig. 8), la entrada de glucosa es inhibida, y el flujo por la vía de las pentosas modificada es menor.

Las observaciones realizadas no permiten llegar a ninguna conclusión acerca del mecanismo molecular por el cual la cepa NAD-G6PDH adopta ese estado caracterizado por una menor entrada de glucosa y un menor flujo a través de la vía de las pentosas modificada, pero sí podemos utilizar el FBA para entender el impacto, sobre el crecimiento, del flujo por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, a diferentes tasas de consumo de glucosa, y diferentes porcentajes de flujo por la vía de las pentosas.

Por lo tanto, se realizó un análisis más sistémico para entender cómo el cambio puntual en la especificidad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa impacta a la tasa de crecimiento.

*La especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa determina el impacto sobre el crecimiento del flujo por la vía de las pentosas*

Como parte del procedimiento de optimización es posible calcular, además del valor de la función objetivo, y los flujos a través de las diferentes enzimas y transportadores, los *costos reducidos* de cada uno de estos flujos sobre el valor de la función objetivo.

En optimización se define el *costo reducido* como la diferencia entre el ingreso marginal y el costo marginal. El ingreso marginal es el incremento en el

resultado provocado por el ingreso en la solución de una unidad adicional de una actividad. El costo marginal es el incremento en el costo total resultante de agregar una unidad de actividad en la solución. Aplicando estos conceptos a la distribución óptima de los flujos se puede definir el *costo reducido* de un flujo como el efecto neto sobre la función objetivo (usualmente la formación de biomasa) de aumentar la magnitud de dicho flujo en una unidad.

Se calcularon entonces los costos reducidos sobre la producción de biomasa del flujo por la EcG6PDH y por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> para todas las combinaciones posibles de consumo de glucosa (entre 1 y 10 mmol\*gdW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>) repartida entre la glicólisis y la vía de las pentosas, yendo entre 0 y 98 % de la glucosa por la vía de las pentosas (Fig. 9).

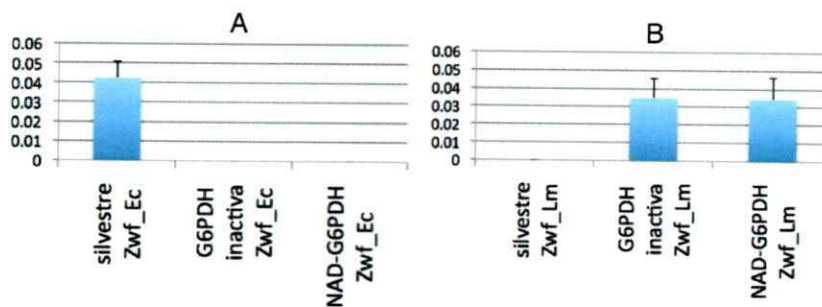


Fig. 8: PCR cuantitativo del locus *zwf*. Se utilizaron como partidores oligonucleótidos capaces de permitir la amplificación del cDNA de *zwf* de *Escherichia coli* (A) o del cDNA de *zwf* de *Leuconostoc mesenteroides* (B). Como referencia se utiliza la amplificación del cDNA del gen *gap*.

Tabla 8: Valores experimentales de las variables fisiológicas estudiadas obtenidos en las cepas carentes del gen *pgi*. Estos valores fueron utilizados como restricciones para simular la distribución de flujos que se representa en la Tabla 9.

cepa	tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ )	tasa de consumo de glucosa ( $mmolgDW^{-1}h^{-1}$ )
$\Delta pgi$	$0.145 \pm 0.003$	$1.63 \pm 0.04$
$\Delta pgi-NAD$	$0.231 \pm 0.003$	$3.04 \pm 0.04$

Tabla 9: Flujos metabólicos internos estimados mediante el *análisis de variabilidad de los flujos* (FVA) en las cepas carentes del gen *pgi*. Con el FVA se calculan los flujos mínimos y máximos posibles que sean son coherentes con las tasas de consumo de glucosa observadas y que satisfagan las tasas de crecimiento registradas. Se incluyen los números asociados con cada reacción según lo representado en la Figura 1 para una mejor visualización.

#	reacción	$\Delta pgi$		$\Delta pgi-NAD$	
		mín.	máx.	mín.	máx.
1	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1.6	1.6	3.0	3.0
2	fosfo-gluco-isomerasa	0	0	0	0
3	transcetolasa	0.5	0.5	0.9	1.0
4	transaldolasa	0.5	0.5	0.9	1.0
5	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	2.5	2.5	4.5	4.6
6	piruvato carboxilasa	0.0	0.3	0.0	5.1
7	piruvato deshidrogenasa	1.7	2.0	2.6	4.9
8	acetato kinasa	0	0	0	0
9	isocitrato deshidrogenasa	1.0	1.3	0.2	2.2
10	malato deshidrogenasa	1.2	1.5	-0.6	3.9
11	enzima málica NADP dependiente	0.0	0.0	0.0	3.5
11	enzima málica NAD dependiente	0.0	0.0	0.0	3.3
12	transhidrogenasa pntAB	0.0	0.0	0.0	9.0
13	citocromo oxidasa	10.7	10.7	15.4	18.5
14	ATP sintetasa	11.8	11.8	15.9	20.4
15	transhidrogenasa UdhA	2.3	2.6	0.0	10.4

Tabla 10: Valores experimentales de las variables fisiológicas estudiadas obtenidos en las cepas silvestre, inact-G6PDH y NAD-G6PDH. Estos valores, junto con la medición directa del flujo por la vía de las pentosas por medio del marcaje con carbono 13, fueron utilizados como restricciones para estimar la distribución de flujos que se representa en la Tabla 11.

cepa	tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ )	tasa de consumo de glucosa ( $mmolgDW^{-1}h^{-1}$ )	tasa de excreción de acetato ( $mmolgDW^{-1}h^{-1}$ )
silvestre	$0.64 \pm 0.02$	$8.08 \pm 0.20$	$1.91 \pm 0.17$
inact-G6PDH	$0.53 \pm 0.02$	$7.19 \pm 0.18$	$2.93 \pm 0.15$
NAD-G6PDH	$0.36 \pm 0.02$	$4.53 \pm 0.17$	-

Tabla 11: Flujos metabólicos internos estimados mediante el *análisis de variabilidad de los flujos* (FVA) para el resto de las cepas en estudio. Se incluyen los números asociados con cada reacción según lo representado en la Figura 1 para una mejor visualización.

#	reacción	silvestre		inact-G6PDH		NAD-G6PDH	
		mín.	máx.	mín.	máx.	mín.	máx.
1	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1.6	2.0	0	0	0.4	0.5
2	fosfo-gluco-isomerasa	6.1	6.5	7.1	7.3	4.1	4.2
3	transcetolasa	0.4	0.5	-0.1	-0.1	0.1	0.1
4	transaldolasa	0.4	0.5	-0.1	-0.1	0.1	0.1
5	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	13.9	14.3	13.0	13.3	8.1	8.2
6	piruvato carboxilasa	0.0	5.6	0.0	5.4	0.0	2.8
7	piruvato deshidrogenasa	8.8	12.4	8.8	12.1	5.2	6.7
8	acetato kinasa	2.1	1.7	3.1	2.8	0	0
9	isocitrato deshidrogenasa	1.5	5.0	1.1	4.2	2.5	3.9
10	malato deshidrogenasa	0.8	7.0	-0.1	6.1	1.8	4.8
11	enzima málica NADP dependiente	0.0	3.7	0.0	3.9	0.0	1.7
11	enzima málica NAD dependiente	0.0	2.4	0.0	2.3	0.0	0.8
12	transhidrogenasa pntAB	0.0	8.4	2.2	10.3	0.9	4.3
13	citocromo oxidasa	32.8	34.7	27.5	29.2	22.6	23.2
14	ATP sintetasa	32.1	36.4	25.4	29.4	22.0	23.7
15	transhidrogenasa UdhA	0.0	4.8	0.0	4.5	0.0	1.7

En el caso de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>, todos los costos reducidos fueron negativos, pero los resultados experimentales (consumo de glucosa de 4.5 mmol\*gDW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>, 10 % de ella yendo por la vía de las pentosas) caen en la zona donde el impacto negativo es menor (Fig. 10).

En el caso de la enzima EcG6PDH, se observaron costos reducidos positivos y negativos, lo cual indica que en algunas configuraciones de entrada y distribución de glucosa el uso de esta enzima puede tener impactos diferentes sobre la tasa de crecimiento (Fig. 11). Coherentemente con el caso del uso de la enzima mutante, los resultados experimentales (consumo de glucosa de 8.1 mmol\*gDW<sup>-1</sup>\*h<sup>-1</sup>, 22 % de ella yendo por la vía de las pentosas) se ubican en la zona en la cual el impacto positivo es mayor.

*Por lo tanto, es posible que la velocidad de entrada de glucosa en E. coli esté regulada para controlar el efecto sobre el crecimiento del flujo a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas, y este efecto claramente depende de la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.*

Resumiendo, el análisis computacional sistémico, junto con el resto de las observaciones experimentales realizadas, muestran que la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es una característica que define la velocidad de captación de la glucosa y la distribución de los flujos en *E. coli* durante el crecimiento aeróbico utilizando glucosa como única fuente de carbono.

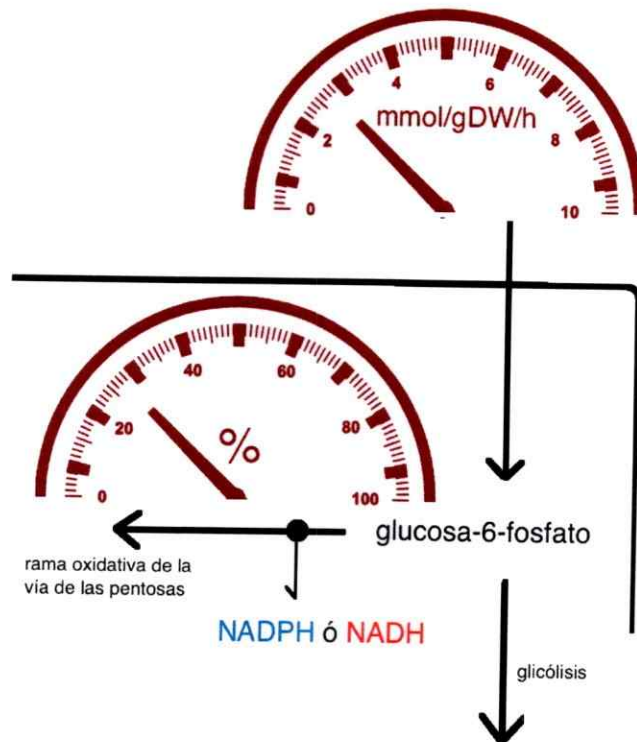


Fig. 9: Variables analizadas para investigar el costo reducido sobre el crecimiento del uso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Para cada consumo de glucosa fijado en algún valor entre 1 y 10  $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  se exploraron *in silico* todos los porcentajes posibles de reparto entre la glicólisis y la vía de las pentosas dejando un 2% de la glucosa-6-fosfato dedicada a la formación de componentes de la pared celular. La otra restricción que se tuvo en cuenta fue una tasa máxima de consumo de oxígeno de  $15 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  correspondiente al consumo calculado para la cepa silvestre.

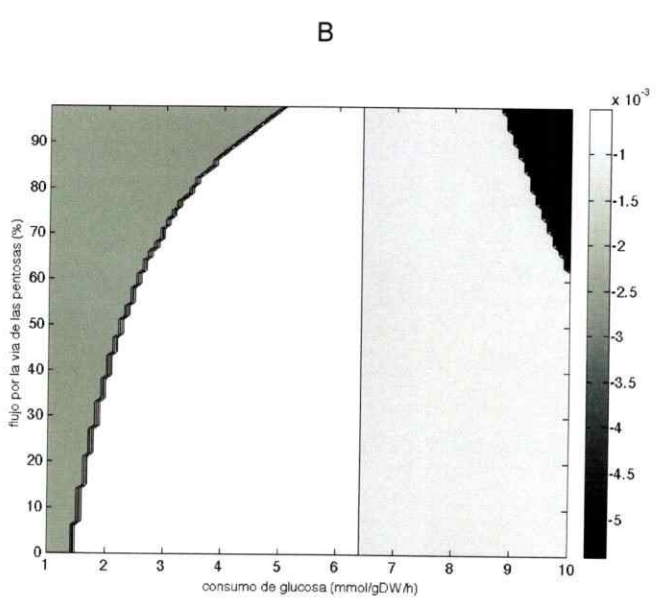
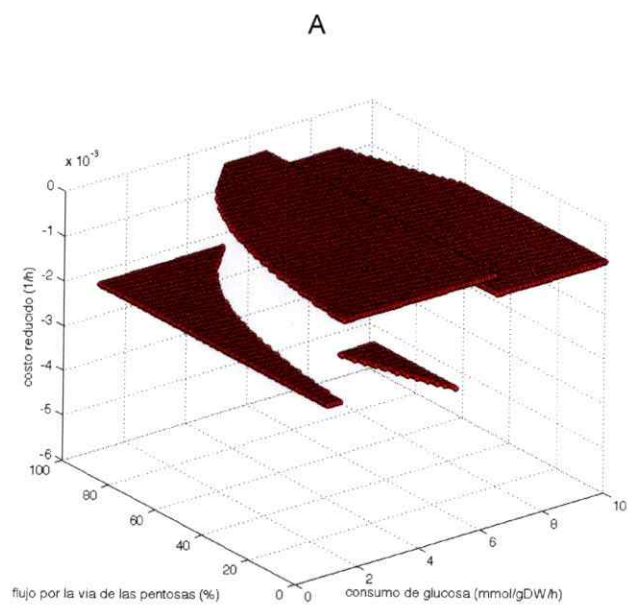


Fig. 10: Costos reducidos del uso de la enzima mutante LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> dadas diferentes tasas de consumo de glucosa y diferentes porcentajes de partición entre la glicólisis y la vía de las pentosas. En el panel A se representa el resultado en un gráfico tridimensional, mientras que en panel B se muestra la proyección de los costos reducidos en el plano consumo-flujo. La zona más clara indica para qué configuraciones de consumo-flujo el costo reducido es menos negativo.



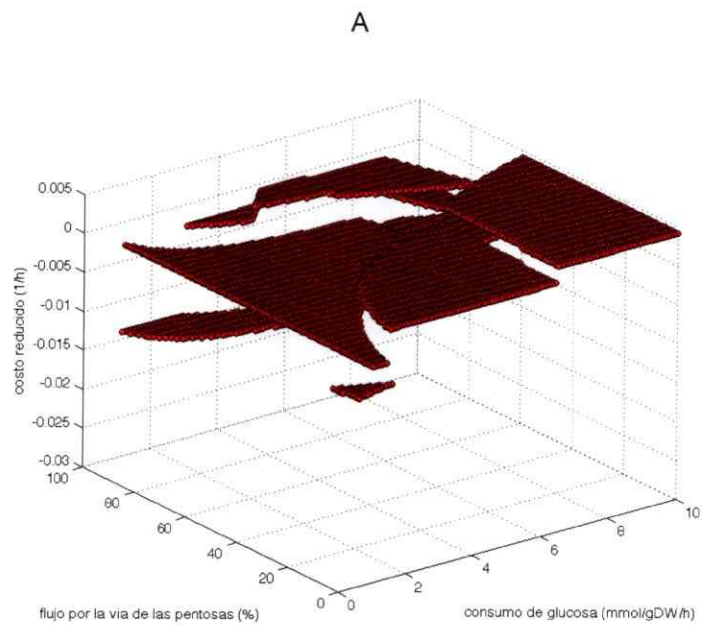


Fig. 11: Costos reducidos del uso de la enzima nativa EcG6PDH dadas diferentes tasas de consumo de glucosa y diferentes porcentajes de partición entre la glicólisis y la vía de las pentosas. En el panel A se representa el resultado en un gráfico tridimensional, mientras que en panel B se muestra la proyección de los costos reducidos en el plano consumo-flujo. La zona más clara indica para qué configuraciones de consumo-flujo el costo reducido es más positivo.

## DISCUSION

En el metabolismo acontecen simultáneamente un conjunto de reacciones con características bien peculiares. Una de estas características es la existencia de rutas alternativas para la transformación de ciertos metabolitos. Por ejemplo, una molécula de glucosa-6-fosfato puede continuar su transformación por la vía de las pentosas, por la glicólisis, o ser precursora para la formación de los componentes de la pared celular. Los principios que explican qué porcentaje del metabolito se transforma por cada una de las rutas alternativas posibles son aun desconocidos.

Las diferentes ramas de una bifurcación metabólica tienen rendimientos diferentes en cuanto a los cofactores que son generados o consumidos. Por lo tanto, la partición del flujo metabólico en una bifurcación es una característica aparentemente local pero que potencialmente puede impactar a toda la red metabólica ya que la producción de cofactores puede cambiar con el uso relativo que tengan las ramas de una bifurcación.

Por otra parte, conocer los principios que determinan cuánto flujo puede ser desviado por una de las ramas de una bifurcación beneficiaría enormemente a la industria biotecnológica ya que podría desviarse el flujo metabólico hacia la ruta de interés. Por todo lo anterior es importante entender los factores que determinan la partición de los flujos metabólicos.

Otra característica interesante del metabolismo es la existencia de compuestos, fabricados por la propia maquinaria metabólica, que sirven para canalizar el potencial redox de ciertas moléculas provenientes del ambiente hacia los procesos bioquímicos que permiten el mantenimiento de las estructuras y los procesos internos. Ejemplos claros de este tipo de metabolitos son los cofactores NAD(H) y NADP(H).

En este trabajo de investigación abordamos la relación entre estos dos aspectos fundamentales del metabolismo a través de una pregunta claramente planteada: *¿Qué pasa con la partición del flujo entre la glicólisis y la vía de las pentosas si cambiamos la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa?*

En *E. coli* la producción de NAD(H) y NADP(H) depende del porcentaje de partición de determinados metabolitos entre sus diferentes rutas alternativas de transformación, ya que la producción de dichos cofactores está claramente segregada (Figura 1). Entiéndase, en esta especie no existen deshidrogenasas duales (Fuhrer y Sauer, 2009).

En el caso de la rama oxidativa de la vía de las pentosas en *E. coli*, se ha considerado tradicionalmente que las dos deshidrogenasas que están presentes son específicas para NADP, y se estima que en conjunto producen un tercio del NADPH requerido cuando la glucosa es la única fuente de carbono (Sauer y cols., 2004). Sin embargo, esta vía no es una ruta metabólica esencial en esas condiciones (Fraenkel, 1968; Sauer y cols., 2004). Considerando además que en esta enterobacteria existen las enzimas transhidrogenasas que catalizan la

transferencia de equivalentes de reducción entre el NAD(H) y el NADP(H), llama entonces la atención la alta especificidad por el cofactor NADP que se le ha atribuido a las deshidrogenasas de esta vía.

Para determinar si esa especificidad por NADP obedece a alguna restricción metabólica, en este trabajo se observó el efecto sobre la distribución de los flujos y la tasa de crecimiento de la sustitución de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa nativa preferente por NADP por una enzima de igual función pero preferente por NAD. Para lograr y analizar integralmente estas observaciones fue necesario utilizar herramientas de diferentes disciplinas: Biología Molecular, Cinética Enzimática, Biología Estructural, Fisiología Microbiana y Biología Computacional.

Los experimentos bioquímicos, fisiológicos y computacionales realizados permitieron observar el impacto a nivel sistémico de un cambio que no implica la eliminación ni la sobre-expresión de un gen sino un cambio en la estequiometría de la red metabólica, un desvío en el destino de los equivalentes de reducción arrancados a la glucosa durante la oxidación de la misma. Este cambio puntual desencadenó reordenamientos en la distribución de los flujos metabólicos y cambios en las tasas de crecimiento.

Esta investigación se dividió operativamente en tres partes. En la primera parte se realizaron los estudios necesarios para determinar cuantitativamente cuán específica por el NADP es la enzima nativa EcG6PDH. En la segunda parte se obtuvo y se caracterizó cinéticamente la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>, y además se obtuvieron las cepas mutantes utilizadas en este estudio. También se

realizaron las primeras simulaciones de la distribución esperada de los flujos metabólicos tras los cambios genéticos que se realizarían y estos cálculos ayudaron en el diseño experimental de los siguientes pasos. En la tercera y última parte se realizaron los estudios fisiológicos requeridos para estimar las tasas de consumo de glucosa y de producción de acetato, así como se determinó directamente el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas. Finalmente se llevaron a cabo algunos experimentos computacionales para apreciar efectos no obvios del cambio de la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobre la tasa de crecimiento.

#### *Sobre la importancia de los estudios cinéticos realizados*

Los estudios cinéticos pre-existentes eran claramente insuficientes para esclarecer cuantitativamente cuál es la especificidad de la EcG6PDH por el NADP. La influencia del NADH sobre la actividad de esta enzima era otro aspecto oscuro. Si bien desde inicios de los años 70's se había demostrado que el putativo efecto del NADH como inhibidor alostérico (Sanwal, 1970) era un artefacto de medición (Sable y Cavalieri, 1973), sitios web como ECOCYC o BRENDA, que alimentan con sus datos a cientos de investigaciones computacionales, indican que el NADH actúa como inhibidor alostérico de la EcG6PDH y por lo tanto es un regulador del flujo a través de la vía de las pentosas. Por lo tanto era necesario esclarecer definitivamente que el efecto que ejerce el NADH sobre la EcG6PDH es de inhibición competitiva.

Se implementó entonces el estudio de los parámetros cinéticos de la enzima EcG6PDH más completo realizado hasta la fecha. Para lograrlo se estandarizaron las condiciones apropiadas para la purificación de la enzima, el control de su inactivación y la medición correcta de las variaciones en la absorbancia. Estos últimos dos factores son a menudo soslayados en muchos estudios cinéticos, pese a que su importancia ha sido resaltada en los textos clásicos de la especialidad (Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1995).

El estudio de las velocidades iniciales de las reacciones enzimáticas simplifica extraordinariamente las ecuaciones de velocidad. Sin embargo, el amplio y exitoso estudio de las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato le ha sustraído importancia al hecho de que las ecuaciones fundamentales de la cinética enzimática se obtuvieron estudiando curvas de progreso (Michaelis y Menten, 1913). Paralelamente a los estudios de velocidad inicial implementamos mediciones de curvas de progreso y aprendimos las herramientas computacionales que permiten realizar los ajustes estadísticos derivados de este tipo de análisis.

Los estudios de curvas de progreso implican el uso de técnicas de integración numérica (Koerber y Fink, 1987; Østgaard y Larsen, 1993), de series numéricas (Philo y Selwyn, 1973) o de manipulaciones algebraicas para linealizar la ecuación integrada correspondiente (Stödeman y Schwartz, 2002). En esta investigación se utilizó otro enfoque y se amplió la solución analítica propuesta por primera vez por Schnell y Mendoza (1997) para incluir el caso de un proceso enzimático irreversible en el cual el producto es un inhibidor competitivo

de la catálisis. Por lo tanto, encontramos una expresión que describe la variación temporal en la concentración de sustrato donde aparecen las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $k_{cat}$  y  $K_i$ .

Los valores estimados con la solución analítica propuesta fueron muy similares a los obtenidos en los estudios de velocidad inicial (Tabla 3). Es importante notar que si bien los valores de  $K_M$  y  $k_{cat}$  determinados con uno u otro método no son estrictamente iguales (Tablas 1, 2 y 3), el valor de la constante de especificidad  $k_{cat}/K_M$  hallado con cada metodología es muy parecido. Las diferencias entre los parámetros cinéticos estimados con una y otra metodología se deben a los errores de medición.

Gracias al monitoreo de las curvas de progreso se encontraron evidencias que apoyan que el NADH es un inhibidor competitivo sin necesidad de adicionar este compuesto *a priori* a las mezclas de reacción de la glucosa-6-fosfato con el NAD, evitando así el artefacto de medición que invalidó parte de los resultados de Sanwal (1970). Además, se realizaron mediciones gracias a las cuáles se cuantificó rigurosamente el grado de especificidad por NADP y por NAD de la EcG6PDH.

#### *Un enfoque más integral de la especificidad por cofactor de una deshidrogenasa*

Partiendo de la ecuación *genérica* descrita por Rohwer y cols. (2006), se desarrolló una ecuación *ad hoc* que describe cómo varía la actividad de la enzima EcG6PDH en función del cociente redox  $R=NAD(P)/NAD(P)H$ . La

ecuación obtenida utiliza parámetros cinéticos y fisiológicos, y mediante las conversiones adecuadas, devuelve un valor en las mismas unidades en que se manejan los datos de flujo metabólico ( $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

El uso de la ecuación *ad hoc* es compatible con los estudios que se han realizado para establecer el rango de valores para los cocientes  $R = \text{NAD(P)}/\text{NAD(P)H}$  dentro de los cuáles, según los análisis termodinámicos de Henry y cols. (2007) las reacciones metabólicas pueden ocurrir en el sentido en que es posible el metabolismo. Los cálculos muestran que la relación entre las velocidades con NAD y NADP varía con el valor de R, a diferencia de la relación entre las eficiencias catalíticas ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) que es un valor fijo. Al considerar también el efecto de la inhibición por el producto, la influencia de la concentración del co-sustrato (las  $K_M$  se pueden manejar como variables que dependen de la concentración del co-sustrato) y la factibilidad termodinámica de los valores de R, es un análisis más integral para evaluar la preferencia por el cofactor que la simple división entre las constantes de especificidad para uno y otro cofactor. Es posible también observar que para la EcG6PDH, la velocidad varía grandemente dentro de los valores de  $R^{\text{NADP}}$  termodinámicamente factibles, pero no acontece lo mismo para los valores de  $R^{\text{NAD}}$ . Esto es consistente con el rol que se le ha atribuido a la EcG6PDH en la defensa contra el estrés oxidativo, un fenómeno en el cual las variaciones de la concentración de NADPH son parte de la señal y de la respuesta del organismo (Krapp y cols., 2011).

Los valores de actividad calculados con la ecuación *ad hoc* pueden variar



mucho según los datos de concentración de los cofactores. Cuando se utilizan los datos de Brumaghim y cols. (2003) se obtienen  $2575 \mu\text{molNADPH}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  *versus*  $9.4 \mu\text{molNADH}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Por otra parte, si se utilizan los datos de Bennett y cols. (2009) entonces la actividad con NAD sería 13.4 mayor que la actividad con NADP. Los datos de concentraciones de los cofactores aportados por Brumaghim y cols. (2003) caen fuera del rango metabólicamente viable según el análisis termodinámico de Henry y cols. (2007). Los datos de Bennett y cols. (2009) caen en el rango de lo metabólicamente posible pero el flujo estaría muy por debajo de lo que se ha observado y la EcG6PDH estaría produciendo más NADH que NADPH. Si se consideran todos los resultados que evidencian que la EcG6PDH produce fundamentalmente NADPH y no NADH, más los datos de flujo a través de esta enzima, todo indicaría que Bennett y cols. (2009) sub-estimaron las concentraciones de NADP. Entonces, los estudios cinéticos realizados en esta investigación también muestran la importancia de la exactitud de las determinaciones de la concentración de estos cofactores para poder hacer a partir de estos datos inferencias metabólicas, sobre todo si se considera el gran número de reacciones en las que ellos participan.

Estamos al tanto de que el flujo real por la EcG6PDH no está controlado solamente por la actividad de esta enzima. El flujo a través de una enzima que forma parte de una vía metabólica es una propiedad sistémica en la cual todas las enzimas de la vía tienen algún grado de control (Kacser y Burns, 1973; Heinrich y Rapoport, 1974). Además, para llegar a la expresión *ad hoc* se ha considerado que la concentración de la  $\delta$ -6-fosfogluconolactona es

despreciable, y esto implica que la reacción catalizada por la EcG6PDH ocurre irreversiblemente sólo en el sentido directo, lo cual no es estrictamente cierto. No obstante, la correspondencia entre los valores de flujo calculados con la ecuación *ad hoc* y los aquí registrados es aceptable. Tampoco es la primera vez en que se intenta predecir el flujo por la vía de las pentosas a partir del conocimiento de las propiedades cinéticas de las enzimas involucradas (Moritz y cols., 2000).

*LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>* es una enzima con las propiedades deseadas

El proceso de revertir la especificidad de una enzima deshidrogenasa no es simple, necesita de conocimiento estructural detallado de la proteína que se desea transformar y puede conllevar el reemplazo de múltiples aminoácidos (Zhu y cols., 2005). Una alternativa utilizada en otros trabajos ha sido la expresión heteróloga, utilizando plásmidos, de deshidrogenasas homólogas de otras especies que naturalmente tienen la especificidad revertida (Martinez y cols. 2008, Marx y cols. 1999). Sin embargo no se conoce ningún homólogo de la EcG6PDH que prefiera claramente NAD sobre NADP. La estructura tridimensional de la EcG6PDH aun no ha sido revelada, lo cual complica la obtención de mutantes de la propia enzima con la especificidad revertida y con la capacidad catalítica apropiada para catalizar la reacción en las condiciones intracelulares.

Solamente existe dos proteínas homólogas cuyas estructuras tridimensionales

están descritas: la de la bacteria *L. mesenteroides* y la de *Homo sapiens*. Afortunadamente, la enzima proveniente de *L. mesenteroides* tiene especificidad dual y existen estructuras cristalinas disponibles asociadas tanto con NAD como con NADP. Se conocía que la mutante simple R46E de la enzima de *L. mesenteroides* prefiere 22 veces NAD sobre NADP (Vought y cols., 2000) y fue un candidato muy interesante, pero mediante simulaciones hechas con técnicas de dinámica molecular se pudo postular que la doble mutante (R46EQ47E) podía ser una enzima aun más preferente por NAD.

Los estudios cinéticos aquí realizados mostraron que efectivamente LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> prefiere 167 veces al NAD sobre el NADP y su eficiencia catalítica con NADP es 3.75 veces más baja que la de la simple mutante LmG6PDH<sup>R46E</sup>. Por lo tanto, para obtener una enzima capaz de oxidar a la glucosa-6-fosfato transfiriendo los equivalentes de reducción al NAD fue necesario mutar dos residuos de una enzima proveniente de otro organismo. Proponemos aquí el término "*heteromutólogo*" para referirnos a un gen proveniente de otra especie que ha sido a su vez mutado para alcanzar una propiedad deseada. Este es el caso de la enzima LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> con respecto a la nativa EcG6PDH. Con el auge de la Biología Sintética y la manipulación de enzimas para lograr mejores propiedades no será raro el uso de proteínas heteromutólogas.

### *Desde la ingeniería de enzimas al estudio del metabolismo*

La aplicación de técnicas de dinámica molecular permitió identificar qué residuos era necesario modificar en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* para conseguir una enzima dependiente de NAD. Mediante técnicas de Biología Molecular fue posible modificar la secuencia de ADN codificante para aminoácidos de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* para introducir los cambios deseados y agregarle una cola de residuos de histidina que permitió su purificación a partir de extractos de células de *E. coli* donde fue sobre-expresada esta enzima mutante. Gracias a la implementación del estudio de curvas de progreso fue posible caracterizar cinéticamente a esta enzima ingenierizada y, utilizando una modificación de la técnica más popular de recombinación homóloga en procariontes (Wanner y Datsenko, 2000), fue posible reemplazar la secuencia cromosomal codificante para la EcG6PDH por la secuencia codificante para aminoácidos de su homóloga preferente por NAD. De esta manera se logró estudiar por primera vez el efecto de un cambio de especificidad en una deshidrogenasa de la vía de las pentosas.

Dada la forma que se escogió para efectuar el reemplazo, la expresión de la enzima mutante quedó bajo el control del promotor nativo. Esto es relevante porque Wolf y cols. (1979) informaron que la actividad específica de EcG6PDH variaba según la velocidad de crecimiento. Existe un reporte de que durante la fase exponencial del crecimiento aumenta la expresión de EcG6PDH (Rowley y

cols., 1991). Existen evidencias, observadas a través de experimentos de expresión génica, de que existen dos factores de transcripción (*MarA* y *SoxS*) que activan la expresión de EcG6PDH (Jair y cols., 1995; 1996). Estos dos factores de transcripción también se activan con el aumento de la concentración de superóxido (Jair y cols., 1995; 1996). Por lo tanto, el aumento de la expresión de EcG6PDH puede considerarse un proceso coherente con las necesidades fisiológicas de ambos estados (crecimiento exponencial y estrés oxidativo) ya que en ambos aumenta la demanda de NADPH.

La disminución del NADPH podría activar la expresión de EcG6PDH mediada por *SoxS* (Gaudu y cols., 2000). *SoxS* activa al menos a una docena de genes (Dempfle, 1996). Por lo tanto, es probable que la sustitución de la EcG6PDH por una variante que produce NADH, puede alterar los niveles de expresión de la enzima mutante y de otras proteínas, propagándose así los efectos de la modificación a través de la célula. Sin embargo, al menos los niveles de expresión de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no se vieron modificados (Fig. 8). Futuros trabajos donde se observen los niveles de expresión de la enzima mutante a lo largo de la curva de crecimiento, o bajo situaciones de estrés oxidativo podrían brindar información relevante acerca del papel de la especificidad por NADP de la EcG6PDH en los procesos de adaptación a nuevas condiciones de crecimiento y como parte del sistema de defensa antioxidante.

### *Aplicaciones y limitaciones del FBA en este estudio*

La modelación con FBA mostró que la sustitución de la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> también debía mejorar la tasa de crecimiento de  $\Delta pgi$  sin necesidad de sobre-expresar la transhidrogenasa UdhA. Para que las predicciones computacionales fueran acertadas fue necesario considerar la existencia de un "límite cinético" al flujo a través de la vía de las pentosas según la interpretación de Canonaco y cols. (2001). Estos autores plantearon la existencia de este límite al observar que aun sobre-expresando la transhidrogenasa UdhA, la tasa de crecimiento de  $\Delta pgi$  solo alcanzó los  $0.27 \text{ h}^{-1}$ . La tasa de crecimiento de  $\Delta pgi\text{-NAD}$  fue de  $0.23 \text{ h}^{-1}$ , lo cual está bien cercano a la predicción y al valor de  $0.27 \text{ h}^{-1}$  obtenido con la sobre-expresión de UdhA, pero por bien debajo del valor de  $0.64 \text{ h}^{-1}$  obtenido en condiciones similares para la cepa silvestre. Por lo tanto, la tasa de crecimiento observada en  $\Delta pgi\text{-NAD}$  es consistente con la hipótesis del "límite cinético" propuesta por Canonaco y cols. (2001). De acuerdo a nuestras estimaciones, en  $\Delta pgi\text{-NAD}$  el flujo por la vía de las pentosas alcanzó los  $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Por otra parte, para la cepa silvestre el crecimiento ( $0.64 \text{ h}^{-1}$ ) fue menor que el esperado ( $0.69 \text{ h}^{-1}$ ) según el cálculo de FBA. Para el cálculo teórico se utilizó como input solamente la tasa de consumo de glucosa y se escogió como función objetivo la formación de biomasa. Parte de la discrepancia entre la tasa de crecimiento esperada y la observada se explica por la producción de acetato. Otra fuente de discrepancia, probablemente relacionada con la anterior, es que

el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas fue inferior al que se espera para un crecimiento óptimo.

Según la modelación, para un crecimiento óptimo, la producción de acetato debería ser cero, considerando un consumo de oxígeno de  $17.8 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Probablemente la producción de acetato se debe a que existe un límite en la cantidad de oxígeno disponible en el medio o la cantidad que *E. coli* puede consumir. Si el oxígeno está limitado, la capacidad de reoxidar NADH está disminuida, y por ello se desvía carbono que podría ser oxidado en el Ciclo de Krebs (produciendo más NADH) hacia la producción de acetato. Experimentalmente se han medido tasas de consumo de oxígeno de  $11 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Chen y cols., 2011), con las cuales se calcula que la secreción de acetato sería de  $6 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  cuando la tasa de consumo de glucosa es de  $8 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . En nuestros experimentos no se midió la tasa de consumo de oxígeno, por lo cual no estamos en condiciones de distinguir si la producción de acetato se debe a una insuficiente oxigenación o si es que el organismo continúa produciendo acetato aun cuando el oxígeno es suficiente. Si el oxígeno es suficiente, la distribución de flujos experimentalmente observada no se correspondería con la de un crecimiento óptimo.

Si el oxígeno es insuficiente esto explicaría la generación de acetato, y explicaría por qué el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas está por debajo del valor óptimo para el crecimiento. Cuando no hay suficiente oxígeno la forma de reoxidar el NADH más óptima para el crecimiento es utilizando la transhidrogenasa *pntAB* la cual genera NADPH, ya que las otras

formas de reoxidar NADH dependen de la disponibilidad de oxígeno (respiración aeróbica) o de la pérdida de carbono (fermentación). Al generarse NADPH por la *pntAB* bajaría el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas.

Al estimar la distribución de los flujos al movernos a lo largo de un gradiente de disponibilidad de oxígeno, optimizando la formación de biomasa, se observa que la actividad de la rama oxidativa de la vía de las pentosas comienza a partir de los  $5 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Fig. 12). En ese punto la reoxidación del NADH a través del uso de la cadena de transporte de electrones respiratoria comienza a contribuir más a la función objetivo (crecer) que reoxidar el NADH a través de la transhidrogenasa *pntAB*, por ello comienza el descenso de la actividad de dicha transhidrogenasa. El uso de la rama oxidativa de la vía de las pentosas implica la pérdida de carbono por descarboxilación, pero es una pérdida menor que la que ocurre mediante la fermentación acética. La fermentación acética permite generar ATP en condiciones anaeróbicas pero una vez que comienza a aumentar el oxígeno, la producción de ATP por respiración aeróbica resulta mayor que lo obtenido por fermentación, por eso la producción de acetato va decreciendo, pero para hacerse cero se requieren altas tasas de consumo de oxígeno (Fig. 12). Por lo tanto, *el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas podría estar íntimamente relacionado con la disponibilidad de oxígeno, la actividad de la pntAB y la producción de acetato*. Sin embargo, experimentalmente se ha registrado flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas aun en condiciones anaeróbicas (Chen y cols., 2011), lo cual indica que el análisis basado en la optimización del crecimiento no es capaz de



explicar completamente la magnitud del flujo por esta ruta metabólica, y que por razones diferentes a la optimización del crecimiento puede haber flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas. En este sentido es sugerente el reporte de la variación en los niveles de expresión de la EcG6PDH en las diferentes fases de una curva de crecimiento (Wolf y cols., 1979; Rowley y cols., 1991).

En vez del 48 % que se esperaba para un crecimiento óptimo, el porcentaje de glucosa que fue catabolizada por la vía de las pentosas fue solamente de 22 %. Si calculamos el 22 % de los  $8 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  de glucosa que la cepa silvestre consumió, vemos que el flujo por la vía de las pentosas fue de aproximadamente  $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Este valor es muy similar al observado por otros colegas en circunstancias experimentales similares (Sauer y cols. (2004)  $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Nicolás y cols. (2007)  $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; Martínez y cols. (2008)  $2.1 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Utilizando la ecuación cinética *ad hoc* para la EcG6PDH se puede ver que  $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  es un valor factible dadas las concentraciones de NADP(H) que según el análisis termodinámico de Henry y cols. (2007) pueden existir en el citoplasma de *E. coli* (Fig. 6).

Dado que el flujo por la vía de las pentosas es menor que el valor óptimo para el crecimiento, la producción de NADPH a través de la transhidrogenasa pntAB podría aportar hasta un 48 % de todo el NADPH producido (Tabla 11). Este rol relevante para la pntAB es consistente con el resultado de Sauer y cols. (2004) donde la mutante  $\Delta\text{pntAB}$  presentó una tasa de crecimiento ( $0.45 \text{ h}^{-1}$ ) un tercio menor que la de la cepa silvestre ( $0.67 \text{ h}^{-1}$ ). El uso de la transhidrogenasa

pntAB para generar NADPH compite con la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa ya que ambos procesos consumen NADH y utilizan el gradiente de protones de transmembrana. Cuando se utiliza la pntAB, la producción de acetato supliría parcialmente el déficit en la generación de ATP por parte de la ATP sintetasa de membrana. Por lo tanto, el uso de pntAB como una fuente importante de NADPH, siendo que no es lo más óptimo para el crecimiento, explicaría también porque la tasa de crecimiento observada es menor que la esperada, y la tasa de excreción de acetato es mayor que la esperada.

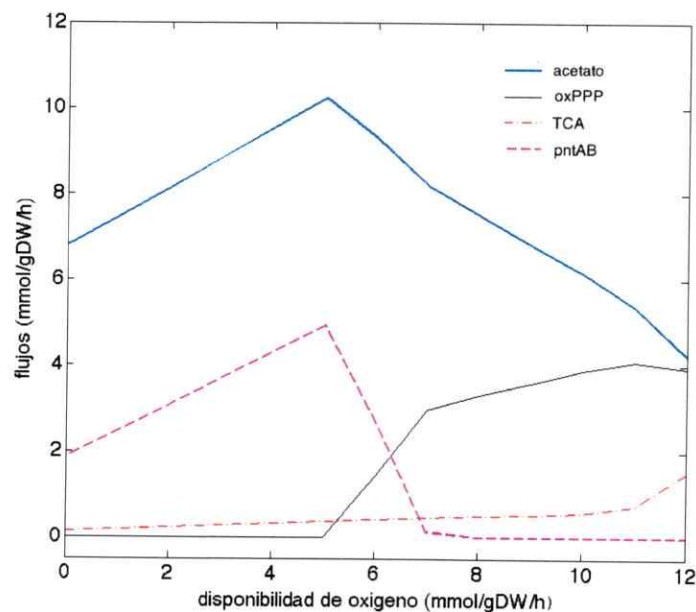


Fig. 12: Modelación de la variación de diferentes flujos según la tasa de consumo de oxígeno. En el gráfico aparece la excreción de acetato, el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas (oxPPP), el flujo por el ciclo de Krebs (TCA) y el flujo por la transhidrogenasa pntAB a lo largo de un gradiente de oxígeno desde 0 a 12  $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Relacionado con lo anterior y en concordancia con las observaciones experimentales con la cepa  $\Delta zwf$  de Sauer y cols. (2004), Zhao y cols. (2004) y Nicolás y cols. (2007), la cepa inact-G6PDH (en la cual tampoco hay producción de NADPH en la rama oxidativa de la vía de las pentosas) produjo más acetato y creció menos que la cepa silvestre.

Contrario a las predicciones del FBA, el reemplazo de la EcG6PDH por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup> no cerró el flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas, y un 10 % de la glucosa consumida en la cepa NAD-G6PDH fue oxidada por esta ruta. Desde la perspectiva teórica del FBA, si hay flujo a través de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa productora de NADH, entonces hay que producir NADPH a expensas del NADH a través de la transhidrogenasa pntAB, lo cual afectaría a la generación de ATP, pero igual tendríamos la pérdida de CO<sub>2</sub> por la descarboxilación catalizada por la 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa. Por este motivo la modelación predice que si se coloca una enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa productora de NADH en lugar de una productora de NADPH no habría flujo por la rama oxidativa de la vía de las pentosas, y la producción de NADPH se compensará con la actividad pntAB sin pérdida de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, si están presentes las condiciones termodinámicas y cinéticas para que una reacción metabólica ocurra (como es el caso de la oxidación de la glucosa-6-fosfato con NAD catalizada por la LmG6PDH<sup>R46EQ47E</sup>), esta reacción ocurrirá aunque no sea lo más óptimo para el crecimiento. Una pregunta abierta es qué sucederá con esa reacción no óptima para el

crecimiento si la cepa NAD-G6PDH es sometida a un proceso de evolución dirigida donde se van seleccionando las bacterias que crecen más rápido.

El estudio computacional sistemático del costo reducido sobre la formación de biomasa del flujo por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, sea específica para NAD o para NADP, mostró que las consecuencias del flujo por esta enzima varían con la tasa de consumo de glucosa y el porcentaje de partición de la glucosa-6-fosfato entre la glicólisis y la vía de las pentosas (Figs. 10 y 11). En ambos casos se identificaron valores de consumo de glucosa y porcentajes de flujo por la vía de las pentosas para los cuales el impacto del flujo por la vía de las pentosas sobre la formación de biomasa es más positivo (si hay una enzima específica por NADP) o menos negativo (si hay una enzima específica por NAD). Los valores de consumo de glucosa y partición del flujo que experimentalmente fueron observados en las respectivas cepas caen en dichos rangos.

Por lo tanto, además del caso de la mutante  $\Delta pgi$  ya estudiado por otros colegas, en este trabajo se han detectado otras dos cepas mutantes ( $\Delta pgi$ -NAD y NAD-G6PDH) en las cuales la tasa de consumo de glucosa observada estuvo muy por debajo de lo esperado si consumieran glucosa al ritmo necesario para maximizar el crecimiento. En el caso de la carencia del gen *pgi*, tanto la sobre-expresión de la UdhA como la sustitución de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa preferente por NADP por una preferente por NAD han logrado recuperar parcialmente la tasa de crecimiento pero alcanzando valores lejanos a los de la cepa silvestre. Si en las cepas carentes de *pgi* existe un "límite

cinético" a la cantidad de glucosa que puede ser catabolizada por la vía de las pentosas es probable que ocurra un aumento de la concentración de glucosa-6-fosfato. Se ha descrito que el aumento de glucosa-6-fosfato gatilla la síntesis de una pequeña molécula de ARN de 227 pb denominada *SgrS*, la cual regula negativamente la traducción y estabilidad del ARN mensajero codificante para el polipéptido *ptsG*, que es un componente indispensable para el funcionamiento del principal sistema transportador de glucosa de *E. coli* (Wadler y Vanderpool, 2007). Por lo tanto, es posible que la limitación en la capacidad de catabolizar la glucosa por la vía de las pentosas desencadene un mecanismo por el cual disminuye el ingreso de glucosa a la célula.

En el caso de la mutante NAD-G6PDH, el análisis computacional realizado muestra que la tasa de consumo de glucosa observada minimizaría los efectos negativos sobre el crecimiento del aumento del flujo por una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa productora de NADH pero el mecanismo por el cual es inhibida la entrada de glucosa aún no está claro para nosotros. Podría involucrar también al ARN *SgrS*.

En cualquier caso *las tasas de consumo de glucosa, la producción de acetato y los flujos metabólicos observados desafían la idea de que la distribución de los flujos es tal que se maximiza la formación de biomasa*. Se hace evidente que los principios que regulan la partición del flujo en el nodo de la glucosa-6-fosfato tienen relación con la especificidad por cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que esté presente. En este sentido es importante destacar que actualmente es una discusión activa cuál función objetivo y cuáles restricciones

es necesario considerar para predecir con aceptable aproximación cuáles serán los flujos internos en *E. coli* (Schuetz y cols., 2007; Feist y Palsson, 2010, Schuetz y cols., 2012).

Por último no se puede soslayar el hecho de que, por razones de simplicidad experimental y conceptual, se suele estudiar el metabolismo de *E. coli* en condiciones bien diferentes de las que hay en su medio natural (tracto intestinal de los mamíferos). Esto limita las interpretaciones evolutivas que se puedan formular a partir de los resultados.

Se necesita más trabajo, principalmente experimental, para observar aspectos de la regulación de la expresión y la señalización e integrarlos a las observaciones de los flujos metabólicos, ya que evidentemente el principio de optimización del crecimiento no es suficiente para explicar las observaciones realizadas. Sí queda claro que la especificidad por el cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es un elemento clave para entender la tasa de consumo y la distribución de la glucosa.

## CONCLUSIONES

- La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli* es mucho más sensible a las variaciones dentro del rango fisiológico del NADP(H) que del NAD(H).
- La alta especificidad por NADP de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli* puede ser evaluada con un enfoque dinámico más completo que el cálculo de la razón entre las constantes de especificidad con NAD y NADP.
- La alta especificidad por NADP de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli* es una característica importante para la regulación del ingreso y la distribución de la glucosa entre las diferentes rutas metabólicas que la procesan.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aon J.C., Caimi R.J., Taylor A.H., Lu Q., Oluboyede F., Dally J., Kessler M.D., Kerrigan J.J., Lewis T.S., Wysocki L.A., Patel P.S. 2008. Suppressing Posttranslational Gluconoylation of Heterologous Proteins by Metabolic Engineering of *Escherichia coli*. *App. Env. Microb.* Vol. 74, No. 4: 950-958.
2. Banerjee S. and Fraenkel D.G. 1972. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli* and from a "High-Level" Mutant. *J. Bact.* Vol. 110, No. 1:155-160.
3. Bennett B.D., Kimball E.H., Gao M., Osterhout R., Van Dien S.J., Rabinowitz J.D. 2009. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* Vol. 5, No. 8: 593-599.
4. Bologna F.P., Andreo C.S. and Drincovich M.F. 2007. *Escherichia coli* Malic Enzymes: Two Isoforms with Substantial Differences in Kinetic Properties, Metabolic Regulation, and Structure. *J. of Bact.*, Vol. 189, No. 16: 5937-5946.
5. Brumaghim J.L., Li Y., Henle E., Linn S. 2003. Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*: changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 43: 42495-42504.
6. Canonaco F., Hess T.A., Heri S., Wang T., Szyperski T., Sauer U. 2001. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.*; Vol. 204, No. 2: 247-252.
7. Cavaliere R.L. and Sable H.Z. 1973. Enzymes of pentose biosynthesis II. Evidence that the proposed control of glucose 6-phosphate dehydrogenase by reduced diphosphopyridine nucleotide is an instrumental artifact. *J. Biol. Chem.* Vol. 248, No. 8: 2815-2817.
8. Charusanti P., Conrad T.M., Knight E.M., Venkataraman K., Fong N.L., Xie B., Gao Y., Palsson B.Ø. 2010. Genetic Basis of Growth Adaptation of *Escherichia coli* after Deletion of *pgi*, a Major Metabolic Gene. *PLoS Genet.* Vol. 6 No.11: 1-13.
9. Chen X., Alonso A.P., Allen D.K., Reed J.L., Shachar-Hill Y. 2011. Synergy between (13)C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*. *Metab. Eng.* No. 1: 38-48.
10. Cornish-Bowden A. 1995. *Fundamentals of enzyme kinetics* Portland



Press, London.

11. Demple B. 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon—a review. *Gene*. Vol. 179, No. 1:53-57.
12. Feist A.M. and Palsson B.Ø. 2010. The biomass objective function. *Curr. Op. Microb.*, No. 13: 344–349.
13. Feist A.M., Henry C.S., Reed J.L., Krummenacker M., Joyce A.R., Karp P.D., Broadbelt L.J., Hatzimanikatis V. and Palsson B.Ø. 2007. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* Vol. 3: 1-18.
14. Fraenkel D.G. 1968. Selection of *Escherichia coli* Mutants Lacking Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase or Gluconate-6-Phosphate Dehydrogenase. *J. Bacteriol.* Vol 95, No. 4: 1267–1271.
15. Fuhrer T., Fischer E., Sauer U. 2005. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.* Vol. 187, No. 5: 1581-1590.
16. Fuhrer T. and Sauer U. 2009. Different Biochemical Mechanisms Ensure Network-Wide Balancing of Reducing Equivalents in Microbial Metabolism. *J. Bacteriol.* , Vol. 191, No. 7: 2112–2121.
17. Gaudu P., S. Dubrac and D Le Touati. 2000. Activation of SoxR by Overproduction of Desulfoferrodoxin: Multiple Ways To Induce the soxRS Regulon. *J Bacter*, Vol. 182: 1761–1763.
18. Giró, M., N. Carrillo, Krapp A.R. 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microb.* Vol. 152: 1119–1128.
19. Glaser L. and D.H. Brown. 1955. Purification and Properties of D-Glucose-Phosphate Dehydrogenase. *J.B.C.* Vol. 216, No.1: 67-79.
20. Goudar C.T., Sonnad J.R. and R.G Duggleby. 1999. Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1429: 377-383
21. Gutierrez O.A.; Danielson U.H. 2006. Detection of competitive enzyme inhibition with end point progress curve data. *Anal. Bioch.*, 358(1): 11-19.
22. Heinrich, R., and T. A. Rapoport. 1974. A linear steady state treatment of enzymatic chains. *Eur. J. Biochem.* 42: 89-120.
23. Henry C.S., Broadbelt L.J. and Hatzimanikatis V. 2007. Thermodynamics-based metabolic flux analysis. *Biophys J.* 92: 1792-1805.
24. Huang, H. T. and Niemann, C. 1951. The Kinetics of the  $\alpha$ -Chymotrypsin Catalyzed Hydrolysis of Acetyl- and Nicotinyl-Ltryptophanamide in

- Aqueous Solutions at 25°C and pH 7.9 *J. Amer. Chem. Soc.* 73: 1541-1548
25. Ingraham JL, Maaløe O, and Neidhardt FC. 1983. *Growth of the bacterial cell*. Sunderland Sinauer Associated, New York.
  26. Jair K.W., Fawcett W.P., Fujita N., Ishihama A., Wolf R.E. 1996. Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol Microbiol.* Vol. 19, No.2: 307-317.
  27. Jair K.W., Martin R.G., Rosner J.L., Fujita N., Ishihama A., Wolf R.E. 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J. Bacteriol.* Vol. 177, No. 24: 7100-7104.
  28. Kacser, H. and Burns, J.A. 1973. The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27: 65-104.
  29. Kayser A, Weber, J, Hecht V and Rinas U. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microb.* 151: 693-706.
  30. Koerber S.C. and Fink A.L. 1987. The analysis of enzyme progress curves by numerical differentiation, including competitive product inhibition and enzyme reactivation. *Anal. Bioch.* Vol. 165, Iss. 1: 75-87.
  31. Koksharova O., Schubert M., Shestakov S., Cerff R. 1998. Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol.*; Vol. 36, No. 1:183-194.
  32. Krapp A.R., Humbert M.V. and Carrillo N. 2011. The soxRS response of *Escherichia coli* can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content. *Microb.* 157: 957-965.
  33. Kuzmič P. 1996. Program DynaFit for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* Vol. 237, No. 2: 260-73.
  34. Kuzmič P. 2009. DynaFit: a software package for enzymology. *Meth. Enzymol.*, 467: 247-80.
  35. Levin M.K., M.M. Hingorani, R.M. Holmes, S.S. Patel and Carson J.H. 2009. Model-based global analysis of heterogeneous experimental data using gfit. *Meth. Mol. Biol.* 500: 335-59.
  36. Lowry O.H., Carter J., Ward J.B. and Glaser L. 1971. The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. *J.B.C.* 246: 6511-6521.

37. Lundquist R. and Olivera B.M. 1971. Pyridine nucleotide metabolism in *Escherichia coli* I. Exponential growth. *J. B. C.* 246: 1107-1116.
38. Martínez I., J Zhu, H Lin, GN. Bennett, K-Y San. 2008. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metab. Eng.* 10: 352-359.
39. Marx, A., Eikmanns, B.J., Sahm, H., de Graaf, A.A. & Eggeling, L. 1999. Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metab. Eng.* 1: 35-48.
40. Michaelis L. and Menten M. 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z.*, 49: 333-369.
41. Mitsch M.J., Cowie A. and Finan T.M. 2007. Malic Enzyme Cofactor and Domain Requirements for Symbiotic N<sub>2</sub> Fixation by *Sinorhizobium meliloti*. *J. of Bact.*, Vol. 189, No. 1: 160-168.
42. Moritz B., Striegel K., de Graaf A.A and Sham H. 2000. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6 phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur. J. Biochem.* 267: 3442-3452.
43. Nicolas C., Kiefer P., Letisse F., Krömer J., Massou S., Soucaille P., Wittmann C., Lindley N.D. and Portais J.C. 2007. Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 581: 3771-3776.
44. Orth J.D., Thiele I. and Palsson B.Ø. 2010. What is flux balance analysis? *Nat. Biotech.*, Vol. 28, No. 3: 245-248.
45. Orthner C.L. y Pizer L.I. 1974. An evaluation of regulation of the hexose monophosphate shunt in *Escherichia coli*. *J.B.C.*, Vol. 249, No. 12: 3750-3755.
46. Østgaard K. and Larsen B. 1993. Substrate conversion and product inhibition of mannuronate lyase from *Halobacterium*. *Carb. Res.* Vol. 246, Is. 1: 229-241.
47. Philo R.D. and Selwyn M.J. 1973. Use of Progress Curves to Investigate Product Inhibition in Enzyme-Catalysed Reactions. Application to the soluble mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Biochem. J.* 135: 525-530.
48. Portnoy V.A., Scott D.A., Lewis N.E., Tarasova Y., Osterman A.L. and Palsson B.Ø. 2010. Deletion of Genes Encoding Cytochrome Oxidases

- and Quinol Monooxygenase Blocks the Aerobic-Anaerobic Shift in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *App. Env. Microb.*, Vol. 76, No. 19: 6529-6540.
49. Reich, J. G. and Sel'kov E. E. 1981. *Energy Metabolism of the Cell. A Theoretical Treatise*, Academic Press, London: 135.
  50. Rocco C.J., Dennison K.L., Klenchin V.A., Rayment I. and Escalante-Semerena J.C. 2008. Construction and use of new cloning vectors for the rapid isolation of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Plasmid*, Vol. 59, Is. 3: 231-237.
  51. Rohwer J.M., Hanekom A.J., Crous C., Snoep J.L., Hofmeyr J.H. 2006. Evaluation of a simplified generic bi-substrate rate equation for computational systems biology. *IEE Proc. Syst. Biol.*, Vol. 153, No. 5: 338-341.
  52. Rowley D.L., Fawcett W.P., and Wolf Jr. R.E. 1992. Molecular Characterization of Mutations Affecting Expression Level and Growth Rate-Dependent Regulation of the *Escherichia coli* *zwf* Gene. *J. Bact.*, Vol. 174, No. 2: 623-626.
  53. Salas, M., Vinuela, E., Sols, A. 1965. Spontaneous and enzymatically catalyzed anomerization of glucose-6-phosphate and anomeric specificity of related enzymes. *J. B. C.* Vol. 240: 561-568.
  54. Sanwal B.D. 1970. Regulatory Mechanisms Involving Nicotinamide Adenine Nucleotides As Allosteric Effectors III. Control of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *J. B.C.* Vol. 245, No. 7: 1626-1631.
  55. Sauer U., Canonaco F., Heri S., Perrenoud A. and Fischer E. 2004. The Soluble and Membrane-bound Transhydrogenases UdhA and PntAB Have Divergent Functions in NADPH Metabolism of *Escherichia coli*. *J. B. C.* Vol. 279, No. 8: 6613-6619.
  56. Savinell J.M. and Palsson B. Ø. 1992. Network Analysis of Intermediary Metabolism using Linear Optimization I. Development of Mathematical Formalism. *J. Theor. Biol.* 154: 421-454
  57. Schellenberger J., Que R., Fleming R.M.T., Thiele I., Orth J.D., Feist A.M., Zielinski D.C., Bordbar A., Lewis N.E., Rahmanian S., Kang J., Hyduke and Palsson B.Ø. 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Prot.* Vol. 6, No. 9: 1290-1307.
  58. Schnell S. and Mendoza C. 1997. Closed Form Solution for Time-dependent Enzyme Kinetics. *J. Theor. Biol.*, 187: 207-212.
  59. Schofield P.J. and Sols A. 1976. Rat liver 6-phosphogluconolactonase: a low Km enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 71, No. 4: 1313-1318.

60. Schuetz R., Kuepfer L. and Sauer U. 2007. Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Mol. Sys. Biol.* 3, article 119: 1-15.
61. Schuetz R., Zamboni N., Zampieri M., Heinemann M. and Sauer U. 2012. Multidimensional Optimality of Microbial Metabolism. *Science* 336: 601-604.
62. Segel, I.H. 1975. *Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems.* John Wiley & Sons, New York, London, Sydney and Toronto.
63. Selwyn M.J. 1965. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 105:193-195.
64. Stödeman M. and Schwarz F.P. 2002. Importance of product inhibition in the kinetics of the acylase hydrolysis reaction by differential stopped flow microcalorimetry. *Anal. Bioch.* Vol. 308: 285-293.
65. Vought V., Ciccone T., Davino M.H., Fairbairn L., Lin Y., Cosgrove M.S., Adams M.J. and Levy H.R. 2000. Delineation of the Roles of Amino Acids Involved in the Catalytic Functions of *Leuconostoc mesenteroides* Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *Bioch.*, Vol. 39: 15012-15021.
66. Wadler C.S. and Vanderpool C.K. 2007. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *PNAS*. Vol. 104, No. 51: 20454-20459.
67. Wanner B.L. and Datsenko K.A. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* Vol. 97: 6640-6645.
68. Wolf Jr. R.E., Prather D.M., and Shea F.M. 1979. Growth-Rate-Dependent Alteration of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. Levels in *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.* Vol. 139, No. 3: 1093-1096.
69. Zhao J., Baba T., Mori H. and Shimizu K. 2004. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metab. Eng.* Vol. 6: 164-174.
70. Zhu, G., Golding, G.B., and Dean, A.M. 2005. The selective cause of an ancient adaptation. *Science*, Vol. 307: 1279-1282.
71. Zimenkov D., Gulevich A., Skorokhodova A., Biriukova I., Kozlov Y. and Mashko S. 2005. *Escherichia coli* ORF ybhE is *pgl* gene encoding 6-phosphogluconolactonase that has no homology with known 6PGLs from other organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 244, No. 2: 275-80.

## Anexo 1: Listado de plásmidos utilizados en esta investigación y sus características principales

Nombre	Procedencia y Referencia	Características y marcador
pETG6PDH*	pETG6PDH donado por Dra. A. Krapp, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. Giró y cols., 2006	Contiene la secuencia codificante para los aminoácidos de la EcG6PDH fusionada a una secuencia de corte con trombina y una cola de poli-histidina. La expresión está bajo control de un promotor reconocible por la T7pol. Kan <sup>R</sup> .
pTEV-LmG6PDH	pTEV (Rocco y cols., 2008) y pET25a-LmG6PDH donado por Dr. M. Cosgrove, Universidad de Siracusa, E.E.U.U. El plásmido pET25a-LmG6PDH no ha sido citado en ninguna publicación pero la fidelidad de su secuencia fue confirmada por secuenciación.	Contiene la secuencia codificante para los aminoácidos de la LmG6PDH fusionada a una secuencia de corte para la proteasa TEV y una cola de poli-histidina. Kan <sup>R</sup> .
pET25a-LmG6PDH <sup>R46EQ47E</sup>	pET25a-LmG6PDH	Contiene la secuencia codificante para los aminoácidos de la LmG6PDH pero los codones correspondientes a los residuos 46 y 47 están modificados para que codifiquen para ácido glutámico. Amp <sup>R</sup> .
pTEV-LmG6PDH <sup>R46EQ47E</sup>	pTEV-LmG6PDH	Contiene la secuencia codificante para los aminoácidos de la LmG6PDH pero los codones correspondientes a los residuos 46 y 47 están modificados para que codifiquen para ácido glutámico, además está fusionada a una secuencia de corte para la proteasa TEV y una cola de poli-histidina. Kan <sup>R</sup> .
pET25a-LmG6PDH <sup>R46EQ47ED16G</sup>	pET25a-LmG6PDH	Contiene la secuencia codificante para los aminoácidos de la LmG6PDH pero los codones correspondientes a los residuos 46 y 47 están modificados para que codifiquen para ácido glutámico y en el residuo 16 aparece una glicina. Amp <sup>R</sup> .
pET-LmG6PDH <sup>R46EQ47E</sup> -FKF	pET25a-LmG6PDH y pKD13 (Wanner y Datsenko, 2000)	Contiene la secuencia codificante para la LmG6PDH <sup>R46EQ47E</sup> acoplada al cassette FRT-Kan <sup>R</sup> -FRT. Amp <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup> .
pET-LmG6PDH <sup>R46EQ47ED16G</sup> -FKF	pET25a-LmG6PDH y pKD13 (Wanner y Datsenko, 2000)	Contiene la secuencia codificante para la LmG6PDH <sup>R46EQ47ED16G</sup> acoplada al cassette FRT-Kan <sup>R</sup> -FRT. Amp <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup> .