



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LA PIRUVATO CINASA Y LA
FOSFOFRUCTOCINASA-1 DEL FITOPATÓGENO
*USTILAGO MAYDIS***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
RODRIGO MARTÍNEZ ACOSTA

DIRECTORA:
DRA. LUCERO ROMERO AGUILAR
CODIRECTORA:
DRA. LAURA MORALES LARA

FEBRERO, 2025





Oficio No. FCBLBT/007/2025
Oficio de Modalidad de Titulación
Por Examen Profesional por Tesis

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de Administración Escolar, BUAP
PRESENTE

At'n: Psic. Marcela Juárez Zenteno
Jefa del Departamento de Titulación

Por este medio, me permito hacer de su conocimiento que el alumno **RODRIGO MARTINEZ ACOSTA** con número de matrícula **201911742** de la Licenciatura en Biotecnología, presentará examen profesional el día **10 de febrero de 2025 a las 11:00 horas**, mismo que **será presencial**.

Informar a los miembros del sínodo evaluador:

NOMBRE	CARGO
D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA	PRESIDENTE
D.C. LUCERO ROMERO AGUILAR	SECRETARIO
D.C. ARMANDO MENA CONTLA	VOCAL

Nota: este documento tiene vigencia por 6 meses a partir de la fecha de su expedición.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su atención y apoyo, quedo de usted.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 23 de enero de 2025

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director

Oficio No. FCBLBT/007/2025
Oficio de Modalidad de Titulación
Por Examen Profesional por Tesis

Facultad de
Ciencias Biológicas

Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria, Puebla,
Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7097, 7085, 7084 y 7086

Agradecimientos:

Se hace el agradecimiento a la Dra. Laura Morales Lara por el apoyo otorgado desde el inicio de la carrera y mostrar el interés en mi potencial como estudiante, ofrecerme la oportunidad de colaborar en su laboratorio y generar una estancia con la Universidad Nacional Autónoma de México para llevar a cabo la realización de mi tesis.

Al mismo tiempo se hace el agradecimiento a la Dra. Lucero Romero Aguilar y al Dr. Juan Pablo Pardo Aguilar por recibirme en su laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, destinando parte de los recursos de la Universidad para mi investigación, además de compartir conocimiento y tiempo con un servidor.

Al sustento y apoyo de mi familia

Al tiempo y risas por parte de mis amigos

A la fuerza y cariño brindado por mi novio

Y paciencia, dedicación y conocimiento de mis doctores

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Sistema de expresión.....	2
1.2 Generalidades de las proteínas recombinantes.....	8
1.3 La vía de la glucólisis.....	9
1.3.1 La hexocinasa.....	10
1.3.2 La fosfofructocinasa-1.....	11
1.3.3 La piruvato cinasa.....	12
2. Antecedentes.....	14
2.1 <i>Ustilago maydis</i> como modelo de estudio.....	14
2.2 La glucólisis en <i>Ustilago maydis</i>	15
2.3 Aplicaciones biotecnológicas de la PK y la PFK-1.....	16
2.4 Métodos de purificación de las proteínas.....	17
2.4.1 Cromatografía.....	17
2.4.2 Purificación por intercambio iónico en columna de gravedad.....	17
2.4.3 Purificación por FPLC.....	18
2.5 Fundamentos de cinética enzimática.....	19
2.5.1 El modelo de Michaelis- Menten.....	19
2.5.2 El modelo de Hans Lineweaver-Dean Burk.....	21
2.5.3 Inhibidores enzimáticos.....	23
3. Justificación.....	25
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	27
5.1 Objetivo General.....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6. Materiales y métodos.....	28
6.1 Mantenimiento de las cepas.....	28
6.2 Crecimiento de las cepas.....	28
6.3 Extracción de DNA plasmídico.....	28
6.4 Cuantificación de DNA.....	29
6.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
6.6 Obtención de células competentes.....	30
6.7 Transformación de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	30
6.8 Inducción de la síntesis de la proteína recombinante.....	31
6.9 Lisis celular con perlas de vidrio.....	31
6.10 Lisis celular por sonicación.....	32
6.11 Determinación de la expresión proteica.....	32
6.12 Determinación de proteína por el método de Lowry.....	33
6.13 Determinación de la actividad específica de la PFK-1.....	33

6.14	Determinación de la actividad específica de la PK.....	35
6.15	Determinación del punto isoeléctrico en las proteínas.....	36
6.16	Empacado y estabilización de la columna para PFK-1.....	36
6.17	Purificación por columna de intercambio iónico por gravedad.....	37
6.18	Determinación de la pureza de las fracciones recuperadas para PFK-1.....	37
6.19	Empaquetado y estabilización de la columna para la PK.....	38
6.20	Purificación por FPLC para la PK y determinación de la actividad enzimática.....	38
6.21	Determinación de proteína.....	39
6.22	Determinación de parámetros cinéticos.....	39
7.	Resultados.....	40
7.1	Crecimiento de cepas.....	40
7.2	Obtención de las transformantes y optimización de la síntesis de la PFK-1..	41
7.3	Obtención de las transformantes y optimización de la síntesis de la PK.....	44
7.4	Estandarización de la expresión de la PK y la PFK-1.....	46
7.5	Punto isoeléctrico teórico de la PK y la PFK-1.....	49
7.6	Purificación de la PFK-1 de la cepa BL21 Gold pLysS (DE3).....	49
7.7	La PFK-1 se inhibe por su sustrato el Mg-ATP.....	50
7.8	Cinética de saturación de la PFK-1 recombinante por su sustrato F6P.....	53
7.9	El ADP es un inhibidor competitivo de la PFK-1.....	55
7.10	La F1,6BP ejerce una inhibición acompetitiva.....	57
7.11	El citrato y el malato no son inhibidores de la PFK-1.....	59
7.12	La PFK-1 es termoestable hasta temperaturas de 45°C.....	61
7.13	Purificación de la PK de la cepa BL21 DE3.....	63
7.14	Cinética de saturación de la PK recombinante por su sustrato el PEP.....	64
7.15	Cinética de saturación de la PK recombinante por su sustrato ADP.....	66
7.16	El Mg-ATP es un inhibidor competitivo de la PK.....	68
7.17	El piruvato es un inhibidor acompetitivo de la PK.....	70
8.	Discusión.....	74
8.1	Optimización de la expresión.....	74
8.2	Purificación de las enzimas.....	76
8.3	Caracterización cinética.....	77
8.3.1	La PK de <i>U. maydis</i>	77
8.3.2	La PFK-1 de <i>U. maydis</i>	79
8.4	Perspectivas.....	82
9.	Conclusiones.....	84
10.	Bibliografía.....	85

Resumen

En este estudio, se optimizó la expresión y caracterización cinética de las enzimas recombinantes piruvato quinasa (PK) y fosfofructocinasa-1 (PFK-1) de *Ustilago maydis*, utilizando diferentes cepas de *Escherichia coli* como sistema de expresión y el vector pET 28a. Se optimizó la expresión de las enzimas PK y PFK-1 variando parámetros como la temperatura, el tiempo de inducción y la concentración del inductor IPTG. Las enzimas fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico, y en el caso de la PK, se utilizó también cromatografía líquida de alta resolución (FPLC). Por primera vez, se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y K_i .

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, la PK de *U. maydis* sigue un modelo cinético de tipo Michaelis-Menten para sus sustratos el fosfoenolpiruvato (PEP) y la adenosina difosfato (ADP). Este comportamiento es indicativo de una regulación eficiente de la glucólisis. Además, se observó una inhibición competitiva por adenosina trifosfato (ATP) frente al PEP, lo cual sugiere que el ATP actúa como un regulador negativo de la PK. También se reportó una inhibición acompetitiva por el piruvato. Por otro lado, la PFK-1 mostró una cinética de tipo Michaelis-Menten con una K_m de 3.26 mM para su sustrato la fructosa-6-fosfato (F6P), mientras que el ATP fue un inhibidor por sustrato a concentraciones mayores de 1 mM. A diferencia de otras PFK-1, la enzima de *U. maydis* no mostró regulación alostérica por el citrato y el malato. Adicionalmente, se observó que el ADP es un inhibidor competitivo de la PFK-1. Mientras que la fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP) es un inhibidor acompetitivo

Estos resultados sugieren que la PK y la PFK-1 de *U. maydis* presentan mecanismos de regulación diferentes a los presentes en la mayoría de los organismos eucariotas, particularmente en cuanto a la falta de inhibición por citrato y malato en la PFK-1, lo que podría ser una adaptación metabólica para mantener un flujo constante de glucosa a través de la glucólisis, optimizando el uso de los recursos energéticos del hongo. Este comportamiento en ambas enzimas reguladoras ofrece potenciales aplicaciones biotecnológicas en la optimización del metabolismo para la producción de metabolitos de valor agregado y la comprensión de la regulación metabólica en *U. maydis*.

1. Introducción

1.1 Sistema de expresión

Los sistemas de expresión son utilizados de manera amplia para expresar proteínas con la finalidad de caracterizarlas cinéticamente, estudiarlas como agentes terapéuticos o analizarlas estructuralmente (Singh et al., 2015). Un sistema de expresión consta de tres componentes:

1. la célula: necesaria para proveer toda la maquinaria necesaria para la síntesis de la proteína.
2. el vector: indispensable para insertar material genético extracelular en el huésped y regular la expresión de la proteína de interés el cual contiene marcadores de selección.
3. un cassette de expresión: necesario para la transcripción y traducción de la proteína de interés.

Hay una amplia gama de sistemas de expresión; uno de los que más se puede destacar es *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa, parte de las enterobacterias. Mayormente se puede localizar en la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos y en heces fecales; una gran parte de estas cepas son inocuas sin embargo otras más pueden desencadenar fuertes infecciones como lo es la hepatitis, la septicemia, y la cistitis. Algunas de las ventajas que pueden resaltar de *E. coli* como sistema de expresión son las siguientes: es de fácil manipulación genética, tiene un tiempo corto de duplicación, de entre 20 y 30 minutos, capacidad de crecer en medios de bajo costo, carece de proteasas y su genoma está completamente secuenciado (Singh et al., 2015) (Lara 2011). En la tabla 1, se pueden apreciar algunas características generales de las diferentes cepas de *E. coli* y el uso recomendado como sistema de expresión.

Los sistemas de expresión presentan diversos problemas y desafíos como lo es la formación de cuerpos de inclusión o formas insolubles de las proteínas, esto como resultado una producción de proteína inactiva o un bajo rendimiento de producción y la falta de maquinaria postraduccion. Algunas causas de la formación de cuerpos de inclusión son: 1) alta temperatura de inducción, 2) alta concentración de inductor, 3) la expresión de un promotor regulable (ser activados a voluntad) (Terol et al., 2021). Si se desea tener un eficaz rendimiento para la proteína de interés se requiere

seleccionar el sistema de expresión apropiado, también se debe considerar las condiciones de inducción como son la temperatura, la concentración del inductor, el tipo de inductor, el tiempo de inducción, el medio de cultivo, y la cepa hospedera (Serrano et Espuñes., 2006)

En conclusión, a través de manipulaciones genéticas se han obtenido diversas cepas de *E. coli* con características genéticas y fisiológicas específicas bien conocidas, como se muestra en la tabla 1, por lo que la elección de la cepa a utilizar también dependerá de las características de la proteína a producir (Sahdev et al., 2007).

Tabla 1. Diferentes cepas de *E. coli* utilizadas como sistema de expresión.

<i>Cepa</i>	<i>Características</i>	<i>Requerimientos de crecimiento</i>	<i>Uso preferente</i>	<i>Referencia</i>
<i>BL21(DE3)</i>	Deficiente en proteasas Lon y Omp-t. Contiene polimerasa T7. Usa altas concentraciones de IPTG para la inducción	No presenta un control estricto de expresión; se recomienda adición de 1% de glucosa en el medio	Expresión de genes no tóxicos	(Papaneyhtou & Kontopidis, 2013)
<i>BL21(DE3) GoldpLysS</i>	El plásmido pLysS produce la lisozima T7 para reducir la expresión a nivel basal del gen de interés. Expresa polimerasa T7 con IPTG	Cloranfenicol 34 µg/mL	Expresión de genes tóxicos	(Rosero et al., 2017)
<i>BL21-AI™</i>	Alberga una copia del gen de la RNA polimerasa T7 con control del promotor araBAD inducible por arabinosa.	Tetraciclina 12.5 µg/mL	En presencia de glucosa se reprime la expresión	(Studier, 2018)
<i>Origami™B (DE3)</i>	Tienen mutaciones en los genes de la tiorredoxina reductasa y de la glutatión reductasa.	Kanamicina 15 µg/mL y Tetraciclina 12.5 µg/mL	Mejora en gran medida la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma	(Hayat et al., 2018)

<i>BL21 CodonPlus (DE3)-RIL</i>	Portan copias adicionales de los genes de RNAt argU, ileY y leuW. Reconocen los codones AGA/AGG (arginina), AUA (isoleucina) y CUA (leucina)	Tetraciclina 12.5 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL	Cuando se utiliza junto con vectores de expresión impulsados por el promotor T7, proporciona niveles significativos de transcripción de genes heterólogos.	Carstens, C. P et al., 2001)
<i>Rosetta™ (DE3)</i>	Derivados de BL21, los genes de RNAt son impulsados por sus promotores nativos.	Cloranfenicol 34 µg/mL	Mejora la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones que rara vez se usan en <i>E. coli</i> .	(Arano-Varela et al., 2012)
<i>DH5α</i>	Implementadas para la detección azul/blanca de colonias en placas bacterianas que contienen Blue-gal o X-gal por medio del gen lacZ M15, permiten una alta producción y calidad de ADN por la mutación en endA	No requiere control de expresión	Adecuadas para la construcción de bancos de genes o para la generación de bibliotecas de DNAc	(Fierro et al., 2019)

Nota: Polimerasa T7 es una enzima que se utiliza para sintetizar ADN a partir de una plantilla de ADN o ARN originaria del virus T7. Lisozima T7 es una enzima que hidroliza enlaces en la pared celular de ciertas bacterias, lo que puede provocar su lisis. Promotor araBAD elemento regulador utilizado para controlar la expresión de genes en sistemas bacterianos; codifican enzimas necesarias para metabolizar la arabinosa. Gen endA codifica una endonucleasa en *E. coli* que es responsable de la degradación del ADN

Un vector es una molécula de DNA que contiene un fragmento de DNA externo al del origen, y es utilizado en técnicas de clonación o DNA recombinante como medio de transporte e introducción a una célula hospedadora. Estos se pueden clasificar en vectores de clonación y de expresión. Los primeros únicamente podrán mantener el DNA externo dentro del fragmento y además duplicarse en diferentes células con la finalidad de producir grandes cantidades de DNA de una molécula recombinante. Por otro lado los vectores de expresión tienen como objetivo final producir una proteína recombinante específica, en un organismo hospedero como lo es *E. coli* (Lara 2011).

Los componentes generales de un vector de expresión de acuerdo con Balbas y Bolívar (1990). son:

- sitio de origen: o replicación sitio único reconocido por proteínas para dar inicio a la replicación unidireccional.
- marcador de selección: gen que confiere resistencia o algún tipo de fenotipo para selección.
- sitios de restricción: sitios únicos de reconocimiento a enzimas de restricción que generan un corte.
- promotor: secuencia de ADN necesaria para el inicio de la transcripción a RNA; por medio de un inductor genera la expresión de la proteína.
- sitio múltiple de clonación
- sitio de unión al ribosoma
- codón de inicio y de terminación

El sistema de vector pET es un sistema ampliamente utilizado para expresar proteínas recombinantes en *E. coli*. El gen de interés se clona en el vector pET bajo el control de un sistema regulador de la transcripción y traducción del bacteriófago T7. La activación de la expresión se logra mediante la RNA polimerasa T7 dentro de la célula. Una vez que el sistema se encuentra en un estado de inducción completa, la mayoría de los recursos presentes en la célula, se dedican a expresar el gen de interés. Pasadas unas pocas horas de inducción, la proteína recombinante podría constituir casi la mitad de la proteína total de la célula (Montes et al., 2016). Para inducir la expresión de la proteína se requiere la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Mierendorf et al., 2003).

Existen dos tipos de vectores

1. vectores de clonación

Los vectores de clonación se presentan como moléculas de ADN circular, que se replican de forma independiente al ADN cromosómico. Estos vectores contienen fragmentos de ADN, generalmente un gen, que se desea introducir en un organismo huésped como *E. coli*. Para lograrlo, el vector se corta con enzimas de restricción y, tras insertar el fragmento, se convierte en un vector

recombinante. Los vectores más comunes incluyen plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales bacterianos o de levadura.

Los componentes principales que debe tener todo vector de clonación son:

- El origen de replicación (ORI) es una secuencia en el ADN del vector que permite el reconocimiento de proteínas necesarias para iniciar la replicación. Los plásmidos suelen tener un solo sitio ORI, lo que les permite replicarse de forma unidireccional.
- El marcador de selección es un gen que otorga resistencia a antibióticos o genera un fenotipo específico, permitiendo identificar las células que han incorporado el vector. Los más comunes son los genes de resistencia a ampicilina o kanamicina, y algunos plásmidos contienen el gen lacZ, que codifica la β -galactosidasa, produciendo una coloración azul cuando se pone en contacto con X-gal. También se utilizan marcadores como el gen GFP (proteína verde fluorescente), que genera fluorescencia bajo luz UV en las células transformadas.
- El sitio de clonación múltiple (MCS) es una región del ADN del vector que contiene varios sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción, facilitando la inserción de diversos fragmentos de ADN. Entre los sitios más comunes en los vectores se encuentran los de las enzimas EcoR I, Hind III, BamH I, Xho I, y Kpn I, figura 1.

2. vectores de expresión

Los vectores de expresión están diseñados para producir RNA o proteínas a partir de un RNA molde; los cuales pueden ser plásmidos o fagos. Aparte de los elementos básicos de los vectores de clonación son el origen de replicación, marcador de selección el sitio de clonación múltiple, además de un promotor fuerte para garantizar una expresión eficiente, un sistema de inducción simple y efectivo y una baja expresión basal. También cuentan con secuencias de terminación de la transcripción y sitios de unión al ribosoma (IRES) que permiten el ensamblaje de la maquinaria de traducción; que es la secuencia Shine-Dalgarno que precede el codón de inicio AUG de la traducción en los ARNm de procariontes. También debe

incluir secuencias de terminación de la transcripción y de adición de cola de poliadenilación, pues con ello el transcrito estará protegido de la degradación de nucleasas, con lo que su vida media se extenderá. Dicha secuencia es complementaria con el extremo 3' del ARNr 16S, cuya hibridación permite el ensamblaje de la maquinaria de inicio de la traducción, figura 1. Es fundamental controlar la expresión basal, ya que un número elevado de copias plasmídicas junto con promotores fuertes puede afectar la viabilidad celular. Ejemplos de estos vectores son pcADN3.1, pET161, y pDEST10. (Sandoval et al. 2013)

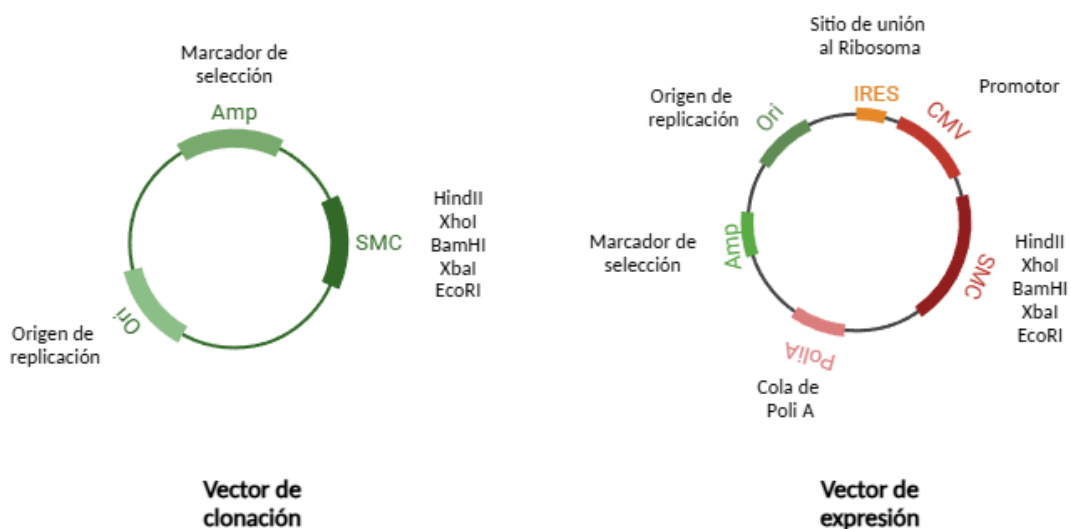


Figura 1. Esquema de un vector de clonación y un vector de expresión. Ambos tipos de vectores cuentan con un origen de replicación, un marcador de selección y un sitio de clonación múltiple; además los vectores de expresión cuentan con un sitio de unión al ribosoma, un promotor y una cola de poliadeninas. Modificado de accessmedicina: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743892>

El sistema de vectores pET es ampliamente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. En este sistema, el gen de interés se inserta bajo el control del regulador fuerte del bacteriófago T7. La activación de la expresión se logra proporcionando la ARN polimerasa T7 dentro de la célula. Cuando se induce por completo, casi todos los recursos de la célula se destinan a la expresión del gen. En pocas horas, la proteína recombinante puede constituir hasta la mitad de la proteína total de la célula (Mierendorf et al., 1998). Existen diferentes marcadores de selección como la ampicilina, la lactamasa y la kanamicina. En los vectores pET la kanamicina es ampliamente utilizada debido a que la ampicilina es degradada por la

lactamasa secretada. Además, el gen de la kanamicina está orientado en el sentido opuesto al promotor T7, por lo que no se incrementará la producción del gen Kan después de la inducción resultante de la transcripción de lectura del promotor T7, figura 2 (Shilling et al., 2020).

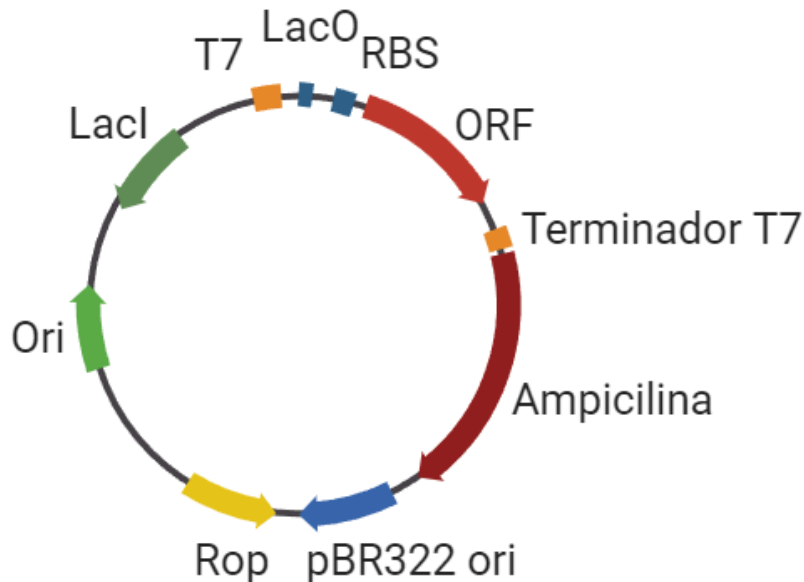


Figura 2. Mapa del vector pET 21. Los componentes del vector son: **T7 Promotor:** Regula la transcripción a altos niveles del gen de interés en presencia de la ARN polimerasa T7. Junto con el elemento LacO, forma el promotor T7lacI. **LacO:** Sitio de unión para LacI que inhibe la actividad del promotor T7, evitando la expresión no deseada del gen. **RBS (Ribosome Binding Site):** Sitio de unión al ribosoma que facilita la producción eficiente de la proteína. **ORF (Open Reading Frame):** El marco de lectura abierta del gen de interés. **Terminador T7:** Secuencia que finaliza la transcripción del gen de interés, evitando la transcripción continua. **Ampicilina:** Gen de resistencia a la ampicilina, que permite la selección del plásmido en *E. coli*. **pBR322 ori:** Origen de replicación pBR322, que genera bajo número de copias del plásmido. **Rop:** Proteína que regula el número de copias del plásmido en combinación con el origen pBR322. **LacI:** Promotor y secuencia codificante del represor lac, que reprime la transcripción del gen de interés y de la ARN polimerasa T7 en ausencia de IPTG. Modificado de vectorbuilder: <https://en.vectorbuilder.com/resources/vector-system/pET16b.html>

1.2 Generalidades de las proteínas recombinantes

Las proteínas tienen características específicas de acuerdo con su cadena lateral constituida por una serie de aminoácidos diferentes, propiedades indispensables de conocer a la hora de aplicar un proceso de purificación, ya que estas técnicas pueden ser afines a la carga de la proteína, el peso molecular, la hidrofobicidad o la especificidad por algún ligando (Jayakrishnan et al., 2024).

Una proteína recombinante es el producto de la implementación de tecnología del DNA recombinante y la implementación de algún tipo de microorganismo como huésped para estudio de una proteína, facilitar la producción de una proteína de interés o la producción de proteínas con una baja disponibilidad natural (Arauzo-Aguilera et al., 2023). De manera simplificada el proceso de obtención de una proteína recombinante se basa en la selección de un gen de interés para después colocarlo dentro de un sistema de expresión disponible; este sistema de expresión debe de dar resultados óptimos en la expresión de genes. Continuando con la inducción de la proteína recombinante para proseguir con una lisis celular y finalmente purificar la enzima por métodos convencionales como el intercambio iónico. El método escogido depende de las características de la proteína recombinante (Eskandari et al., 2024).

1.3 La vía de la glucólisis

La glucólisis es la vía central a través de la cual se oxida la glucosa. Consta de 10 reacciones enzimáticas, que tienen lugar en el citosol. El producto final de la oxidación de la glucosa son dos moléculas de adenosina trifosfato (ATP), dos moléculas de piruvato y dos moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). Dependiendo del organismo el piruvato puede tomar una ruta anaerobia o aerobia. Por la vía aeróbica el piruvato se convierte en oxalacetato (OAA) por acción de la piruvato carboxilasa, o en acetil-CoA si lo toma la piruvato deshidrogenasa. Por la vía anaeróbica el piruvato es convertido en etanol o en lactato. (Caballero Roque, 2006).

De las 10 reacciones de la glucólisis el primer paso es catalizado por una hexocinasa (HK); la reacción encargada de atrapar a la glucosa dentro de la célula fosforilandola, el ATP es el donador de fosfato y se produce la glucosa-6-fosfato (G6P). La reacción catalizada por la hexocinasa es la segunda reacción de la vía es catalizada por la fosfoglucoisomerasa convirtiendo a la G6P en su isómero, la fructosa-6-fosfato (F6P); siendo esta una reacción reversible. Posteriormente la F6P es fosforilada en una reacción catalizada por la fosfofructocinasa-1 (PFK-1), una enzima alostérica, el producto de la reacción es la fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP). La cuarta reacción es la ruptura de la F1,6BP en dos moléculas de 3 carbonos; la dihidroxiacetona 3-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (G3P)

catalizada por la aldolasa; siendo esta una reacción reversible. El DHAP, debe ser convertido en una molécula de G3P por isomerización, una reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa. La reacción es reversible. Las dos moléculas de G3P serán oxidadas incorporando un fosfato además de la reducción de NAD^+ interviniendo la gliceraldehido 3 fosfato isomerasa (GAPDH) dando como producto al 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) y un NADH (Pertierra et al., 2002).

El 1,3-BPG se convierte 3-fosfoglicerato (3PG) por acción de la fosfoglicerato cinasa produciendo además un ATP. Posteriormente, el intermediario 3PG es tomado por la mutasa y se convierte en 2-fosfoglicerato. El penúltimo paso es la deshidratación del 2-fosfoglicerato por medio de una enolasa para producir fosfoenolpiruvato (PEP), una molécula inestable que es convertido rápidamente en piruvato en una reacción catalizada por la piruvato cinasa (PK), la reacción también produce una molécula de ATP; esta reacción es irreversible. (K. Mathews et al., 2003).

La vía de la glucólisis tiene tres pasos limitantes los cuales son catalizados por la HK, la PFK-1 y la PK. A continuación, se describen brevemente algunas características de estas enzimas reguladoras.

1.3.1 La hexocinasa

La HK es una enzima funcional como tetrámero, cataliza la fosforilación de las hexosas utilizando el ATP como donador de fosfato. La existencia de isoformas de HKs se describió en los 60' para *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y para mamíferos. En *Yarrowia lipolytica* se expresa un sólo gen para la HK y la enzima presenta una asa inusual de 37 aminoácidos, no presente en otros géneros de *Yarrowia*. La eliminación de esta asa produce cepas incapaces de fosforilar la glucosa o la fructosa aparentemente por cambios morfológicos inducidos por la pérdida de la asa de 37 aa (Fletterick et al., 1975).

Las HKs estructuralmente son similares entre especies, y constan de dos dominios, un monómero de peso molecular de 51 kDa que tiene una forma alargada y que está dividido en dos lóbulos por una profunda hendidura central, figura 3. Una cadena polipeptídica está plegada en tres dominios estructurales, uno de los cuales es predominantemente α -helicoidal y dos de los cuales contienen cada uno una lámina β -plisada flanqueada por α -hélices (Eugenio & De, 1987)). La HK de humanos contiene 15 α -hélices y 13 β -hélices, mientras que *Kluveromyces lactis* tiene 13

α -hélices y 18 β -hélices. Otra característica compartida por las HKs es la unión de glucosa, en sus dominios se acercan entre sí para adoptar la conformación cerrada del sitio catalítico (Rodríguez-Saavedra et al., 2021).

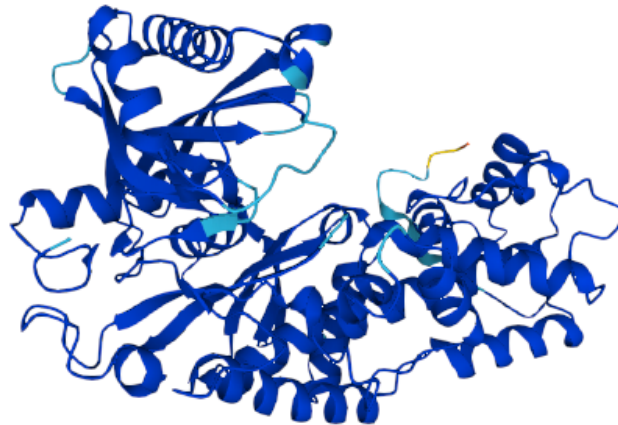


Figura 3. Modelo de la hexocinasa de *S. cerevisiae*. En azul fuerte se muestra la región con una confianza > 90, en azul claro de entre 90 y 70, en amarillo de entre 70 y 50 y en anaranjado < 50. Obtenido de Uniprot:
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P04807/entry#structure>

1.3.2 La fosfofructocinasa-1

La PFK-1 cataliza el segundo paso limitante de la glucólisis utilizando como sustrato a la F6P, formando F1,6BP. El ΔG° para esta reacción es de -14.2 KJ/mol siendo una reacción espontánea junto con un gasto de ATP el cual tiene una alta energía de hidrólisis. La actividad de la enzima catalizadora está regulada negativamente por varios efectores como el ATP, el citrato y su producto el PEP. Altas concentraciones de adenosina monofosfato (AMP) activan a la enzima (Reuter, R & M., Bär, J., Haferburg, D., & Kopperschläger, G, 2000) . En *S. cerevisiae* la PFK-1 forma un heterotetrámero de 835 kDa, compuesto por cuatro subunidades alpha y cuatro betha de aproximadamente 105 kDa cada uno; el análisis del complejo proteína-ligando ha demostrado la unión de la fructosa 2,6-bisfosfato (F2,6BP) (un potente efector de la PFK-1 que se encuentra sólo en eucariotas superiores) activa a la PFK-1 y revela un nuevo sitio de unión de nucleótidos; exhibe una cinética cooperativa con F6P y es activada por AMP y F2,6BP, mientras que el ATP actúa como sustrato y como un inhibidor alostérico (Ruiz et al., 2001; Kricke et al., 1999). La PFK-1 de *Ustilago maydis* consta de 867 aminoácidos y su peso molecular es de 93 KDa; figura 4, se puede observar la estructura de PFK-1 de este organismo.

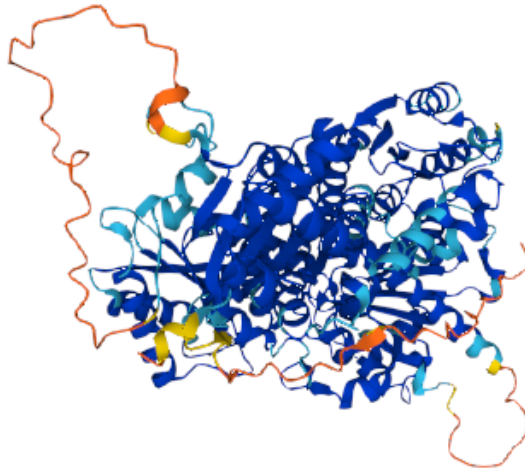


Figura 4. Modelado molecular de la PFK-1 de *U. maydis*. En azul fuerte se muestra la región con una confianza > 90, en azul claro de entre 90 y 70, en amarillo de entre 70 y 50 y en anaranjado < 50. Obtenido de Uniprot: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0D1DZW1/entry>

1.3.3 La piruvato cinasa

El tercer paso limitante de la vía de la glucólisis es catalizado por la PK, esta enzima usa como sustrato al PEP y transfiere un grupo fosforilo al adenosín difosfato (ADP), generando ATP y piruvato los cuales son utilizados en procesos aerobios y anaerobios. Además de ser un proceso irreversible debido a que la reacción posee un ΔG de -31.4 KJ/mol siendo muy favorable, dependiente de Mg^{+2} y K^+ . Los reguladores alostéricos de la enzima son la F1,6BP, el PEP, ATP y acetil-CoA. (Zoraghi et al., 2010). La enzima es un homotetrámero para la mayoría de los organismos, pero también se presenta como monómero, dímero, heterohexámero y heterotetrámero dependiendo del organismo y la ubicación intracelular. La actividad de PK está controlada por varios efectores fisiológicos, incluidos H^+ , Mn^{+2} , K^+ y Mg^{+2} (Muñoz & Ponce, 2003).

La PK de *U. maydis* consta de 528 aminoácidos y un peso molecular de 58 KDa, figura 5.

En *S. cerevisiae* la PK tiene una secuencia de 2885 nucleótidos que codifican a 499 aminoácidos y una cadena polipeptídica de 34 residuos de la secuencia de aminoácidos deducida de la levadura. Además, la proteína tiene un peso molecular como monómero de 57.5 kDa; aunque su estructura pertenece a un tetrámero, el sitio alostérico se encuentra ubicado en el dominio regulador de la enzima. Una de las enzimas más estudiadas es la de este microorganismo (Burke et al., 1983).

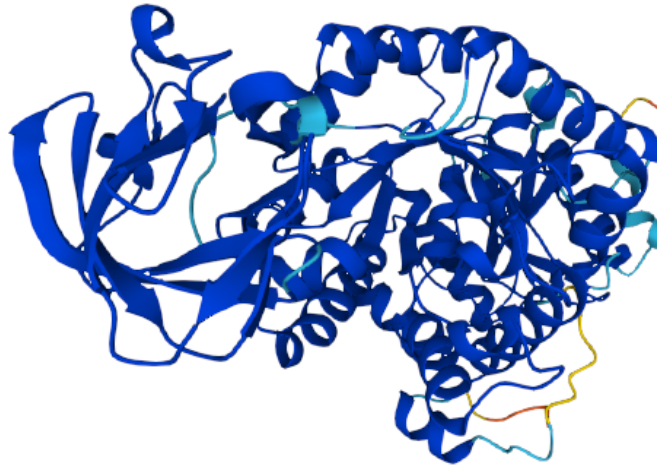


Figura 5. Modelado molecular de la PK de *U. maydis*. En azul fuerte se muestra la región con una confianza > 90, en azul claro de entre 90 y 70, en amarillo de entre 70 y 50 y en anaranjado < 50. Obtenido de Uniprot: : <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0D1E735/ent>

2. Antecedentes

2.1 *Ustilago maydis* como modelo de estudio

Ustilago maydis (*U. maydis*) es un hongo fitopatógeno, comestible y biotrófico perteneciente al orden Basidiomycota y a la familia de los Ustilaginomycetes. Es el responsable de la infección del maíz llamado huitlacoche, teniendo importancia a nivel alimentario; pero también a nivel biotecnológico y biomédico por su fácil manipulación y rápido crecimiento además de producir moléculas de valor agregado como enzimas, ácidos orgánicos, glicolípidos entre otros (Wierckx et al., 2021).

Su ciclo de vida se caracteriza por presentar un dimorfismo, el cual puede generar una transición de levadura a filamentos dependiendo de condiciones *in vitro*. Este proceso se observa al comenzar su crecimiento en fase haploide como levadura saprofita. Después se forma el dicarion dando como resultado un hongo filamentoso que pasa a las células vegetales mediante una estructura de infección especializada llamada apresorio. Como resultado se obtiene una serie de tumores que cambian el tamaño y la morfología con esporas diploides de color negro (Juárez-Montiel et al., 2011).

La levadura *U. maydis* se utiliza ampliamente como modelo de estudio de las vías metabólicas presentes en eucariotas superiores, además se utiliza como modelo para la comprensión de la biología y fisiología celular. Es un microorganismo aeróbico no fermentativo, no produce etanol o lactato. (Olicón-Hernández et al., 2019). *U. maydis* se ha modificado genéticamente para la síntesis de betacarotenos a partir de la expresión del gen *cco1* que codifica para una oxigenasa; esta producción se regula por el pH y la aireación presente en el cultivo. En un estudio de sobreexpresión se observó que conlleva a la producción de 2 moléculas de retinal, con lo cual se concluye que este organismo ocupa el retinal como un pigmento protector el cual se forma a partir de la escisión de dobles enlaces de los carotenoides (Estrada et al., 2009).

En un análisis proteómico, *U. maydis* destaca entre los eucariotas superiores al tener una similitud de 777 proteínas que comparte con el ser humano debido a la correlación que existe entre los genes de ambas especies; lo cual se ha podido aprovechar para estudios de proteínas y diferentes procesos o rutas metabólicas que no se ha observado en otros modelos convencionales como lo es *S. cerevisiae*.

Hablando de comparaciones genéticas en el estudio se detectó que, en un análisis genómico y proteómico, en el humano y el hongo *U. maydis* existen asociaciones en ambos casos a enfermedades como el cáncer, los trastornos cardiovasculares y los defectos en el metabolismo; estos últimos podrían estar estrechamente relacionados con la glucólisis (Steinberg, G., & Perez-Martin, J., 2008) (Münsterkötter & Steinberg, 2007).

El genoma de *U. maydis* comprende 20.5 millones de pares de bases; un número pequeño en comparación con otros hongos fitopatógenos que pueden albergar hasta 6,902 genes que codifican para diversas proteínas, muchas de estas proteínas que previamente no se habían estudiado actualmente se sabe que son expresados para excretar y regular el proceso de infección del maíz (Kämper et al., 2006). El trabajar con hongos ha facilitado el estudio de muchas rutas metabólicas de la célula; en especial las levaduras de gemación, debido a un tiempo de crecimiento rápido y medio de cultivo simple además de su accesibilidad genética e implementación con herramientas moleculares sofisticadas.

2.2 La glucólisis en *Ustilago maydis*

La glucólisis es una ruta bastante estudiada en las levaduras ya que estas tienen la composición proteica mayormente comprendida según estudios proteómicos, además se ha hecho una determinación a profundidad en la cinética de algunas enzimas como lo fue la PFK-1, la enolasa, la aldolasa y la PK en *S. cerevisiae*. La glucólisis de *U. maydis* se ha estudiado en extractos crudos y protoplastos (De la Fuente & Cortés, 2012), los parámetros cinéticos de la glucólisis fueron analizados previamente en *U. maydis*, y revelaron que cambios en factores fisicoquímicos como temperatura, concentraciones de nutrientes, humedad y disponibilidad de oxígeno, genera que el microorganismo se adapte, a diferencia de *S. cerevisiae* (Fuller & Kim, 2021). De acuerdo con Saavedra et al. (2008) las actividades específicas de la PK, la HK y la PFK-1 son mayores en un medio mínimo que en un medio rico en fuente de carbono y nitrógeno, estas se van modificadas por la etapa de crecimiento del microorganismo y por ende la adaptación metabólica a un estado nutricional cambiante el cual implica la regulación transcripcional de genes glicolíticos y probablemente involucra también la actividad específica de las enzimas glucolíticas. La PFK-1 fue la enzima con menor actividad con un valor de

0.05 U/ mg de proteína en medio YPD y de 0.1 U/ mg de proteína en medio mínimo. Una orden de magnitud menor comparado a otras levaduras. Por otro lado, la actividad de la PK en medio YPD fue de 1.3 U/ mg de proteína y en medio mínimo de 0.5 U/mg de proteína el cual es un valor similar al determinado en las levaduras *Suillus bovinus* and *Debaryomyces. hansenii*. (Saavedra et al., 2008).

Las K_m de la PK en medio rico fue para el PEP= 0,12 mM y el ADP= 0,42 mM y en medio mínimo fue de PEP= 0,33 mM y ADP 0,31 mM (Saavedra et al., 2008). En otro estudio, se observó una amplia especificidad de sustrato a la enzima PFK-1 ya que se puede fosforilar con diversos azúcares y nucleótidos al realizar expresión génica en *E. coli* al exhibir mayor actividad en presencia de CO₂ (Shakir et al., 2019).

2.3 Aplicaciones biotecnológicas de la PK y la PFK-1

La PK se utiliza en la fabricación de biosensores de glucosa, que tienen aplicaciones médicas y son fundamentales para el control de la diabetes. Investigar y optimizar el sistema de expresión de la PK podría contribuir al desarrollo de biosensores más eficaces y sensibles, con aplicaciones directas en la monitorización de glucosa y otras enfermedades metabólicas. Caso particular es la elaboración de un biosensor sensible a ATP y ADP con amplificación de sustrato interno a partir de un electrodo enzimático que da respuesta a oxígeno y una capa que incorpora cuatro sistemas enzimáticos (PK, HK, lactato deshidrogenasa (LDH) y lactato monooxigenasa) para la determinación sensible de ADP y ATP. Por medio de reciclaje enzimático con una sensibilidad a ADP 220 veces mayor en comparación con la reacción no amplificada (Ronkainen et al., 2010; Wollenberger et al., 1987).

Otro enfoque de análisis es como objetivo de terapia génica en el caso de deficiencia de la PK (PKD); donde se muestra que en estudios preclínicos en terapia génica para PKD se puede tratar a base de un vector que alberga un promotor de un gen lentiviral utilizado para transducir células madre hematopoyéticas (HSC) de PKD en ratón que posteriormente se trasplantaron a diferentes ratones con PKD mieloablaciones. La expresión ectópica de la PK corrige el fenotipo hematológico y revirtiendo la patología; demostraron una corrección funcional de la vía glucolítica en glóbulos rojos derivados de HSC con PKD corregidas genéticamente, sin alteraciones metabólicas en los leucocitos (Garcia-Gomez et al., 2016).

La regulación de PFK-1 en microorganismos modificados genéticamente puede redirigir el flujo metabólico hacia la producción de compuestos deseados, como productos químicos de alto valor. Esto tiene implicaciones significativas en la producción sostenible de productos químicos y materiales de alto valor. Tal es el caso particular de la sobreexpresión del gen que codifica la PFK-1 de la cepa recombinante *Corynebacterium glutamicum* mediante la introducción del gen heterólogo D-IdhA de *Lactobacillus delbrueckii* crucial para lograr una alta producción de D-lactato alcanzando una concentración de hasta 2.17 M después de un período de incubación de 80 h para el bioproceso en medio de sales minerales (Tsuge et al., 2015)

2.4 Métodos de purificación de las proteínas

2.4.1 Cromatografía

La cromatografía se describe como la interacción de una fase móvil con una fase estacionaria, la cual va a influir directamente con las características físicas y químicas para la separación de 2 o más componentes.

2.4.2 Purificación por intercambio iónico en columna de gravedad

Una de las técnicas cromatográficas más implementadas en la purificación de proteínas es la cromatografía de intercambio iónico, la cual tiene como principio separar las moléculas de acuerdo con su afinidad en carga iónica (Cummins et al., 2010). Para que una proteína se puede adherir a una matriz en una cromatografía de intercambio iónico se debe trabajar de acuerdo a un pH y un punto isoeléctrico (pI) determinados, por ejemplo, cuando la proteína se encuentra en una solución con un pH mayor a su punto pI, esta puede adherirse a una matriz cargada positivamente (intercambio aniónico) y cuando se trabaja con un pH menor a su pI, la proteína se puede pegar a una matriz cargada negativamente (intercambio catiónico) (Mayolo-Deloisa, K et al., 2012).

Una de las resinas empleadas con mayor frecuencia en cromatografía de intercambio iónico es la de dietilaminoetil celulosa (DEAE-C); la resina hace mención del grupo funcional "Dietilaminoetil" que es una amina cuaternaria que contiene dos

grupos etilo en cada extremo de la cadena. Contiene grupos funcionales con carga positiva, lo que le permite interactuar y unirse a iones negativos en solución. Como fase móvil para este tipo de matriz se utiliza el amortiguador Tris a una concentración de 10 mM. El Tris es un amortiguador con un PK_a de 8.06 por lo que su capacidad amortiguadora está en un rango de 7.0 y 9.2 (Mayolo-Deloisa, K et al., 2012).

2.4.3 Purificación por FPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (FPLC, fast performance liquid chromatography) es una cromatografía de media presión desarrollada principalmente para la purificación de proteínas con alta resolución y reproducibilidad. El sistema FPLC permite el uso de una amplia gama de amortiguadores acuosos (la fase móvil) y diferentes fases estacionarias (resina); disponibles en una amplia gama de tamaños de partículas y superficies de ligandos que se seleccionan en función de su aplicación, para realizar los principales modos de cromatografía: intercambio iónico, filtración en gel, afinidad, cromatoenfoco, interacción hidrofóbica, fase inversa. Sin embargo, la cromatografía de intercambio aniónico y de filtración en gel son las más utilizadas. La cromatografía FPLC se puede ampliar, lo que permite el análisis de muestras que contienen desde miligramos de proteínas en columnas de 5 mL hasta la producción preparativa de kilogramos de proteínas purificadas utilizando columnas de varios litros de volumen. El FPLC también cuenta con un detector espectrofotométrico (UV), indicadores de conductividad y un colector de fracciones (Göke & Keim, 1992).

El flujo de la fase móvil a través de la fase estacionaria está controlado por una bomba que mantiene el flujo del amortiguador constante, regularmente va de 1 a 5 mL/min, y a una presión baja, normalmente de 3 a 5 bar. La composición de la fase móvil puede variar mezclando dos o más soluciones contenidas en depósitos externos. Por ejemplo, para un caso de intercambio iónico, la resina se selecciona de manera que la proteína de interés se pueda unir a la resina mediante interacción de carga en un amortiguador y posteriormente pueda dissociarse de la resina y recuperarse con un segundo amortiguador que llamamos de elución (Pontis 2016).

Para el caso particular de la PK y la PFK-1 de *U. maydis*, la determinación del pI teórico se logró a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida de la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), seguido de la implementación de la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) de Expasy (<https://www.expasy.org/>) en función de la cantidad o porcentaje de cada uno de los aminoácidos presentes en la secuencia de la proteína.

2.5 Fundamentos de cinética enzimática

La cinética enzimática hace referencia al estudio y análisis de la velocidad de reacción catalizada por una enzima; la cual es una de sus propiedades principales encargado de describir mecanismos catalíticos y la especificidad de las enzimas (Cornish-Bowden, 2013). La cinética relaciona una unidad de tiempo con la cantidad de producto que se obtiene en una reacción donde interviene una enzima; primordialmente se observa la velocidad con que se lleva a cabo la reacción y puede ser estudiada por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta[P]}{\Delta t} = v = k[S]$$

Ecuación 1. Ecuación de velocidad . [P]: concentración de proteína, t: tiempo, v: velocidad de la reacción, k: constante de Michaelis- Menten, [S]: concentración de sustrato

2.5.1 El modelo de Michaelis- Menten

Los primeros estudios en actividad enzimática modelaron el sistema llave-cerradura en donde una enzima sólo se acopla a un tipo de sustrato, aunado a esto se presentó que una enzima (E) se une a un sustrato (S) para formar un complejo enzima-sustrato (ES) y que la conversión del complejo ES en enzima libre más producto (E + P) se denomina velocidad inicial (Vo) como en la siguiente ecuación:



Ecuación 2. Formación del complejo ES. E Enzima, S: Sustrato, y P: Producto K_m , K_1 y K_2 : velocidades de reacción

Por otro lado, la formación y disociación del complejo ES es una reacción que suele ser rápida debido a que implica la formación y ruptura de enlaces no covalentes. (Cornish 2012).

Para la comprensión de la formación del complejo ES se planteó un modelo matemático como ecuación de velocidad, donde la interacción entre la enzima y el sustrato dependerá de la afinidad de la enzima y la concentración de sustrato; concluyendo que a altas concentraciones de sustrato la enzima es limitante y a bajas concentraciones de sustrato la velocidad inicial de reacción puede cambiar su afinidad catalítica. Al analizar en una gráfica se puede aplicar la siguiente ecuación a una hipérbola correspondiente a la pendiente de la curva de V_0 en función del sustrato [S]

$$y = \frac{ax}{b+x}$$

Ecuación 3. Ecuación de hipérbola rectangular

donde a es la asíntota de la curva (el valor de y a un valor de x infinito) y b es el punto del eje x que corresponde a un valor igual a $a/2$. Los términos se pueden definir para la cinética enzimática donde $y=V_0$, $x=[S]$, $a = V_{max}$ y $b=$ Constante de Michaelis-Menten (K_m). Dando como resultado la ecuación de Michaelis Menten:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 4. Ecuación de Michaelis-Menten

En la ecuación 4, V_{max} se define como la velocidad máxima de la reacción a concentraciones de sustrato saturante. Mientras que K_m se expresa como la constante de equilibrio de disociación de ES para dar E+S o la medida de afinidad de la E por el S, es decir, mientras menor sea el valor numérico de K_m , la enzima tiene mayor afinidad por su sustrato. Al presentar los datos en una gráfica, figura 6, la K_m es la concentración del sustrato necesario para alcanzar $\frac{1}{2}$ de V_{max} (H. Robert Horton et al., 2008).

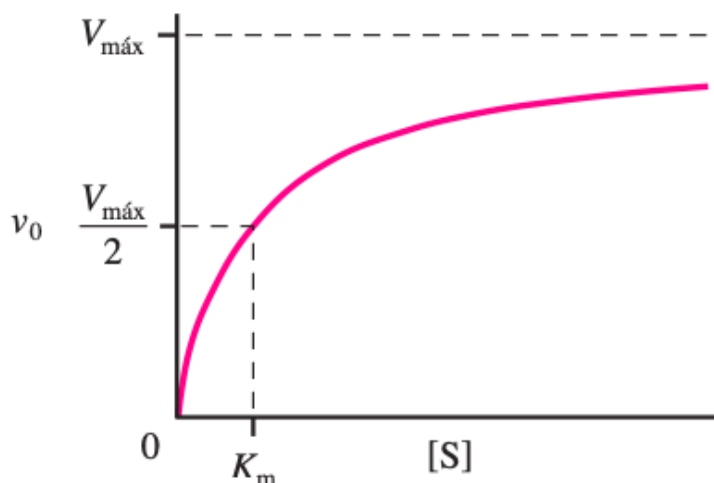


Figura 6. Modelo de cinética de Michaelis Menten. En el eje de las X se observa la variación de la concentración del sustrato, la K_m se puede apreciar como un medio de la $V_{máx}$ en función de la velocidad inicial de una reacción enzimática sobre el eje de las Y.

2.5.2 El modelo de Hans Lineweaver-Dean Burk

El modelo de Leonor Michaelis y Maud Menten describe la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de un sustrato. Sin embargo, la representación directa de este modelo resulta en una hipérbola lo que dificulta el análisis de los datos. Motivo por el cual en 1934 Hans Lineweaver y Dean Burk propusieron la transformación de la hipérbola a una línea recta. La fórmula matemática de la representación es:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Ecuación 5. Ecuación de Lineweaver-Burk

En el gráfico de Lineweaver-Burk, figura 7, el eje de las abscisas representa el recíproco de la concentración del sustrato ($1/S$) y el eje de las ordenadas representa el recíproco de la velocidad de la reacción $1/v$. La intersección de la línea con el eje de las ordenadas da el valor de $1/V_{máx}$ y la pendiente de la línea recta es igual a $K_m / V_{máx}$. Así la ecuación de Lineweaver-Burk facilita la obtención de los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$ para una enzima de interés (Rodríguez et al., 2019). La ecuación de Lineweaver-Burk puede compararse con los términos de la ecuación de una línea recta (ecuación 6) como se muestra en la tabla 2:

$$Y = mx + b$$

Ecuación 6. Ecuación de la línea recta

Tabla 2. Comparación de los términos de la ecuación de la línea recta y la ecuación de Lineweaver-Burk.

<i>Componente</i>	<i>Valor en la ecuación</i>
Y	$\frac{1}{V_0}$
m	$(-\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}})$
x	$\frac{1}{[S]}$
b	$\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$

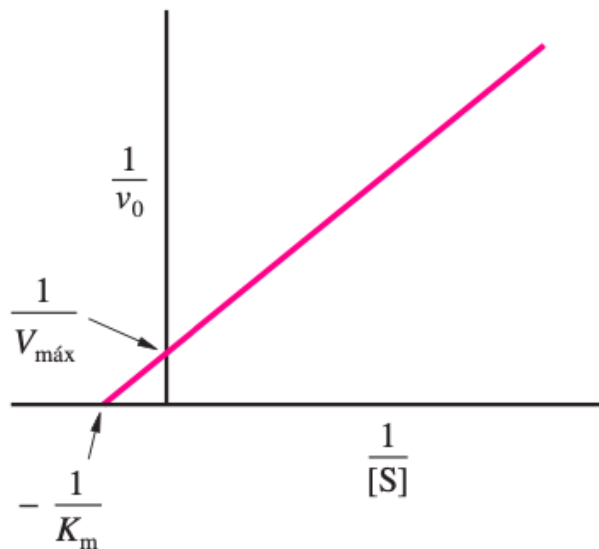


Figura 7. Modelo de Lineweaver-Burk. Los valores de $-1/K_m$ se obtienen con la intersección de la recta con el eje de las x y el valor de $1/V_{m\acute{a}x}$ se obtiene de la ordenada al origen.

2.5.3 Inhibidores enzimáticos

Un inhibidor enzimático es una molécula que se une a una enzima y modifica su actividad catalítica. Si la unión es reversible se habla de una unión no covalente, si la unión es irreversible se hace referencia a una unión covalente (Saboury, 2009).

Existen tres tipos de inhibición reversible, 1) la **inhibición competitiva**, donde el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo sitio activo en la enzima. El inhibidor se

asemeja estructuralmente al sustrato y se une al sitio activo de la enzima, bloqueando así el acceso del sustrato. Cuando el sustrato se une al sitio activo, el inhibidor no puede hacerlo, y viceversa. Si el inhibidor se une al sitio activo, resulta en una disminución de la velocidad de reacción, el efecto que produce es un incremento en el valor de la K_m , pero sin alterar V_{max} ; esto significa que se necesita una mayor concentración de sustrato para alcanzar la misma velocidad máxima comparado en ausencia del inhibidor; figura 8a (H. Robert Horton et al., 2008). El segundo tipo de inhibición es 2) la **inhibición no competitiva**; en este caso, el inhibidor se une al sitio alostérico de la enzima; el cual se puede definir como el punto de unión de una enzima que al interactuar con un modulador o efector va a generar un cambio su conformación y además de alterar su actividad catalítica. Esto puede ocurrir tanto en presencia como en ausencia del sustrato. En consecuencia, el parámetro cinético V_{max} disminuye sin alterar la K_m , figura 8b. La mayoría de las enzimas no se apegan al modelo de inhibición no competitiva, que se caracteriza por no modificar el valor de la K_m . Sin embargo, cuando se altera tanto la V_{max} como la K_m , se habla de una inhibición no competitiva de tipo mixta, esto debido a que la afinidad del inhibidor hacia la enzima libre "E" tiende a aumentar o disminuir por el complejo enzima-sustrato "ES" (Dixon, 1953).

3) La **inhibición acompetitiva** es el tercer tipo de inhibición, donde el inhibidor solo se centra en el complejo "ES" y no en la "E", dando como resultado la disminución de la V_{max} al convertir la "E" en el complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor "ESI". La formación del complejo ESI no es reversible ni siquiera a elevadas concentraciones de S; también provoca un descenso en K_m de manera proporcional a V_{max} , figura 8c (H. Robert Horton et al., 2008).

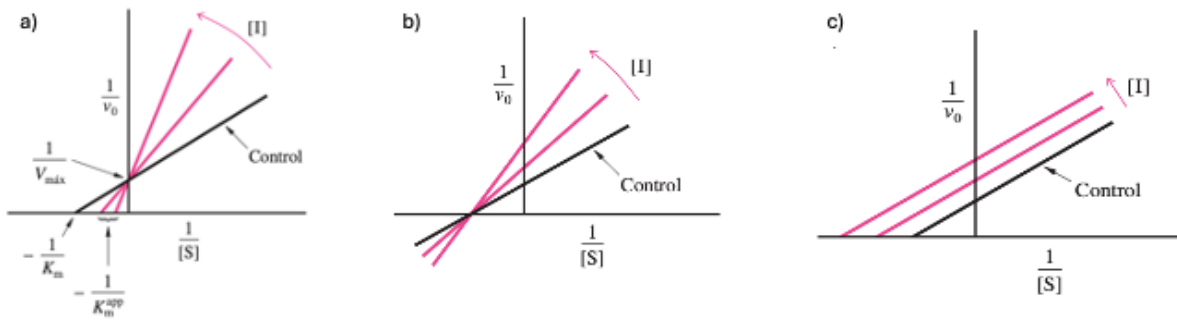


Figura 8. Modelo de Lineweaver-Burk. Se ejemplifican los tres tipos de inhibición: a) Inhibición competitiva b) Inhibición no competitiva y c) Inhibición acompetitiva. En negro se representa la actividad de una enzima en ausencia de inhibidor y en rosa la actividad de la misma enzima en presencia de un inhibidor.

3. Justificación

U. maydis es un microorganismo aeróbico no fermentativo que depende de la glucólisis aerobia para la obtención de energía. La glucólisis es una vía metabólica regulada por las enzimas hexocinasa, piruvato cinasa y fosfofructocinasa-1; juegan un papel importante en la generación de energía en forma de ATP. La actividad específica de las enzimas reguladoras de la glucólisis se ha determinado en extractos citosólicos y en protoplastos de *U. maydis* cultivada en presencia de diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, no se han logrado caracterizar los valores de los parámetros cinéticos V_{max} , K_m para la PFK-1 y la PK y no se han establecido los inhibidores de la actividad de estas enzimas. Este trabajo busca primero establecer un sistema de expresión para producir las enzimas recombinantes de PK y de PFK-1 de *U. maydis* y segundo obtener los parámetros cinéticos V_{max} , K_m para cada uno de sus sustratos y por último la K_i de sus respectivos inhibidores.

4.Hipótesis

La PK y la PFK-1 de *U. maydis* presentan propiedades cinéticas y mecanismos de regulación distintos a los convencionales en organismos eucariotas; la PFK-1 no está sujeta a la regulación alostérica tradicional ejercida por citrato y malato, y la PK sigue un modelo cinético tradicional de Michaelis-Menten bajo condiciones de altas concentración de PEP y ADP.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

- Optimizar la expresión, purificación y caracterización de la PK y la PFK-1 del fitopatógeno *Ustilago maydis*.

5.2 Objetivos específicos

- Transformar las cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21(DE3) GoldpLysS, BL21-AI™, Origami™B(DE3), Rosetta™ (DE3).
- Establecer la concentración de IPTG y/o arabinosa adecuada para obtener la óptima expresión de la PK y la PFK-1.
- Establecer la temperatura óptima de inducción de la expresión de la PK y la PFK-1.
- Establecer el tiempo óptimo de inducción de la expresión de la PK y la PFK-1.
- Purificar a la PK y PFK-1 por columna de intercambio iónico.
- Determinar el mecanismo cinético de la PK y la PFK-1 para cada uno de sus sustratos.
- Determinar la K_i para los respectivos inhibidores de la PK y la PFK-1.

6. Materiales y métodos

6.1 Mantenimiento de las cepas

Las cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21(DE3) GoldpLysS, BL21-AI™, Origami™B(DE3), Rosetta™ (DE3) y DH5α se conservaron en una solución de glicerol al 25% a -70 °C o en nitrógeno líquido a -230 °C.

6.2 Crecimiento de las cepas

Las cepas de trabajo *E. coli* fueron reactivadas por siembra en Luria Bertani (LB) agar (Extracto de Levadura: 5 g/L, NaCl: 5 g/L, Triptona: 10 g/L y agar selectivo al 2%). Después se inoculó en LB-líquido en un matraz de 50 mL con 10 mL de medio LB junto con Kanamicina 50 mg/mL por 14 h a 37 °C con 160 rpm. De este cultivo se inoculó un matraz con medio LB con antibiótico para empezar el crecimiento celular ajustado a una DO_{600nm} de 0.1 unidades de absorbancia y se siguió el crecimiento hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 unidades de absorbancia. En este momento se detuvo el crecimiento incubando en hielo por un par de minutos.

6.3 Extracción de DNA plasmídico

A partir del medio de cultivo de la cepa DH5α que contenía el plásmido pET 28a (PK o PFK-1), se tomó una alícuota de 600 μL en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 11,000 rpm durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 600 μL de agua esterilizada. Se prosiguió con la extracción de DNA plasmídico de acuerdo con el Kit Zyppy Plasmid miniprep™ (Zymo Research, USA). A la vez, el pellet celular se resuspendió adicionando 100 μL de 7x amortiguador de lisis celular, el tubo se agitó por inversión de 4 a 6 veces y se dejó incubar durante 2 minutos hasta pasar de un color azul turbio a un azul transparente. Así mismo se agregaron 350 μL del amortiguador de neutralización (Neutralization Buffer). Después la muestra se mezcló cuidadosamente hasta tener una neutralización completa, para continuar con la formación de un precipitado. Posteriormente la muestra se centrifugó a 11,000 rpm durante 4 minutos. Durante ese tiempo se montó la columna de extracción con Zymo-Spin y el tubo de colección. Una vez terminada

la centrifugación se recolectó el sobrenadante con una pipeta y se colocó sobre la columna de extracción para volver a centrifugar la columna a 11,000 rpm durante 15 segundos. Pasado el tiempo se descartó el sobrenadante de la columna y se lavó por adición de 200 μ L de Endo-wash Buffer y centrifugando a 11,000 rpm durante 30 segundos. Al término se adicionaron 400 μ L de Zyppy wash Buffer a la columna y se volvió a centrifugar a 11,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio y se agregaron 30 μ L de Zyppy Elution Buffer a la matriz de la columna, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante que contiene el plásmido se guardó a -4 °C (Burbano et al., 2017), (Kit Zyppy Plasmid miniprep™ Zymo Research, USA).

6.4 Cuantificación de DNA

La concentración de DNA extraído se determinó en el NanoDrop de Thermo Fisher™ seleccionando la opción de DNA de doble cadena, para poder obtener la concentración de DNA en ng/mL; por medio de las absorbancias a 280/260 nm y 260/230 nm. El instrumento se calibró a cero con agua destilada. Después se levantó el cabezal y se limpió el lector con un paño. De la misma forma se continuó colocando las muestras de DNA extraídas en el lector y haciendo las lecturas correspondientes para determinar la concentración de DNA. (Burbano et al., 2017)

6.5 Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa al 1% se preparó con el amortiguador TAE al 1X a partir de TAE 50x, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 mM, Tris 2 M y ácido acético glacial 1 M). La agarosa se fundió con pulsos de 10 segundos en microondas hasta que se observó transparente. Una vez que la temperatura disminuyó se le agregó 200 ng/mL de bromuro de etidio, posteriormente se mezcló suavemente y para finalmente verterlo en el soporte de electroforesis. Una vez que el gel solidificó se agregó TAE al 1X sobre la cámara de electroforesis hasta cubrir completamente el gel de agarosa. Después se colocaron las muestras de DNA (5 μ L de muestra combinada con 5 μ L de DNA loading buffer, 2-20 μ g/ μ L). Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera de DNA de rango alto GeneRuler SM 1351. El

voltaje se ajustó a 75 voltios y se dejó aproximadamente durante 1 hora. Al finalizar, el DNA se visualizó en el gel con luz UV.

6.6 Obtención de células competentes

A partir de las diferentes cepas de *E. coli* (BL21(DE3), BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21(DE3) GoldpLysS, BL21-AI™, Origami™B(DE3), , Rosetta™ (DE3) sección 6.2 sin vector, se hizo un pre-cultivo en 10 mL de medio LB junto con el antibiótico adecuado (kanamicina 50 mg/mL, cloranfenicol 20 mg/mL y/o tetraciclina 10 mg/mL); y se realizó un Overnight, a 37 °C con agitación constante de 180 rpm. Al término se tomó una alícuota se determinó la DO_{600nm} y se inocularon 10 mL de medio LB a una DO_{600nm} inicial de 0.1. Se siguió el crecimiento y se registró hasta llegar a una DO_{600nm} de 0.6. Una vez alcanzada esta densidad el crecimiento se detuvo colocando las células en frío a 4 °C y se centrifugó a 7000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en $CaCl_2$ 100 mM y se dejó incubar 30 minutos a 4 °C. Al término se centrifugó a 7000 rpm a 4 °C por 5 minutos, posteriormente, el pellet se resuspendió con 200 μ L de solución estéril de $CaCl_2$ con 15% de glicerol fría y simultáneamente mezclando por inmersión suavemente el tubo que las contenía. Se realizaron alícuotas de 50 μ L y se conservaron a -72 °C hasta que se requirieron. (Chang et al., 2017).

6.7 Transformación de las cepas de *Escherichia coli*

Una alícuota de células competentes, ver sección 6.7, se transfirió a un tubo falcon de polipropileno, y se le agregó de 10 pg a 100 ng de DNA plasmídico con el vector de la secuencia codificante para la PK o la PFK-1 y se incubó a 4 °C por 30 minutos. Al mismo tiempo se realizó el mismo procedimiento con otra alícuota, pero sin agregar DNA plasmídico para tener un control negativo. Pasado ese tiempo las células competentes se sometieron a un choque térmico en baño María a 42 °C durante 20 segundos y se volvió a colocar a 4 °C por 2 minutos. Al término de la incubación se adicionó 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación constante a 180 rpm. Finalizada la incubación se tomó una alícuota de 20 μ L y sembró por extensión en medio LB-agar selectivo (con antibiótico) y se incubó a 37 °C por un periodo de 12 a 16 h. Para optimizar el protocolo de transformación se ensayaron diferentes condiciones de choque térmico

desde los 38 °C hasta los 45 °C y lapsos de tiempos de 15 segundos hasta los 30 s (Chang et al., 2017).

6.8 Inducción de la síntesis de la proteína recombinante

A partir de las colonias transformadas, sección 6.8, se seleccionó una colonia y se inoculó en 10 mL de LB con el antibiótico de selección y se incubó a 37 °C. A partir de este pre-cultivo se tomó una alícuota para comenzar un cultivo en 10 mL de LB líquido más antibiótico con una DO_{600nm} de 0.1. Por consiguiente, cada 30 minutos se tomó una alícuota y se registró la absorbancia hasta llegar a una DO_{600nm} de 0.6. Una vez alcanzada esta absorbancia se realizó la inducción con 200 μ M de IPTG a 16 °C durante 12 h (overnight). Finalizado el overnight, se centrifugó la muestra en cadena de frío a 4 °C a 8000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y se obtuvo el peso húmedo por diferencia de pesos, después se resuspendió de acuerdo con la relación 1 mL de amortiguador de lisis por cada gr de peso húmedo. Como control se tomó una alícuota de un 1 mL de células sin inducir, todas las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ L de amortiguador de lisis para bacterias que contenía Tris-HCl 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, NaCl 100 mM, Glicerol al 5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, cocktail inhibidor de proteasas Roche y DNAasa 5 unidades / mL.

6.9 Lisis celular con perlas de vidrio

Por medio de viales para el Mini Beadbeater se colocaron 600 μ L de perlas de vidrio de 25 μ m de diámetro y se dejaron a -20 °C. Continuando con las células resuspendidas como se describe en 6.9, se adicionaron en el vial conteniendo las perlas de vidrio y se agregó PMSF 1 mM y DNAasa 5 unidades/ mL. Se prosiguió a lisar en el equipo Mini Beadbeater; para ello se realizaron 5 ciclos con lapsos de 30 segundos de lisis y 1 minuto de reposando en baño de agua fría a 4 °C. Una vez finalizada la lisis, se retiraron las perlas de vidrio por decantación y el sobrenadante se centrifugó a 15,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Al término se recuperó el sobrenadante, inmediatamente se adicionó PMSF 1 mM, por consiguiente, la muestra se conservó a 4 °C hasta su uso. El pellet se suspendió de acuerdo con la relación 1:1 utilizando el amortiguador de lisis y se tomó una alícuota de 20 μ L que

se conservó a 4 °C hasta su uso. De este modo el sobrenadante y el pellet se analizaron por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).

6.10 Lisis celular por sonicación

Las células descritas en 6.9, se resuspendieron en el amortiguador de lisis de bacterias y se agregó PMSF 1 mM y DNAasa 5 unidades/ mL para posteriormente sonicarlas en el equipo Soniprep 150™ a una amplitud ajustada a 10 (amplitude microns), llevando el proceso en cadena de frío a 4 °C. En este sentido se realizaron 8 ciclos de 30 segundos de sonicación por 1 min de reposo en baño de agua a 4 °C. Una vez finalizados los ciclos, el lisado se centrifugó a 15,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para terminar, se analizó el sobrenadante y el pellet por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.

6.11 Determinación de la expresión proteica

El pellet y el sobrenadante de las muestras previas se analizaron por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE; para ello, se elaboró un gel SDS. En la parte inferior se elaboró un gel separador de acrilamida al 10% a partir de una solución de acrilamida al 30%, Bis-Acrilamida al 0.8%, Tris HCl-pH 8.8 3 M, agua destilada, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, PMSF al 10% y tetrametiletilendiamina (TEMED) al 99%. En la parte superior se colocó el gel concentrador a partir de una solución de acrilamida al 30%, Bis-acrilamida al 0.8%, Tris-HCl-pH 6.8 0.5 M, agua destilada, SDS al 10%, PMSF al 10% y TEMED al 99%. Una vez solidificado el gel, se elaboró el amortiguador de corrida al 10x con glicina 1.92 M y Tris 250 mM para posteriormente diluirlo al 1x con agua destilada y verterlo dentro de la cámara con SDS al 0.1%. Posteriormente para cargar las proteínas en el gel, se mezclaron con loading buffer que contiene Tris-HCl 0.5 M 10 mL, SDS al 20% 10 mL, glicerol 100% 10 mL, azul de bromofenol 0.02% 8 mL, y 40 mL de agua; antes de ocupar por cada 100 µL añadir, β-mercaptoetanol 5 µ, y se corrió primero a un voltaje de 80 voltios aproximadamente 30 minutos hasta alinear las muestra, enseguida, se aumentó el voltaje a 110 voltios para terminar de correr el gel. Una vez terminada la electroforesis se tiñó con solución de tinción a partir de Coomassie R250 0.5 gr, metanol 150 mL, ácido acético 25 mL y agua, alrededor de 12 h en agitación a 100 rpm. Después se lavó con solución desteñidora que contenía

metanol al 30% y ácido acético al 7% dejando en agitación; esta solución se cambió las veces necesarias hasta tener un gel claro. Posteriormente, el gel se observó a contraluz para analizar los resultados (González A & Fillat MF, 2018)

6.12 Determinación de proteína por el método de Lowry

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951), modificado por Bensadoun y Weinstein (Bensadoun & Weinstein, 1976). Brevemente, la curva estándar se realizó con albúmina de suero de bovino (BSA). Además, se ocupó el reactivo A (Na_2CO_3 al 2% y NaOH 1N), reactivo B ($\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ al 2%,) y reactivo C ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al .2%). Después se mezclaron 20 mL de A junto con 0.2 mL de B y 0.2 mL de C para tener como resultado el reactivo D.

Así mismo en tubos de ensayo se colocó los volúmenes correspondientes para construir la curva estándar: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg de BSA, y 2 μL y 4 μL de las muestras extraídas de lisado. El volumen de los tubos de ensayo se ajustó a 100 μL con agua destilada y posteriormente, se adicionó 500 μL de detergente desoxicolato de sodio (DOC) al 4% y 1.5 mL del reactivo D. Después las muestras se agitaron suavemente en el vortex y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación se adicionó 150 μL del reactivo de Folin 1N y se mezcló en vortex. La muestra se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación se determinó la absorbancia a 660 nm.

6.13 Determinación de la actividad específica de la PFK-1

Para determinar la actividad de PFK-1 se ocupó el un microplate reader Varioskan Lux de Thermo Scientific. Como blanco se realizó una lectura a 340 nm con la placa vacía y con agua. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 μL . La mezcla contenía lo siguiente: MgCl_2 5 mM, EGTA 0.5 mM, KH_2PO_4 1 mM, Mg-ATP 1 mM, NADH 0.15 mM, F6P 2.5 mM, KCN 500 μM , *n*-octilgalato 3 μM , BSA al 0.1%, LDH 3 unidades, PK 4 unidades, sorbitol 100 mM. La reacción se inició con la adición de Mg-ATP Tanto para determinar la V_{max} y la K_m para el Mg-ATP y la F6P, se realizaron ensayos en los cuales se mantenía la concentración del Mg-ATP fija en 0.5 mM y se variaron la concentración de la F6P de 0.0625 mM a 4 mM, o se

mantuvo fija la concentración de la F6P en 2 mM variando la concentración del Mg-ATP de 0.0625 mM a 3 mM, respectivamente. La actividad de la PFK-1 se determinó siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}}=6.2 \text{ mM}^{-1}$) siguiendo la reacción, figura 9 (Santamaría et al., 2002).



Figura 9. Ensayo acoplado para la PFK-1. Se muestra el acoplamiento de PFK-1 en color azul, y el uso de las enzimas acoplantes PK y LDH para determinar la actividad enzimática de PFK-1, utilizando a sus sustratos el F6P y el Mg-ATP y siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm.

Para la cinética de inhibición de la PFK-1 por ADP, se trabajó el ensayo acoplado con diferentes enzimas; el volumen final de la reacción fue de 50 μL . La mezcla de reacción contenía lo siguiente: MgCl_2 5 mM, EGTA 0.5 mM, KH_2PO_4 1 mM, Mg-ATP 1 mM, NADH 0.15 mM, F6P 2.5 mM, KCN 500 μM , *n*-octilgalato 3 μM , BSA al 0.1%, Aldolasa 2 unidades, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 3 unidades, triosa fosfato isomerasa 3 unidades, sorbitol 100 mM. La reacción se inició con la adición de Mg-ATP Para determinar la V_{max} y la K_m para el ADP, se realizaron ensayos en los cuales se mantuvo fija la concentración del Mg-ATP en 0.5 mM y se varió la concentración de la F6P de 0.0625 mM a 4 mM. La actividad se determinó siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm y tomando en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{\text{NADH}}= 6.2 \text{ mM}^{-1}$ y la proteína en el ensayo, figura 10 (Hansen & Schönheit, 2004).

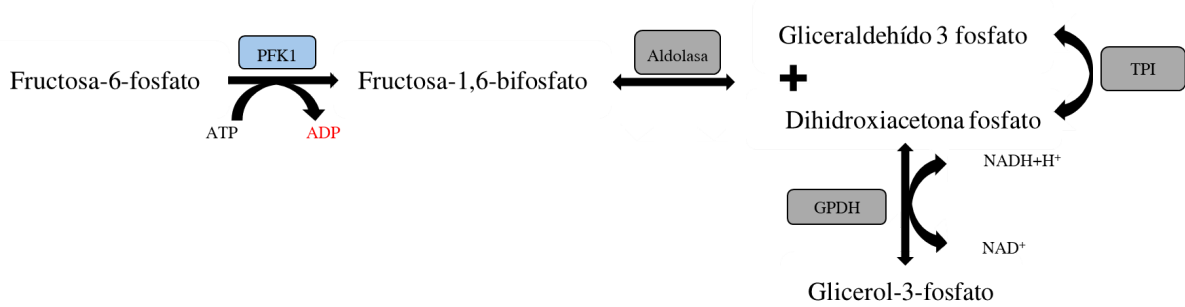


Figura 10. Ensayo acoplado para determinar la actividad de la PFK-1 con inhibición por ADP. Se muestra el acoplamiento de PFK-1 en color azul, en presencia de sus sustratos la F6P y el Mg-ATP y como inhibidor al ADP en rojo. También se hace uso de la aldolasa, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la triosa fosfato isomerasa en gris, como enzimas de reacción, siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm.

6.14 Determinación de la actividad específica de la PK

La actividad de la PK se determinó en microplaca como blanco se realizó una lectura a 340 nm con la placa vacía y con agua. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 100 μL , la cual contenía: MgCl_2 5 mM, EGTA 0.5 mM, KH_2PO_4 10 mM, KCl 100 mM, ADP 3 mM, NADH 0.15 mM, PEP 1 mM, LDH 2 unidades, BSA al 0.1%. Se inició la reacción con la adición de ADP. Para determinar la V_{max} y la K_m de la enzima por su sustrato el PEP el ADP se realizaron ensayos en los cuales se mantenía la concentración de ADP fija en 1 mM y se variaba la concentración del PEP de 0.0625 mM a 4 mM, o se mantenía constante la concentración del PEP en 2 mM y se variaba la del ADP de 0.0625 mM a 2 mM. La actividad se determinó siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm a partir de la reacción, figura 11 (Irving & Williams, 1973). El cálculo de la actividad específica se realizó considerando el coeficiente de extinción molar del NADH ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.2 \text{ mM}^{-1}$) y la proteína utilizada en el ensayo.

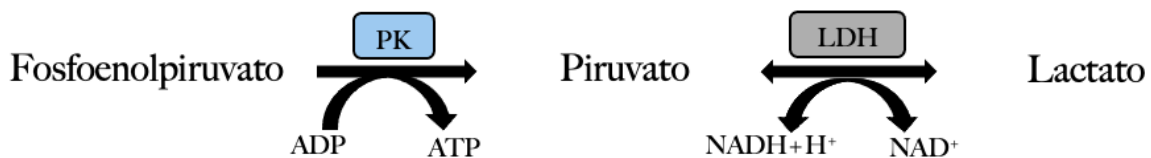


Figura 11. Ensayo acoplado para determinar la actividad de la PK. Se muestra el acoplamiento de la PK en azul además del uso de so de la LDH en gris para determinar la actividad enzimática de PK, usando sus sustratos el PEP y el ADP, siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm.

Para la cinética de inhibición de PK por su producto el piruvato el volumen final de la reacción fue de 100 μ L. La mezcla de reacción contenía $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0.5 mM, KH_2PO_4 10 mM, KCl 100 mM, ADP 1 mM, NAD^+ 0.2 mM, PEP 1 mM, HK 2 unidades, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 5 unidades, piruvato 6 mM, glucosa 10 mM y BSA 0.1%. La actividad específica se determinó siguiendo la reducción del NAD^+ y se calculó considerando el coeficiente de extinción molar del NAD^+ ($\epsilon_{NAD^+} = 6.2 \text{ mM}^{-1}$) y la cantidad de proteína en el ensayo, esquematizando la reacción acoplada utilizada para esta determinación, figura 12 (Byrnes et al., 1994)

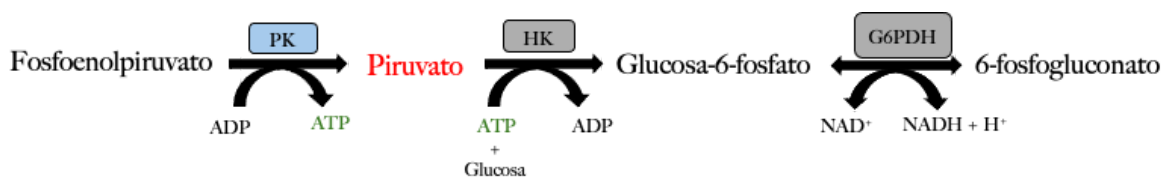


Figura 12. Ensayo acoplado para determinar la actividad de la PK con inhibición por piruvato. Se muestra el acoplamiento de la PK en color azul. Las enzimas HK y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en gris, se usaron para determinar la actividad enzimática de la PK teniendo como sustratos al PEP y al ADP, observando su inhibición por su producto el piruvato en rojo, siguiendo la reducción del NAD^+ a 340 nm.

6.15 Determinación del punto isoeléctrico en las proteínas

En primer lugar, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de cada una de las enzimas de interés (PK y PFK-1) utilizando la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Después se implementó la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) de Expasy (<https://www.expasy.org/>) para así obtener su pI teórico a partir de la cantidad o porcentaje de cada uno de los aminoácidos presentes en la secuencia de la proteína.

6.16 Empacado y estabilización de la columna para PFK-1

Se utilizó la resina DEAE-C. La resina se preparó realizando 3 lavados; el primer lavado se realizó incubando la resina con HCl 0.5 M durante 1 hora, al término el ácido se retiró por decantación. La resina se enjuago una vez con amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, el segundo lavado se realizó con NaOH 0.5 M, durante 1 hora, al término el NaOH se retiró por decantación y el tercer lavado se realizó con el amortiguador de corrida que contiene Tris-HCl pH 7.5 10 mM; este lavado se repitió dos veces. Al término de los lavados la resina se empacó por

sedimentación en una columna Pharma de longitud 40 cm y un diámetro de 2.6 cm. La altura final de la resina empacada fue de 10 cm. Posteriormente la resina se equilibró pasando el amortiguador Tris-HCl pH 7.5 10 mM a un flujo de 20 mL por hora durante toda la noche (12 h). Al día siguiente se procedió a inyectar la muestra.

6.17 Purificación por columna de intercambio iónico por gravedad

La muestra se cargó dejando un flujo de 20 mL por hora; una vez agotado el volumen de la muestra se adicionó la fase móvil Tris-HCl pH 7.5 10 mM para eliminar interferentes. Para corroborar que la proteína se adhirió a la columna con la resina DEAE-C, se realizaron ensayos acoplados para confirmar que no hubiera actividad de la PFK-1 en algunas fracciones colectadas. Para eluir los restos de la enzima adherida a la resina DEAE-C se introdujo en la columna un gradiente de NaCl a una concentración de 0 a 0.3 M junto el amortiguador de corrida previamente utilizado, la bomba se dejó trabajando a un flujo de 20 mL por hora, el cual se fue recolectando en un colector de tubos de ensayo. Al final se agregó un pulso de NaCl al 0.5 M para corroborar que todo se haya desprendido de la columna

6.18 Determinación de la pureza de las fracciones recuperadas para PFK-1

La proteína recuperada en las fracciones se agregó 1 mM de fluoruro de fenil-p-metilsulfonilo (PMSF) y posteriormente se determinó la cantidad de proteína en el NanoDrop de Thermo Fisher™ a una longitud de onda de 280 nm. Para ello, primero se calibró a cero el instrumento con agua destilada y se procedió a determinar la cantidad de proteína presente en cada fracción. Con los datos obtenidos se construyó una curva de absorbancia. Aquellas fracciones que contenían la muestra de la PFK-1 y proteínas interferentes mostraron una mayor absorbancia. La pureza de las fracciones colectadas se analizó por SDS-PAGE (10%) y también se analizó su actividad utilizando el ensayo acoplado correspondiente para la PFK-1 (sección 6.14)

6.19 Empaquetado y estabilización de la columna para la PK

La purificación de la PK se realizó por FPLC. Se utilizó la resina DEAE-C. La resina se preparó realizando 3 lavados; el primer lavado se realizó incubando la resina con HCl 0.5 M durante 1 hora, al término el ácido se retiró por decantación. La resina se enjuago una vez con amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, el segundo lavado se realizó con NaOH 0.5 M, durante 1 hora, al término el NaOH se retiró por decantación y el tercer lavado se realizó con el amortiguador de corrida que contiene Tris-HCl pH 7.5 10 mM; este lavado se repitió dos veces. Al término de los lavados, se empaquetó la resina por sedimentación en una columna, el volumen fue de 1.5 mL la altura final de fue de 10 cm. Después con el mismo amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 se equilibró la resina. El correcto funcionamiento de la columna se determinó y dejó pasar el amortiguador de corrida Tris-HCl pH 7.5 10 mM a un flujo de 500 μ L por minuto durante 30 minutos.

6.20 Purificación por FPLC para la PK y determinación de la actividad enzimática.

La muestra se diluyó 1:1 (v/v) con el amortiguador de corrida Tris-HCl pH 7.5 10 mM y se filtró usando un filtro Pall de 0.2 μ M fluorodino con membrana baja en proteínas de unión apirógena. Una vez filtrada la muestra, esta se inyectó en la columna DEAE-C, el flujo de inyección de la muestra se ajustó a 500 μ L por minuto. El programa de FLPC se configuró de la siguiente forma: el gradiente de elusión se inició ajustando el gradiente de concentración al 0% y velocidad constante de 500 μ L por minuto de flujo durante 10 minutos, posteriormente la velocidad de flujo se mantuvo fija y se aumentó el gradiente de concentración de la fase móvil a 100% en 30 minutos y se mantuvo fija durante 10 minutos. Finalmente se disminuyó la concentración del gradiente al 0 % durante 2 minutos y 30 segundos. Las fracciones recolectadas fueron de 500 microlitros y se adicionó 1 mM de PMSF. La presencia de proteína se detectó a una longitud de onda de 260 nm.

Aquellas fracciones que contenían la muestra de la PK y proteínas interferentes mostraron una mayor absorbancia. La pureza de las fracciones colectadas se analizó por SDS-PAGE (10%) y también se analizó su actividad utilizando el ensayo acoplado correspondiente para la PFK-1 (inciso 6.15)

6.21 Determinación de proteína

Para calcular la proteína específica para cada enzima (PK y PFK-1) presente en la fracción seleccionada, se realizó una curva estándar utilizando BSA, en gel SDS-PAGE al 10%; como se describió su elaboración en 6.12. En el gel se cargaron las concentraciones de 0.25 μg , 0.50 μg , 0.75 μg y 1 μg de BSA para realizar la curva estándar, además se cargaron 14 μL y 25 μL de la muestra de la PK y la PFK-1 por duplicado.

El gel se corrió a una carga inicial de 80 voltios durante 20 minutos para colocar las muestras en el gel concentrador. Después se continuó corriendo el gel a una carga de 110 voltios hasta terminar la electroforesis. Una vez terminada la electroforesis el gel se tiñó con mezcla de tinción (Coomassie R250 0.5 gr, metanol 150 mL, ácido acético 25 mL y agua) alrededor de 12 h en agitación a 100 rpm. Después se lavó con solución desteñidora que contenía metanol al 30% y ácido acético al 7% en agitación constante; esta solución se cambió las veces necesarias hasta tener un gel claro.

Después se cortaron las bandas de interés para la PK y la PFK-1 y de la curva de BSA. Cada banda se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía 1 mL de la solución de elusión de Coomassie: SDS al 3% e Isopropanol al 50%, además se cortó una banda sin carga de proteína, para tomar como blanco, los tubos se colocaron en baño María a 37 °C de 12 h a 24 h. Finalmente se leyó la absorbancia de la solución a 595 nm tomando como blanco la solución desteñidora del fragmento de el sin proteína. Los datos se graficaron, y con la ecuación de la línea recta se realizó la curva patrón y se estimó el contenido de la proteína PK y PFK1.

6.22 Determinación de parámetros cinéticos

A partir de los ensayos enzimáticos descritos previamente, se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la PFK-1 por sus sustratos F6P y Mg-ATP en ausencia y presencia de sus inhibidores ADP, F16BP, citrato y malato y los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la PK con los sustratos ADP y PEP en ausencia y presencia de sus inhibidores Mg-ATP y piruvato.

7. Resultados

7.1 Crecimiento de cepas

Las cepas fueron cultivadas en medio LB y se fue tomando su densidad óptica a 600 nm cada 30 minutos para poder generar una curva de crecimiento. Se muestra el crecimiento de la cepa BL21 DE3 con el vector de la PK de *U. maydis* y BL21 Gold pLysS (DE3) transformados con el vector PFK-1 de *U. maydis*, figuras 13 y 14 respectivamente.

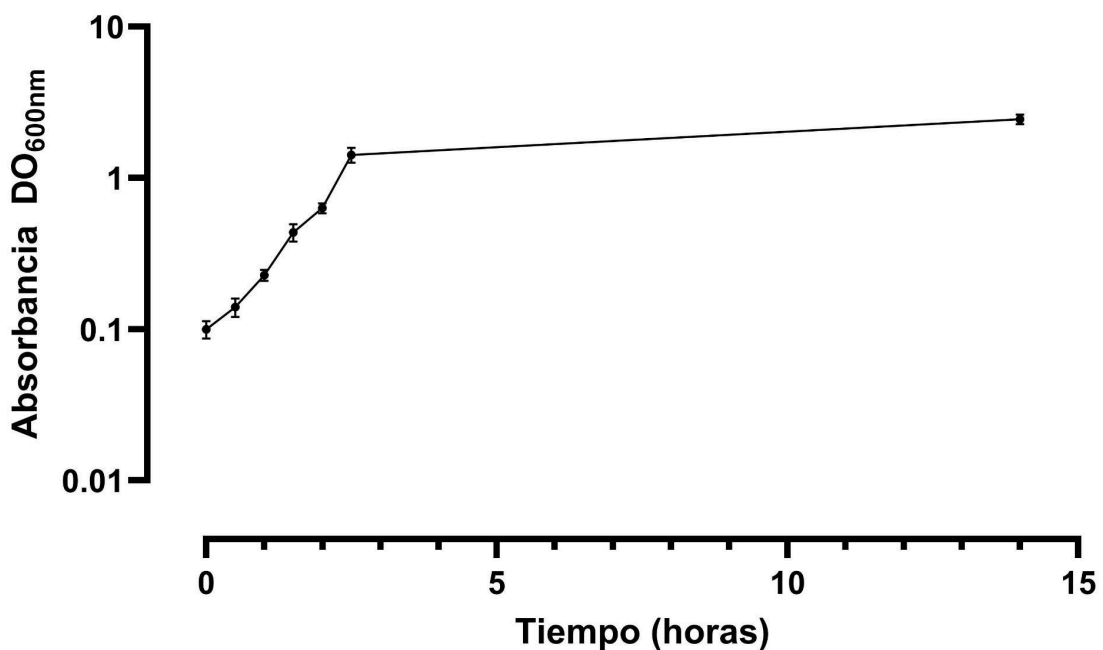


Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa BL21 DE3 transformada con el vector pET 28 conteniendo el gen de la PK. Se puede observar que a partir de la 1° h la cepa se encuentra en una fase de crecimiento exponencial, al llegar a una DO_{600nm} de 0.6 se agregó el inductor IPTG en una concentración de 100 mM para la síntesis de la PK. n=3 ± SD

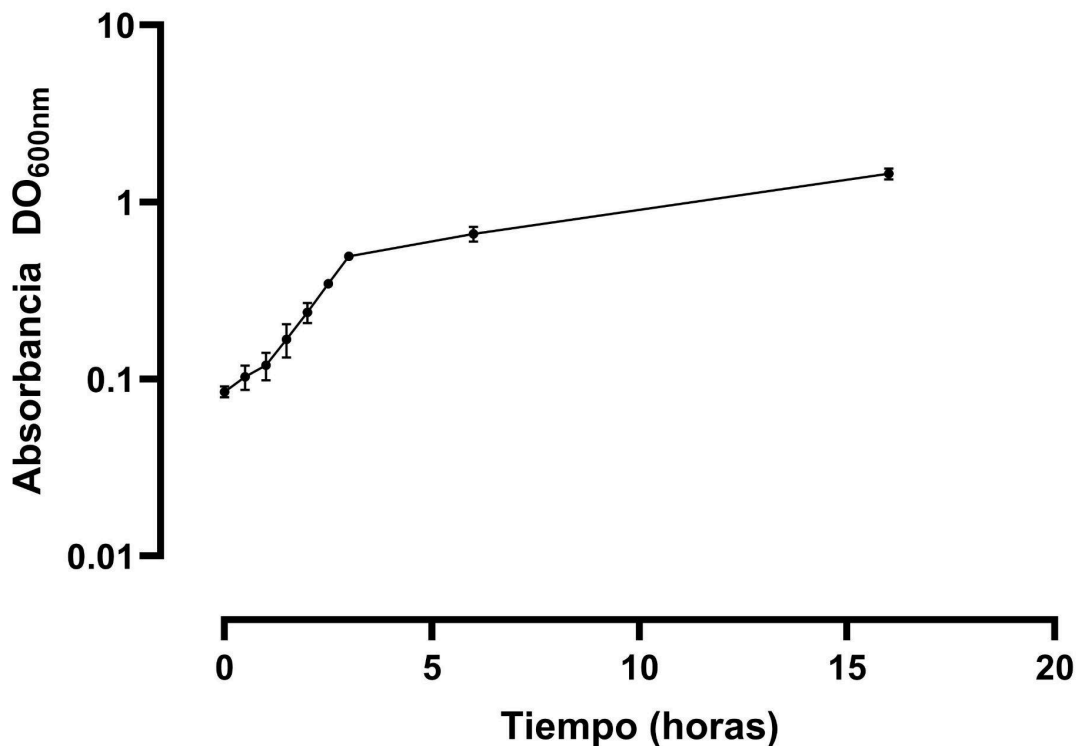


Figura 14. Curva de crecimiento de cepa BL21 Gold pLysS (DE3) transformada con el vector pET 28 que contenía a la PFK-1. De la misma forma se puede observar que a partir de la 1^o h la cepa se encuentra en una fase de crecimiento exponencial, al llegar a una DO_{600nm} de 0.6 se agregó el inductor IPTG en una concentración de 100 mM para la síntesis de la PFK-1. n=3 ± SD.

7.2 Obtención de las transformantes y optimización de la síntesis de la PFK-1

La extracción de DNA de la cepas *E. coli* DH5 α portadora del vector de la PFK-1 en *U. maydis* se realizó por medio del Kit Zyppy Plasmid miniprep™ (Zymo Research, USA) obteniendo 37.2 ng/ μ L DNA de PFK-1 el cual se cuantificó usando el NanoDrop de Thermo Fisher™.

El proceso de transformación para las cepas de *E. coli* (BL21(DE3), BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21(DE3) GoldpLysS, BL21-AI™, Origami™B(DE3), Rosetta™ (DE3) se llevó a cabo por golpes de temperatura comenzando con una incubación de 30 minutos a 4 °C, posterior se ensayaron diferentes temperaturas y tiempos para los golpes de calor: 42 °C durante 15, 20 y 25 segundos y 30 °C durante 15, 20 y 25 segundos; para las cepas de *E. coli* BL21 DE3, BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 Gold pLysS (DE3) el proceso óptimo fue un golpe de calor a 42 °C durante 20 segundos, para la cepa de *E. coli* Origami™B(DE3) el

proceso óptimo de transformación fue con un golpe de calor a 30 °C durante 15 segundos y para las cepas de *E. coli* Rosetta™ (DE3) y BL21-AI™ no se obtuvo células transformantes con el vector que contenía la PFK-1. En la tabla 3 se muestran las cepas que toleraron los procesos de transformación y se obtuvieron colonias para la expresión de las proteínas con resistencia al antibiótico correspondiente para cada cepa.

Las cepas de *E. coli* BL21 DE3, BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 Gold pLysS (DE3) y Origami™B(DE3) transformadas el vector que contenía la PFK-1 fueron incubadas en medio LB a 37 y 16 °C durante 3 y 12 h respectivamente y en ambos casos se analizaron concentraciones de inductor de 100 y 200 µM de IPTG; se cosecharon y se realizó una SDS-page al 10% para analizar la expresión, en la tabla 3 se muestra las cepas que toleraron los procesos de transformación y se obtuvieron colonias para la expresión de las proteínas con resistencia al antibiótico correspondiente para cada cepa. Finalmente se optimizaron los procesos de inducción para la síntesis de la PFK-1

Tabla 3. Cepas transformadas ante diferentes condiciones de inducción con el vector pET 28 que contiene el gen de la PFK-1.

Cepa	Vector	Crecimiento de colonia en agar selectivo posterior al proceso de transformación	Tiempo de la inducción (h)	Temperatura de inducción (°C)	Concentración del inductor (µM)
BL21 DE3	PFK-1	Crecimiento de colonia	3	37	100
BL21 DE3	PFK-1	Crecimiento de colonia	3	37	200
BL21 DE3	PFK-1	Crecimiento de colonia	12	16	100
BL21 DE3	PFK-1	Crecimiento de colonia	12	16	200
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	PFK-1	Crecimiento de colonia	3	37	200

BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	PFK-1	Crecimiento de colonia	12	16	200
BL21 Gold pLysS (DE3)	PFK-1	Crecimiento de colonia	3	37	200
BL21 Gold pLysS (DE3)	PFK-1	Crecimiento de colonia	12	16	200
BL21-AI™	PFK-1	Sin crecimiento de colonia	-	-	-
Origami™B (DE3)	PFK-1	Crecimiento de colonia	3	37	100
Origami™B (DE3)	PFK-1	Crecimiento de colonia	3	37	200
Origami™B (DE3)	PFK-1	Crecimiento de colonia	12	16	100
Origami™B (DE3)	PFK-1	Crecimiento de colonia	12	16	200
Rosetta™ (DE3)	PFK-1	Sin crecimiento de colonia	-	-	-

7.3 Obtención de las transformantes y optimización de la síntesis de la PK

La extracción de DNA de la cepa *E. coli* DH5 α portadora del vector de la PK en *U. maydis* se realizó por medio del Kit Zyppy Plasmid miniprep™ (Zymo Research, USA) obteniendo 72.9 ng/ μ l. Además, se cuantificó por medio del espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop de Thermo Fisher™.

El proceso de transformación para las cepas de *E. coli* BL21 DE3, BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 Gold pLysS (DE3) y Origami™B(DE3), BL21-AI™ y Rosetta™ (DE3) se llevó a cabo por golpes de temperatura comenzando con una incubación de 30 minutos a 4 °C, posterior se estudiaron diferentes temperaturas y tiempos para los golpes de calor: 42 °C durante 15, 20 y 25 segundos y 30 °C durante 15, 20 y 25 segundos; para las cepas de *E. coli* BL21 DE3, BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 Gold pLysS (DE3) el proceso óptimo fue un golpe de calor a 42 °C durante 20 segundos, para la cepa de *E. coli* Origami™B(DE3) el proceso óptimo de transformación fue con un golpe de calor a 30 °C durante 15 segundos y para las cepas de *E. coli* Rosetta™ (DE3) y BL21-AI™ no se obtuvo células transformantes con los vectores de la PK y la PFK-1. En la tabla 4 se muestran las cepas que toleraron los procesos de transformación y se obtuvieron colonias para la expresión de las proteínas con resistencia al antibiótico correspondiente para cada cepa.

Las cepas de *E. coli* BL21 DE3, BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21 Gold pLysS (DE3) y Origami™B(DE3) transformadas con los vectores que contenía la PK fueron incubadas en medio LB a 37 y 16 °C durante 3 y 12 h respectivamente y en ambos casos se consideraron concentraciones de inductor de 100 y 200 μ M de IPTG; se cosecharon y se realizó una SDS-page para analizar la expresión, en la tabla 4 se muestra las cepas que toleraron los procesos de transformación y se obtuvieron colonias para la expresión de las proteínas con resistencia al antibiótico correspondiente para cada cepa. Finalmente se optimizaron los procesos de inducción para la síntesis de la PK.

Tabla 4. Cepas transformadas ante diferentes condiciones de inducción con el vector pET28 que contiene el gen de la PK.

Cepa	Vector	Crecimiento de colonia en agar selectivo posterior al proceso de transformación	Tiempo de la inducción (h)	Temperatura de inducción (°C)	Concentración del inductor (µM)
BL21 DE3	PK	Crecimiento de colonia	3	37	100
BL21 DE3	PK	Crecimiento de colonia	3	37	200
BL21 DE3	PK	Crecimiento de colonia	12	16	100
BL21 DE3	PK	Crecimiento de colonia	12	16	200
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	PK	Crecimiento de colonia	3	37	100
BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	PK	Crecimiento de colonia	12	16	100
BL21 Gold pLysS (DE3)	PK	Crecimiento de colonia	3	37	100
BL21 Gold pLysS (DE3)	PK	Crecimiento de colonia	12	16	100
BL21-AITM	PK	Sin crecimiento de colonia	-	-	-
OrigamiTMB (DE3)	PK	Crecimiento de colonia	3	37	100
OrigamiTMB (DE3)	PK	Crecimiento de colonia	3	37	200

OrigamiTMB (DE3)	PK	Crecimiento de colonia	12	16	100
OrigamiTMB (DE3)	PK	Crecimiento de colonia	12	16	200
RosettaTM (DE3)	PK	Sin crecimiento de colonia	-	-	-

7.4 Estandarización de la expresión de la PK y la PFK-1

El análisis de la expresión de las enzimas recombinantes en las cepas de *E. coli* se realizó por medio de SDS-PAGE para los extractos obtenidos con los diferentes tiempos (3 y 12 h), temperaturas (37 °C y 16 °C) y concentraciones de inducción (100 y 200 µM de IPTG). Se muestra la expresión que se obtuvo utilizando las cepas BL21 DE3, CodonPlus (DE3)-RIL) y BL21 Gold pLysS (DE3) como sistemas de expresión de la PK y de la PFK-1, figura 15. La mejor expresión se obtuvo para ambas enzimas cuando la cepa (BL21 DE3 y Gold pLysS DE3) se incubó a una temperatura de 16 °C. También se observó una expresión considerable en la cepa BL21 CodonPlus (DE3)-RIL transformada con el vector para la PKF-1. Por otro lado, la cepa BL21 CodonPlus (DE3)-RIL para el vector de la PK no mostró expresión, lo mismo ocurrió para la cepa OrigamiTMB(DE3) con ambos vectores de expresión (PK y PFK-1) al variar parámetros de inducción. El control negativo del vector de expresión pET 28 vacío no mostró expresión, como se esperaba.

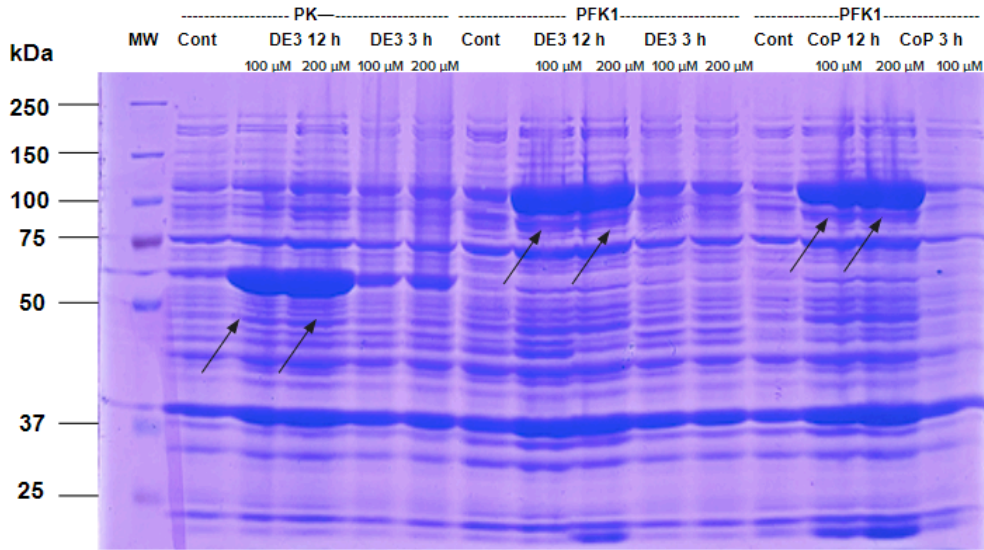
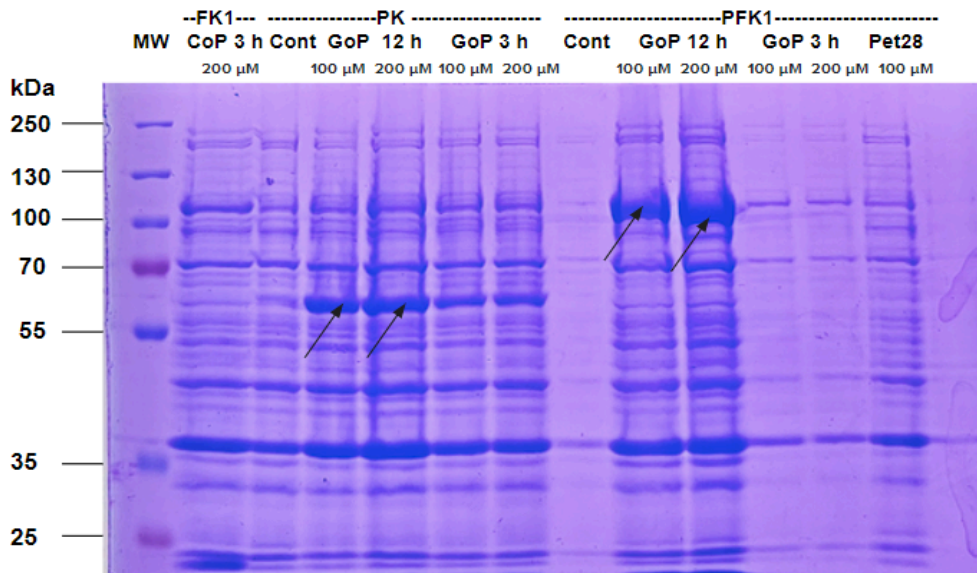
a**b**

Figura 15. Estandarización de la expresión de la PK y la PFK-1. La optimización de la expresión de las enzimas recombinantes se realizó en las cepas *E. coli* DE3 (*E. coli* BL21 DE3), CoP (*E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL), GoP (*E. coli* BL21 Gold pLysS (DE3)), Cont (control) pET 28 (BL21 DE3 con pET 28 vacío). La PK con un peso molecular de 58 kDa y la PFK-1 con peso molecular de 93 kDa utilizando diferentes concentraciones de IPTG (100 y 200 μM) y temperaturas y tiempos de incubación (3 h a 37 °C y 12 h a 16 °C). El gel de poliacrilamida se cargó con 20 μL de proteína y se indica la óptima condición para la expresión de la enzima de interés.

Al realizar la cuantificación y el análisis de actividad enzimática en los diferentes sistemas de expresión, los que tuvieron un mayor grado de actividad en la fracción soluble o el sobrenadante comparado con la cepa BL21 DE3 con el vector pET 28 vacío (control), para el caso de la PFK-1, el sistema de expresión con mayor grado de actividad enzimática fue en la cepa BL21 Gold pLysS (DE3) y de la PK el sistema

con mayor grado de actividad enzimática fue en la cepa BL21 DE3; ambos inducidos con IPTG 100 μM y una temperatura de 16 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 h, figura 16.

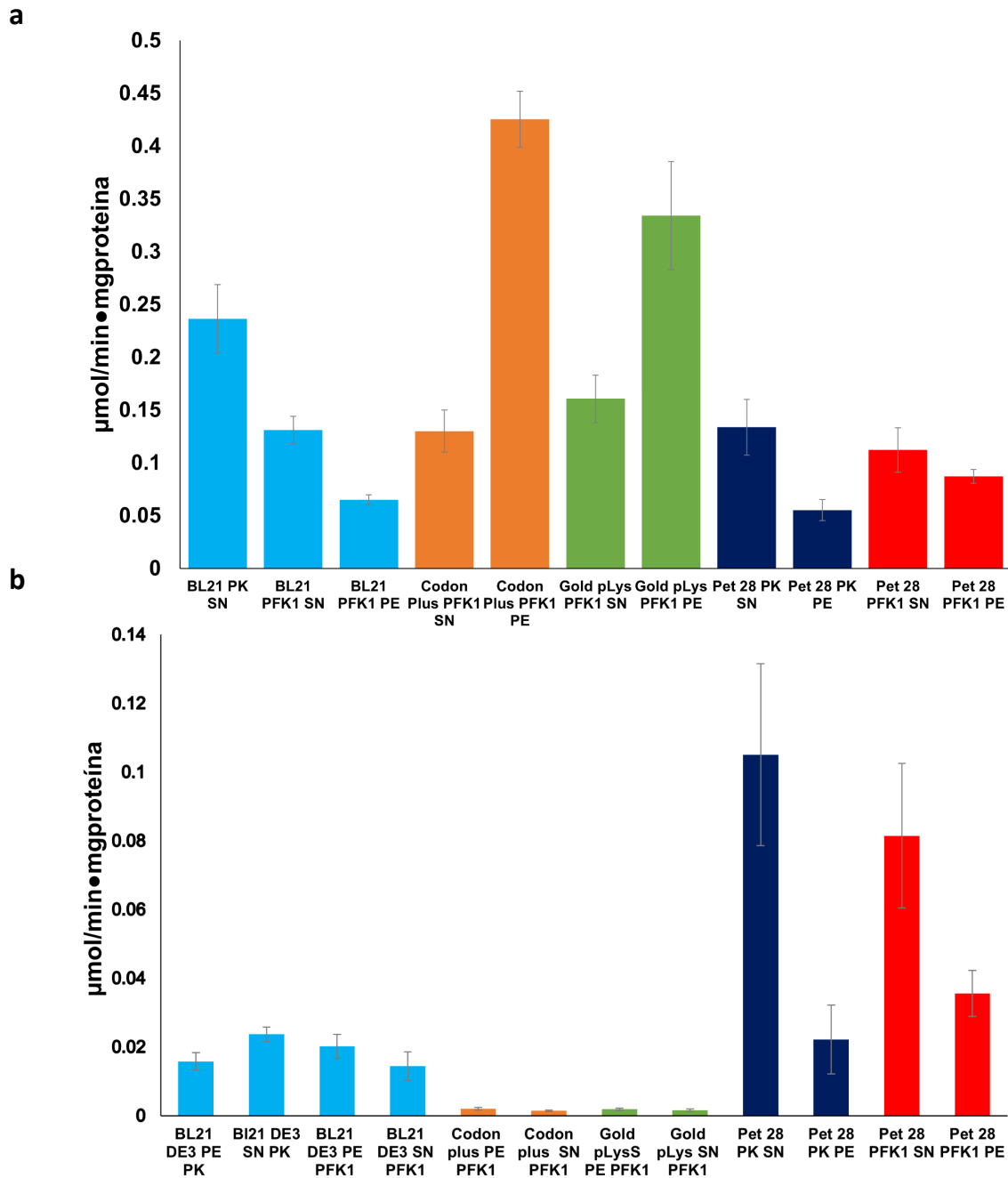


Figura 16. Análisis comparativo de la actividad específica de la PK y la PFK-1. a) Comparación de la actividad específica de la PK y la PFK-1 entre las cepas inducidas con 100 μM de IPTG a 16 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 h. Como control negativo se ocupó la cepa BL21 que contenía el vector pET 28 vacío. b) Comparación de la actividad específica de la PK y la PFK-1 entre las cepas inducidas con 100 μM de IPTG a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 h, la cepa BL21 que contenía el vector pET 28 vacío se ocupó como control.

En azul claro *E. coli* BL21 DE3 (BL21 DE3), en naranja cepa *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Codon plus), en verde cepa *E. coli* BL21 Gold pLysS (Gold pLysS), en azul fuerte BL21 DE3 con pET 28 vacío (pET 28) y rojo la cepa BL21 DE3 con pET 28 vacío; estos dos últimos como control para la PK y la PFK-1 respectivamente. SE: Sobrenadante, PE: Botón de lisis o pellet, PK: Vector pET 28 con el gen de la PK para la determinación de su actividad enzimática y PFK-1 Vector pET 28 con el gen de la enzima PFK-1 para la determinación de su actividad enzimática. $n = 3 \pm \text{SD}$.

7.5 Punto isoeléctrico teórico de la PK y la PFK-1

El punto isoeléctrico se determinó utilizando el programa ProtParam de ExPASy, el pI teórico para la PK es de 5.9 y para la PFK-1 de 6.3. Con base en el pI determinado, se decidió ocupar un amortiguador de elución de 7.8, de esta forma al tener un pH más alto que el pI de las enzimas, la proteína estaría cargada negativamente, también se decidió ocupar la resina DEAE-C ya que es comúnmente utilizada para separar moléculas cargadas negativamente, como proteínas y ácidos nucleicos. Al contener la resina grupos funcionales con carga positiva permitió interactuar y unirse a los iones negativos en la solución.

7.6 Purificación de la PFK-1 de la cepa BL21 Gold pLysS (DE3)

La expresión de la PFK-1 en la cepa BL21 Gold pLysS (DE3) se corroboró por electroforesis SDS-PAGE (10%), una vez corroborada la expresión de la proteína el extracto clarificado y filtrado se pasó por la columna de intercambio iónico, se colectaron diversas fracciones (1.5 mL) y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE (10%), figura 17. Las fracciones con un mayor grado de pureza fueron de la 18 a la 24. La actividad enzimática correspondiente a la PFK-1 de las fracciones de interés se determinó por medio de ensayos acoplados, registrando la oxidación del NADH a 340 nm y utilizando su coeficiente de extinción molar para se calculó la actividad específica, figura 18. Las fracciones con una mayor actividad enzimática fueron las número 21 y 27. Interesantemente las fracciones más puras no tuvieron la mayor actividad de la PFK-1. La fracción 27 presentaba una mayor actividad y se decidió utilizarla para llevar a cabo la caracterización de la enzima.

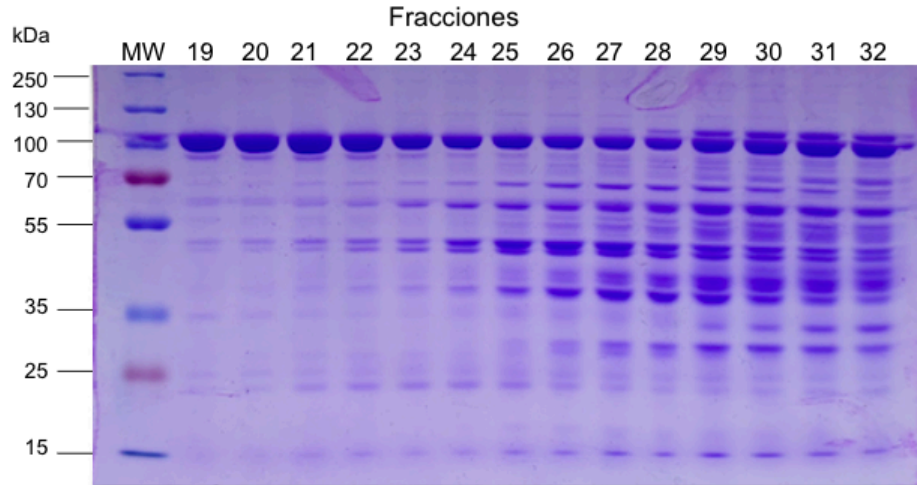


Figura 17. Análisis de pureza de las fracciones que contienen a la PFK-1. La PFK-1 recombinante se obtuvo de la cepa *E. coli* BL21 Gold pLysS (DE3) inducida a 16 °C durante 12 h. La pureza se analizó mediante SDS-PAGE (10%), la imagen muestra las fracciones recolectadas a partir de la purificación por cromatografía de intercambio iónico con resina DEAE-C. De la fracción 19 a la 21 se observa una mayor pureza de la enzima de interés.

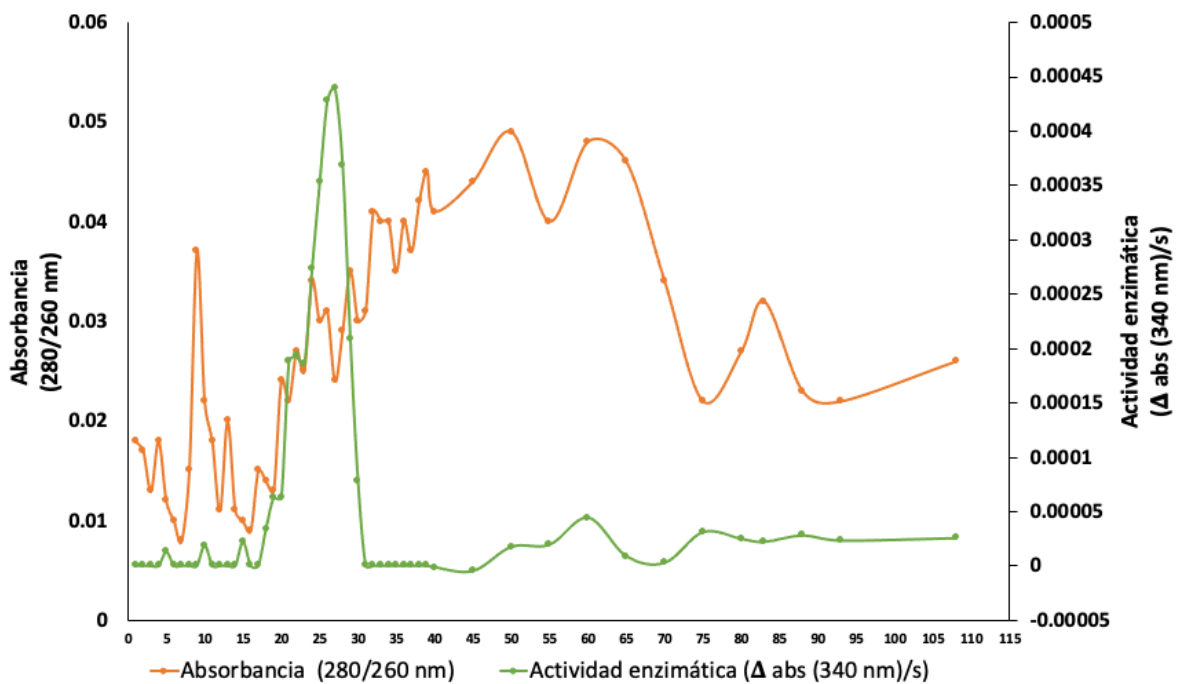


Figura 18. Perfil de elusión de la PFK-1. La enzima recombinante fue purificada por cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina DEA-C. A cada una de las fracciones colectadas se les determinó la $DO_{280/260nm}$ y la actividad enzimática a 25 °C. Las fracciones que tuvieron mayor actividad fueron la 21 y la 27.

7.7 La PFK-1 se inhibe por su sustrato el Mg-ATP

Para realizar la caracterización cinética de la PFK-1 por su sustrato el Mg-ATP, se realizaron ensayos acoplados en donde se variaba la concentración de

Mg-ATP desde 0.0625 mM hasta 3 mM mientras que la concentración de F6P se mantuvo constante en 2 mM. La PFK-1 mostró una cinética del tipo Michaelis-Menten a bajas concentraciones (0.125 a 0.75 mM) mientras que a partir de 1 mM de Mg-ATP inesperadamente la PFK-1 se inhibió, figura 19.

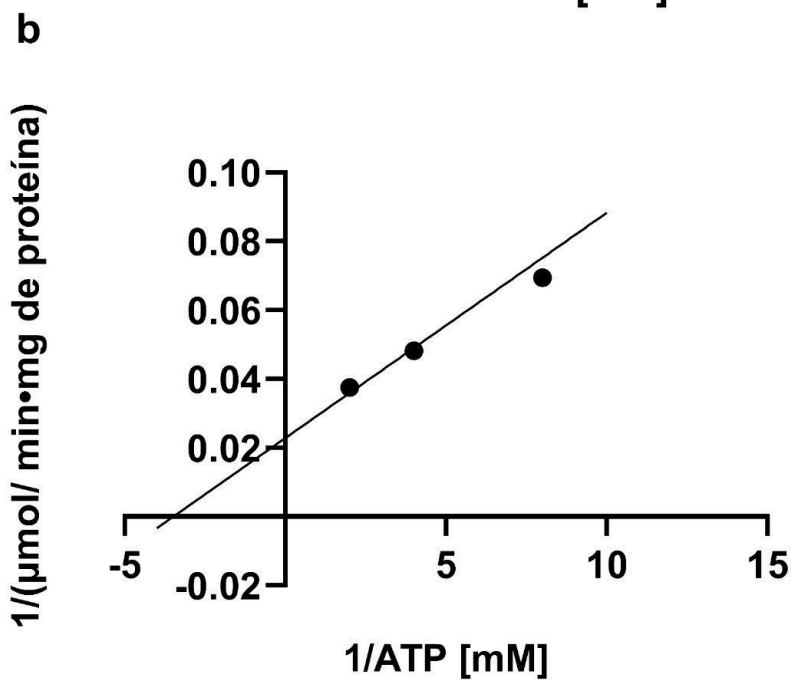
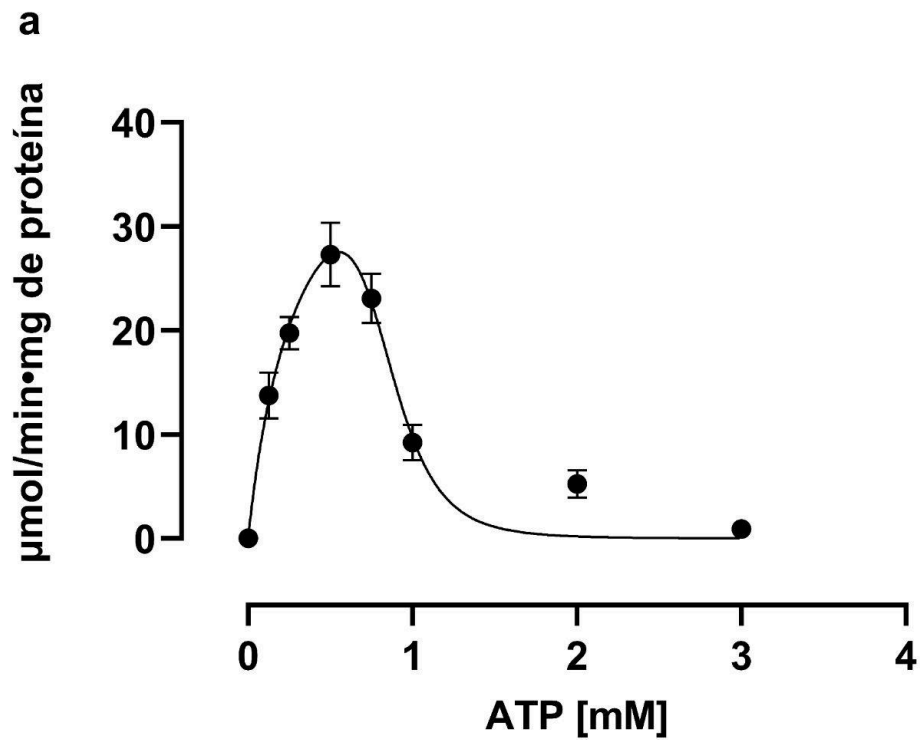
Debido a que la fracción 27 no contiene a la PFK-1 pura. El contenido de proteína que corresponde a la PFK-1 se determinó realizando un SDS-PAGE que contenía 14, y 25 μL de la fracción de interés y 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL y 1 mg/mL de BSA como curva estándar. Con los datos se construyó la curva estándar y utilizando la ecuación de la línea recta se determinó el contenido de proteína en las fracciones de interés (21 y 27). El contenido de proteína fue de 0.008 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se utilizó para calcular la actividad específica de la PFK-1 a partir de la pendiente resultante en los ensayos acoplados.

Para obtener los parámetros cinéticos V_{max} , K_m y K_i , los datos obtenidos de los ensayos acoplados se analizaron con el programa Prism 10 utilizando la ecuación de inhibición por sustrato. La $V_{max} = 45.25 \pm 9.74 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, y $K_m = 0.30 \pm 0.12 \text{ mM}$. Dado que la enzima mostró inhibición por sustrato se determinó una constante de inhibición (K_i) la cual tuvo un valor de $K_i = 0.29 \pm 0.09 \text{ mM}$ y $n = 6.07 \pm 1.42$. En donde “n” es la suma de los órdenes parciales de las especies de reacción y se toma como punto de partida para la integración de la ecuación de cinética dando el orden de reacción.

Por otra parte, la actividad de la PFK-1 contenida en las fracciones más puras (19 a 25) se analizó utilizando Mg-ATP 0.5 mM, en esta concentración se observó la velocidad máxima de la reacción, sin embargo, la PFK-1 contenida en las fracciones 19 y 25 no mostraron una mayor actividad enzimática, por lo que se continuó trabajando con la fracción 27.

$$y = \frac{V_{max} \cdot x}{(K_m + x \cdot (1 + (x^n)/k_i))}$$

Ecuación 7. Inhibición por sustrato. V_{max} , velocidad máxima de la enzima, K_m , constante de Michaelis-Menten, K_i , constante de disociación para la unión del sustrato y n, exponente que refleja la cooperatividad o la naturaleza no lineal de la inhibición.



$$y = 0.0065x + 0.0228$$

Figura 19. Cinética de la PFK-1 al variar su sustrato el Mg-ATP. a) Efecto de la concentración del Mg-ATP sobre la velocidad de reacción catalizada por la PFK-1 con una concentración fija de F6P de 2 mM, pH 7 y una temperatura de 25 °C. n=3 ± SD. b) Doble recíproco de la PFK-1.

7.8 Cinética de saturación de la PFK-1 recombinante por su sustrato F6P

Se realizó la cinética de PFK-1 por medio de ensayo enzimático al variar la concentración de F6P desde 0.25 mM hasta 8 mM; manteniendo Mg-ATP constante en una concentración de 0.5 mM; se ocupó esta concentración de Mg-ATP debido a que a altas concentraciones la enzima se inhibe. Una vez obtenida la actividad específica a diferentes concentraciones de sustrato, los datos se analizaron con dos ecuaciones: ecuación de Michaelis-Menten, ecuación 8. Y con la ecuación de alosterismo sigmoideal, ecuación 9 esto debido a que se observó que los datos graficados presentaban una curva sigmoide. El mejor ajuste se obtuvo con la ecuación de Michaelis-Menten, Figura 20. Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos fueron $V_{max} = 85.23 \pm 5.54 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína y $K_m = 3.26 \pm 0.47 \text{ mM}$.

$$vO = \frac{V_{max} \cdot x}{K_m + x}$$

Ecuación 8. Michaelis-Menten. V_{max} , es la velocidad máxima de la enzima y K_m es la constante de Michaelis-Menten.

$$vO = \frac{V_{max} \cdot x^h}{Khalf^h + x^h}$$

Ecuación 9. Sigmoideo alostérico. V_{max} , es la velocidad máxima de la enzima y $Khalf^h$ es la concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima de la enzima, h es la pendiente de Hill; cuando $h = 1$, esta ecuación es idéntica a la ecuación estándar de Michaelis-Menten, cuando es mayor que 1, la curva es sigmoidea debido a la cooperatividad positiva.

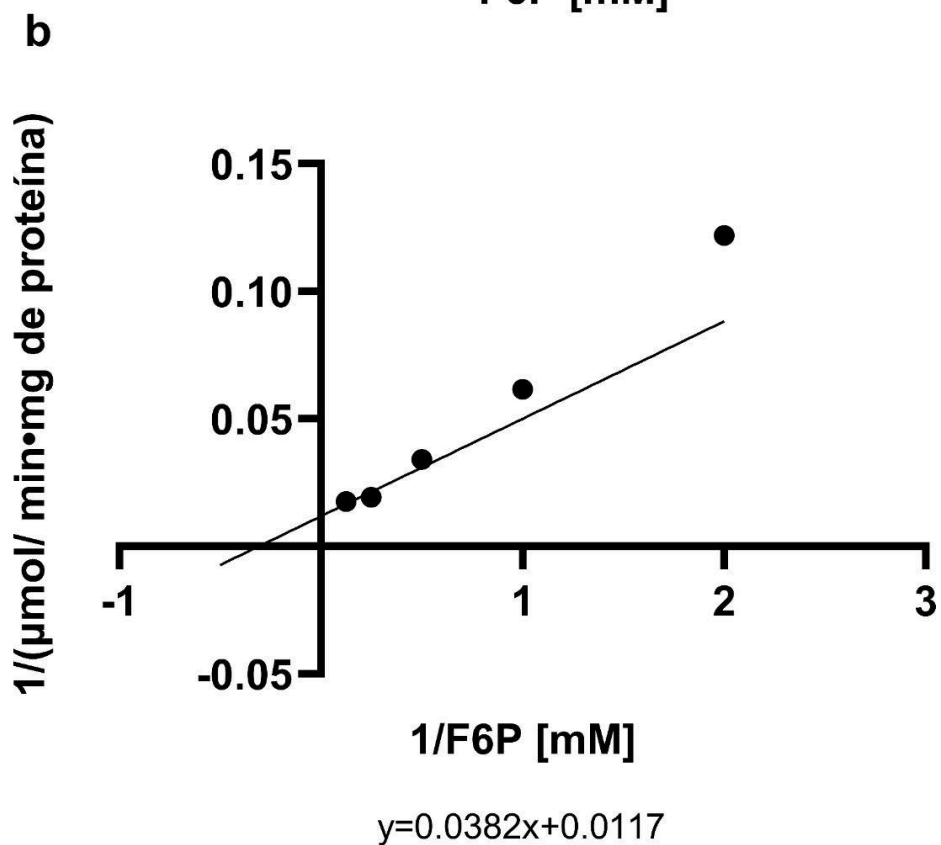
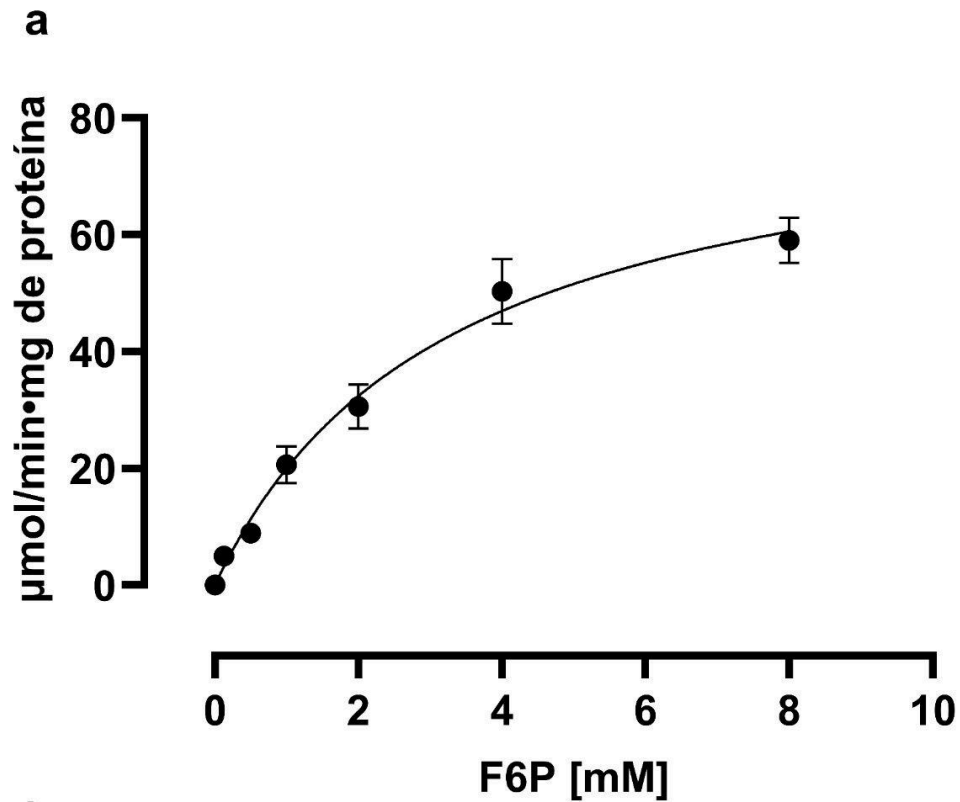


Figura 20. Cinética de saturación de la PFK-1 por su sustrato la F6P. a) Efecto de la concentración de F6P sobre la velocidad de reacción catalizada por la PFK-1 con una concentración constante de Mg-ATP 5 mM a un pH 7 y 25 °C. b) Doble recíproco de los datos. $n=3 \pm SD$.

7.9 El ADP es un inhibidor competitivo de la PFK-1

Para continuar con la caracterización cinética de la enzima se evaluaron algunos inhibidores reportados para la enzima. El ADP es un subproducto de la reacción catalizada por la PFK-1 en presencia de Mg-ATP y F6P, es por ello que se analizó el efecto del ADP sobre la enzima, las concentraciones utilizadas fueron 0.2 y 0.5 mM; estas concentraciones se han reportado previamente en *Bacillus stearothermophilus* y *Methanosarcina acetivorans* (F16BP y ADP) (Byrnes et al., 1994; Santiago-Martínez et al., 2019). Se muestra que el ajuste de los datos a un modelo Michaelis-Menten (a) y su recíproco (b) obtenidos en ausencia y presencia de ADP, figura 21. La presencia del ADP modificó los parámetros cinéticos K_m y V_{max} por lo que se analizó el tipo de inhibición que presentaba la enzima en presencia de ADP. Los datos se analizaron con la ecuación de inhibición competitiva, la a-competitiva, la no competitiva y de inhibición mixta. La ecuación con la que mayormente se ajustaron los datos fue para una inhibición competitiva, ecuación 10, esto quiere decir que el ADP compite con el Mg-ATP por el mismo sitio activo en la enzima. En este caso el inhibidor se asemeja estructuralmente al sustrato y se une al sitio activo de la enzima, bloqueando así el acceso del sustrato, produciendo un incremento en el valor de la K_m , pero sin alterar V_{max} . Con esta ecuación se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos $V_{max} = 83.52 \pm 3.93 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, $K_m = 3.08 \pm 0.33 \text{ mM}$ y $K_i = 0.36 \pm 0.04 \text{ mM}$. La inhibición competitiva se caracteriza por mantener sin cambios la V_{max} en presencia o ausencia del inhibidor mientras que la K_m varía. En el gráfico de Lineweaver Burk se observa un cambio en la intersección en el eje x que corresponde al parámetro K_m .

$$K_m \text{ Obs} = K_m (1 + [I]/K_i) ; \quad y = \frac{V_{max} \cdot x}{K_m \text{ Obs} + x}$$

Ecuación 10. Ecuación de Inhibición competitiva. V_{max} , es la velocidad máxima de la enzima, K_m es la constante de Michaelis-Menten, K_i es la constante de inhibición e I es la concentración del inhibidor.

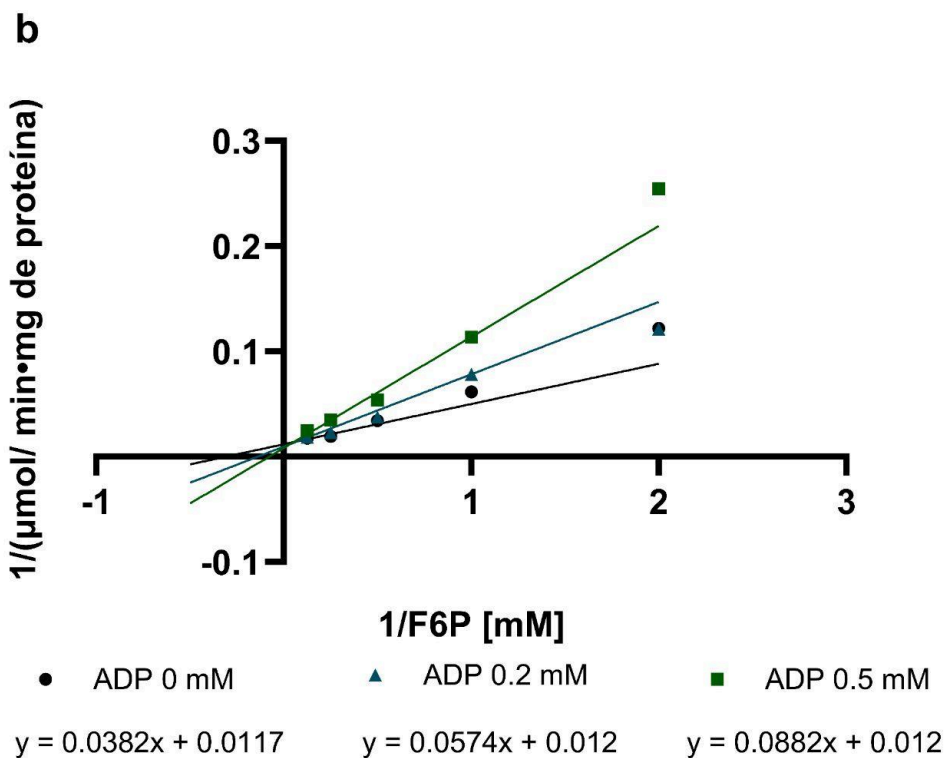
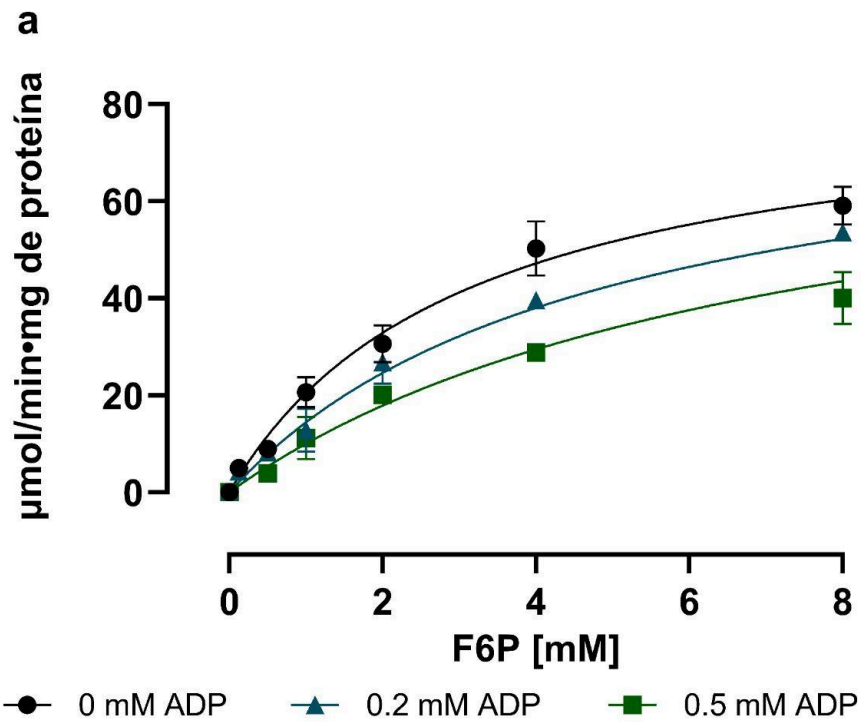


Figura 21. Inhibición competitiva del ADP sobre la PFK-1. a) Inhibición competitiva del ADP sobre la PFK-1 cuando se varía la F6P y se fija el Mg-ATP en 0.5 mM, a un pH 7 y 25 °C. Control (●), 0.2 mM ADP (▲) y 0.5 mM ADP (■). b) Doble recíproco de los datos, las líneas convergen en el eje de las Y ($1/V_{max}$) y tienen diferentes puntos sobre el eje X ($-1/K_m$) característico de una inhibición competitiva. $n=3 \pm \text{SD}$.

7.10 La F1,6BP ejerce una inhibición acompetitiva

También se analizó el efecto de la F1,6BP sobre la PFK-1, la F1,6BP es un subproducto de reacción de la PFK-1 al utilizar sus sustratos el Mg-ATP y la F6P. La actividad de PFK-1 se determinó en presencia de 0.2 mM de F1,6BP. Se decidió utilizar esta concentración debido a que se ha reportado en *Bacillus stearothermophilus* y *Methanosarcina acetivorans* (Byrnes et al., 1994; Santiago-Martínez et al., 2019). La F1,6BP causó una inhibición parcial de la actividad de la PFK-1, y de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m , figura 22, por lo que la inhibición que se presenta es del tipo acompetitiva; esto quiere decir que el inhibidor solo se une al complejo “ES” (enzima-sustrato), y como resultado presenta una disminución en la V_{max} al convertir la “E” en el complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor “ESI”.

El tipo de inhibición que ejerce la F1,6BP sobre la PFK-1 se analizó con una ecuación para inhibición competitiva, acompetitiva, no competitiva y mixta teniendo como resultado que el modelo más adecuado a estos datos fue una inhibición acompetitiva, la ecuación que se utilizó es la siguiente:

$$V_{Max} App = \frac{V_{Max}}{(1 + I / Alpha K_i)} \quad ; \quad K_m App = \frac{K_m}{(1 + I / Alpha K_i)} \quad ; \quad y = \frac{V_{Max} App \cdot x}{(K_m App + x)}$$

Ecuación 11. Inhibición acompetitiva. V_{max} , es la velocidad máxima de la enzima, K_m es la constante de Michaelis-Menten, $Alpha K_i$ es la constante de inhibición e I es la concentración del inhibidor.

Los valores que se obtuvieron son: V_{max} = 86.44 ± 4.50 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, K_m = 3.89 ± 0.37 mM y $Alpha (K_i)$ = 0.18 ± 0.02 mM. Al analizar el doble recíproco de Lineweaver-Burk se puede observar que las líneas generadas tras obtener los inversos son paralelas y nunca se tocan; por lo que se concluye una inhibición del tipo acompetitiva o también llamada inhibición mixta.

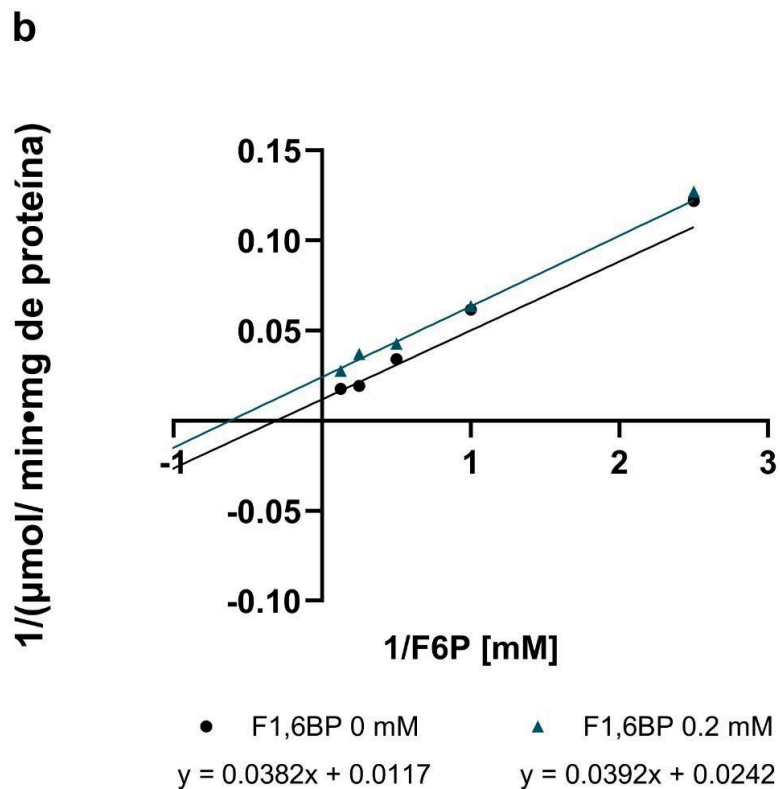
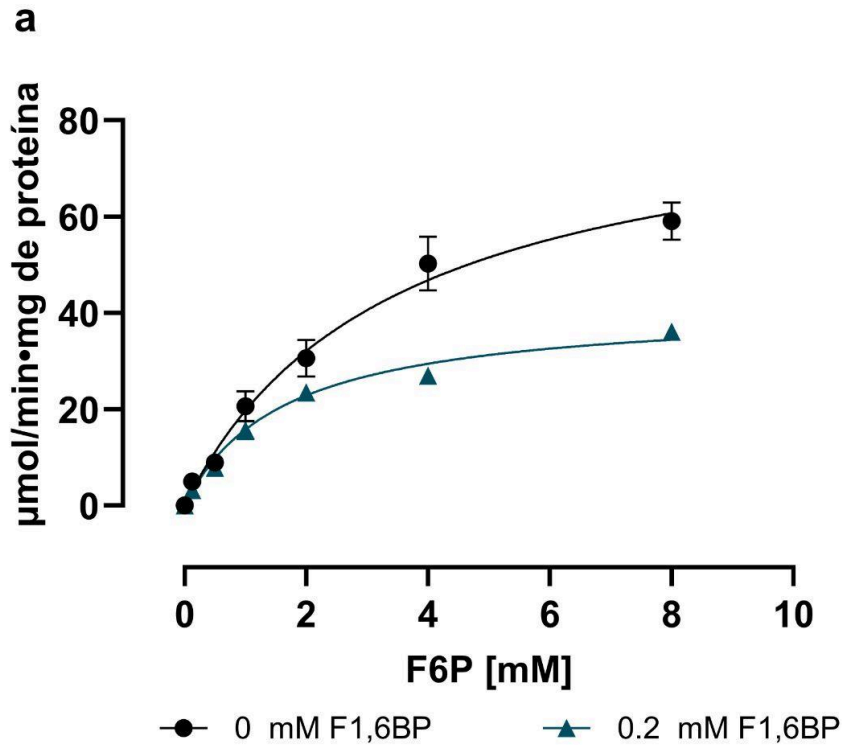


Figura 22. Inhibición acompetitiva de la F1,6BP sobre la PFK-1. a) Cinética del control(●) y en presencia de 0.2 mM del inhibidor F1,6BP (▲). La actividad se determinó a una concentración fija de 0.5 mM Mg-ATP 0.5, pH 7 y 25 °C. b) Se muestra el doble recíproco de los datos, con sus respectivas ecuaciones; se aprecian dos rectas paralelas característico de una inhibición acompetitiva. $n=3 \pm \text{SD}$.

7.11 El citrato y el malato no son inhibidores de la PFK-1

Se escogieron al citrato y al malato como posibles inhibidores de la PFK-1. Las concentraciones probadas para cada uno de los posibles inhibidores fueron 2 y 5 mM. Estas concentraciones se tomaron como referencia de estudios realizados para *Teladorsagia circumcincta* (Walker et al., 2012). El malato y el citrato no tuvieron un efecto inhibitor sobre la actividad catalítica de la PFK-1 en ninguna de las concentraciones ensayadas, figura 23. Los datos con y sin inhibidor se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Ecuación 8).

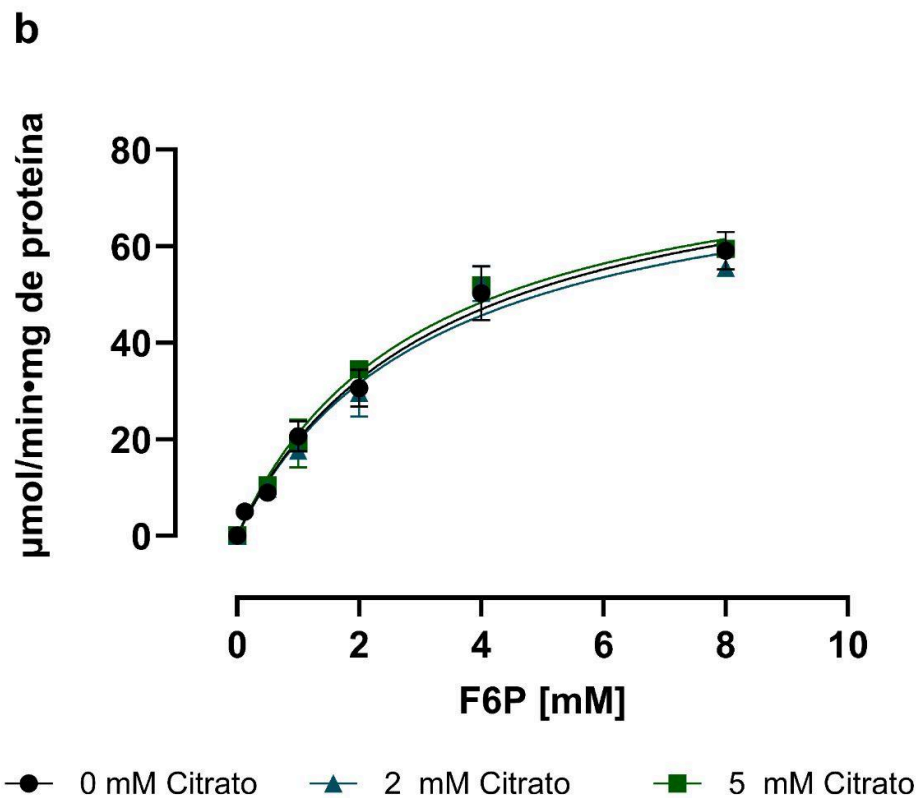
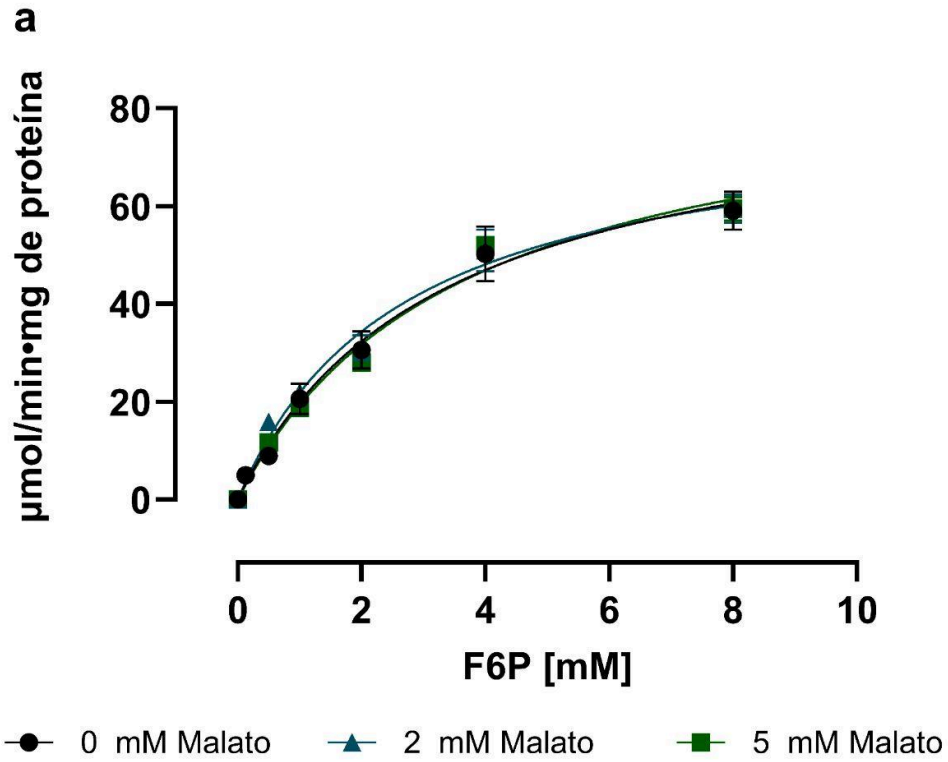


Figura 23. Efecto del malato y el citrato en la actividad de la PFK-1. a) Se muestra la actividad de la enzima en ausencia del inhibidor, control (●) y utilizando concentraciones de 2 mM (▲) y 5 mM (■) de malato (a) y citrato (b). El ensayo se realizó en condiciones saturantes de sustrato 0.5 mM Mg-ATP, pH 7.0 y 25 °C en presencia o ausencia del inhibidor. $n=3 \pm \text{SD}$

7.12 La PFK-1 es termoestable hasta temperaturas de 45°C

La estabilidad de la enzima a altas temperaturas se analizó por ensayos acoplados. La enzima pura se incubó a diferentes temperaturas, estas fueron de 30 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C a una incubación de 5, 10 y 15 minutos. Interesantemente no se observó un cambio en la actividad específica de la enzima en el rango de 30 °C a 45 °C. A 50 °C con 5 minutos de incubación la enzima perdió un 50% de su actividad. Después de los 15 minutos pierde un 75% de actividad específica, figura 24.

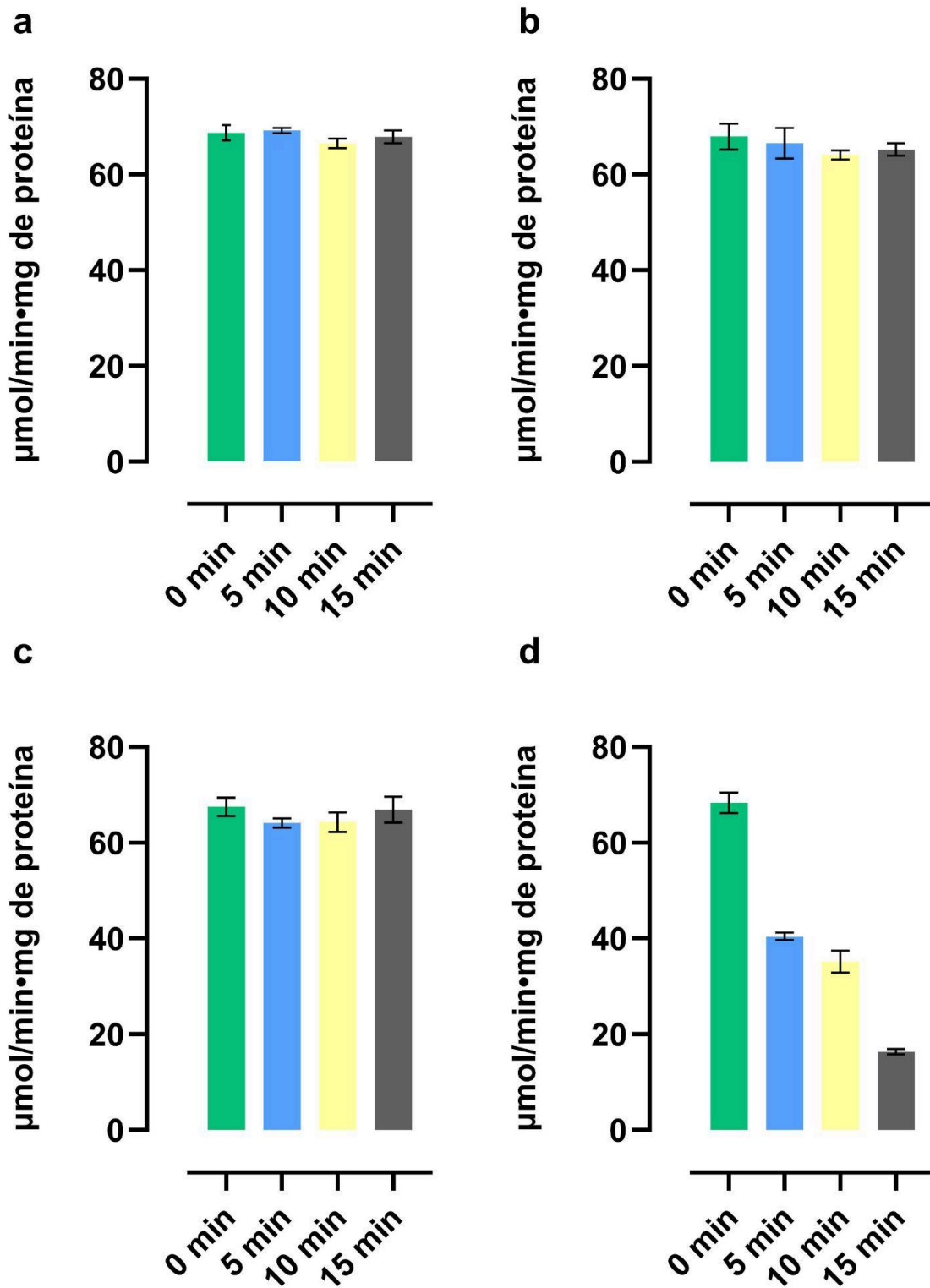


Figura 24. Análisis de la termoestabilidad de la PFK-1. Incubación de la PFK-1 durante 0, 5, 10 y 15 minutos a temperaturas de **a)** 30 °C, **b)** 40 °C, **c)** 45 °C y **d)** 50 °C. Se calculó la actividad específica para cada rango. La PFK-1 pierde termoestabilidad pasando los 50 °C. n=2 ± SD

7.13 Purificación de la PK de la cepa BL21 DE3

El extracto de la cepa BL21 DE3 obtenido por sonicación se pasó por una columna de intercambio iónico acoplado a un cromatógrafo. Las fracciones colectadas con un mayor grado de pureza fueron la 17, 18 y 19; esto se analizó por SDS-PAGE, figura 25. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática por medio de ensayos acoplados y se obtuvo que la fracción con una mayor actividad enzimática fue la 18, figura 26.

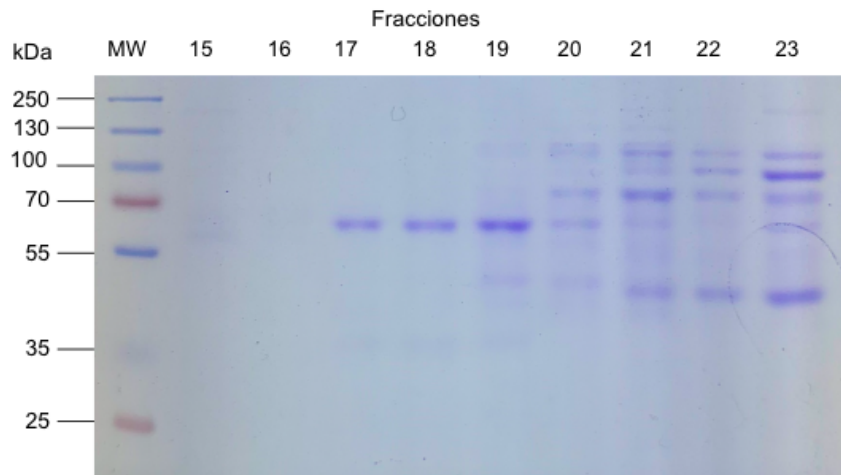


Figura 25. Análisis de la pureza de las fracciones que contienen a la PK. La PK recombinante se obtuvo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) inducida a 16 °C durante 12 h. La pureza se analizó por SDS-PAGE (10%), la imagen muestra las fracciones recolectadas a partir de la purificación por cromatografía de intercambio iónico con resina DEAE-C acoplado a FPLC. En las fracciones 17, 18 y 19 se observa una mayor pureza de la enzima de interés.

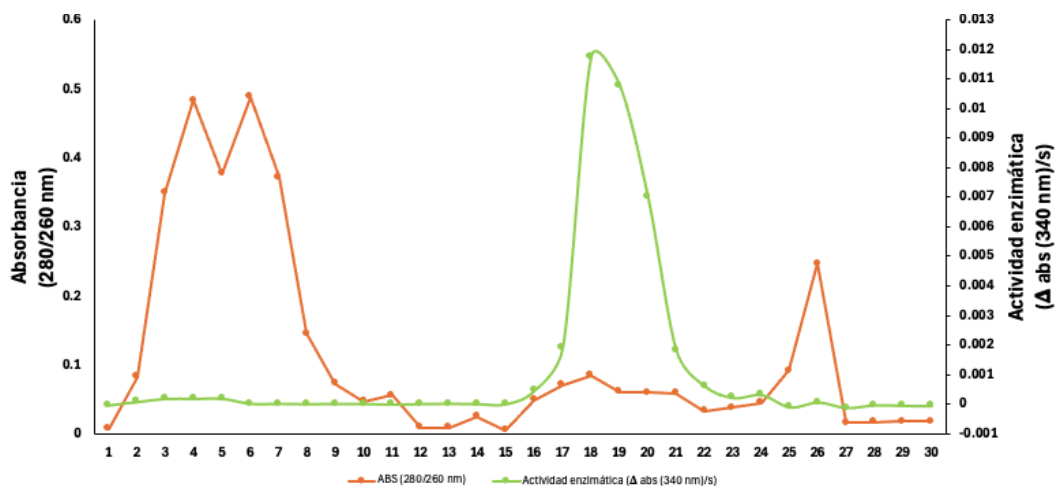


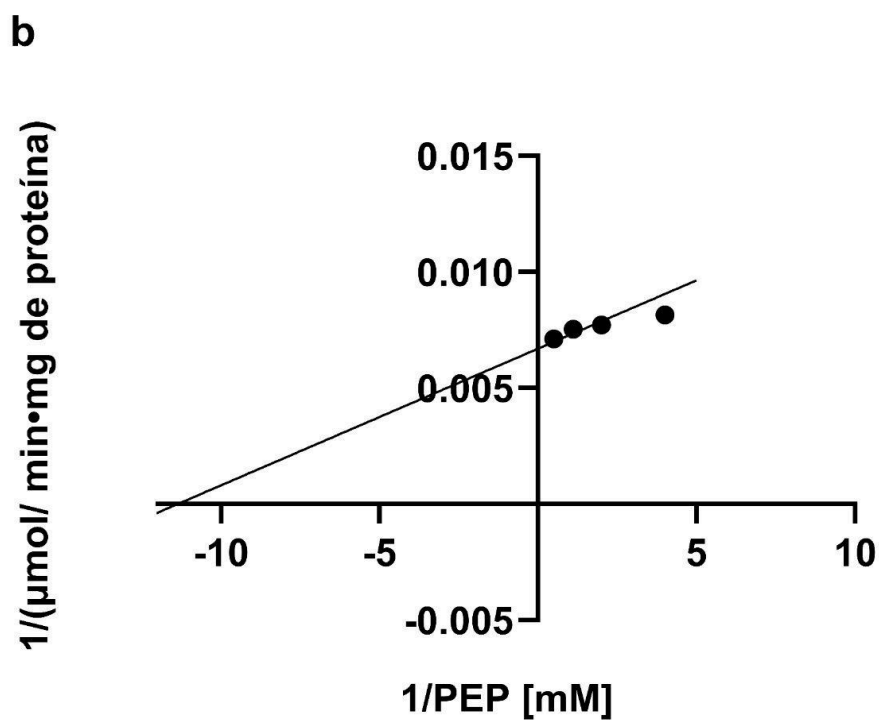
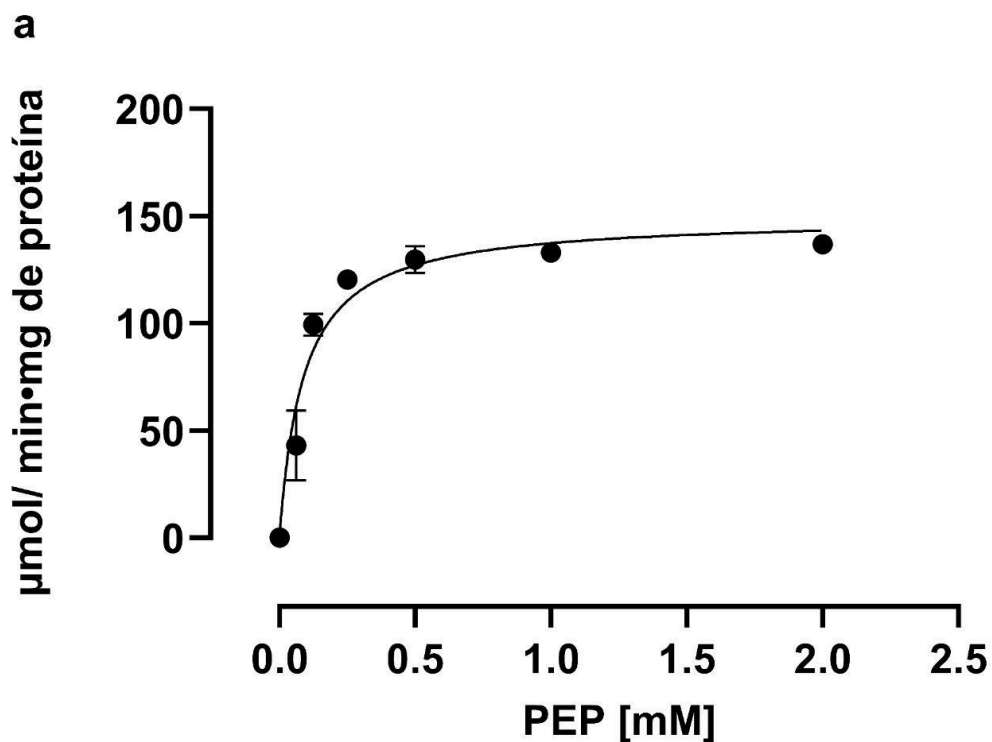
Figura 26. Perfil de elución de la PK. La enzima recombinante fue purificada por cromatografía de intercambio iónico, acoplado a FPLC, utilizando la resina DEA-C. A cada una de las fracciones colectadas se les determinó la $DO_{280/260\text{ nm}}$ y la actividad enzimática a 25 °C. Las fracciones que tuvieron mayor actividad fueron la 18 y 19.

7.14 Cinética de saturación de la PK recombinante por su sustrato el PEP

La cinética de la PK se realizó con ensayos acoplados en donde se varió la concentración del PEP desde 0.25 mM hasta 2 mM mientras se mantuvo fijo el ADP a una concentración de 3 mM. Se muestra la cinética de saturación de la PK por su sustrato el PEP la cual es del tipo Michaelis-Menten, figura 27. Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos fueron $V_{Max}=149.49 \pm 5.21$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína y $K_m=0.088 \pm 0.01$ mM

El contenido de proteína se determinó por SDS-PAGE; para ello se realizó una curva de BSA en un gel desnaturizante SDS-page como se describe para la PFK-1 en el apartado 7.7.

Con los datos se construyó una curva estándar y utilizando la ecuación de la línea recta se determinó el contenido de proteína en las fracciones de interés, la cual se utilizó para calcular la actividad específica de la PK a partir de la pendiente resultante en los ensayos acoplados y se determinó la proteína total para la fracción proteica 18, dando un resultado de 0.023 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína.

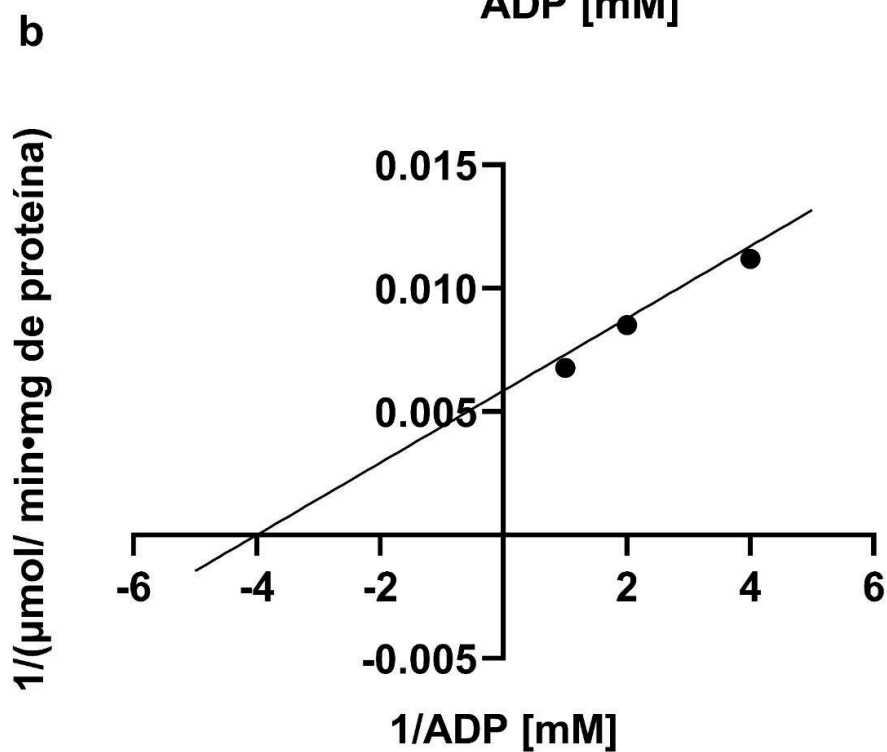
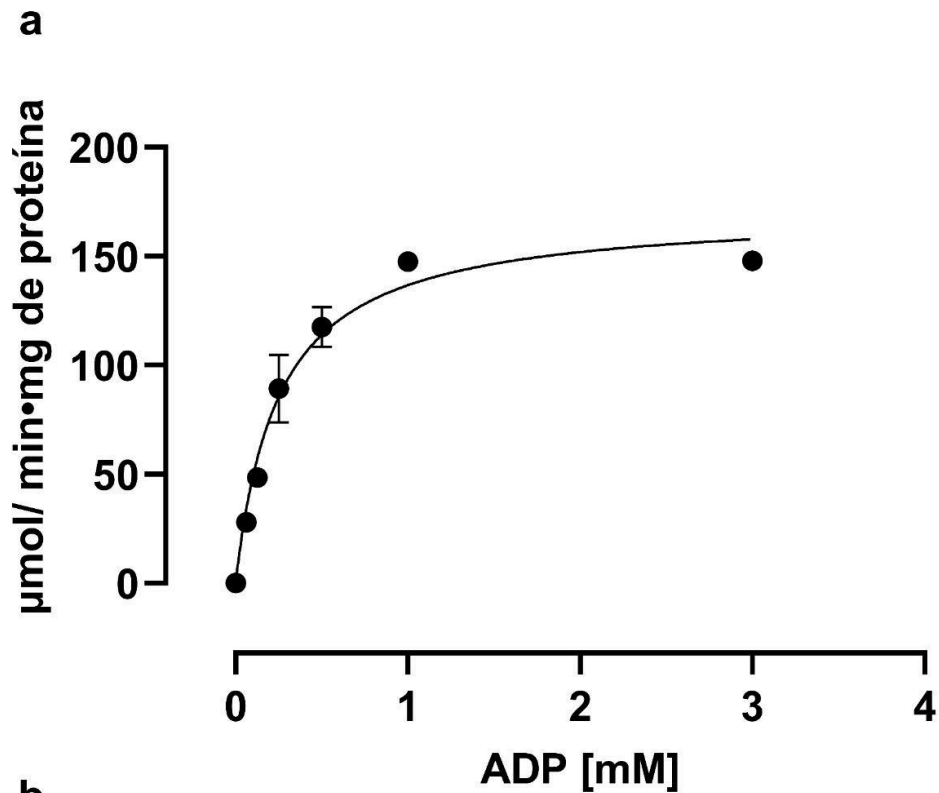


$$y = 0.0006x + 0.0067$$

Figura 27. Cinética de saturación de la PK por su sustrato el PEP. a) Efecto de la concentración del PEP sobre la velocidad de reacción catalizada por la PK con una concentración constante de ADP 3 mM a un pH 7 y 25 °C, con un volumen de enzima de 5 μL en una dilución 1:2. b) Doble recíproco de los datos. n=3 ± SD.

7.15 Cinética de saturación de la PK recombinante por su sustrato ADP

La cinética de la PK se realizó con ensayos acoplados en donde varió la concentración del ADP en la reacción, la variación fue 0.25 mM hasta 3 mM teniendo una concentración fija de PEP 2 mM; al analizar la enzima con una ecuación de Michaelis por medio de Prism 10, figura 28. El análisis cinético por medio del programa Prism 10 se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 8) para determinar los parámetros cinéticos y se obtuvo los siguientes valores $V_{max}=170.87 \pm 5.39 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína y $K_m=0.25 \pm 0.02 \text{ mM}$



$$y = 0.0015x + 0.0059$$

Figura 28. Cinética de saturación de la PK por su sustrato el ADP. a) Efecto de la concentración del ADP sobre la velocidad de reacción catalizada por la PK con una concentración constante de PEP 2 mM a un pH de 7 y 25 °C, con un volumen de enzima de 5 μl en una dilución 1:2. b) Doble recíproco de los datos. n=3 ± SD.

7.16 El Mg-ATP es un inhibidor competitivo de la PK

El ATP es un subproducto de la reacción catalizada por la PK en presencia de ADP y PEP, por lo que se probó el efecto del Mg-ATP sobre la enzima, la concentración utilizada fue de 6 mM la cual ha sido probada en músculo de conejo y *S. cerevisiae* (Macfarlane & Ainsworth, 1972) (Ainsworth & Macfarlane, 1973). Se muestran los ajustes de Michaelis-Menten (a) y Lineweaver Burk (b) obtenidos en ausencia y presencia de Mg-ATP, figura 29. Al observar cambios en la K_m y la V_{max} se decidió analizar el tipo de inhibición que presentaba la enzima en presencia de Mg-ATP el cual es un producto de la reacción catalizada. Los datos se analizaron utilizando la ecuación de la inhibición competitiva, la a-competitiva, la no competitiva y de inhibición mixta. La ecuación con la que mejor se ajustaron los datos fue para una inhibición competitiva, esto quiere decir que el Mg-ATP compite con el ADP por el mismo sitio activo en la enzima. En este caso el inhibidor se asemeja estructuralmente al sustrato y se une al sitio activo de la enzima, bloqueando así el acceso del sustrato, produciendo un incremento en el valor de la K_m , pero sin alterar V_{max} .

Se utilizó ecuación inhibición competitiva (Ecuación 10) y se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos $V_{max}=146.60 \pm 4.46 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, $K_m=0.083 \pm 0.01 \text{ mM}$, $K_i=2.85 \pm 1.05 \text{ mM}$. La inhibición competitiva se caracteriza por mantener sin cambios la V_{max} en presencia o ausencia del inhibidor mientras que la K_m varía. En el gráfico de Lineweaver Burk se observa un cambio en la intersección en el eje x que corresponde al parámetro K_m .

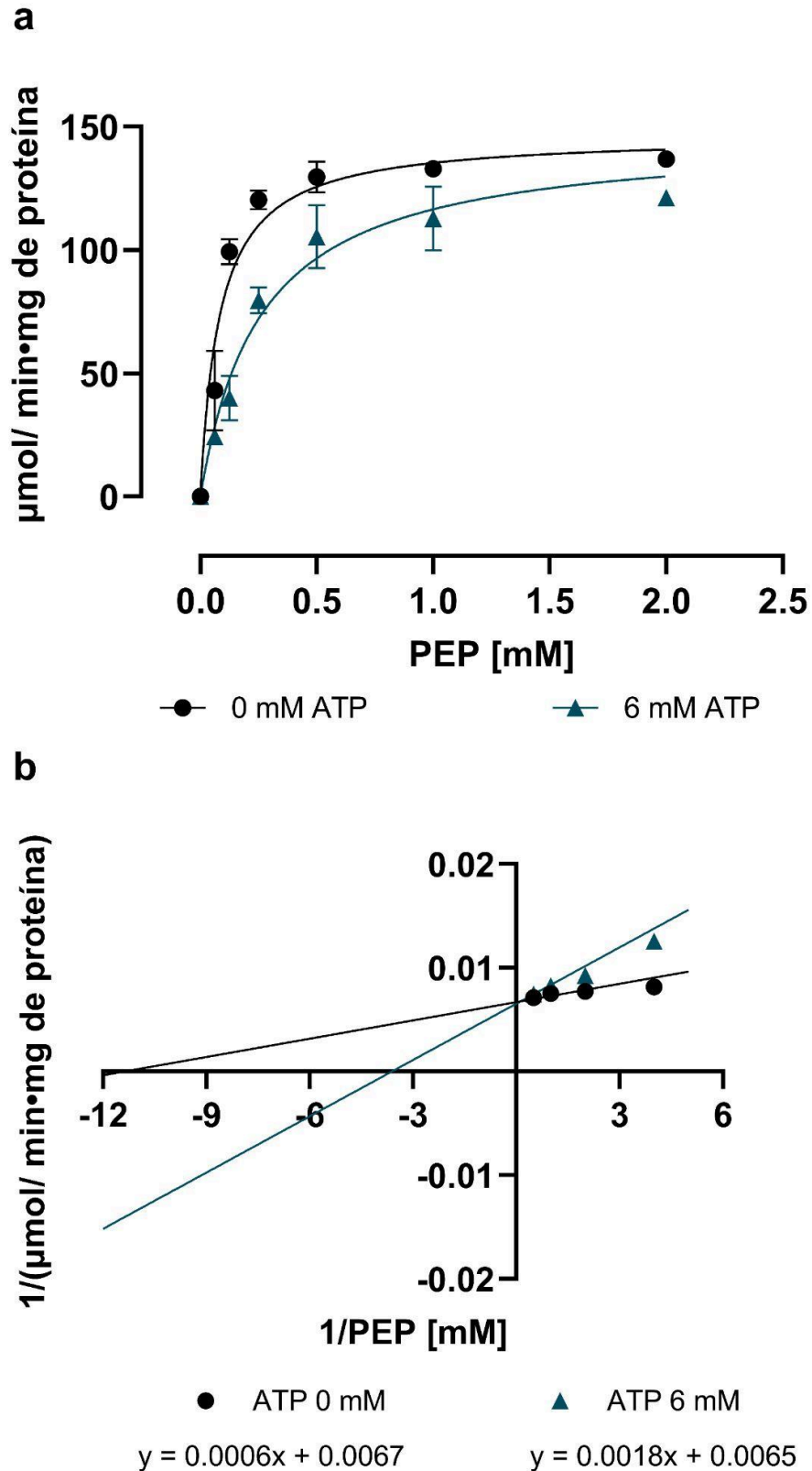


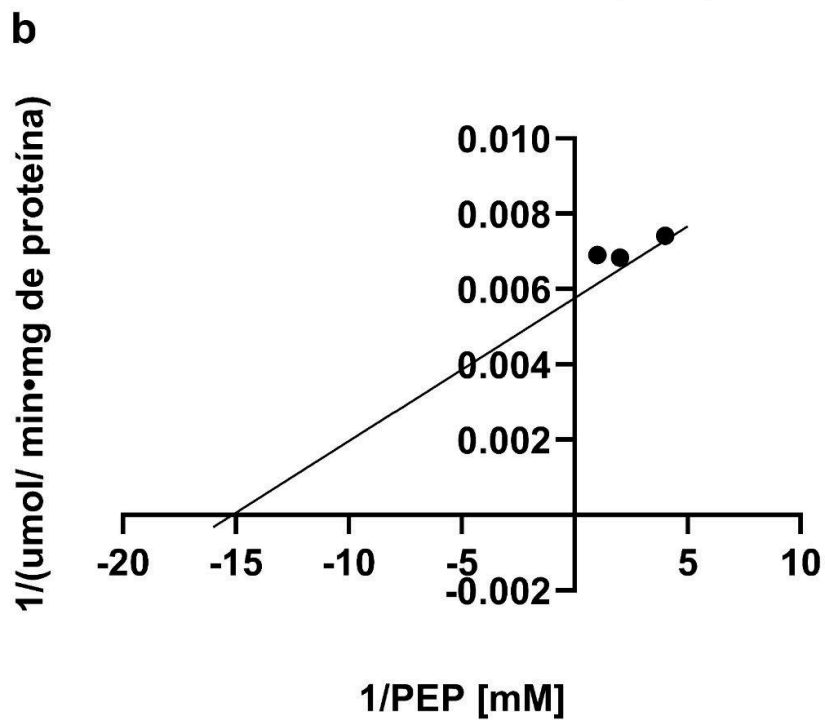
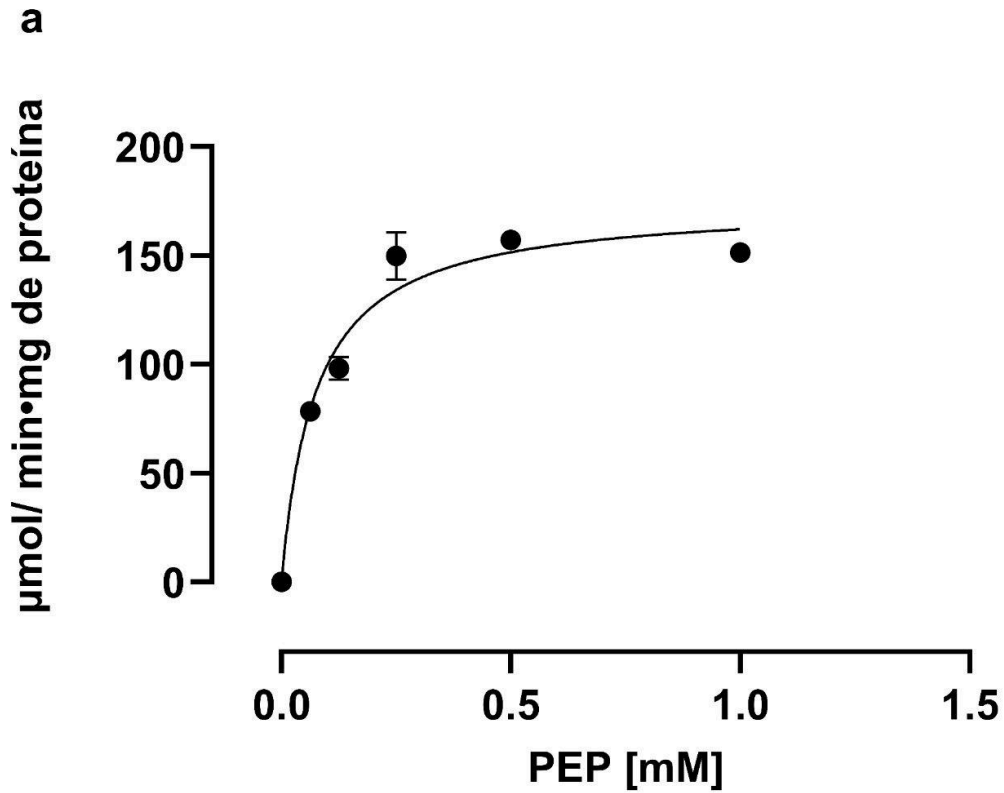
Figura 29. Inhibición de la PK por Mg-ATP. a) Comparación de los efectos de la cinética de la actividad específica de la PFK-1 con Mg-ATP en ausencia (●) y una concentración de 6 mM (▲) además de una concentración fija de ADP 3 mM a un pH 7 y 25 °C. b) Doble recíproco de los datos. $n=3 \pm \text{SD}$.

7.17 El piruvato es un inhibidor acompetitivo de la PK

También se analizó el efecto del piruvato sobre la PK, el piruvato es un subproducto de reacción de la PK al utilizar sus sustratos el ADP y la PEP. Para ellos primero se cambió el sistema para un ensayo acoplado con la oxidación de NAD^+ para que no existiera alguna interferencia con piruvato, como se describe en 6.15. A partir de aquí se generó un control (Figura 30) analizándolo con la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 8) y se obtuvo los siguientes valores: $V_{max}=174.09 \pm 7.95 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína y $K_m=0.07 \pm 0.01 \text{ mM}$

La actividad de la PK se determinó en presencia de 6 mM de piruvato. Se decidió utilizar esta concentración debido a que se ha reportado en músculo de conejo, *S. cerevisiae* igual que para el caso de Mg-ATP (Macfarlane & Ainsworth, 1972) (Ainsworth & Macfarlane, 1973). El piruvato causó una inhibición parcial de la actividad de la PK, los parámetros cinéticos V_{max} y K_m disminuyeron de manera similar, figura 31. Por lo que la inhibición que se presenta es del tipo acompetitiva; esto quiere decir el inhibidor solo se centra en el complejo "ES", y como resultado presenta una disminución en la V_{max} al convertir la "E" en el complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor "ESI". Además, provoca un descenso en K_m de manera proporcional a V_{max} .

El tipo de inhibición que ejerce la F1,6BP sobre la PFK-1 se analizó con una ecuación para inhibición competitiva, acompetitiva, no competitiva y mixta teniendo como resultado que el modelo más adecuado a estos datos fue una inhibición acompetitiva (Ecuación 11). Los valores que se obtuvieron son: $V_{max}=171.40 \pm 4.39 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, $K_m=0.06 \pm 0.01 \text{ mM}$ y $K_{i(\alpha)}=10.72 \pm 0.08 \text{ mM}$. Al analizar el doble recíproco de Lineweaver-Burk se puede observar que la intersección en el eje "x" y "y" nunca se tocan generando las líneas paralelas; por lo que se corrobora una inhibición de tipo acompetitiva.



$$y = 0.0004x + 0.0057$$

Figura 30. Cinética de saturación de la PK por su sustrato el PEP. a) Efecto de la concentración del PEP sobre la velocidad de reacción catalizada por la PK con una concentración constante de ADP 3 mM a un pH 7 y 25 °C, con un volumen de enzima de 5 μL en una dilución 1:2. b) Doble recíproco de los datos. n=3 ± SD.

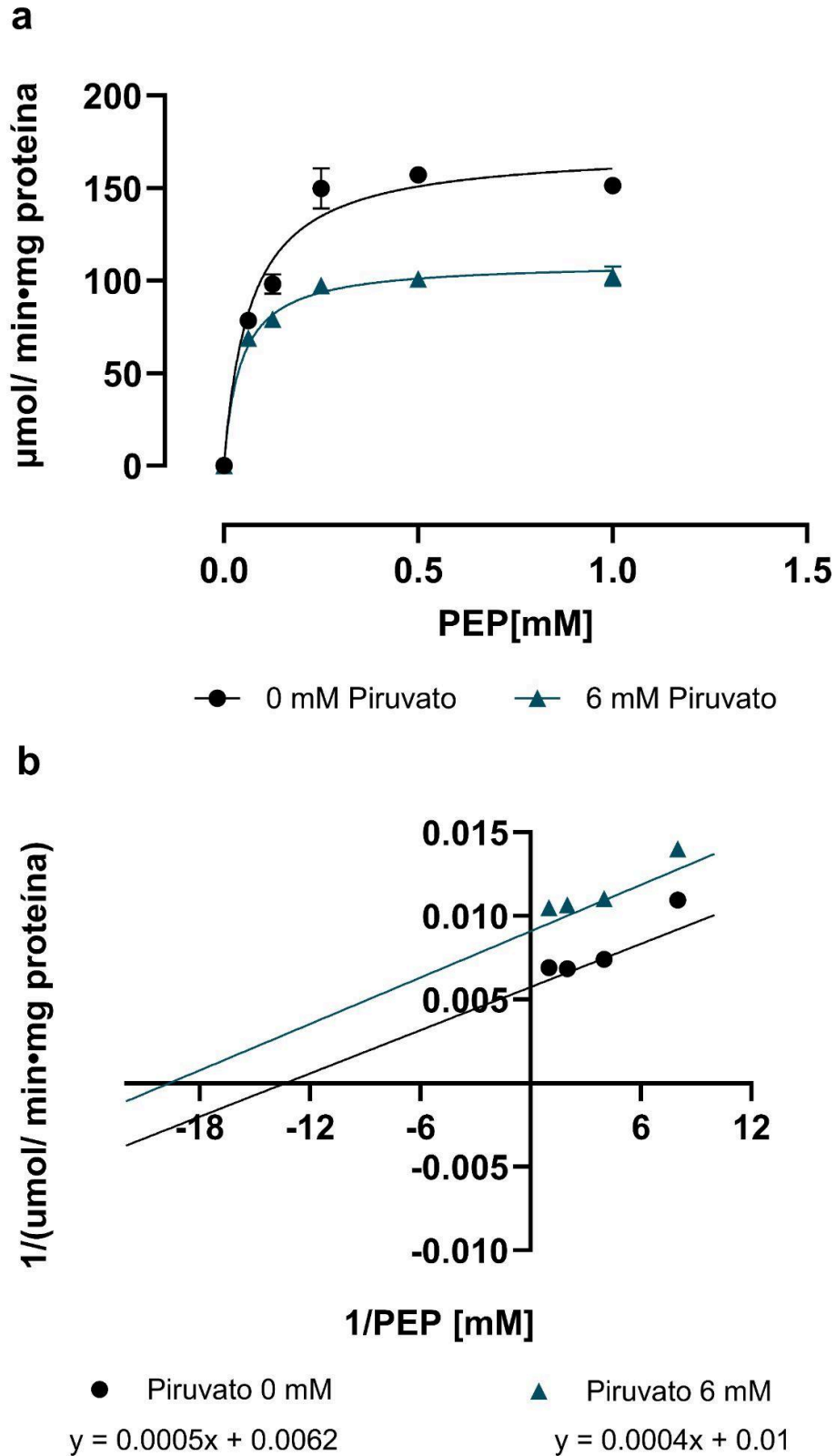


Figura 31. Inhibición de la PK por piruvato. a) Comparación de los efectos de la cinética de la actividad específica de la PFK-1 con Mg-ATP en ausencia (●) y una concentración de Piruvato 6 mM (▲) además de una concentración fija de ADP 3 mM a un pH 7 y 25 °C. b) Doble recíproco de los datos. $n=3 \pm \text{SD}$

En la tabla 5 se muestra un compendio de los parámetros cinéticos obtenidos para cada una de las enzimas.

Tabla 5. Compendio de los parámetros cinéticos obtenidos para la PFK-1 y la PK para cada uno de sus sustratos e inhibidores.

<i>Enzima</i>	Sustrato	Inhibidor	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína)	K_i (mM)
<i>PFK-1</i>	Mg-ATP	-	0.30 ± 0.12	45.25 ± 9.74	29 ± 0.09
	F6P	-	3.26 ± 0.47	85.23 ± 5.54	-
	F6P	ADP	3.08 ± 0.33	83.52 ± 3.93	0.36 ± 0.04
	F6P	F1,6BF	2.94 ± 0.33	81.69 ± 4.03	0.32 ± 0.03
	F6P	Malato	3.16 ± 0.52	84.85 ± 5.57	-
	F6P	Citrato	3.14 ± 0.53	83.90 ± 6.23	-
<i>PK</i>	ADP	-	0.25 ± 0.02	170.87 ± 5.59	-
	PEP	-	0.08 ± 0.01	149.49 ± 5.23	-
	PEP* NAD ⁺	-	0.07 ± 0.01	174.09 ± 7.95	-
	PEP	Mg-ATP	0.083 ± 0.01	146.60 ± 3.83	2.85 ± 0.51
	PEP* NAD ⁺ +	Piruvato	0.06 ± 0.01	171.40 ± 4.39	10.72 ± 0.85

*Para la determinación de la inhibición de la PK por piruvato se utilizó el ensayo acoplado descrito en 6.15 para el correcto acoplamiento de la enzima y también se determinó los parámetros cinéticos V_{max} y K_m en presencia y ausencia del inhibidor.

8. Discusión

En investigaciones anteriores, se había evaluado la actividad de las diez enzimas implicadas en la glucólisis en *U. maydis* mediante el uso de extractos clarificados y protoplastos. Sin embargo, no se había logrado obtener los parámetros cinéticos para la PFK-1. Para tratar esta restricción, en el estudio actual se realizó la expresión, purificación y caracterización cinética de la PFK-1 y la PK; dos enzimas que regulan la glucólisis.

8.1 Optimización de la expresión

El gen codificante para todas las enzimas se introdujo en el plásmido pET 28a utilizando las cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, BL21(DE3) GoldpLysS, BL21-AI™, Origami™B(DE3) y Rosetta™ (DE3) como sistemas de expresión. Estas cepas fueron tratadas para hacerlas competentes y posteriormente se realizó la transformación por choque térmico para la inserción del vector pET 28.

El seguimiento del crecimiento celular se realizó hasta alcanzar un valor de DO_{600nm} de 0.6 unidades de absorbancia, momento en el cual se procedió a la inducción con IPTG.

Se ha reportado que la sobreexpresión inducida por IPTG a bajas temperaturas, en un rango de 15 °C a 23 °C, incrementa significativamente la solubilidad y actividad de las proteínas (San-Miguel et al., 2013). Durante la fase exponencial de crecimiento en *E. coli*, al relacionar un crecimiento lento debido a las bajas temperaturas en las que se encuentra el sistema de expresión y facilitar una buena expresión de proteínas heterólogas, permite un óptimo plegamiento de las proteínas y reduce la formación de agregados insolubles. Sin embargo, en las condiciones descritas se ha reportado una menor tasa de síntesis de proteína total, con un incremento en la calidad y solubilidad de las proteínas expresadas, lo cual es ventajoso para el objetivo (San-Miguel et al., 2013).

Inducir la expresión en la fase logarítmica media asegura que las células estén activas, tengan división y una elevada síntesis de proteínas, lo que maximiza el rendimiento de la proteína heteróloga. Por otro lado, realizar la inducción en una fase tardía de crecimiento puede resultar en una menor producción de proteínas funcionales debido a la proteólisis intracelular, la acumulación de proteasas

intracelulares que pueden degradar las proteínas recién sintetizadas, reduciendo así el rendimiento y calidad de las proteínas heterólogas (Jiang, Y. M et al., 2007).

En otro estudio, se ha confirmado que la inducción del promotor Lac en *E. coli* mediante IPTG a bajas concentraciones resulta eficaz para regular la actividad transcripcional de este promotor. Sin embargo, es crucial monitorear el momento de inducción, ya que puede variar dependiendo de la proteína de interés (Briand et al., 2016). Además, la inducción con altas concentraciones de IPTG puede tener efectos negativos en la síntesis de la proteína deseada, posiblemente debido a la sobrecarga metabólica y la acumulación de proteínas mal plegadas. (Briand et al., 2016). Se ha señalado que el uso de concentraciones bajas de IPTG permite una expresión más controlada y eficiente de proteínas recombinantes, minimizando el estrés celular y mejorando la solubilidad y disminuyendo la formación de cuerpos de inclusión de las proteínas.

Asimismo, se ha observado que la inducción en cultivos en fase exponencial temprana (DO_{600nm} de 0.1 unidades) y en fase exponencial media (DO_{600nm} de 0.6 unidades) no se detecta una gran fluctuación en el rendimiento de la producción de proteína recombinante. En contraste, la inducción en una fase de crecimiento exponencial tardía (DO_{600nm} de 1.0 unidades) resulta en una reducción significativa de la producción de proteína total. Por otro lado, la inducción en la fase de latencia inhibe considerablemente la producción de biomasa, lo que a su vez afecta negativamente la producción de proteínas recombinantes. Durante la fase de latencia, las células no están activas, dividiéndose ni produciendo proteínas a un ritmo elevado, lo que reduce la eficiencia de la expresión de proteínas inducidas (Olaofe et al., 2010).

En este proyecto con base en la literatura, la inducción se realizó en una fase de crecimiento exponencial media. Ambas cepas de BL21(DE3) y BL21 Gold pLysS, presentaban un rendimiento óptimo en la producción de la proteína de interés. Además, se detectó la formación de cuerpos de inclusión, pero estos decrecieron con la modificación de la temperatura y el tiempo de inducción. La inducción se llevó a cabo a una DO_{600nm} de 0.6 unidades, temperatura de expresión óptima fue de 16 °C con un tiempo de 12 h para la PFK-1 y la PK.

Durante la lisis y la obtención del extracto clarificado de estas cepas, se analizó la actividad específica de las proteínas recombinantes y se comparó el extracto clarificado con el pellet generado, se observó que, en algunas cepas, como Origami™B (DE3) no se obtenía una buena actividad. En el caso de BL21 Gold pLysS y BL21 CodonPlus (DE3)-RIL, la proteína se acumulaba en cuerpos de inclusión, permaneciendo una parte de la proteína en el pellet y el resto en el sobrenadante por lo que se probaron diferentes temperaturas y tiempos de inducción para disminuir esta incidencia. Este hallazgo concuerda con estudios que sugieren que las bajas temperaturas favorecen el correcto plegamiento de las proteínas y reducen la formación de cuerpos de inclusión (Baneyx, 1999). En cuanto a la concentración del inductor IPTG, se determinó que no afectaba significativamente los resultados finales en la expresión de la proteína, ya sea con 100 μ M o 200 μ M de IPTG. Por lo tanto, se decidió trabajar con concentraciones bajas para reducir riesgos de toxicidad de las células y no comprometer el rendimiento para ambas enzimas (Studier, 2005).

8.2 Purificación de las enzimas

Los polioles y azúcares en presencia de una enzima que se encuentra purificada en un medio acuoso brindan estabilidad a las enzimas, las interacciones hidrofóbicas entre los residuos de aminoácidos no polares se fortalecen, lo que produce una estructura más rígida de las proteínas y un efecto de termoestabilidad o resistencia a cambios de temperatura. Este suceso radica en el efecto positivo en la actividad del agua del medio. Ejemplo de ello, en un estudio la implementación de glicerol en concentraciones de 10-100% aumentó la estabilidad térmica de la glucoamilasa sometida a 60°C, durante 10 minutos, mientras que una proteasa se pudo almacenar durante 23 días a 33 °C con la adición de 50-70% de glicerol. También la adición de DMSO condujo a una actividad residual del 100% después de 9 meses para una malato deshidrogenasa brindando una mayor estabilidad junto con el glicerol cuando se usa como crioprotector generando una gran efectividad (Iyer & Ananthanarayan, 2008).

Una vez completado el proceso de purificación de la PFK-1 y determinada la actividad específica de las fracciones obtenidas, las fracciones 21, 27 y 19 se preservaron en glicerol al 50% para su almacenamiento a 3°C y -15°C. Además, los

ensayos para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de ambas enzimas revelaron resultados muy similares en términos de actividad específica, indicando que ambas fracciones eran funcionalmente equivalentes. Para la PK y la PFK-1 todas las fracciones se preservaron en glicerol al 50% para su almacenamiento a 3 °C y -15 °C, ya que se observó que, al no realizar este paso, inmediatamente perdía su actividad.

8.3 Caracterización cinética

De acuerdo con los estudios que se llevaron a cabo en la presente tesis, la PK presenta un modelo cinético de Michaelis-Menten en presencia de ambos sustratos de la misma forma que la PFK-1 en presencia de su sustrato la F6P; a diferencia de su sustrato el Mg-ATP para este sustrato la enzima muestra una inhibición por sustrato a concentraciones mayores de 2 mM, similar a la PFK-1 de eritrocitos de ratas y ratones (Kühn et al., 1974) *Setaria cervi* (Sharma, 2011). Por otro lado la PFK-1 presentó una inhibición competitiva por ADP y una inhibición acompetitiva por la F1,6BP al tener como sustrato variable F6P y sustrato fijo al Mg-ATP. Este estudio demuestra que la PK, tiene una inhibición competitiva por el Mg-ATP y una inhibición acompetitiva por el piruvato cuando se varía la concentración de PEP como primer sustrato y teniendo una concentración fija de ADP como su segundo sustrato. Por otro lado, la PFK-1 presentó una inhibición competitiva por ADP y una inhibición acompetitiva por la F1,6BP al tener como sustrato variable F6P y sustrato fijo al Mg-ATP.

8.3.1 La PK de *U. maydis*

Este estudio demuestra que la PK, tiene una inhibición competitiva por el Mg-ATP y una inhibición acompetitiva por el piruvato cuando se varía la concentración de PEP como primer sustrato y teniendo una concentración fija de ADP como su segundo sustrato. Se puede sugerir que la PK de *U. maydis*, al ajustarse a un modelo de Michaelis-Menten con ambos sustratos como se mencionó previamente, es probable que se adecue a una cinética más simple y eficaz, lo que forme una relación directa entre la concentración de sus sustratos (PEP y ADP) y la velocidad de la reacción hasta que la enzima esté completamente saturada y así poder desempeñar de mejor manera la regulación metabólica del hongo; los valores

obtenidos de K_m para PEP y ADP indica que la enzima tiene una alta afinidad por sus sustratos, por lo que funcionará de manera eficiente incluso a bajas concentraciones de estos. Haciendo una comparación con los valores de la PK de *T. brucei* (Barnard & Pedersen, 1988) y *P. falciparum* (Chan & Sim, 2004) muestra valores de K_m más altos para los dos sustratos, tanto PEP como ADP, lo que indica una afinidad menor, esto ya que cada microorganismos lograría adaptarse de manera diferentes en los mecanismos de su metabolismo parasítico u oportunistas, siendo que las fluctuaciones en la disponibilidad de recursos pueden ser más significativas o diferentes para cada caso. Por otro lado, las comparaciones con la PK de *Babesia microti* (Xiaomeng An et al., 2021) y *Pseudomonas aeruginosa* (Abdelhamid et al., 2019) ofrecen una perspectiva sobre cómo las enzimas similares pueden divergir en sus mecanismos de regulación dependiendo del contexto metabólico esto al comparar la K_m de la enzima en cada organismo.

Analizando las diferentes inhibiciones que presenta la PK de *U. maydis*, el caso de las isoenzimas de ricino (Ireland et al., 1980) sirve como modelo de comparación ya que se identificó la inhibición por citrato, malato y Mg-ATP. Aunque la PK de *U. maydis* no mostró inhibición directa por citrato o malato, sí mostró una inhibición competitiva por el Mg-ATP, lo que sugiere que esta molécula es un regulador competitivo de la enzima. Este comportamiento de la enzima también se ha reportado para la PK de *S. cerevisiae* (Macfarlane & Ainsworth, 1972). una regulación alostérica por la fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP) para la PK se ha reportado, sin embargo, en este trabajo no se exploró en *U. maydis*, pero se puede marcar como un punto de interés a futuro, ya que este efector positivo ayuda en el incremento de la actividad enzimática como una respuesta a la demanda energética del mismo microorganismo.

La inhibición acompetitiva de *U. maydis*, por piruvato y la competitiva por Mg-ATP destacan como mecanismos específicos que permiten un control preciso sobre la glucólisis, lo que permite que se controle la producción de energía y metabolitos intermedios en respuesta a las condiciones celulares sin que exista un gasto energético mayor. En el caso de la PK de músculo de conejo (Ainsworth & Macfarlane, 1973; Reynard et al., 1961), la inhibición competitiva por Mg-ATP y la inhibición no competitiva por piruvato muestran mecanismos de regulación similares

en cuanto a la dependencia de Mg-ATP en comparación con *U. maydis*, pero se diferencian en términos de la interacción con productos finales, la PK de conejo regula su actividad mediante interacciones con productos separados del sitio activo lo que conlleva a una enzima alostérica y al mismo tiempo se forma un ajuste que se vincula a la demanda energética específica del tejido muscular. Se demuestra que el tipo de inhibición puede variar dependiendo de la especie; mientras que en *U. maydis* la inhibición es competitiva para la PK frente a Mg-ATP, en *C. reinhardtii* (Wu & Turpin, 1992) y *T. tubifex* (Hoffmann, 1981), se observa una inhibición no competitiva o mixta, lo que sugiere diferencias en la interacción de Mg-ATP con las enzimas y posibles variaciones en la estructura o accesibilidad del sitio de unión. Además, la inhibición acompetitiva por piruvato para la PK en *U. maydis* no se presenta de la misma forma, ya que se muestra de forma competitiva en *C. reinhardtii* (Wu & Turpin, 1992) frente a piruvato; esto destaca cómo los organismos priorizan diferentes estrategias para regular el flujo de metabolitos en la glucólisis. En *U. maydis*, este tipo de regulación podría estar vinculado a su capacidad para derivar intermediarios hacia otras rutas metabólicas como la gluconeogénesis o la biosíntesis de aminoácidos en respuesta a cambios ambientales.

8.3.2 La PFK-1 de *U. maydis*

De acuerdo con este estudio, la PFK-1 de *U. maydis* presenta una K_m alta para F6P, con lo que se puede inferir que esta enzima funciona de manera eficiente solo cuando hay abundantes niveles de F6P en la célula y al mismo tiempo podría generar una óptima regulación del flujo de la glucólisis. De la misma forma este suceso podría provocar que en situaciones de escasez de F6P, la PFK-1 no se encuentre activada de manera eficiente y así limitaría la entrada de glucosa hacia la glucólisis y conserva recursos metabólicos que se pueden usar en otros momentos. En un estudio sobre la PFK-1 de *E. coli* se mostró un comportamiento similar donde la enzima se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten cuando se incrementa la concentración de F6P. (Atkinson & Walton, 1965), de la misma forma en cómo se mostró para *U. maydis*; aquí se indicó que la enzima sigue este mismo modelo cinético, al presentar una dependencia directa de la concentración de F6P para su actividad máxima. En *Mycobacterium tuberculosis* (Snášel et al., 2021), la comparación entre las isoformas A y B muestran diferencias en la afinidad y la

sensibilidad a ciertos inhibidores: la isoforma A, es más activa en la glucólisis además de que muestra inhibición por sustratos como F1,6BP y ADP, por otro lado, la isoforma B no presenta alguna regulación por moduladores, lo cual destaca una funcionalidad diferenciada que optimiza la adaptación metabólica pero dentro de un mismo organismo.

Cabe recalcar que la inhibición de la PFK-1 por Mg-ATP, a pesar de ser su sustrato, sugiere estar estrechamente relacionada con el estado energético de la célula; la inhibición por sustrato puede fungir como un mecanismo para que se evite un gasto excesivo de glucosa para la vía de la glucólisis y así poderse acoplar de acuerdo con las necesidades energéticas de la célula. Además de resaltar la importancia del suceso, este fenómeno se ha reportado en otros organismos de manera similar, tales son los casos provenientes de eritrocitos de ratones y ratas, donde se reporta que a concentraciones de Mg-ATP superiores a 0.4 mM se disminuye gradualmente la actividad de la PFK-1 hasta alcanzar una inhibición completa a 1 mM. (Kühn et al., 1974). Otro caso donde se presenta la inhibición por su sustrato es en *Setaria cervi*, la PFK-1 se también se inhibe a altas concentraciones de Mg-ATP; el artículo sugiere que las concentraciones óptimas de Mg-ATP para la enzima debe ser por debajo de 100 μ M (Sharma, 2011). También se presenta en *Lactobacillus bulgaricus* donde se observó una inhibición por sustrato a concentraciones superiores a 1 mM de Mg-ATP (Paricharttanakul et al., 2005), sin embargo, en *L. bulgaricus*, este efecto inhibitorio puede ser contrarrestado cuando la concentración de F6P supera los 5 mM.

Por otro lado, en estudios de algunos mamíferos, como el mono (Sharma, 2011), es necesario concentraciones entre 0.4 y 1 mM de Mg-ATP para la activación de PFK-1, a diferencia de algunos parásitos como *Moniezia expansa*, *Ascaris suum*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* (Sharma, 2011) que requieren entre 50 y 200 μ M de Mg-ATP para la activación de la enzima; concentraciones mucho más bajas, lo que expone una diferencia en la regulación de la actividad enzimática entre estos microorganismos y los vertebrados. De acuerdo con el estudio, el fenómeno se puede explicar al plantear un modelo alostérico de la enzima, donde el Mg-ATP se une a un sitio distinto al activo, lo que produce una conformación de la enzima y reduce su actividad. Sin embargo, en *U. maydis*, la regulación podría depender de la

disponibilidad de sustratos (Mg-ATP y F6P), sin que se presente algún tipo de conformación alostérica como se plantea con otros organismos. Esto podría ser una adaptación metabólica específica del hongo y presentar una mayor susceptibilidad a la inhibición por sustrato para que se genere una regulación más efectiva por Mg-ATP con la finalidad de evitar un exceso de flujo glucolítico.

Así como los productos de la PFK-1 para *U. maydis* se presentaron como sus inhibidores, en caso competitivo con ADP y no competitivo con F1,6BP, en *Bacillus stearothermophilus*, ADP y F16BP actúan como inhibidores: el ADP en concentraciones de 0.05 a 0.5 mM disminuye significativamente la actividad enzimática al comportarse como un inhibidor de tipo competitivo, mientras que F16BP, en concentraciones de 0.2 a 2 mM, muestra una inhibición de tipo acompetitiva (Byrnes et al., 1994). También es el caso de la PFK-1 de *Methanosarcina acetivorans*, donde la F1,6BP y el ADP a una concentración de 3 mM actúan como inhibidores competitivos, al mantener constante el valor de V_{max} pero un aumento en la K_m , confirmando su competencia directa con el sustrato por el sitio activo (Santiago-Martínez et al., 2019).

En muchos organismos, el citrato y el malato actúan como inhibidores de la PFK-1 un ejemplo es el mostrado por *Teladorsagia circumcincta* (Walker et al., 2012) y *Bacillus licheniformis* (Marschke & Bernlohr, 1973), ambos metabolitos, al ser reguladores típicos del ciclo de Krebs; suelen indicar un estado energético alto en la célula, y al mismo tiempo reduce la necesidad de continuar la glucólisis y como resultado genera la inhibición de la PFK-1 para disminuir la producción de ATP. Sin embargo *U. maydis* no presenta este fenómeno, lo que podría inferir una adaptación para ser menos sensible a estos inhibidores y al mismo tiempo permitir un flujo glucolítico más preciso incluso en presencia de niveles elevados de estos metabolitos, otro enfoque sería la relación entre las diferencias en la regulación metabólica y la estructura de la enzima en este organismo en comparación con otros organismos. En el caso de *U. maydis*, es posible que la PFK-1 tenga una estructura con conformaciones diferentes o que su sitio de unión a los inhibidores alostéricos no sea tan accesible y en consecuencia se presente una menor afinidad por estas moléculas. Se plantea la existencia de otras rutas regulatorias que cumplen esta función, haciendo que la inhibición por citrato y malato no sea necesaria o menos

efectiva en el hongo. Por ejemplo, la regulación de la glucólisis en este organismo podría depender más de otros metabolitos o condiciones ambientales específicas que no están presentes en otros sistemas estudiados. Es posible que la falta de inhibición por citrato y malato sea una adaptación evolutiva que le permite a *U. maydis* mantener una mayor flexibilidad en su metabolismo, para que pueda asegurar un flujo constante a través de la glucólisis incluso cuando hay una acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs.

8.4 Perspectivas

El estudio presenta algunas restricciones, entre las que sobresale la ausencia de pruebas adicionales con moléculas capaces de eliminar o reducir la inhibición por sustrato de la PFK-1 en presencia de Mg-ATP, tal como se señala en el debate de resultados presentados en múltiples investigaciones. A pesar de que este efecto inhibitorio ha sido detectado, no se han investigado posibles moduladores que podrían mitigar dicha inhibición, lo que resulta esencial para un entendimiento más integral de la regulación de la PFK-1. Adicionalmente, el estudio de otras moléculas ya sea para la PFK-1 o la PK, podría facilitar un estudio más extenso acerca de su posible papel como factores en la cinética de estas enzimas.

Otra limitación importante presente en el estudio es la ausencia de la cristalización de las enzimas. La cristalización permitiría realizar estudios estructurales detallados, generando una visión más clara de la interacción de la enzima con sus sustratos y productos durante la reacción. De esta forma se podría facilitar la identificación de sitios de unión y si existiera el caso la presencia de conformaciones alostéricas que podrían explicar de manera más precisa los diferentes tipos de inhibición observados con diversas moléculas. También la estructura cristalina podría revelar puntos claves en la dinámica de la enzima, y de esta forma aclarar cómo los productos de la reacción influyen en la actividad enzimática y contribuyen a la inhibición observada. Al no existir a la fecha información cristalográfica de las enzimas, las interpretaciones sobre los mecanismos de inhibición son limitadas únicamente basados en los modelos cinéticos postulados que, aunque informativos, no pueden capturar completamente la complejidad de las interacciones moleculares involucradas.

Un caso ilustrativo sería entender cómo las fluctuaciones en la concentración de metabolitos durante el ciclo vital del hongo influyen en la actividad de PK y PFK-1. A pesar de esto, la investigación se ha enfocado principalmente en la descripción cinética y estructural de las enzimas. No obstante, son escasas las investigaciones de validación funcional que verifiquen que las conductas detectadas in vitro se manifiestan en la fisiología y metabolismo auténtico del hongo.

9. Conclusiones

- El sistema óptimo de expresión en la PK de *U. maydis* fue con *E. coli* BL21 DE3, en esta cepa se obtuvo una expresión fuerte de la enzima y una alta actividad catalítica realizando la inducción con 100 μ M de IPTG durante 12 h a una incubación de 16 °C.
- El sistema óptimo de expresión en la PFK-1 de *U. maydis* fue *E. coli* BL21 Gold pLysS (DE3) mostrando una expresión amplia de la enzima y alta actividad catalítica con una inducción de 100 μ M de IPTG durante 12 horas a una incubación de 16 °C.
- La K_m y V_{max} para la PK en *U. maydis* con ADP como sustrato fue de 0.25 ± 0.02 mM y 170.87 ± 5.59 μ mol/min·mg de proteína, respectivamente. La enzima se ajusta al modelo cinético de tipo Michaelis-Menten.
- La K_m y V_{max} de PK en *U. maydis* con PEP como sustrato variable fue de 0.07 ± 0.01 mM y 174.09 ± 7.95 μ mol/min·mg de proteína, respectivamente. La enzima sigue un modelo cinético de tipo Michaelis-Menten.
- La PK muestra una inhibición competitiva para el Mg-ATP con una K_i de 2.85 ± 0.51 mM y una inhibición acompetitiva (no competitiva) por el piruvato con una K_i de 10.72 ± 0.85 mM teniendo como sustrato variable al PEP.
- La K_m y V_{max} de la PFK-1 en *U. maydis* con Mg-ATP como sustrato variable fue de 0.30 ± 0.12 mM y 45.25 ± 9.74 μ mol/min·mg de proteína, respectivamente. La enzima sigue un modelo de inhibición por sustrato Mg-ATP a concentraciones mayor a 1 mM.
- La K_m y V_{max} de la PFK-1 en *U. maydis* con F6P como sustrato fue de 3.26 ± 0.47 mM y 85.23 ± 5.54 μ mol/min·mg de proteína, respectivamente. La enzima sigue un modelo cinético del tipo Michaelis-Menten.
- La PFK-1 muestra una termoestabilidad entre los 30 °C y los 45°C; al llegar a los 50 °C pierde su actividad catalítica.
- La PFK-1 es inhibida competitiva por el ADP con una K_i de 0.36 ± 0.04 mM y la fructosa 1,6 bisfosfato es un inhibidor acompetitivo de la PFK1 con una K_i de 0.32 ± 0.03 mM.
- El citrato y el malato no son reguladores negativos de la PFK1.

10. Bibliografía

1. Abdelhamid, Y., Brear, P., Greenhalgh, J., Chee, X., Rahman, T., & Welch, M. (2019). Evolutionary plasticity in the allosteric regulator-binding site of pyruvate kinase isoform PykA from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(42), 15505–15516. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.009156>
2. Ainsworth, S., & Macfarlane, N. (1973). A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. *The Biochemical Journal*, 131(2), 223–236. <https://doi.org/10.1042/bj1310223>
3. An, X., Yu, L., Wang, S., Ao, Y., Zhan, X., Liu, Q., Zhao, Y., Li, M., Shu, X., Li, F., He, L., & Zhao, J. (2021). Kinetic Characterization and Inhibitor Screening of Pyruvate Kinase I From *Babesia microti*. *Frontiers in microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710678>
4. Arano-Varela, H., Dominguez-Dominguez, J., & Paredes-Lopez, O. (2012). Effect of environmental conditions on the expression levels of a recombinant 11S amaranth globulin in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Biotechnology*, 6(1), 23–31. <https://doi.org/10.2174/187220812799789181>
5. Arauzo-Aguilera, K., Buscajoni, L., Koch, K., Thompson, G., Robinson, C., & Berkemeyer, M. (2023). Yields and product comparison between *Escherichia coli* BL21 and W3110 in industrially relevant conditions: anti-c-Met scFv as a case study. *Microbial Cell Factories*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02111-4>
6. Atkinson, D. E., & Walton, G. M. (1965). Kinetics of regulatory enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(2), 757–763. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)45240-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)45240-9)
7. Balbas, P., & Bolivar, F. (1990). [3] Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, 185, 14–37.. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85005-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85005-9)
8. Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)
9. Barnard, J. P., & Pedersen, P. L. (1988). Purification in a single step and kinetic characterization of the pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 31(2), 141–147. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90165-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90165-x)
10. Bensadoun, A., & Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, 70(1), 241–250. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(76\)80064-4](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(76)80064-4)
11. Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R., & Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep33037>
12. Burbano Rosero, E. M., Caetano de Almeida, B., Otero, I., & Álvarez, S. (2017). *Manual de Biología Molecular: Procedimientos básicos*. Editorial Universidad de Nariño.
13. Burke, R. L., Tekamp-Olson, P., & Najarian, R. (1983). The isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of

- Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(4), 2193–2201. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)32907-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)32907-7)
14. Byrnes, M., Zhu, X., Younathan, E. S., & Chang, S. H. (1994). Kinetic characteristics of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*: MgATP nonallosterically inhibits the enzyme. *Biochemistry*, 33(11), 3424–3431. <https://doi.org/10.1021/bi00177a036>
 15. Caballero Roque, A. (2012). *Principios básicos sobre biomoléculas y vías metabólicas*. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
 16. Carstens, C. P., Bonnardel, J., Allen, R., & Waesche, A. (2001). BL21-Codon-Plus cells correct expression problems caused by codon bias. *Strategies (Stratagene)*, 14, 50-51.
 17. Chan, M., & Sim, T.-S. (2004). Functional analysis, overexpression, and kinetic characterization of pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(1), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.018>
 18. Cornish-Bowden, A. (2013). The origins of enzyme kinetics. *FEBS Letters*, 587(17), 2725–2730. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.009>
 19. Cummins, P. M., Dowling, O., & O'Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: Basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. En *Methods in Molecular Biology* (pp. 215–228). Humana Press.
 20. De la Fuente, I. M., & Cortes, J. M. (2012). Quantitative analysis of the effective functional structure in yeast glycolysis. *PloS One*, 7(2), e30162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030162>
 21. Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal*, 55(1), 170–171. <https://doi.org/10.1042/bj0550170>
 22. Enriqueta Muñoz, M., & Ponce, E. (2003). Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 135(2), 197–218. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(03\)00081-2](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(03)00081-2)
 23. Eskandari, A., Nezhad, N. G., Leow, T. C., Rahman, M. B. A., & Oslan, S. N. (2024). Essential factors, advanced strategies, challenges, and approaches involved for efficient expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 206(4). <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03871-2>
 24. Estrada, A. F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., & Avalos, J. (2009). *Ustilago maydis* accumulates β -carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 46(10), 803–813. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.06.011>
 25. Fernández Sánchez, M. T. (1987). *Regulación de la hexoquinasa PII de levaduras y su papel en la represión catabólica* (Doctoral dissertation).. <http://hdl.handle.net/10651/17127>
 26. Fletterick, R. J., Bates, D. J., & Steitz, T. A. (1975). The structure of a yeast hexokinase monomer and its complexes with substrates at 2.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 38–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.38>
 27. Fuller, G. G., & Kim, J. K. (2021). Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis. *Journal of Cell Science*, 134(20). <https://doi.org/10.1242/jcs.258469>

28. Garcia-Gomez, M., Calabria, A., Garcia-Bravo, M., Benedicenti, F., Kosinski, P., López-Manzaneda, S., Hill, C., del Mar Mañu-Pereira, M., Martín, M. A., Orman, I., Vives-Corrons, J.-L., Kung, C., Schambach, A., Jin, S., Bueren, J. A., Montini, E., Navarro, S., & Segovia, J. C. (2016). Safe and efficient gene therapy for pyruvate kinase deficiency. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(7), 1187–1198. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.87>
29. Göke, B., & Keim, V. (1992). HPLC and FPLC: Recent progress in the use of automated chromatography systems for resolution of pancreatic secretory proteins. *International Journal of Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology*, 11(2), 109–116. <https://doi.org/10.1007/bf02925982>
30. Gómez Fierro, M. G., García Cárdenas, S. Y., Ruvalcaba Hidrogo, D. G., Alvarado González, C. C., Juárez Acosta, Ó. E., Espinoza Duarte, M. R., & Espino Solís, G. P. (2019). Comparación de la eficiencia de transformación entre diferentes cepas de E. coli: Comparison of transformation efficiency in different E. coli strains. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 13(2), 112–120. <https://doi.org/10.54167/tch.v13i2.434>
31. González, A., & Fillat, M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *Revista de educación Bioquímica*, 37(1), 14-27.
32. Hansen, T., & Schönheit, P. (2004). ADP-dependent 6-phosphofructokinase, an extremely thermophilic, non-allosteric enzyme from the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 8(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0356-1>
33. Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E.coli): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718-725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>
34. Hoffmann, K. H. (1981). Inhibition of tubifex pyruvate kinase by storage phosphagens and adenosine triphosphate. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 70(1), 77–83. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90126-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90126-7)
35. Horton, R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., & David Rawn, J. (2008). *Principios de bioquímica*. Pearson.
36. Ireland, R. J., De Luca, V., & Dennis, D. T. (1980). Characterization and kinetics of isoenzymes of pyruvate kinase from developing castor bean endosperm. *Plant Physiology*, 65(6), 1188–1193. <https://doi.org/10.1104/pp.65.6.1188>
37. Irving, M. G., & Williams, J. F. (1973). Kinetic studies on the regulation of rabbit liver pyruvate kinase. *The Biochemical Journal*, 131(2), 287–301. <https://doi.org/10.1042/bj1310287>
38. Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, 43(10), 1019–1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>
39. Jayakrishnan, A., Wan Rosli, W. R., Tahir, A. R. M., Razak, F. S. A., Kee, P. E., Ng, H. S., Chew, Y.-L., Lee, S.-K., Ramasamy, M., Tan, C. S., & Liew, K. B. (2024). Evolving paradigms of recombinant protein production in

- pharmaceutical industry: A rigorous review. *Sci*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.3390/sci6010009>
40. Jiang, y. M, Tong, W. Y, & Wei, D. Z. (2007). Effects of induction starting time and Ca²⁺ on expression of active penicillin G acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 23(5), 1031-1037.
 41. Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>
 42. Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., ... Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
 43. Kricke, J., Mayer, F., Kopperschläger, G., & Kriegel, T. (1999). Phosphofructokinase-1 from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of molecular structure and function by electron microscopy and self-catalysed affinity labelling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 24(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(98\)00063-4](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(98)00063-4)
 44. Kühn, B., Jacobasch, G., Gerth, C., & Rapoport, S. M. (1974). Kinetic properties of the phosphofructokinase from erythrocytes of rats and rabbits: 2. The influence of effectors under nearly cellular conditions. *European Journal of Biochemistry*, 43(3), 443–450. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03430.x>
 45. Lara, A. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209–223. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&tlng=es.
 46. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
 47. Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
 48. Macfarlane, N., & Ainsworth, S. (1972). A kinetic study of baker's-yeast pyruvate kinase activated by fructose 1,6-diphosphate. *Biochemical Journal*, 129(5), 1035–1047. <https://doi.org/10.1042/bj1291035>
 49. Mansour, T. E. (1970). Kinetic and physical properties of phosphofructokinase. *Advances in Enzyme Regulation*, 8, 37–51. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(70\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0065-2571(70)90007-5)
 50. Marschke, C. K., & Bernlohr, R. W. (1973). Purification and characterization of phosphofructokinase of *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 156(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90335-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90335-4)
 51. Mathews, K., Van Holde, E., & Ahern, K. (2003). *Bioquímica. Editorial Mc Graw Hill*.
 52. Mayolo-Deloisa, K, Martinez, IM, & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales,

- estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(3), 415-429.
53. Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B., & Novy, R. E. (2003). Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. En *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (pp. 257–292). Humana Press.
 54. Montes, A. M. S., Borunda, J. S. A., & Rodríguez, A. S. S. (2016). *Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana Editores.
 55. Münsterkötter, M., & Steinberg, G. (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 8(1), 473. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-473>
 56. Olaofe, O. A., Burton, S. G., Cowan, D. A., & Harrison, S. T. L. (2010). Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 52(1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.06.013>
 57. Olicón-Hernández, D. R., Araiza-Villanueva, M. G., Pardo, J. P., Aranda, E., & Guerra-Sánchez, G. (2019). New insights of *Ustilago maydis* as yeast model for genetic and biotechnological research: A review. *Current Microbiology*, 76(8), 917–926. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01629-4>
 58. Papanephytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expression and Purification*, 94, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>
 59. Paricharttanakul, N. M., Ye, S., Menefee, A. L., Javid-Majd, F., Sacchettini, J. C., & Reinhart, G. D. (2005). Kinetic and Structural Characterization of Phosphofructokinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochemistry*, 44(46), 15280–15286. <https://doi.org/10.1021/bi051283g>
 60. Pertierra, A., Olmo, R., & Anzar, C. (2002). *Bioquímica metabólica: conceptos y tests*. Editorial Tebar.
 61. Pontis, H. G. (2017). Protein and carbohydrate separation and purification. En *Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms* (pp. 45–63). Elsevier.
 62. Reuter, R. N., & M., Bär, J., Haferburg, D., & Kopperschläger, G. (2000). Purification, molecular and kinetic characterization of phosphofructokinase-1 from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for an unusual subunit composition. *Yeast*, 16(14), 1273-1285.
 63. Reynard, A. M., Hass, L. F., Jacobsen, D. D., & Boyer, P. D. (1961). The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 236(8), 2277–2283. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64071-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64071-2)
 64. Rodríguez, J.-M. G., Hux, N. P., Philips, S. J., & Towns, M. H. (2019). Michaelis–Menten graphs, lineweaver–Burk plots, and reaction schemes: Investigating introductory biochemistry students' conceptions of representations in enzyme kinetics. *Journal of Chemical Education*, 96(9), 1833–1845. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00396>
 65. Rodríguez-Saavedra, C., Morgado-Martínez, L. E., Burgos-Palacios, A., King-Díaz, B., López-Coria, M., & Sánchez-Nieto, S. (2021). Moonlighting

- proteins: The case of the hexokinases. *Frontiers in molecular biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.701975>
66. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747. <https://doi.org/10.1039/b714449k>
 67. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
 68. Ruiz, T., Kopperschläger, G., & Radermacher, M. (2001). The first three-dimensional structure of phosphofructokinase from *Saccharomyces cerevisiae* determined by electron microscopy of single particles. *Journal of Structural Biology*, 136(3), 167–180. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4440>
 69. Saavedra, E., Ramos-Casillas, L. E., Marañón-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., & Guerra-Sánchez, G. (2008). Glycolysis in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Research*, 8(8), 1313–1323. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00437.x>
 70. Saboury, A. A. (2009). Enzyme inhibition and activation: A general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6(2), 219–229. <https://doi.org/10.1007/bf03245829>
 71. Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2007). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1–2), 249–264. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
 72. San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>
 73. Santamaría, B., Estévez, A. M., Martínez-Costa, O. H., & Aragón, J. J. (2002). Creation of an allosteric phosphofructokinase starting with a nonallosteric enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1210–1216. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109480200>
 74. Santiago-Martínez, M. G., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Yoval-Sánchez, B., Feregrino-Mondragón, R. D., Rodríguez-Zavala, J. S., Pardo, J. P., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2019). FruBPase II and ADP-PFK1 are involved in the modulation of carbon flow in the metabolism of carbohydrates in *Methanosarcina acetivorans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 669, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.05.012>
 75. Shakir, N. A., Bibi, T., Aslam, M., & Rashid, N. (2020). Biochemical characterization of a highly active ADP-dependent phosphofructokinase from *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.014>
 76. Sharma, B. (2011). Kinetic characterisation of phosphofructokinase purified from *Setaria cervi*: A bovine filarial parasite. *Enzyme Research*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.4061/2011/939472>
 77. Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>

78. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
79. Snášel, J., Machová, I., Šolínová, V., Kašička, V., Krečmerová, M., & Pichová, I. (2021). Phosphofructokinases A and B from *Mycobacterium tuberculosis* display different catalytic properties and allosteric regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1483. <https://doi.org/10.3390/ijms22031483>
80. Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). *Ustilago Maydis*, A New Fungal Model System for Cell Biology. *Trends In Cell Biology*, 18(2), 61–67.
81. Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
82. Studier, F. W. (2018). T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli*. *Et al [Current Protocols in Molecular Biology]*, 124(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.63>
83. Tsume, Y., Yamamoto, S., Kato, N., Suda, M., Vertès, A. A., Yukawa, H., & Inui, M. (2015). Overexpression of the phosphofructokinase encoding gene is crucial for achieving high production of D-lactate in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4679–4689. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6546-9>
84. Walker, L. R., Simcock, D. C., Pedley, K. C., Simpson, H. V., & Brown, S. (2012). The kinetics and regulation of phosphofructokinase from *Teladorsagia circumcincta*. *Experimental Parasitology*, 130(4), 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.011>
85. Wierckx, N., Miebach, K., Ihling, N., Hussnaetter, K. P., Büchs, J., & Schipper, K. (2021). Perspectives for the application of Ustilaginaceae as biotech cell factories. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 365–379. <https://doi.org/10.1042/ebc20200141>
86. Wollenberger, U., Schubert, F., Scheller, F., Danielsson, B., & Mosbach, K. (1987). A biosensor for ADP with internal substrate amplification. *Analytical Letters*, 20(5), 657–668. <https://doi.org/10.1080/00032718708062919>
87. Wu, H. B., & Turpin, D. H. (1992). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PYRUVATE KINASE FROM THE GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*. *Journal of Phycology*, 28(4), 472–481. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00472.x>
88. Zoraghi, R., See, R. H., Gong, H., Lian, T., Swayze, R., Finlay, B. B., Brunham, R. C., McMaster, W. R., & Reiner, N. E. (2010). Functional analysis, Overexpression, and kinetic characterization of pyruvate kinase from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 49(35), 7733–7747. <https://doi.org/10.1021/bi100780t>