

Bifuncionalidad de la acil-coenzima A liasa (LiuE) de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Alma Laura Díaz-Pérez, Mauricio Nahuam Chávez Avilés y Jesús Campos García

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH

Resumen

Algunos compuestos de origen natural, como los isoprenoides acíclicos citronelol y geraniol, poseen una ramificación en la posición 3 de la cadena principal que previene la degradación bacteriana. En *Pseudomonas aeruginosa* éstos se han utilizado como modelo para el estudio de la degradación de compuestos 3-metil ramificados. La ruta degradativa de isoprenoides acíclicos comprende a la vía central (codificada por el operón *atu*) y a la vía de leucina/isovalerato (codificada por el operón *liu*); en ambas vías hay reacciones análogas y entre sus operones se encuentran genes parálogos, excepto para el gen *liuE*, que es el único encontrado en el genoma de *P. aeruginosa*. Lo anterior sugiere que el producto de *liuE* participa en ambas vías metabólicas. La enzima LiuE es una 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) liasa que también presenta actividad de 3-hidroxi-3-isohexenilglutaril-CoA (HIHG-CoA) liasa. En el presente estudio, la proteína LiuE fue expresada en un organismo heterólogo y purificada a homogeneidad. Bajo condiciones óptimas de reacción la enzima muestra preferencia por el catión divalente Mg^{2+} y es inhibida por uno de sus productos, acetil-CoA. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos de la proteína LiuE presentó 7 sitios probables de fosforilación, sugiriendo que éstos podrían estar relacionados con la regulación de la actividad enzimática. Los resultados indican que LiuE es una enzima regulada metabólicamente a nivel de producto y con capacidad de utilizar HMG-CoA y HIHG-CoA

como sustratos, propiedad que juega un papel clave en las vías degradativas de leucina e isoprenoides acíclicos.

Palabras clave: isoprenoides acíclicos, leucina, LiuE, regulación metabólica.

Abstract

Some naturally occurring compounds such as acyclic isoprenoids citronellol and geraniol, have a branch at the 3 position of the backbone, which prevents bacterial degradation. These compounds in *Pseudomonas aeruginosa* have been used as model for studies of degradation of 3-methyl branched compounds. The acyclic isoprenoid degradation pathway comprises central pathway (encoded by *atu* operon) and leucine/isovalerate pathway (encoded by *liu* operon), in both pathways there occur analogous reactions encoded on their operons where paralogous genes are located, except for the *liuE* gene, which was found only in the genome of *P. aeruginosa*, suggesting that the product of *liuE* gene participates in both degradative pathways. The LiuE protein is a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HMG-CoA lyase), that also has activity of 3-hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA (HIHG) lyase. In the present study, the LiuE protein was heterologously expressed and purified to homogeneity. Under optimal reaction conditions it shows preference for the divalent cation Mg^{2+} and it was inhibited by one of its products, acetyl-CoA. On the other hand, the sequence of amino acids of the LiuE protein shows 7 putative sites of phosphorylation, suggesting that these sites could be related with its enzymatic activity regulation. Results indicate that LiuE is metabolically regulated at product level and having the capability to use HMG-CoA and HIHG-CoA as substrates, playing an important role in the degradation pathways of leucine and acyclic isoprenoids.

Keywords: acyclic isoprenoids pathway, LiuE, metabolic regulation.

Introducción

La utilización de alcanos por microorganismos como fuente de carbono y energía ha sido sujeta de estudio, debido al impacto ambiental que éstos causan (Díaz-Pérez et al., 2004). Los alcanos ramificados son generalmente menos susceptibles a la biodegradación, ya que la ramificación disminuye la disponibilidad metabólica del compuesto. Un ejemplo de esto se refiere a que una ramificación en la posición 3 de la cadena principal del alcano representa un impedimento estructural que evita la degradación del compuesto, resultando en un impedimento estérico para las enzimas oxidantes. Lo anterior ocurre con los alcanos 3-metil ramificados, también llamados β ramificados, cuya sustitución evita a la oxidación β (Pirnik et al., 1974; Fall et al., 1979; Schaeffer et al., 1979). Estructuras moleculares metil ramificadas se encuentran en compuestos de origen natural, tales como los isoprenoides. Algunos de ellos como el citronelol (3, 7-dimetil-octen-1-ol) y el geraniol (3, 7-dimetil-octa-2, 6

dien-1-ol) se han utilizado como compuestos modelo para el estudio de la degradación de compuestos 3-metil ramificados en *Pseudomonas citronellolis* y *P. aeruginosa* (Cantwell et al., 1978; Höstle et al., 2005; Förster-Fromme et al., 2006; Díaz-Pérez y Campos-García., 2012). Esta vía de degradación consta de 4 etapas: (i) vía superior de oxidación-activación, (ii) vía central de terpenos acíclicos (ATU), (iii) acoplamiento a la oxidación β y (iv) convergencia con la vía de leucina/isovalerato (LIU). Se ha observado que las reacciones de deshidrogenación, carboxilación, hidratación y tiólisis son análogas entre la vía ATU (codificada por el operón *atu*) y la vía LIU (codificada por el operón *liu*) (Fig. 1). Sin embargo, aunque entre los operones que codifican a ambas vías están contenidos genes parálogos, sólo se ha encontrado un único gen *liuE* en el genoma de *P. aeruginosa*, sugiriendo que el producto del gen *liuE* tiene una función dual, participando en las vías ATU y LIU (Chávez-Avilés et al., 2010; Campos-García, 2010).

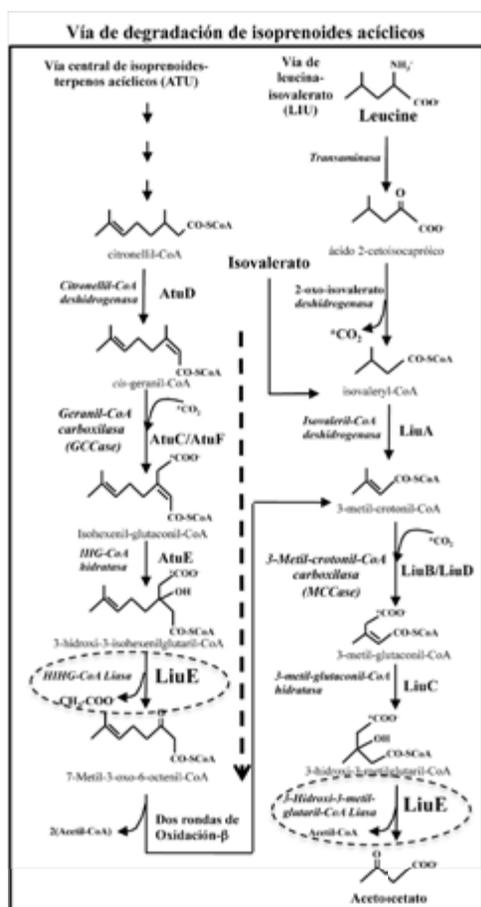


Figura 1. Vía central de utilización de isoprenoides/terpenos acíclicos (ATU) y la vía de leucina/isovalerato (LIU). Las funciones propuestas se basaron en el análisis fenotípico, determinación de la actividad, y/o análisis informático de las secuencias de las proteínas codificadas de los genes identificados. En círculos se indican las etapas en las que participa la enzima codificada por el gen *liuE* (Modificado de Chávez-Avilés et al., 2009; Campos-García, 2010; Díaz-Pérez y Campos-García, 2012).

Recientemente se ha reportado que el gen *liuE* codifica para la enzima LiuE, la cual es una HMG-CoA liasa que participa en la vía LIU y que cataliza el rompimiento del HMG-CoA en acetyl-CoA y acetoacetato (Fig. 1). Esta enzima se conforma como un homodímero proteico, con un comportamiento cinético de tipo Michaeliano, con temperatura y pH óptimos de 37°C y 7.0, respectivamente; teniendo constantes cinéticas de K_m de 100 μM y V_{max} de 21 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, y una dependencia por cofactores metálicos divalentes como el Mg^{2+} y Mn^{2+} (Chávez-Avilés et al., 2009). Se ha sugerido que la enzima LiuE participa en las vías LIU y ATU, debido a que la mutante de *P. aeruginosa* en el gen *liuE* es incapaz de asimilar leucina e isoprenoides acíclicos del tipo del citronelol (Aguilar et al., 2006; 2008). En la vía ATU la proteína LiuE llevaría a cabo la transformación del HMG-CoA a 7-metil-3-oxo-6-octenil-CoA (Fig. 1). Esta propuesta se ve fortalecida, ya que la vía ATU ha sido reconstituída *in vitro* y se demostró que la enzima LiuE también tiene actividad de HMG-CoA liasa (Chávez-Avilés et al., 2010). Debido a su función dual, LiuE podría considerarse como una enzima clave en la vía de degradación de isoprenoides acíclicos. Este tipo de enzimas están sujetas a una regulación precisa para ajustar la degradación de metabolitos a los requerimientos fisiológicos y pueden estar reguladas a diferentes niveles: control transcripcional, control funcional por interconversión y modulación por ligandos (Koolman y Roehm, 2005). Por lo que en el presente estudio se explora el mecanismo de regulación de la actividad enzimática de LiuE, con la finalidad de profundizar el entendimiento de la vía de degradación de isoprenoides acíclicos en *P. aeruginosa*.

Materiales y Métodos

Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo.

Las cepas y los plásmidos utilizados en éste trabajo se enlistan en la Tabla 1. Las cepas crecieron a 37°C o 30°C en caldo Luria-Bertani (CL), agar Luria-Bertani (AL) o medio mínimo M9 suplementado con 0.2% glucosa, 0.02% peptona de caseína y 0.5 ml/l de una solución de trazas de metales (Sambrook et al., 1989). Los antibióticos se adicionaron al medio AL en concentraciones de $\mu\text{g/ml}$: para *E. coli*, ampicilina (Ap), 100; *P. aeruginosa*, gentamicina (Gm), 100 y estreptomocina (Sm), 200.

Manipulación del DNA.

La preparación de plásmidos, restricciones y el corrimiento de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) se hicieron por métodos estándar (Sambrook et al., 1989).

TABLA 1
Cepas y plásmidos empleados en este trabajo.

Cepas	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio <i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI'Z</i> Δ M15].	Yanish-Perron et al., 1985.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1SR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 resistente a estreptomicina.	Wong y Mekalanos, 2000.
PAM <i>liuE</i>	PAO1SR <i>liuE</i> :: <i>Gm^R</i> , mutante obtenida por recombinación.	Díaz-Pérez et al., 2004.
Plásmidos	Características	Referencia
pTLE2011	PTrcHis2A con un fragmento de 0.9 kb correspondiente al ORF PA2011de <i>P. aeruginosa</i> .	Chávez-Avilés et al., 2009.

Expresión y purificación de la proteína recombinante LiuE.

La cepa de *E. coli* JM101 transformada con el plásmido pTLE2011 se creció en CL con agitación constante (150 rpm a 30°C) a una D.O._{600nm}=0.6, adicionando 0.1 mM de IPTG para la inducción del gen *liuE*. El cultivo crecido bajo las condiciones de inducción se cosechó por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La pastilla bacteriana se lavó y resuspendió en amortiguador de equilibrio 1X (50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, pH 8.0) adicionado con 1 mM de inhibidor de proteasas PMSF (Sigma). Se lisaron las células por sonicación y se eliminaron células y restos celulares por centrifugación bajo las condiciones antes mencionadas. La fracción soluble se aplicó a 300 μ l de la resina de cobalto TALON (BD Biosciences) previamente equilibrada. La suspensión se agitó suavemente por una hora a 4°C y se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el complejo resina-proteína se lavó, agitándolo suavemente durante 10 min a 4°C con amortiguador de lavado (50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 15 mM de imidazol, pH 8.0), posteriormente se centrifugó a 7,500 rpm, 10 min a 4°C, este paso se repitió 7 veces. La proteína se eluyó con 500 μ l del amortiguador de elución (50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7.0), agitando suavemente durante 20 minutos a 4°C. La muestra se centrifugó y la fracción soluble se recuperó para dializarla en 25 mM Na₂HPO₄ y 31.25 mM DTT, pH 6.7 durante 1 h a 4°C, posteriormente fue concentrada por ultrafiltración (Amicon Ultra- 4, filtro de 30 kDa MWCO; Millipore).

Determinación de la actividad de HMG-CoA liasa.

La actividad enzimática se determinó por el método reportado por Wanders et al., (1988) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final

de 100 μ l con amortiguador de fosfatos (20 mM KH_2PO_4 , pH 6.7), 10 mM MgCl_2 y extracto protéico o proteína purificada. La reacción se inició con la adición del sustrato, 3-HMG-CoA, se incubó a 37°C por 5 min y se detuvo con la adición de 3 μ l de HCl al 25%. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante se recuperó y se neutralizó con 15 μ l de amortiguador de fosfatos (2 M KH_2PO_4 , pH 9.1). La reacción se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Varian Mod 240), con una columna Microsorb-MV 100-5 C-18, 150 X 4.6 (Varian) equilibrada con amortiguador de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 6.7). La separación de los compuestos se realizó mediante la fase móvil constituida por un gradiente de acetonitrilo (10-80%) en amortiguador de fosfatos 50 mM, con un flujo de 1 ml/min. La detección de los compuestos se realizó mediante un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 455 nm (Chávez-Avilés et al., 2009). La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método de Bradford (Sambrook et al., 1989).

Determinación de la actividad de HMG-CoA liasa.

La determinación de la actividad de HMG-CoA liasa se realizó en extractos crudos libres de células de *P. aeruginosa* PAO1 o de la mutante PAM\text{MgCl}_2, 10 mM NaHCO_3 , 100 mM amortiguador de fosfatos de potasio, pH 7.6, extracto crudo de PAO1 o extracto crudo de PAM\mug/ μ l de LiuE, en un volumen final de 100 μ l. La reacción se inició con la adición de 10 μ l de *cis*-geranyl-CoA 10 mM (Aguilar et al., 2008), se incubaron 15 o 30 min a 37°C y se detuvieron con la adición de 5 μ l de HCl al 25%. Las mezclas de reacción se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min y la fracción soluble se analizó por HPLC.

Análisis de la secuencia de la enzima LiuE.

La secuencia de aminoácidos de la enzima LiuE fue obtenida en formato Fasta en la página web Pseudomonas genome database (www.pseudomonas.com; ID=PA2011) y para la búsqueda de sitios de fosforilación, la secuencia de LiuE fue analizada en el servidor NetPhosBac 1.0 Server (Miller et al., 2009) en la página web del Center for biological sequence analysis (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosBac-1.0).

Resultados y Discusión

Expresión y purificación de la proteína recombinante LiuE de *P. aeruginosa*

Para la caracterización del mecanismo de regulación de una enzima se sugiere preferentemente utilizar a la enzima purificada. Con la finalidad de profundizar en el mecanismo de regulación de la HMG-CoA liasa, codificada por el gen *liuE* de *P. aeruginosa*, se procedió

a la expresión y purificación de la enzima. Se decidió etiquetar a la proteína LiuE en su extremo carboxilo con el epítipo de 6-Histidinas, el cual permitirá su purificación mediante cromatografía de afinidad, además, esta estrategia hace posible la identificación de la proteína expresada mediante inmunodetección, usando anticuerpos específicos anti-etiqueta (Terpe, 2006). Para llevar a cabo esta estrategia se dispuso del plásmido pTLE2011 (Chávez-Avilés et al., 2009), el cual tiene clonado al gen *liuE* en el vector para expresión de proteínas pTrcHis2A, que adiciona al gen clonado una secuencia de nucleótidos que codifica para 6 histidinas, etiqueta que se fusiona en el extremo carboxilo de la proteína (Fig. 2A). Con el plásmido pTLE2011 se transformó a *E. coli* JM101 y a las clonas seleccionadas por el gen reportero se les realizó la purificación del plásmido pTLE2011, el cual fue analizado por restricción con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III, obteniéndose el patrón de restricción esperado, dos fragmentos de 0.9 kb y 4.4 kb, correspondientes al gen *liuE* y al plásmido pTrcHis2A, respectivamente (Fig. 2B). Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de la enzima LiuE, se determinó el tiempo de expresión máxima de la proteína recombinante en la cepa transformada con pTLE2011. Alícuotas de extractos celulares tomados del cultivo de *E. coli* transformada con el plásmido pTLE2011 a diferentes tiempos de inducción, fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), se observó una banda diferencial correspondiente al peso molecular esperado de 33 kDa a partir de las 8 horas posterior a la inducción. Los resultados indican que la máxima expresión de la proteína fue en el período comprendido entre 20 y 24 horas de inducción (Fig. 3A). Con éste resultado se procedió a la purificación de la proteína LiuE a partir de los extractos celulares

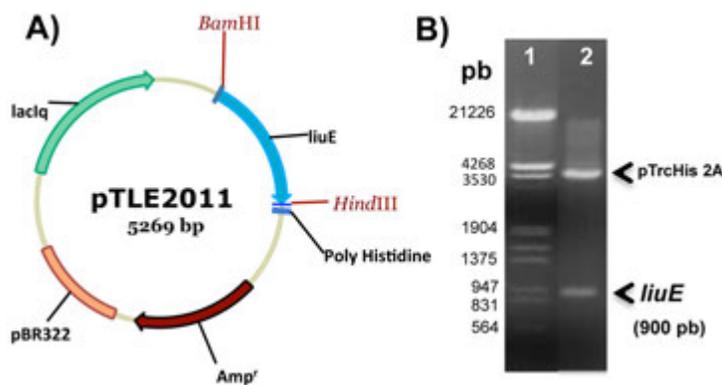


Figura 2. Esquema y análisis del plásmido pTLE2011. A) Plásmido de expresión pTLE2011, el cual contiene el gen *liuE* de *P. aeruginosa* que codifica para la enzima HMG-CoA liasa. Se indican los sitios de restricción de las endonucleasas usadas para escindir el gen *liuE*, mismos que fueron utilizados para la subclonación en el vector pTrcHis2A. Se señala la etiqueta que se anexa (poli-histidina) al gen *liuE* fusionado, el gen regulador (*lacI*), el marcador de resistencia a ampicilina (*Amp*^r) y el origen de replicación del plásmido pBR322. B) Fotografía del corrimiento electroforético en gel de agarosa de los productos de la reacción de restricción del plásmido pTLE2011. Carril 1) marcador de tamaño molecular, DNA del fago λ (*Hind*III); carril 2) restricción del plásmido pTLE2011 (*Bam*HI/*Hind*III).

obtenidos a las 24 horas de inducción (Materiales y Métodos). La purificación de la proteína LiuE se corroboró mediante el corrimiento electroforético en geles SDS-PAGE, en donde se observó un enriquecimiento de la banda de interés, cuyo peso molecular calculado correspondió a 33 kDa y se estimó una purificación mayor al 95% (Fig. 3B), lo cual indica que la proteína fue expresada eficientemente y purificada a homogeneidad.

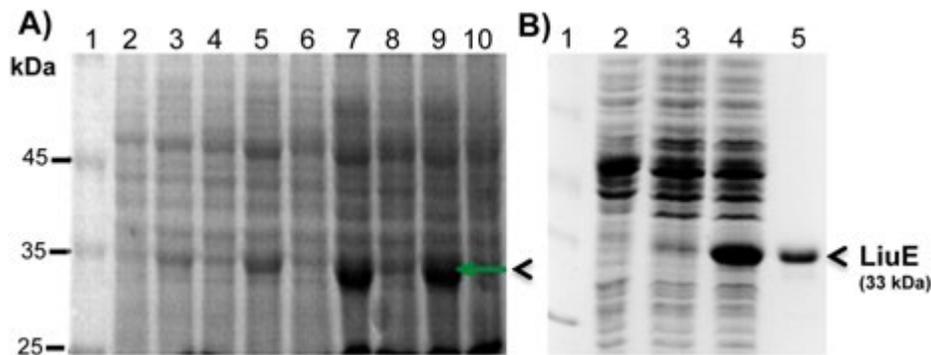


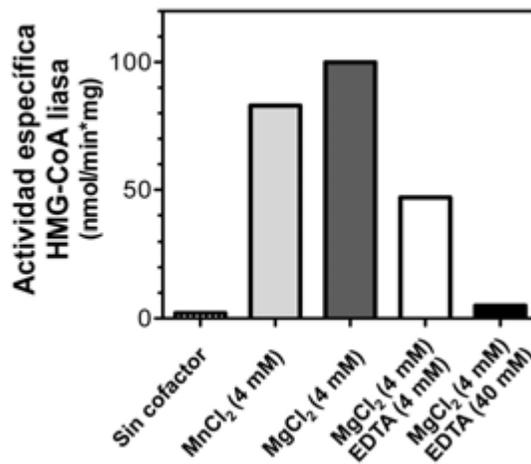
Figura 3. Expresión y purificación de la proteína recombinante LiuE. A) Monitoreo de la inducción de la proteína LiuE en extractos de *E. coli*. Fotografía del corrimiento electroforético SDS-PAGE. Carril 1) marcador de peso molecular; carril 2) extracto celular del cultivo de *E. coli* (pTLE2011) previo a la inducción; carriles 3, 5, 7 y 9) extractos celulares de cultivos de *E. coli* (pTLE2011) inducidos y tomados a los tiempos 4, 8, 20 y 24 h, respectivamente; carriles 4, 6, 8 y 10) extractos celulares de *E. coli* (pTLE2011) no inducidos tomados a los mismos tiempos. B) Análisis de la purificación de la proteína recombinante LiuE. Fotografía del corrimiento electroforético del gel SDS-PAGE. Carril 1) marcador de peso molecular (kDa); carril 2) extracto celular del cultivo de *E. coli* JM101; carril 3) extracto celular del cultivo de *E. coli* (pTLE2011) no inducido; carril 4) extracto celular del cultivo de *E. coli* (pTLE2011) inducido por 24 h; carril 5) proteína purificada LiuE.

Modulación de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* por ligandos metálicos

La actividad enzimática de la proteína purificada LiuE se determinó cuantificando los productos de la reacción mediante la separación y detección por HPLC (Materiales y Métodos). Para la reacción enzimática de la HMG-CoA liasa se utilizaron los parámetros óptimos de temperatura y pH reportados previamente (Chávez-Avilés et al., 2009), y se determinaron el tiempo óptimo de reacción y la concentración óptima de proteína (donde la velocidad de reacción presenta un comportamiento lineal). Los resultados mostraron que los parámetros óptimos de reacción fueron 5 minutos y 1 μg de proteína total, respectivamente. Una vez obtenidas las condiciones de reacción y en función de que el cofactor es un elemento que influye en la catálisis enzimática, se procedió a la determinación del efecto del cofactor metálico sobre la actividad de la enzima. Se ha descrito que otras HMG-CoA liasas presentes en otros organismos son dependientes de Mg^{2+} (Chávez-Avilés et al., 2009); sin embargo, para la enzima encontrada en *P. aeruginosa* no se ha explorado si algún otro catión divalente puede ser usado como cofactor, por lo que se determinó el efecto de los cofactores Mg^{2+} y Mn^{2+} sobre la actividad de la enzima LiuE de *P. aeruginosa*. Cuando se utilizó MnCl_2 se observó

una disminución en la actividad enzimática del 13% con respecto a la observada con el MgCl_2 , mientras que en ausencia de éstos cationes divalente la enzima fue inactiva (Fig. 4). Cuando se adicionó a la mezcla de reacción en concentración creciente el agente quelante EDTA, la actividad enzimática se afectó drásticamente, disminuyendo en un 68% (Fig. 4). Estos resultados indican que la enzima LiuE de *P. aeruginosa* es una metaloenzima, con preferencia por el ión Mg^{2+} . Se ha reportado que hay preferencia por el Mg^{+2} en comparación al Mn^{+2} para interactuar con residuos de aminoácidos que contienen oxígeno (grupos carbonilos o hidroxilos), por lo que este resultado es congruente al mecanismo de reacción propuesto para éste tipo de enzimas, el cual plantea que un catión divalente interactúa con el oxígeno de un grupo carbonilo de un residuo de la enzima y el oxígeno del grupo hidroxilo del sustrato (Tuinstra y Mizioroko, 2003; Forouhar et al., 2006).

Figura 4. Efecto de la adición de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. La actividad enzimática fue determinada en la fracción purificada de la proteína recombinante LiuE en presencia de MnCl_2 y MgCl_2 , así como en presencia del agente quelante EDTA utilizando las condiciones descritas en Material y Métodos.



Frecuentemente las enzimas clave en las rutas metabólicas son inhibidas por alguno de sus productos de reacción (inhibición por retro-alimentación) (Koolman y Roehm, 2005); por lo que se estudió si la enzima HMG-CoA liasa (LiuE) es inhibida por sus productos de reacción, el acetoacetato y el acetil-CoA (Fig. 1). Para lo anterior, se realizaron pruebas de inhibición de la actividad enzimática a diferentes concentraciones tanto del sustrato como de los compuestos a probar como inhibidores. El acetil-CoA causó inhibición de la actividad enzimática de la HMG-CoA liasa (alcanzando entre 65% al 95 % de inhibición con concentraciones de 5 y 10 mM de inhibidor). Por el contrario, a las concentraciones probadas, el acetoacetato no produjo inhibición en la actividad de la enzima (Fig. 5). Los resultados anteriores sugieren que uno de los productos de la reacción, el acetil-CoA, es capaz de producir inhibición de la actividad de la HMG-CoA liasa, muy probablemente por un mecanismo de inhibición por producto y no así para el segundo de éstos, el acetoacetato.

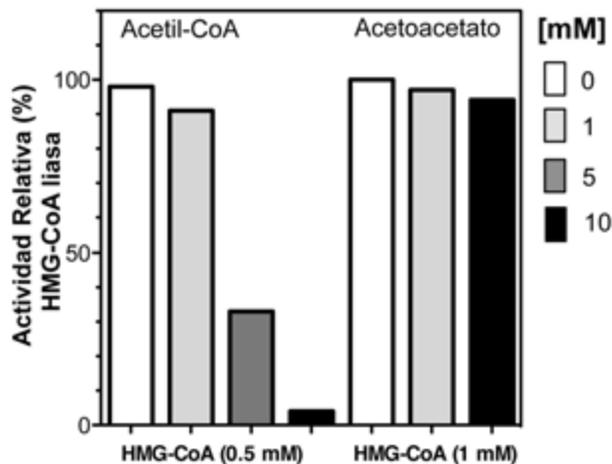


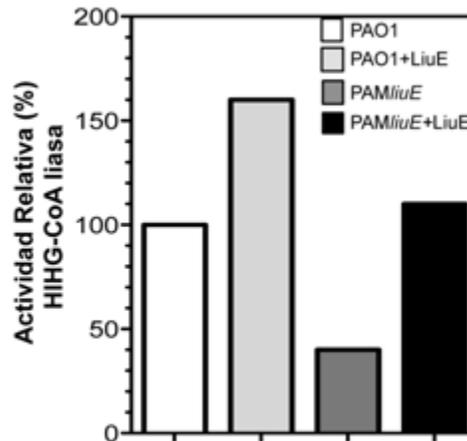
Figura 5. Efecto de los productos de reacción acetil-CoA y acetoacetato sobre la actividad enzimática de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa*. Actividad de HMG-CoA liasa de la proteína purificada LiuE en presencia de acetil-CoA o acetoacetato usando concentraciones de 0.5 y 1 mM del sustrato HMG-CoA.

Para determinar el tipo o mecanismo de inhibición causado por el acetil-CoA sobre la HMG-CoA liasa, se realizó el análisis del efecto inhibitorio del acetil-CoA sobre la actividad enzimática, empleando el modelo matemático de Lineweaver-Burk (datos no mostrados). Los resultados preliminares obtenidos presentaron una tendencia de las rectas a interceptarse en el eje de las "X" del cuadrante I del plano cartesiano, éste tipo de intercepto es clásico para un inhibidor competitivo, por lo que se sugiere que el acetil-CoA se comporta como un inhibidor competitivo para la enzima HMG-CoA liasa.

Actividad de hidrox-i-sohexenil-glutaril-CoA liasa por la proteína LiuE

La determinación de la actividad de HIHG-CoA liasa de la proteína LiuE se realizó en extractos crudos libres de células de *P. aeruginosa* PAO1 y de la mutante en el gen *liuE*, PAM*liuE* (Materiales y Métodos). Se observó que la reacción con el extracto celular de la mutante PAM*liuE* presentó un remanente del 40% en la actividad de HIHG-CoA liasa con respecto a la reacción con el extracto celular de la cepa control, *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 6). Cuando a la reacción con el extracto celular de la mutante PAM*liuE* se le adicionó la proteína recombinante LiuE, la actividad de HIHG-CoA liasa se restableció a un 110%. Adicionalmente, se observó un incremento en la actividad de HIHG-CoA liasa de 160% en el extracto celular de la cepa silvestre, *P. aeruginosa* PAO1, cuando se adicionó a la reacción la proteína recombinante LiuE (Fig. 6). Estos resultados sugieren que la proteína recombinante LiuE expresada en un organismo heterólogo y purificada a homogeneidad, posee actividad adicional de HIHG-CoA liasa, participando en la catálisis del *cis*-geranil-CoA, metabolito de la ruta degradativa de isoprenoides acíclicos (Fig. 1).

Figura 6. Determinación de la actividad de HIHG-CoA liasa en extractos celulares de *P. aeruginosa*. Extractos celulares obtenidos de cultivos de las cepas fueron utilizados con o sin la adición de una fracción de proteína LiuE purificada, para la determinación de la actividad enzimática de HIHG-CoA liasa como se describe en Material y Métodos. PAO1, cepa silvestre, WT; PAMliuE, cepa mutante en el gen *liuE*. PAO1+LiuE y PAMliuE+LiuE, extractos crudos de cepas adicionadas con la proteína purificada LiuE.



Análisis de sitios de fosforilación en la proteína LiuE de *P. aeruginosa*

Durante la caracterización de la proteína LiuE de *P. aeruginosa* se encontró experimentalmente mediante electroforesis de isoelectroenfoque, que la enzima presenta al menos 5 isoformas con puntos isoelectrónicos de 5.9, 6.2, 6.5, 6.8, y 7.0 (Chávez-Avilés et al. 2009). El punto isoelectrónico de 5.9 corresponde al reportado teóricamente, mientras que los puntos isoelectrónicos de 6.8 y 7.0 fueron las dos isoformas que mayoritariamente se observaron en los geles de isoelectroenfoque-SDS-PAGE. La presencia de éstas isoformas de la proteína LiuE podrían ser el resultado de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, ya que la interconversión de algunas enzimas de una forma activa a una inactiva, o viceversa, es un mecanismo de regulación metabólica mediado principalmente por el grado de fosforilación de sus residuos, el cual es dependiente del estado energético de la célula. Por lo anterior, se analizó *in silico* la secuencia de aminoácidos de la proteína LiuE de *P. aeruginosa* en la búsqueda de probables sitios de fosforilación (Materiales y Métodos).

Mediante el programa informático NetPhosBac1.0 se encontraron en la secuencia de la proteína LiuE, 7 sitios probables de fosforilación (Tabla 2). Los residuos indicados como sitios de posible fosforilación recaen en 6 residuos de serina y una treonina, éstos dos residuos (serina y treonina) son los más frecuentes de ser fosforilados en las proteínas que son reguladas por éste mecanismo (Lau et al., 1989). De los datos obtenidos, de acuerdo al programa informático usado, los residuos Ser¹²⁰ y Ser¹⁴³ presentaron los mayores valores de probabilidad (score), lo que nos indica que éstos residuos en la proteína LiuE podrían ser blanco de eventos de fosforilación. El proceso de interconversión (fosforilación/defosforilación) representaría para la enzima HMG-CoA liasa un punto de regulación metabólica, pasando entre un estado activo e inactivo. Este sistema de regulación postraduccional

requiere de un menor gasto energético que el control a nivel transcripcional-traducciona, debido a que la enzima inactiva es convertida a la forma catalíticamente activa solamente por una modificación química mediada por los niveles de energía (ATP/AMPc).

TABLA 2			
Sitios probables de fosforilación de la proteína <i>liuE</i> de <i>P. aeruginosa</i> .			
Aminoácido	Posición	Contexto	Score
Serina	49	IEVGSFVSP	0.546
Serina	116	NINCSIKDS	0.550
Serina	120	SIKDSLRF	0.679
Serina	143	RGYISCVLG	0.774
Treonina	184	IGVGTAGAT	0.615
Serina	232	AVFDSSVAG	0.515
Serina	287	VLGKSNGRS	0.672

Conclusiones

La enzima codificada por el gen *liuE* de *P. aeruginosa* es una 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa capaz de usar como sustratos el HMG-CoA y el HMG-CoA, mostrando que el Mg^{2+} es el ión metálico preferencial para la actividad enzimática. La actividad enzimática de la HMG-CoA liasa de *P. aeruginosa* muestra inhibición por uno de sus productos (acetil-CoA). La HMG-CoA liasa presenta diversas isoformas y se identificaron probables sitios de fosforilación en su secuencia aminoacídica. Adicional al hecho de que esta enzima mostró bifuncionalidad, siendo capaz de reconocer los sustratos de la vía de asimilación de la leucina y de la vía catabólica de isoprenoides acíclicos y al presentar posibles sitios de fosforilación sugiere que la HMG-CoA liasa es una enzima que puede estar jugando un papel esencial como punto de regulación a nivel metabólico en las vías en las que participa.

Bibliografía

- Aguilar J.A., A.N. Zavala, C. Díaz-Pérez, C. Cervantes, A. L. Díaz-Pérez y J. Campos-García. 2006. The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2070–2079.
- Aguilar J. A., C. Díaz-Pérez C., A. L. Díaz-Pérez, J. S. Rodríguez-Zavala, B. J. Nikolau y J. Campos-García. 2008. Substrate specificity of the 3-methylcrotonyl coenzyme A

- (CoA) and Geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 190: 4888-4893.
- Campos-García. 2010. Metabolism of acyclic terpenes by *Pseudomonas*. P. 235-253. En *Pseudomonas* Volume 6: Molecular microbiology, infection and biodiversity. (J.-L. Ramos y A. Filloux), Eds Springer. Dordrecht, Heidelberg, London y New York.
- Cantwell S. G., E. P. Lau, D. S. Watt y R. R. Fall. 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. J. Bacteriol. 135: 324-333.
- Chávez-Avilés M., A. L. Díaz-Pérez, H. Reyes-de la Cruz y J. Campos-García. 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* *liuE* gene encodes the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase, involved in leucine and acyclic terpene catabolism. FEMS Microbiol. Lett. 296: 117-123.
- Chávez-Avilés M., A. L. Díaz-Pérez y J. Campos-García. 2010. The bifunctional role of LiuE from *Pseudomonas aeruginosa*, displays additionally HHG-CoA lyase enzymatic activity. Mol. Biol. Rep. 37: 1787-123.
- Díaz-Pérez A. L., A. N. Zavala-Hernández, C. Cervantes y J. Campos-García. 2004. The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5102-5110.
- Díaz-Pérez A. L. y J. Campos-García. 2012. Convergencia catabólica de las rutas degradativas de isoprenoides acíclicos y de leucina en bacterias del género *Pseudomonas*. REB. 31(4): 127-135.
- Fall R. R., J. L. Brwn y T. L. Schaeffer. 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. Appl. Environ. Microbiol. 4: 715-722.
- Forouhar F., M. Hussain, R. Farid, J. Benach, M. Abashidze, W. C. Edstrom, S. M. Vorobjerv R. Xiao, T. B. Acton, Z. Fu, J.-J. P. Kim., H. M. Miziorko, G. T. Montelione y J. F. Hunt. 2006. Crystal structures of two bacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyases suggest a common catalytic mechanism among a family of TIM barrel metalloenzymes cleaving carbon-carbon-bonds. Jbc. 281 (11): 7533-7545.
- Föster-Fromme K., B. Höschle, C. Mack, M. Bott, W. Armbruster y D. Jendrossek. 2006. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4819-4828.
- Höschle B., V Gnau y D. Jendrossek. 2005. Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. 151: 3649-3656.
- Koolman J. y K.-H. Roehm. 2005. En Koolman, color atlas of biochemistry. Eds. Thieme. Stuttgart and New York. 467 pp.

- Lau K.-H. W., J. R. Farley y D. J. Baylink. 1989. Phosphotyrosyl protein phosphatases. *Biochem. J.* 257: 23-26.
- Miller M. L., B. Soufi, C. Jers, N. Blom, B. Macek y I. Majakovic. 2009. NetPhosBac- A predictor for Ser/Thr phosphorylation sites in bacterial proteins, in bacteria. *Proteomics*. 9(1): 116-125.
- Pimik M. P., R. M. Atlas y R. Bartha. 1974. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *J. Bacteriol.* 119: 868-878.
- Sambrook J., J. E. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª. Ed. Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schaeffer T. L., S. G. Cantwell, J. L. Brown, D. S. Watt y R. R. Fall. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 742-746.
- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *App. Microbiol. Biotechnol.*: 72:211-222.
- Tuinstra R. L. y H. M. Miziorko. 2003. Investigation of conserved acidic residues en 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *J. Biol. Chem.* 278: 37092-37098.
- Wanders R. J. A., R. B. H. Schutgens y P. H. M. Zoeters. 1988. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin. Chim. Acta* 171: 95-102.
- Won S. M. y J. J. Mekalanos. 2000. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(18): 10191-10196.
- Yanish-Peron C., J. Viera y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33: 103-119.