



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TÍTULO DE TESIS:

**“ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LA
ENZIMA ISOCITRATO LIASA (ICL) DE
Pseudomonas aeruginosa PAO1”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

M.C. ALMA LAURA DÍAZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS CAMPOS GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN, Septiembre 2023.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. JESÚS CAMPOS GARCÍA.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	v
1. RESUMEN	vii
2. ABSTRACT	viii
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1. El contexto biológico de la enzima isocitrato liasa (ICL)	1
3.1.1. Factores que influyen en la colonización microbiana.....	1
3.1.2. Asimilación de carbono a partir de sustratos gluconeogénicos	2
3.1.3. El problema de la asimilación de carbono a partir de sustratos no gluconeogénicos.....	5
3.1.4. El ciclo del glioxilato.....	5
3.1.5. Regulación de la desviación del glioxilato.....	8
3.1.6. Regulación transcripcional de la desviación del glioxilato.....	12
3.2. Generalidades de la ICL.....	14
3.2.1. Mecanismo de reacción de la ICL.....	16
3.2.2. Características físico-químicas de la ICL.....	17
3.2.3. Modificación postraducciona l de la ICL.....	18
3.2.4. Inhibidores de la ICL.....	19
3.3. Importancia de la enzima ICL en la patogenicidad microbiana	20
3.4. La familia AceA de isocitrato liasas (AceA/ICL)	23
3.5. Estructura de la ICL	25
3.5.1. El sitio catalítico de la ICL.....	29
3.5.2. Ensamblaje del homotetrámero de la ICL.....	31

4. ANTECEDENTES	34
4.1. Identificación del gen que codifica a la ICL de <i>P. aeruginosa</i>	34
4.2. Identificación de aminoácidos importantes en la ICL de <i>P. aeruginosa</i>	38
4.3. Comparación estructural entre las ICLs de <i>P. aeruginosa</i> y miembros característicos de las subfamilias 1 y 2.....	40
4.4. Importancia del extremo carboxilo de la ICL	42
4.5. Participación de la ICL en la patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i>	44
5. JUSTIFICACIÓN	50
6. HIPÓTESIS	51
7. OBJETIVO GENERAL	51
7.1. Objetivos específicos	51
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	52
9. RESULTADOS	53
9.1. Estudio de los dominios periféricos en la estructura-función de la isocitrato liasa (ICL) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
10. DISCUSIÓN	104
11. CONCLUSIONES	113
12. BIBLIOGRAFÍA	114

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Interconexión de las rutas metabólicas para la generación de energía y biomasa.....	4
Figura 2. El ciclo del glioxilato.....	7
Figura 3. Regulación del flujo de carbono entre el ciclo del glioxilato y el CAT en <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 4. Reacción general de la ICL.....	15
Figura 5. Mecanismo de la escisión retro-aldólica catalizada por la ICL.....	16
Figura 6. Árbol filogenético de la familia de enzimas AceA/ICL.....	24
Figura 7. Plasticidad del dominio TIM-barrel.....	27
Figura 8. Conformación de la ICL.....	33
Figura 9. Caracterización de la mutante A39.....	34
Figura 10. Contexto genómico del gen <i>aceA</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	35
Figura 11. Alineamiento de múltiples secuencias de las regiones catalíticas de las proteínas ICL seleccionadas.....	38
Figura 12. Comparación estructural de la PaICL.....	41
Figura 13. Efecto de la etiqueta de 6X-histidinas sobre la actividad de la PaICL.....	42
Figura 14. Localización de los extremos amino y carboxilo en la PaICL.....	44
Figura 15. Mutantes de <i>P. aeruginosa</i> en el ciclo del glioxilato son deficientes en el crecimiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	46
Figura 16. La actividad y la expresión de la ICL están alteradas en FRD1.....	48

Tabla 1. Clasificación de los aminoácidos de acuerdo al intermediario que generan.....	3
Tabla 2. Relevancia de la ICL en la patogenicidad microbiana.....	21
Tabla 3. ICLs cristalizadas e ingresadas a la base de datos PBD.....	25
Tabla 4. Propiedades relacionadas a los dominios insertados en la periferia del dominio TIM-barrel.....	28
Tabla 5. Elementos conservados en ICLs de las subfamilias 1, 2 y 3.....	31
Tabla 6. Actividad de ICL en cepas de <i>P. aeruginosa</i> crecidas en varias fuentes de carbono.....	37
Tabla 7. Constantes cinéticas de la PaICL y de las mutantes sitio dirigidas.....	40
Tabla 8. Modificaciones realizadas en el extremo carboxilo de la ICL.....	43
Tabla 9. La ICL es requerida para la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> en los modelos de alfalfa y de pulmón de rata.....	46

ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
A	Alanina
AA	Aminoácido(s)
AH	Aconitato hidratasa
AceK	ICD cinasa/fosfatasa
AnICL	Isocitrato liasa de <i>Aspergillus nidulans</i>
B ^c	Base catalítica
C	Cisteína
CaICL	ICL de <i>Candida albicans</i>
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CICL	PaICL con una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo
CPEP	Carboxifosfoenolpiruvato
CS	Citrato sintasa
D	Aspartato
DI	Dominio I
DII	Dominio II
DIII	Motivo extendido
E	Glutamato
EcICL	Isocitrato liasa de <i>Escherichia coli</i>
F	Fenilalanina
FRD1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> aislada de una infección crónica pulmonar
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
ICD	Isocitrato deshidrogenasa sensible a AceK
ICL	Isocitrato liasa
IcIR	Regulador isocitrato liasa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa insensible a la AceK
K	Lisina
k_{cat}	número de recambio
k_{cat}/K_m	eficiencia catalítica
kDa	kilodaltones
KDPG	2-dehidro-3-deoxi-fosfogluconato

KPHMT	Cetopantoato hidroximetiltransferasas
L	Leucina
M	Metionina
MD	Malato deshidrogenasa
MICL	2-metilisocitrato liasas
MoICL	Isocitrato liasa de <i>Magnaporthe oryzae</i>
MS	Malato sintasa
MtICL	Isocitrato liasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Asparagina
NICL	PaICL con una etiqueta de histidinas en el extremo amino
nt	Nucleótido(s)
OAH	Oxalacetato hidrolasas
ORF	Marco de lectura abierto
P	Prolina
PaICL	Isocitrato liasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	Pares de bases
PbICL	Isocitrato liasa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPH	Fosfoenolpiruvato hidrolasas
PEPM	Fosfoenolpiruvato mutasas
Q	Glutamina
R	Arginina
RamB	Regulador del metabolismo del acetato
S	Serina
ScICL	Isocitrato liasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Treonina
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TIM-barrel	Dominio del barril de la triosafosfato isomerasa
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Valina
VPF	Vía de las pentosas fosfato
W	Triptófano
Y	Tirosina

1. RESUMEN

La capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para asimilar nutrientes es esencial para la colonización de nichos ambientales y contribuye con su patogenicidad. La enzima isocitrato liasa (ICL) es la primera enzima del ciclo del glioxilato y desvía al isocitrato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos hacia la producción de glioxilato y succinato. La ICL de *P. aeruginosa* (PaICL) se considera como un factor de virulencia, debido a su función en la asimilación de carbono durante la infección. La familia de proteínas AceA/ICL está integrada por subfamilias que comparten el dominio I catalítico, el cual corresponde al dominio del barril de la trisafosfato isomerasa (TIM-barrel). El extremo carboxilo del dominio I es esencial para la ICL de *Escherichia coli* (EclCL) de la subfamilia 1. La PaICL es parte de la subfamilia 3, tiene al dominio II insertado en la periferia del dominio I, el cual se propuso que participa en la oligomerización de la enzima. Adicionalmente, la PaICL contiene al motivo $\alpha 13$ -loop- $\alpha 14$ (motivo extendido), el cual sobresale de la enzima y se desconoce su función. El propósito de este trabajo consistió en dilucidar la función del dominio II, del motivo extendido, y la región del extremo carboxilo en la función de la PaICL y su participación en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1. La delección del dominio II y del motivo extendido resultó en la inactivación y en la inestabilidad estructural de la enzima. La adición de la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo de la PaICL originó una enzima menos eficiente que la PaICL etiquetada en el extremo amino; sin embargo, no se afectó la asimilación de acetato o la virulencia de la bacteria. El homotetrámero de la PaICL se estabilizó por interacciones iónicas y el extremo carboxilo fue crítico para la conformación de la estructura cuaternaria de la PaICL. Estos resultados indican que el dominio II y el motivo extendido de la PaICL son esenciales para estructura/función de la enzima y el extremo carboxilo participa en la conformación de la estructura cuaternaria.

Palabras clave: patogenicidad bacteriana, isocitrato liasa, *Pseudomonas aeruginosa*, estructura proteica, TIM-barrel.

2. ABSTRACT

The capacity of *Pseudomonas aeruginosa* to assimilate nutrients is essential for niche colonization and contributes to its pathogenicity. Isocitrate lyase (ICL) is the first enzyme of the glyoxylate cycle and redirects isocitrate from the tricarboxylic acid cycle to render glyoxylate and succinate. *P. aeruginosa* ICL (PaICL) is regarded as a virulence factor, due to its role in carbon assimilation during infection. The AceA/ICL protein family is integrated by subfamilies that share the catalytic domain I, which corresponds to triosephosphate isomerase barrel (TIM-barrel) domain. The carboxyl terminus of domain I is essential for *Escherichia coli* ICL (EciCL) of subfamily 1. PaICL, which belongs to subfamily 3, has domain II inserted at the periphery of domain I, which is believed to participate in enzyme oligomerization. In addition, PaICL has the $\alpha 13$ -loop- $\alpha 14$ motif (extended motif), which protrudes from the enzyme core, being of unknown function. The aim of this study was to elucidate the role of domain II, the extended motif and the carboxyl-terminal region in the function of the PaICL enzyme, and their involvement in the virulence of *P. aeruginosa* PAO1. Deletion of domain II and the extended motif resulted in inactivation and structural instability of the enzyme. The addition of a histidine tag at the C-terminus of PaICL resulted in a less efficient enzyme than the PaICL tagged at the N-terminus, but without affecting the acetate assimilation or virulence of the bacterium. The PaICL homotetramer is stabilized by ionic interactions and the C-terminus is critical for conformation of the PaICL quaternary structure. The results indicate that domain II and the extended motif of PaICL are essential for structure/function of the enzyme, and the C-terminus participates in the quaternary structure conformation.

Key words: bacterial-pathogenicity, isocitrate lyase, *Pseudomonas aeruginosa*, protein structure, TIM-barrel.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. El contexto biológico de la enzima isocitrato liasa (ICL)

3.1.1. Factores que influyen en la colonización microbiana

Los microorganismos, incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa*, modulan su fisiología celular frente a los cambios de temperatura, pH, presión osmótica, disponibilidad de oxígeno y de nutrientes en su ambiente local. Esta capacidad de adaptación es lo que les permite prosperar en diferentes nichos ambientales, tales como ambientes terrestres y acuáticos, organismos inferiores, plantas, insectos y animales, entre ellos al hombre (Hoboth *et al.* 2009; Lam *et al.* 2014; Campilongo *et al.* 2017; Perinbam *et al.* 2020). La adaptación a diferentes ambientes depende de varios factores, entre los que se encuentran la presencia de: (i) sistemas efectivos para la resistencia al estrés externo, (ii) proteínas sensoras, (iii) vías de transducción de señales, (iv) reguladores transcripcionales y v) la capacidad de adquirir y asimilar nutrientes (Poncet *et al.* 2009; Lam *et al.* 2014; Campilongo *et al.* 2017).

Las proteínas sensoras le permiten al microorganismo percibir constantemente las características del medio que los rodea como el pH, la temperatura, la concentración de sales y la presencia de nutrientes. Estos parámetros limitan el crecimiento y suponen un estrés al cual la bacteria debe adaptarse para mantener la homeostasis celular (Lam *et al.* 2014; Bonilla 2020). Las señales que perciben los microorganismos se integran a través de las vías de transducción de señales para modular la expresión génica bajo el control de los reguladores transcripcionales, lo que finalmente llevará a la producción de proteínas para poder responder al estímulo detectado, tratándose de una situación que impone un estrés ambiental o por la presencia de un nutriente (Nishijyo *et al.* 2001; Lam *et al.* 2014; Bonilla 2020).

La capacidad de adquirir y asimilar nutrientes parece ser clave para la exitosa colonización de la mayoría de los nichos ambientales, incluyendo nichos específicos dentro de organismos hospederos (Lam *et al.* 2014; Campilongo *et al.* 2017), dado que, todos los microorganismos requieren de una fuente de carbono y energía para crecer y multiplicarse (Somerville y Proctor, 2009).

3.1.2. Asimilación de carbono a partir de sustratos gluconeogénicos

La célula bacteriana, a partir del rompimiento enzimático de moléculas complejas que provienen del hospedero o de la materia orgánica en descomposición, obtiene una variedad de sustratos que utiliza como fuente de carbono y energía, tales como carbohidratos, lípidos, glicolípidos, ácidos dicarboxílicos y aminoácidos (AA) (Muñoz-Elías *et al.* 2005; Somerville y Proctor 2009; Díaz-Pérez *et al.* 2016). Una vez dentro de la célula, los nutrientes son canalizados a las rutas del metabolismo central para proveer a la célula de energía en forma de ATP y de equivalentes reductores. Además, de los precursores necesarios para la síntesis de las macromoléculas que soportan las funciones biológicas y el crecimiento del organismo (Figura 1) (Muñoz-Elías *et al.* 2005; Murima *et al.* 2016; Campilongo *et al.* 2017; Dolan y Welch 2018). Al mismo tiempo se restablecen las pozas de los precursores, mediante las reacciones anapleróticas, a un nivel suficiente para mantener el flujo metabólico, de manera que hay un equilibrio entre la oxidación de metabolitos para la ganancia de energía y la asimilación de carbono para sustentar la producción de biomasa (Muñoz-Elías *et al.* 2005; Murima *et al.* 2016). Por ejemplo, *Escherichia coli* en cultivo axénico dirige la mitad de la glucosa disponible hacia las vías biosintéticas y la otra mitad la usa para la generación de energía (Muñoz-Elías *et al.* 2005).

Los compuestos como los carbohidratos se metabolizan hacia el piruvato, el cual puede seguir dos vías. La primera está destinada para la generación de energía mediante el intermediario acetil-CoA, el cual al entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) se oxida completamente a CO₂, lo que genera poder

reductor en forma de NADH_2 y FADH_2 . Posteriormente, en la fosforilación oxidativa, los equivalentes reductores generan grandes cantidades de ATP (Muñoz-Elías *et al.* 2005; Doelle 2014; Schink *et al.* 2022). En el CAT, el carbono del acetil-CoA se pierde como CO_2 , debido a las dos reacciones de descarboxilación que forman parte del ciclo, por lo que en esta ruta no hay asimilación neta de carbono para la producción de biomasa (Muñoz-Elías *et al.* 2005; Dolan *et al.* 2018). La segunda vía que puede seguir el piruvato va dirigida hacia la conservación de carbono para la generación de biomasa, ya que el piruvato, al ser un intermediario gluconeogénico, puede contribuir a la síntesis de la glucosa vía el oxalacetato, dándose una ganancia neta de carbono (Figura 1) (Oh *et al.* 2002; Muñoz-Elías *et al.* 2005; Murima *et al.* 2016). Otros precursores gluconeogénicos son los AA glucogénicos y los AA glucogénicos-cetogénicos (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los aminoácidos de acuerdo al intermediario que generan.

Tipo de Aminoácido	Aminoácido
Glucogénico	Alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, metionina, prolina, serina, valina y lisina*
Cetogénico	Leucina
Glucogénico-cetogénico	Fenilalanina, isoleucina, treonina, triptófano y tirosina

* En los mamíferos es un aminoácido cetogénico.

Los AA glucogénicos y los glucogénicos-cetogénicos ingresan al CAT en pasos posteriores a las reacciones de descarboxilación (vía piruvato, oxalacetato, fumarato, succinil-CoA y α -cetoglutarato) por lo que producen poder reductor y aumentan las pozas de los intermediarios del CAT. Esto contribuye con más carbono del que se pierde como CO_2 y dirige el flujo de carbono hacia el oxalacetato para la producción de glucosa o se desvía a alguno de los intermediarios del ciclo hacia otras rutas biosintéticas, lo que finalmente lleva a la producción de biomasa (Figura 1) (Owen *et al.* 2002; Knorr *et al.* 2018; Tetrick y Odle 2020).

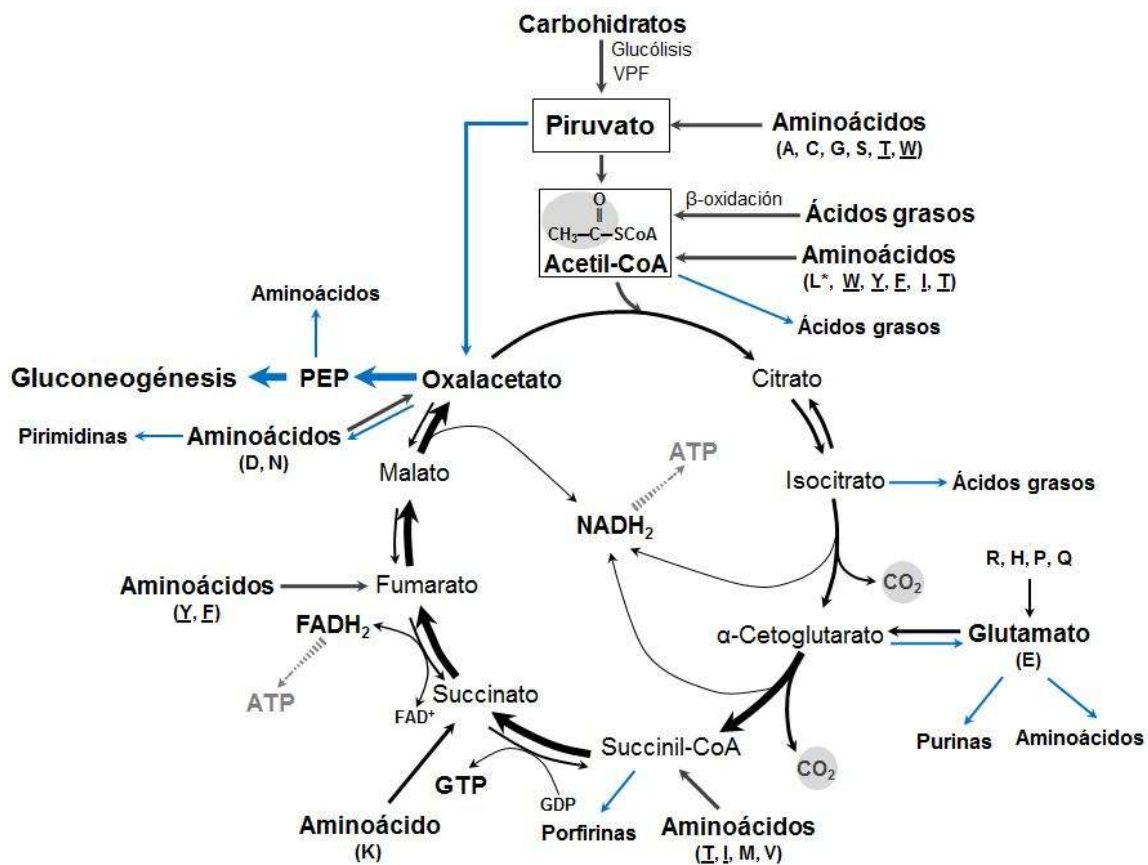


Figura 1. Interconexión de las rutas metabólicas para la generación de energía y biomasa. Los compuestos que generan intermediarios gluconeogénicos (los carbohidratos y varios AA) aportan carbono para la síntesis de la glucosa, además de ser anapleróticos, ya que pueden rellenar las pozas de los intermediarios del CAT, lo que aporta más carbono del que se libera como CO₂. Los compuestos que se metabolizan vía el acetil-CoA (ácidos grasos y los AA cetogénicos) no generan asimilación neta de carbono, ya que los dos carbonos de la molécula se liberan como CO₂ en el CAT, por lo que no se acumula carbono para la producción de biomasa. En un marco están los intermediarios en donde convergen varias rutas metabólicas. Las flechas gruesas indican el flujo de carbono dirigido hacia la gluconeogénesis. Las flechas azules indican el flujo de carbono que va hacia otras vías biosintéticas. CAT, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; VPF, vía de las pentosas fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; AA, aminoácido(s). El AA cetogénico aparece con el asterisco y es L, leucina. Los AA glucogénicos-cetogénicos aparecen subrayados y son: W, triptófano; Y, tirosina; F, fenilalanina; I, isoleucina y T, treonina. Los AA glucogénicos aparecen sin ningún distintivo y son: A, alanina; C, cisteína; G, glicina; S, serina; R, arginina; H, histidina; P, prolina; Q, glutamina; E, glutamato; M, metionina; V, valina; D, aspartato; N, asparagina y K, lisina. En mamíferos la lisina es un AA cetogénico.

3.1.3. El problema de la asimilación de carbono a partir de sustratos no gluconeogénicos

Las fuentes de carbono no gluconeogénicas, como los ácidos grasos y el AA cetogénico leucina, entre otras (Figura 2), se caracterizan por producir como intermediario metabólico al acetil-CoA. Este intermediario no genera ganancia neta de carbono, como ya se mencionó anteriormente; por lo tanto, no hay carbono para dirigirlo hacia la síntesis de la glucosa, ni para el reabastecimiento de los intermediarios del CAT que fueron canalizados hacia otras rutas biosintéticas, como consecuencia de esto, no se genera biomasa para el crecimiento (Dunn *et al.* 2009; Ahn *et al.* 2016; Campilongo *et al.* 2017; Dolan *et al.* 2018). Este problema de asimilación de carbono es resuelto por muchas bacterias, entre ellas *P. aeruginosa*, mediante la activación de una ruta que se conoce como el ciclo del glioxilato (Figura 2), que se encarga de desviar el flujo de carbono de los pasos de descarboxilación oxidativa del CAT, es decir, evita la pérdida de carbono, lo que le permite al organismo conservar este elemento para la generación de biomasa (Campilongo *et al.* 2017; Dolan *et al.* 2018).

3.1.4. El ciclo del glioxilato

El ciclo del glioxilato fue descrito en 1957 por Kornberg y Krebs en *Pseudomonas fluorescens* KB1 al observar la síntesis de los ácidos dicarboxílicos a partir del acetato. Este ciclo está presente en una gran variedad de organismos procariontes y eucariontes (Dunn *et al.* 2009; Eprintsev *et al.* 2014; Dolan *et al.* 2018). En los genomas bacterianos, los genes que codifican a las enzimas que forman parte del ciclo solo se encontraron en los microorganismos capaces de llevar a cabo un metabolismo aeróbico (Ahn *et al.* 2016). En los mamíferos, su presencia es controversial; sin embargo, la mayoría de las investigaciones concuerdan en que el ciclo está ausente en estos organismos (Vanni *et al.* 1990; Eprintsev *et al.* 2014; Campilongo *et al.* 2017; Tetrick *et al.* 2020).

El ciclo del glioxilato se induce en las bacterias cuando crecen en presencia de compuestos como el acetato, los ácidos grasos, los alcanos, polímeros como el poli- β -hidroxibutirato, los terpenos acíclicos, el etanol y los AA cetogénicos como la leucina. Todos estos compuestos tienen en común que durante su degradación principalmente generan como intermediario metabólico al acetil-CoA y no producen intermediarios gluconeogénicos (Aguilar *et al.* 2006; Díaz-Pérez *et al.* 2007; Dunn *et al.* 2009; Ahn *et al.* 2016; Dolan *et al.* 2018).

En la reacción global del ciclo del glioxilato, dos moléculas de acetil-CoA se transforman en una molécula de oxalacetato, de esta manera se regeneran los dos carbonos perdidos como CO₂ en el CAT, cuando el isocitrato se particiona entre el CAT para producir energía y el ciclo del glioxilato para conservar carbono (Figura 2) (Gainey *et al.* 1991; Britton *et al.* 2001). Así, el ciclo del glioxilato asegura el suplemento de intermediarios del CAT para la biosíntesis de carbohidratos, lo cual es esencial para el crecimiento (Britton *et al.* 2001; Marrero *et al.* 2010).

El ciclo consiste en cinco reacciones, tres de las cuales se comparten con el CAT y corresponden a las reacciones que realizan las enzimas malato deshidrogenasa, citrato sintasa y aconitato hidratasa, la cual también se conoce como aconitasa (Figura 2). Las dos reacciones restantes son exclusivas del ciclo del glioxilato y una de ellas forma parte de la desviación del glioxilato, que hace referencia a la bifurcación que sufre el isocitrato, alejándolo del CAT y llevándolo hacia la producción de malato y succinato mediante las dos reacciones enzimáticas que catalizan las enzimas únicas de este ciclo (Figura 2) (Dunn *et al.* 2009; Fahnoe *et al.* 2012).

En la primera de estas reacciones, la isocitrato liasa (ICL) cataliza el rompimiento del isocitrato en glioxilato y succinato y en la segunda reacción, el acetil-CoA se condensa con el glioxilato para formar malato, mediante la enzima malato sintasa (Figura 2) (Dunn *et al.* 2009; Eprintsev *et al.* 2014; Dolan *et al.*

2018). En resumen, durante el ciclo del glioxilato, dos moléculas de acetil-CoA y una molécula de oxalacetato originan una molécula de succinato y una molécula de malato, que puede oxidarse a oxalacetato o puede transformarse a fumarato y posteriormente a succinato utilizando una molécula de NADH₂, esta última serie de reacciones representa la ruta para la bioproducción del succinato (Dunn *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2012; Choi *et al.* 2015).

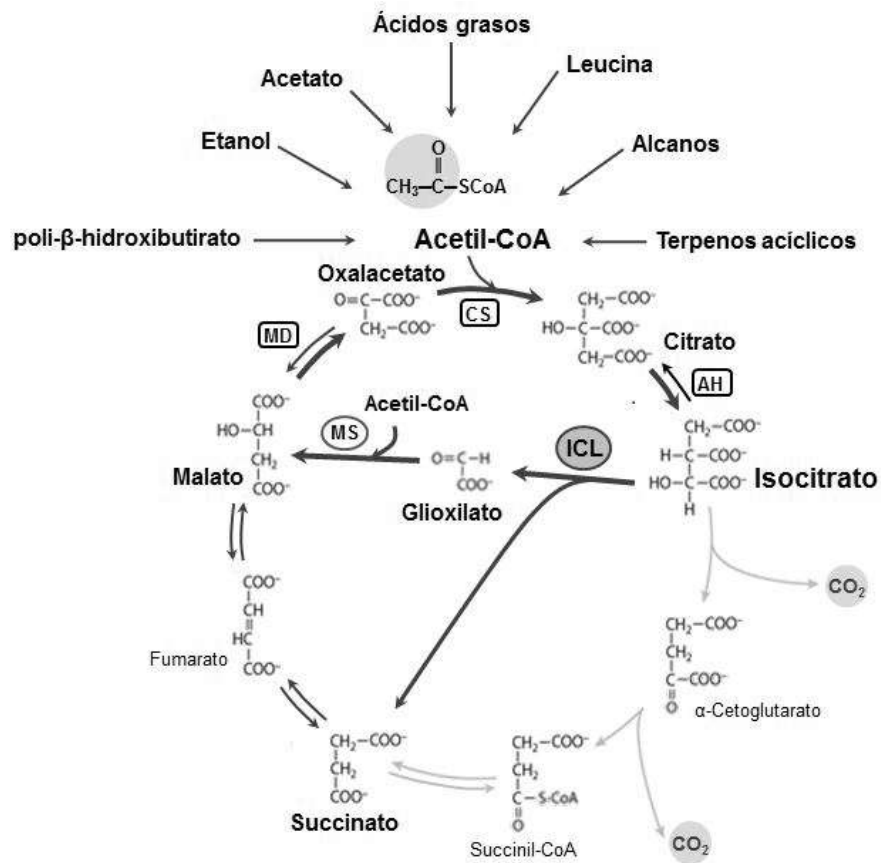


Figura 2. El ciclo del glioxilato. El catabolismo de varios compuestos genera al acetil-CoA como intermediario metabólico. En la primera reacción del ciclo del glioxilato, la enzima ICL desvía al isocitrato del CAT, evitando las reacciones de descarboxilación oxidativa, las cuales liberan carbono en forma de CO₂. Esto permite conservar el carbono para que se lleven procesos como la gluconeogénesis y la anaplerosis. CAT, ciclo de los ácidos tricarbónicos; ICL, isocitrato liasa; MS, malato sintasa; MD, malato deshidrogenasa; CS, citrato sintasa; AH, aconitasa hidratasa. El ciclo del glioxilato se indica con las flechas gruesas. Modificado de Dolan *et al.* (2018).

3.1.5. Regulación de la desviación del glioxilato

El paradigma del particionamiento del isocitrato entre el CAT y el ciclo del glioxilato en *E. coli* permaneció por varios años; sin embargo, cuando se estudió la regulación en *Mycobacterium smegmatis* se observó que era diferente, al igual que en *P. aeruginosa*, cuyo mecanismo se describió recientemente (Crousilles *et al.* 2018). Los tres modelos comparten que la regulación se ejerce sobre las enzimas: (i) la ICD cinasa/fosfatasa (AceK), (ii) la isocitrato deshidrogenasa sensible a AceK (ICD), (iii) la isocitrato deshidrogenasa insensible a la AceK (IDH) y (iv) la ICL. Estas enzimas se ubican en el punto de la bifurcación entre el CAT y el ciclo del glioxilato; por lo tanto, son las encargadas de direccionar el flujo de carbono entre ambos ciclos (Miller *et al.* 2000; Murima *et al.* 2016; Crousilles *et al.* 2018).

La regulación del flujo de carbono entre el CAT y el ciclo del glioxilato en *E. coli* es la más simple, ya que la controla la fosforilación reversible de la ICD. Cuando *E. coli* crece en acetato, la ICD y la ICL compiten por el mismo sustrato, pero la afinidad de la ICD por el isocitrato es ~75 veces mayor que la afinidad de la ICL. Por lo tanto, la primera tiene que ser inhibida para permitir que aumente la concentración intracelular del isocitrato y entonces se dirija hacia el ciclo del glioxilato. La actividad de la ICD se regula a través de la enzima bifuncional AceK, que se encarga de fosforilar a la ICD por medio de su actividad cinasa en la serina 113, que se localiza en el sitio activo de la ICD. La fosforilación de este residuo ocasiona la inactivación de la enzima. La actividad fosfatasa de la AceK revierte la inactivación de la ICD mediante la desfosforilación del residuo de serina. De esta manera, la AceK determina el grado de fosforilación de la ICD y a su vez esto determina como se reparte el sustrato entre el CAT y el ciclo del glioxilato. Cuando *E. coli* crece en acetato, la ICD se inactiva parcialmente (~70%), forzando la entrada del isocitrato al ciclo del glioxilato (Miller *et al.* 2000; Dolan *et al.* 2018). Hay dos clases de compuestos que regulan a la enzima AceK: (i) los compuestos que interactúan directamente sobre la enzima y (ii) los compuestos que ejercen su función de manera indirecta, uniéndose a la ICD, y así impiden que la AceK

realice su función. El NADP⁺, el NADPH y el isocitrato pertenecen a la segunda clase; tanto el NADP reducido u oxidado inhiben la actividad fosfatasa y cinasa de la AceK, mientras que el isocitrato solo inhibe la actividad cinasa. Dentro de la primera clase de compuestos se encuentra el AMP y algunos intermediarios de la glucólisis, como el 3-fosfoglicerato y el piruvato, que estimulan la actividad fosfatasa de AceK, mientras que inhiben su actividad cinasa, lo que favorece el direccionamiento del isocitrato hacia el CAT (Miller *et al.* 2000).

La regulación de la distribución del isocitrato entre el CAT y el ciclo del glioxilato en *M. smegmatis* no implica a la enzima AceK, ya que carece de un homólogo de esta enzima, y aunque cuenta con dos isocitrato deshidrogenasas, la IDH y la ICD, solo la IDH (la forma insensible a AceK) es importante para dirigir el flujo de carbono hacia el CAT. Además, la diferencia de afinidades entre la IDH y la ICL es solo de un factor de 7, por lo que no es necesaria la acumulación del sustrato para dirigir el flujo hacia el ciclo del glioxilato. En esta bacteria se propuso un modelo que consiste en un mecanismo tipo reostato, en el cual el glioxilato estimula la actividad de la IDH. A la par que el flujo de carbono va aumentando a través de la ICL, también lo hace la concentración del glioxilato, el cual activará alostéricamente a la IDH, lo que provoca que progresivamente disminuya el flujo de carbono hacia el ciclo del glioxilato y vaya aumentando el flujo de carbono hacia el CAT (Crousilles *et al.* 2018; Dolan *et al.* 2018).

La complejidad en la regulación del flujo de carbono entre el CAT y el ciclo del glioxilato en *P. aeruginosa* no solo radica en que abarca a ambos mecanismos, sino que también incluye a ambas isocitrato deshidrogenasas (Figura 3). El mayor control del flujo de carbono entre ambos ciclos podría deberse a que la bacteria se caracteriza por preferir otras fuentes de carbono sobre los carbohidratos, exhibiendo una particular preferencia por los ácidos grasos; por lo tanto, debe haber un fino balance en el control de la distribución del isocitrato de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la bacteria (Sonnleitner *et al.* 2012; Crousilles *et al.* 2018). En *P. aeruginosa*, la ICL, la ICD y la IDH

compiten por el mismo sustrato y a diferencia de lo que se observó en *E. coli* y en *M. smegmatis*, en este modelo la ICL, la ICD y la IDH prácticamente tienen la misma afinidad por el sustrato, por lo que el flujo de carbono no se favorece hacia uno de los ciclos en particular; por lo tanto, en este punto es necesario ejercer un estricto control para direccionar el flujo de carbono entre ambos ciclos. Los precursores gluconeogénicos piruvato y oxalacetato son los principales reguladores del modelo, ya que recíprocamente controlan a la ICL, a la IDH y a la ICD (esta última a través del control que se ejerce sobre la enzima AceK), coordinando la distribución del flujo de carbono entre el CAT y el ciclo del glioxilato (Crousilles *et al.* 2018).

Cuando el piruvato y el oxalacetato son abundantes (lo que indica que hay suficiente carbono para la producción de biomasa), el flujo hacia el CAT se favorece y el flujo hacia el ciclo del glioxilato se reprime, ya que el piruvato y el oxalacetato activan alostéricamente a la IDH y estimulan la actividad de fosfatasa de AceK, lo que conduce a la activación de la ICD; mientras que inhiben alostéricamente a la ICL, junto con el fosfoenolpiruvato (PEP), el succinato y la CoA (Figura 3). Hay varios precursores gluconeogénicos que también estimulan la actividad de fosfatasa de AceK (llevando a la activación de la ICD), tales como el fumarato, el α -cetoglutarato y el isocitrato, además del gliceraldehído 3-fosfato. Por el contrario, cuando el piruvato y el oxalacetato escasean, la IDH se desactiva y la ICL se desinhibe, restaurando el flujo hacia el ciclo del glioxilato (Figura 3). Se espera que durante la limitación del oxalacetato (indicando que es necesaria la anaplerosis) y en el crecimiento de la bacteria en fuentes de carbono cetogénicas se acumule el acetil-CoA, lo que lleva a la estimulación de la actividad cinasa de AceK, promoviendo la forma inactiva de la ICD y llevando el flujo hacia el ciclo del glioxilato (Crousilles *et al.* 2018).

El control reostático en *P. aeruginosa* opera directamente sobre tres de las cuatro enzimas que participan en el punto de ramificación entre el CAT y el ciclo del glioxilato. El control reostático se ejerce mediante los productos de la reacción

Como prueba de la efectividad del control que se ejerce en el punto de ramificación entre el CAT y el ciclo del glioxilato en *P. aeruginosa*, es que la mutante Δ PA5438 en el represor que controla la transcripción de los genes que codifican a la ICL y a la MS, presentó una alta expresión de las enzimas ICL y MS cuando creció en glucosa; sin embargo, su velocidad de crecimiento fue similar a la cepa silvestre, por lo que la expresión de las enzimas no le impuso una presión metabólica que no pudiera compensar, debido a que una que vez que las enzimas se sintetizan, todavía están sujetas a una fuerte represión alostérica y al control reostático (Dolan *et al.* 2020).

3.1.6. Regulación transcripcional de la desviación del glioxilato

En un principio, el prototipo del control transcripcional surgió de la regulación que se observó en *E. coli*. Los genes que codifican a las enzimas exclusivas del ciclo del glioxilato, la ICL y la MS, forman un operón en esta bacteria, junto con el gen que codifica a la enzima AceK, dando origen al operón *aceBAK*, el cual está bajo el control negativo del regulador isocitrato liasa (IclR). Cuando la bacteria crece en acetato o ácidos grasos, el regulador se separa del sitio operador y entonces el operón puede transcribirse. Varias moléculas que se probaron *in vitro* funcionaron como inductores, por ejemplo, el glioxilato evita que el IclR se una a la región operadora, permitiendo la transcripción de los genes, ya que estabiliza al dímero del represor IclR, que es la forma inactiva e la proteína; por el contrario, el piruvato induce la represión, debido a que estabiliza al homotetrámero del IclR, que es la forma activa que se une al DNA, evitando la transcripción. La regulación del gen que codifica al IclR está bajo su propio control, en este caso funciona como un represor, aunque el inductor aún no se identifica, mientras que el regulador FadR es un activador de la transcripción del gen *iclR* (Dolan *et al.* 2018).

En *Corynebacterium glutamicum*, la regulación transcripcional se lleva a cabo mediante el regulador del metabolismo del acetato (RamB), ya que no

cuenta con un homólogo del regulador IclR. RamB reprime la transcripción de los genes *aceA* y *aceB* (este último codifica a la malato sintasa) en ausencia de acetato. En *Mycobacterium tuberculosis*, durante el crecimiento en glucosa, RamB se reprime a sí mismo y al gen *icl1*, que codifica a la ICL. En propionato, el regulador transcripcional PrpR actúa como un activador transcripcional del gen *icl1* y como un represor para el gen *ramB*, lo que permite la transcripción del gen *icl1* (Masiewicz *et al.* 2012; Dolan *et al.* 2018).

En *P. fluorescens*, los genes relacionados con la desviación del glioxilato, *aceA* y *glcB*, forman parte del regulón RccR, junto con otros genes del metabolismo del carbono. El inductor del regulador transcripcional RccR es el 2-dehidro-3-deoxi-fosfogluconato (KDPG), que es un intermediario del catabolismo de la glucosa por la ruta Entner-Doudoroff. RccR se une en el repetido palindrómico TGTAGT/ACTACA, que se ubica en las regiones promotoras de los genes blanco. El palíndromo es parte de dos secuencias consenso, una de 28 nt y otra de 15 nt, a las cuales se une diferencialmente RccR en presencia del inductor. En una alta concentración de KDPG, como pasa cuando la bacteria crece en glucosa, glicerol o piruvato, la afinidad de RccR por la secuencia de 28 nt es alta. Esto lleva a la represión de los genes *aceA* y *glcB* del ciclo del glioxilato y al gen *pckA* de la gluconeogénesis. En la condición antes mencionada, la afinidad por la secuencia de 15 nt disminuye, liberando la represión del operón *aceE/F*, cuyos genes codifican a la enzima piruvato deshidrogenasa, que participa en la conversión del piruvato a acetyl-CoA. Contrariamente, cuando los niveles de KDPG son bajos, por ejemplo, en acetato, la afinidad de RccR por el consenso de 28 nt disminuye y aumenta la afinidad por el consenso de 15 nt, permitiendo la transcripción de los genes *aceA*, *glcB* y *pckA*, mientras que reprime a los genes *aceE/F*. La diferencia de afinidades que muestra RccR con la unión del efector permite que se produzca una respuesta regulatoria integrada frente a la fuente de carbono presente en el medio (Campilongo *et al.* 2017).

En *P. aeruginosa* los genes *aceA* y *glcB* codifican a la ICL y a la MS, respectivamente. Estos genes no se encuentran formando un operón; sin embargo, ambos están bajo el control independiente del producto del ORF PA5438, el cual codifica a un probable regulador transcripcional de la familia RpiR. Los integrantes de esta familia se caracterizan por participar en la regulación de genes involucrados en el catabolismo de carbohidratos y su dominio N-terminal tiene la conformación hélice-giro-hélice que une al DNA. La mutante en el ORF PA5438 expresó a la ICL y a la MS en glucosa, a diferencia de *P. aeruginosa* que reprime la expresión de ambas proteínas. Además, las fusiones transcripcionales con las regiones promotoras de los genes *aceA* y *glcB* dan una alta expresión del gen reportero en la mutante cuando creció tanto en glucosa como en acetato, mientras que *P. aeruginosa* mostró una alta expresión del gen reportero en acetato y una baja expresión en glucosa. Esto comprueba que los genes se reprimen durante el crecimiento en glucosa y se inducen en acetato y que el producto del ORF PA5438 funciona como un regulador negativo, que reprime la transcripción de los genes *aceA* y *glcB* durante el crecimiento de la bacteria en glucosa (Dolan *et al.* 2020).

3.2. Generalidades de la ICL

La ICL (*treo*-D_s-isocitrato glioxilato-liasa, EC 4.1.3.1) se reportó por primera vez en 1954 por Smith y Gunsalus en extractos de *P. aeruginosa* (Dunn *et al.*, 2009). La ICL es una enzima ancestral, que se distribuye ampliamente en los tres dominios de la vida, *Bacteria*, *Archea* y *Eucaria*. Dentro del dominio *Eucaria*, solo se encuentra en hongos, nematodos, plantas y protistas, (Vanni *et al.* 1990; Campos-Garcia *et al.* 2013; Lee *et al.* 2015).

Aunque con algunas excepciones, la ICL generalmente es codificada por un gen que se encuentra en una sola copia en el genoma del organismo. En procariontes, corresponde al gen *aceA* y en algunos casos al gen *icl*, mientras que en eucariontes la enzima se codifica por el gen *ICL1*, *acuD*, *acu3* o *acu7* (Bibbins

et al. 1998; Ebel *et al.* 2006; Park *et al.* 2016) (www.uniprot.org). El gen *aceA* puede encontrarse formando parte de un operón, el cual tiene dos arreglos estructurales. El primero, que es como se presenta en el genoma de *E. coli*, el operón se integra por los genes *aceBAK*, correspondientes los genes que codifican a la malato sintasa, a la ICL y a la fosfatasa/cinasa de la isocitrato deshidrogenasa, respectivamente. En el segundo arreglo, el operón consta de los genes *aceBA* y es como se encuentra en el genoma de *Yersinia pestis* (Dolan *et al.* 2018). Otra alternativa es que el gen puede aparecer en solitario en el genoma, dando origen a una unidad monocistrónica, como es el caso de *C. glutamicum*, *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis*, entre otras bacterias (Wendisch *et al.* 1997; Dolan *et al.* 2018).

En procariontes, la ICL es citoplasmática y en eucariontes se encuentra compartamentalizada, por ejemplo, en los cotiledones o en el endospermo de semillas en germinación la enzima se localiza en la matriz de los glioxisomas. En protozoarios, algas y hongos se localiza en los peroxisomas o en unos organelos tipo glioxisomas (Uchida *et al.* 1986; Vanni *et al.* 1990; Britton *et al.* 2001).

La ICL es una enzima que se activa por metal, presenta una cinética de Michaelis-Menten y tiene especificidad por el treo-D_s-isocitrato, el cual es uno de los cuatro isómeros del sustrato (Vanni *et al.* 1990; Eprintsev *et al.* 2014). La enzima cataliza la conversión reversible del isocitrato a glioxilato y succinato en una reacción dependiente de un tiol y de un catión divalente, generalmente Mg²⁺, (Figura 4) (Vanni *et al.* 1990; Dolan *et al.* 2018).

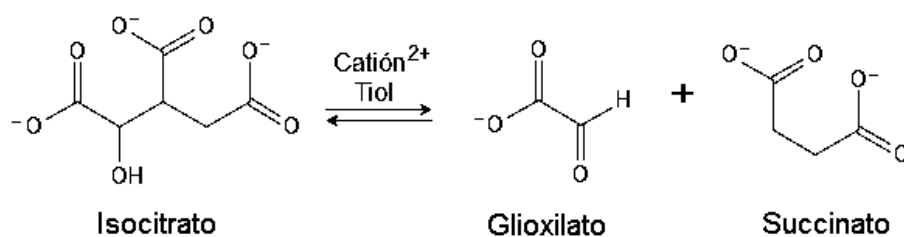


Figura 4. Reacción general de la ICL. Preferentemente, la ICL realiza la catálisis en presencia de magnesio como catión divalente. Modificada de Vanni *et al.*, 1990.

3.2.1. Mecanismo de reacción de la ICL

El mecanismo de reacción de la conversión del isocitrato a succinato y glioxilato es por escisión retro-aldólica y se detalló en la ICL de *M. tuberculosis* (MtICL). En el sitio activo, el isocitrato se encuentra coordinado con el ion magnesio (Mg^{2+}) (Figura 3A). La reacción comienza con una base catalítica (B^-) que lleva a cabo la desprotonación del grupo hidroxilo, que se ubica en el C β del isocitrato (Figura 3A y 3B), para formar el grupo carbonilo del glioxilato y al mismo tiempo el intermediario enolato, y se libera el glioxilato por el rompimiento del enlace entre el C α -C β (Figura 3B y 3C). Finalmente, el enolato se vuelve a protonar por la acción de la cisteína 191 (posición en la MtICL), que se ubica en el loop catalítico, para generar el otro producto de la reacción (Figura 3C y 3D) (Park *et al.* 2016; Pham *et al.* 2017). La H356 en la ICL de *E. coli* (EcICL) se sugirió que funciona como la base catalítica (Britton *et al.* 2000), la cual corresponde a la H352 en la MtICL.

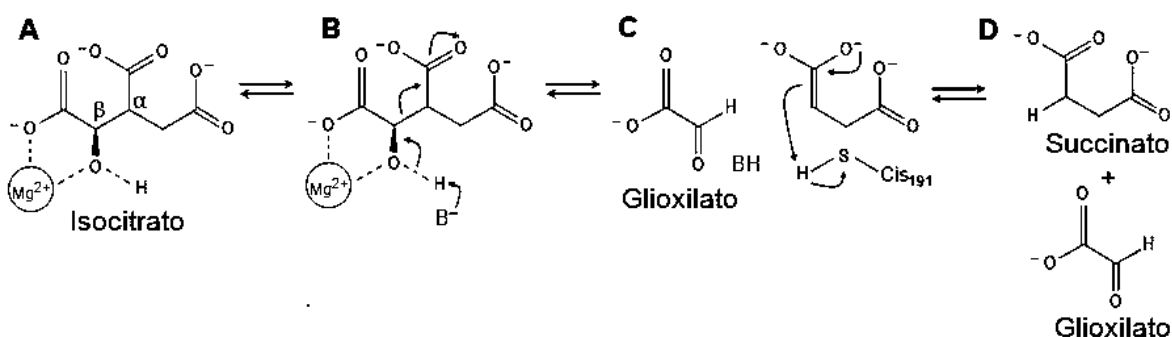


Figura 5. Mecanismo de la escisión retro-aldólica que cataliza la ICL. A. El grupo hidroxilo en la posición α se desprotona por la base catalítica (B^-). B. Se forma un grupo carbonilo y al mismo tiempo el intermediario enolato. C. Se libera el glioxilato y el enolato por el rompimiento del enlace entre los C α -C β y se vuelve a protonar el enolato por la cisteína 191 (numeración en la MtICL), que funciona como un ácido catalítico, derivando en la formación del succinato. D. El resultado final es la producción del succinato y el glioxilato. Modificada de Pham *et al.*, 2017.

3.2.2. Características físico-químicas de la ICL

El peso molecular del monómero de la ICL se encuentra en un rango de 48 kDa para las ICLs de procariontes (*E. coli*) a 75 kDa para las ICLs de eucariontes (*Saccharomyces cerevisiae*) (Lopez-Boado *et al.* 1988; Vanni *et al.* 1990). El estado oligomérico de la ICL generalmente corresponde a un homotetrámero con un arreglo de un “dímero de dímeros”, más que el de un tetrámero regular de monómeros funcionalmente idénticos (Vanni *et al.* 1990; Crousilles *et al.* 2018). Con pocas excepciones, la ICL presenta otros estados de oligomerización. En *Candida tropicalis*, dos grupos independientes la reportaron como un dímero, al igual que en *Glycine max* y como un trímero en *Pinus densiflora*. En *Cucumis sativus* es un tanto controversial, ya que se observó como un tetrámero y como un pentámero (Vanni *et al.* 1990; Eprintsev *et al.* 2014), mientras que en *Neurospora crassa* se reportó como un tetrámero y como un dímero. Sin embargo, en este organismo hay dos isoformas de la ICL, una inducible por acetato (ICL-1) y la otra constitutiva (ICL-2), la cual es responsable del 20% de la actividad total de la ICL, por lo que es probable que cada estado de oligomerización corresponda a una isoforma de esta enzima (Uchida *et al.* 1986; Gainey *et al.* 1991). En *M. tuberculosis*, la ICL se obtuvo como un dímero estable, pero solo fue funcional como un tetrámero (Lee *et al.* 2015).

El magnesio (Mg^{2+}) en concentraciones de 1.5 mM a 8 mM es el catión divalente para que la ICL realice la actividad catalítica de manera óptima. Otros cationes divalentes pueden reemplazarlo con diferentes eficiencias. El manganeso (Mn^{2+}) es el sustituto más frecuente para el Mg^{2+} , mientras que con el calcio (Ca^{2+}) solo algunas ICLs presentan actividad. Otros cationes en presencia de Mg^{2+} tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima (Vanni *et al.* 1990; Dunn *et al.* 2009). El Mg^{2+} y el Mn^{2+} actúan como activadores de la MtICL y no inducen ningún cambio estructural significativo en la enzima; sin embargo, interactúan con el TIM-barrel de la ICL y lo desestabilizan. El Zn^{2+} y el Cd^{2+} interactúan directamente con el dominio catalítico de la enzima y lo despliegan, lo que ocasiona la pérdida completa de la actividad enzimática (Kumar y Bhakuni 2008).

El punto isoeléctrico de las ICLs varía entre 4.5 y 6.6, y el pH óptimo se encuentra en un rango de 7.0 a 7.7. Muchas de las ICLs se inactivan a bajo y alto pH (Vanni *et al.* 1990; Eprintsev *et al.* 2014). La ICL se caracteriza por su inestabilidad, tanto en extracto crudo como en su forma purificada y es común que pierda la actividad durante el proceso de purificación o se obtengan preparaciones lábiles de ella, a excepción de la ICL de *S. cerevisiae* (ScICL) que demostró ser termoestable a 50°C durante 60 min en altas concentraciones de sal. Sin embargo, rápidamente perdió su actividad a -20°C o durante el proceso de diálisis (Lopez-Boado *et al.* 1988; Vanni *et al.* 1990).

3.2.3. Modificación postraducciona de la ICL

La EclCL tiene trece sitios de acetilación, la desacetilación de la lisina 13 y la lisina 331 aumentó en un 40% la actividad de la enzima, por lo que la EclCL se regula por acetilación. La actividad de la MtlCL también se modula por este mecanismo. La acetilación ocurre en los residuos K322, K331 y K392, que generan un efecto diferencial sobre la actividad enzimática, por ejemplo, la acetilación en el residuo 322 redujo la actividad de la enzima, al contrario de la acetilación en la posición 392, que la aumentó y modificó su abundancia, ya que la concentración de la MtlCL aumentó en los cultivos de *M. tuberculosis* crecidos en acetato o propionato, probablemente protegiéndola del recambio. Además, la acetilación en la K322 ocasionó la disminución en la actividad de 2-metilisocitrato liasa de la MtlCL (Dolan *et al.* 2018). Otra modificación que presenta la MtlCL es la pupilación, que es un sistema para marcar proteínas para su degradación en el proteosoma, de manera similar a la ubiquitinación de proteínas en eucariontes. La proteína pequeña Pup se une a su sustrato, que es una lisina en el extremo carboxilo de la proteína blanco. La MtlCL presentó un sitio de pupilación en la K334, a la cual se le unió covalentemente Pup. Además, la acumulación de la MtlCL recombinante en las mutantes *mpa* y *pafA*, que están afectadas en la degradación de proteínas, sugirió que la MtlCL es blanco para la degradación en el proteosoma (Festa *et al.* 2010).

En *S. cerevisiae*, la ICL es blanco de la regulación postraduccional a través de la ubiquitinación, que como se mencionó antes, es un proceso que marca a las proteínas para que sean transportadas a los proteosomas para su degradación. La ScICL tiene una señal para degradación en su extremo amino, conocida como N-degrón. Esta señal la reconoce la subunidad GID4 de la ubiquitin ligasa GID. GID4 es el componente de reconocimiento de la vía N-degrón, la cual es un sistema proteolítico que reconoce y poliubiquitina proteínas para su degradación en el proteosoma (Chen *et al.* 2017; Hiragi *et al.* 2021).

La regulación postraduccional parece ser el mecanismo de regulación de la ICL en el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* durante su estadio de levadura. La ICL de *P. brasiliensis* (PbICL) se expresó constitutivamente en células levaduriformes; sin embargo, durante el crecimiento en glucosa se detectó una baja actividad enzimática, a pesar de que la concentración de la enzima no se modificó, además, la enzima se fosforiló extensivamente. Cuando la PbICL se desfosforiló, aumentó su actividad y el patrón de fosforilación fue similar al que presentó la PbICL en células crecidas en acetato, que se caracterizan por tener una alta actividad enzimática. El mecanismo de inactivación de la PbICL por medio de la fosforilación reversible representa una nueva estrategia para la rápida adaptación de *P. brasiliensis* al ambiente (da Silva Cruz *et al.* 2011).

3.2.4. Inhibidores de la ICL

La ICL generalmente se inhibe por análogos del succinato (itaconato, 3-nitropropionato y malonato), del glioxilato (oxalato) y del piruvato (3-bromopiruvato), además, del ácido maleico. Por otro lado, los intermediarios con relación al metabolismo del carbono (citrato, CoA, glicolato, malato, oxalacetato, fosfoenolpiruvato, piruvato y succinato) ejercen un efecto diferencial, que depende de la fuente de la enzima (Shin *et al.* 2005; Lee *et al.* 2015; Crousilles *et al.* 2018). Algunos aniones (Cl^- , NO_3^- , CH_3COO^- , HPO_4^{2-} y SO_4^{2-}) y metales pesados (Cd, Pb, Cu y Ni) también tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima (Vanni *et al.*

1990). Debido a que la ICL se considera como un potencial blanco terapéutico, en años recientes se identificaron nuevos inhibidores de la MtlICL y de la ICL de *Candida albicans* (CaICL), ya que el número de casos por infecciones ocasionadas por estos microorganismos ha ido en aumento (Lee *et al.* 2015; Li *et al.* 2015). Entre los nuevos inhibidores que son efectivos contra la MtlICL, se encuentran los derivados de la fluoroquinolona y ptalizinilo, análogos del piruvato-isoniazida, el 2-vinil-D-isocitrato y la quercentina (Shukla *et al.* 2015; Pham *et al.* 2017). La quercentina es un inhibidor no competitivo de la ICL, ya que la predicción del docking identificó una cavidad cercana al extremo amino de la enzima, que probablemente funciona como un sitio alostérico para el compuesto. La unión de la quercentina posiblemente induce cambios conformacionales que afectan la unión del sustrato. (Shukla *et al.* 2015). La búsqueda de inhibidores de la enzima también se enfocó en compuestos naturales, encontrando que los péptidos mohangamida A y mohangamida B de *Streptomyces* sp. son específicos contra la CaICL (Li *et al.* 2015; Dolan *et al.* 2018), mientras que, la dicetopiperacina ciclo(L-Fen-L-Val) que se aisló de *Streptomyces puniceus* Act1085 y la lactona macrocíclica bahamaolida A de *Streptomyces* sp. CNQ343 son inhibidores indirectos de la enzima, ya que su efecto es sobre la transcripción de la ICL (Kim *et al.* 2019).

3.3. Importancia de la enzima ICL en la patogenicidad microbiana

El análisis transcripcional y proteómico, además, del uso de mutantes evidenció que la ICL, debido a la función que desempeña en el metabolismo del carbono, participa en la patogenicidad de microorganismos patógenos y patógenos oportunistas que atacan tanto a plantas como a animales (Tabla 2). Por ejemplo, la enzima se relaciona con la virulencia de hongos fitopatógenos, tales como *Magnaporthe grisea* y *Colletotrichum lagenarium*, en la patogenicidad de algunos hongos intracelulares, que incluyen a *P. brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* y *C. albicans*, en esta levadura la ICL también participa en la utilización de una variedad de fuentes de carbono, sugiriendo la interconexión de la ICL con

múltiples redes metabólicas (Dunn *et al.* 2009). La ICL es esencial para el establecimiento de infecciones crónicas causadas por *P. aeruginosa* o por bacterias intracelulares, tales como *M. tuberculosis*, *Salmonella entérica* serovar Typhimurium y *Rhodococcus equi* (Dunn *et al.* 2009; Murima *et al.* 2016; Basta *et al.* 2017; Dolan *et al.* 2018). La ICL también se implicó en la respuesta a estreses presentes durante la infección, tales como hipoxia, inanición, resistencia a antibióticos o estrés oxidativo, por lo que la ICL desempeña una función más compleja y que va más allá de su función canónica en el ciclo del glioxilato (Ahn *et al.* 2016; Dolan *et al.* 2018).

Tabla 2. Relevancia de la ICL en la patogenicidad microbiana.

Característica	Microorganismo	Relevancia de la ICL	Referencia
Hongo fitopatógeno	<i>Magnaporthe grisea</i>	Virulencia en hojas y raíz	Dunn <i>et al.</i> , 2009
	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Virulencia en hojas y cotiledones	Dunn <i>et al.</i> , 2009
Hongo patógeno	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Adaptación al ambiente interno de macrófagos	Dunn <i>et al.</i> , 2009
	<i>Penicillium marneffeii</i>	Adaptación al ambiente interno de macrófagos	Dunn <i>et al.</i> , 2009
Hongo patógeno oportunista	<i>Candida albicans</i>	Virulencia en modelo de ratón Sobreexpresión en diferentes infecciones	Dunn <i>et al.</i> , 2009
Bacteria patógena	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Virulencia en modelo de ratón Adaptación al ambiente interno de macrófagos, granulomas y linfocitos.	Serfass, 2007 Dunn <i>et al.</i> , 2009 Murima <i>et al.</i> , 2016
	<i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium	Infección crónica en modelo de ratón	Dunn <i>et al.</i> , 2009
	<i>Rhodococcus equi</i>	Virulencia en modelo de ratón	Dunn <i>et al.</i> , 2009
Bacteria patógena oportunista	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Virulencia en modelo de ratón Infección crónica en modelo de ratón	Dunn <i>et al.</i> , 2009 Crousilles <i>et al.</i> , 2015

La ICL se relaciona con la persistencia microbiana en el hospedero. En hongos y bacterias que pueden sobrevivir y crecer dentro de los macrófagos, se observó consistentemente que la enzima se indujo después de la fagocitosis, sugiriendo que la ICL es esencial para la adaptación metabólica de estos organismos durante la sobrevivencia y proliferación en macrófagos (Dunn *et al.* 2009; Daniel *et al.* 2011). En otros microorganismos patógenos, la mutación en el gen que codifica a la ICL generalmente lleva a la incapacidad para sostener la infección, sobre todo en el modelo de infección pulmonar. El ambiente pulmonar contiene lípidos provenientes de la fosfatidilcolina (Fahnoe *et al.* 2012), por lo que el microorganismo debe redireccionar su metabolismo para utilizar los nutrientes disponibles en su nuevo ambiente, debido a esto la ICL es necesaria para la adaptación al hospedero (Hagins *et al.* 2009; Hoboth *et al.* 2009; Fahnoe *et al.* 2012). Aunque en la mayoría de los casos la ICL participa en la patogenicidad microbiana, hay algunas excepciones, tales como en *Aspergillus fumigatus* en el modelo de ratón, en *Cryptococcus neoformans* en el modelo de ratón y en el modelo de meningitis en conejo, en *Brucella suis* y en *Yersinia pestis*. Esto indica que aunque la función de la ICL en la virulencia está ampliamente difundida, no es general (Dunn *et al.* 2009).

Dada la conservación en la estructura y función, además, de su relación con la patogenicidad y sumando el hecho de que no se encuentran ortólogos en mamíferos, hacen de la ICL un objetivo atractivo para el desarrollo de nuevas vacunas y para la síntesis de inhibidores específicos para combatir las enfermedades fúngicas y bacterianas (Dunn *et al.* 2009; Thomas *et al.* 2009; Ahn *et al.* 2016; Dolan *et al.* 2018), por lo que es importante conocer a profundidad la estructura de la enzima, con la finalidad de contribuir en el desarrollo de este tipo de terapias antimicrobianas.

3.4. La familia AceA de isocitrato liasas (AceA/ICL)

La ICL pertenece a la superfamilia ICL/PEPM_KPHMT (CDD:cd06556), que se integra por las fosfoenolpiruvato mutasas (PEPM), las fosfoenolpiruvato hidrolasas (PEPH), las carboxifosfoenolpiruvato mutasas (CPEP mutasa), las oxalacetato hidrolasas (OAH), las isocitrato liasas (ICL), las 2-metilisocitrato liasas (MICL) y las cetopantoato hidrometiltransferasas (KPHMT). Los integrantes de esta superfamilia catalizan la formación o el rompimiento de enlaces C–C o C–P y se caracterizan por compartir el andamiaje estructural altamente conservado del barril de la triosafosfato isomerasa (TIM-barrel) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Este dominio estructural es el más frecuente en las proteínas, ya que se encuentra en el 10% de las enzimas conocidas (Rodríguez-Bolaños *et al.*, 2020). A su vez, por sí solas las enzimas ICLs forman una superfamilia (Figura 6), que se compone de dos familias: la familia AceA/ICL y la familia PrpB/MICL; la primera está formada por los integrantes que tienen al dominio AceA (isocitrato liasa, COG2224), y la segunda comprende a los integrantes que tienen al dominio PrpB (metil-isocitrato liasa, COG2513). Las enzimas del dominio PrpB se encargan del rompimiento del 2-metilisocitrato y anteriormente pertenecían a las ICLs de arqueas (Campos-García *et al.* 2013).

La familia AceA/ICL se compone de cinco subfamilias que albergan a las ICLs pertenecientes a nematodos, hongos, plantas, arqueas y a diversas clases bacterianas (Figura 6). Las ICLs de entre 350 AA a 450 AA forman a la subfamilia 1, la cual se integra principalmente por las ICLs de bacterias. A esta subfamilia pertenecen las ICLs de la mayoría de los miembros del género *Pseudomonas*, que se ubican dentro de la clase γ -*proteobacteria* (Figura 6). La subfamilia 2 comprende a miembros de más de 500 AA pertenecientes a eucariontes de los reinos *Fungi* y *Plantae*, excepto por las ICLs de nematodos, que se agrupan dentro la subfamilia 1. La subfamilia 3 se integra por las ICLs de más de 550 AA provenientes de bacterias, cabe resaltar que la ICL de *P. aeruginosa* (PaICL), al igual que las ICLs de *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas stutzeri* se ubican dentro de esta subfamilia, interesantemente, estas ICLs se agrupan en una

rama junto con las ICLs de microorganismos psicófilicos pertenecientes a las γ -*proteobacteria* y β -*proteobacteria* (Figura 6). La subfamilia 4 incluye a las ICLs de *Archea* y un pequeño grupo de ICLs de más de 700 AA presentes principalmente en *Mycobacterium* dan origen a la subfamilia 5 (Campos-García *et al.* 2013).

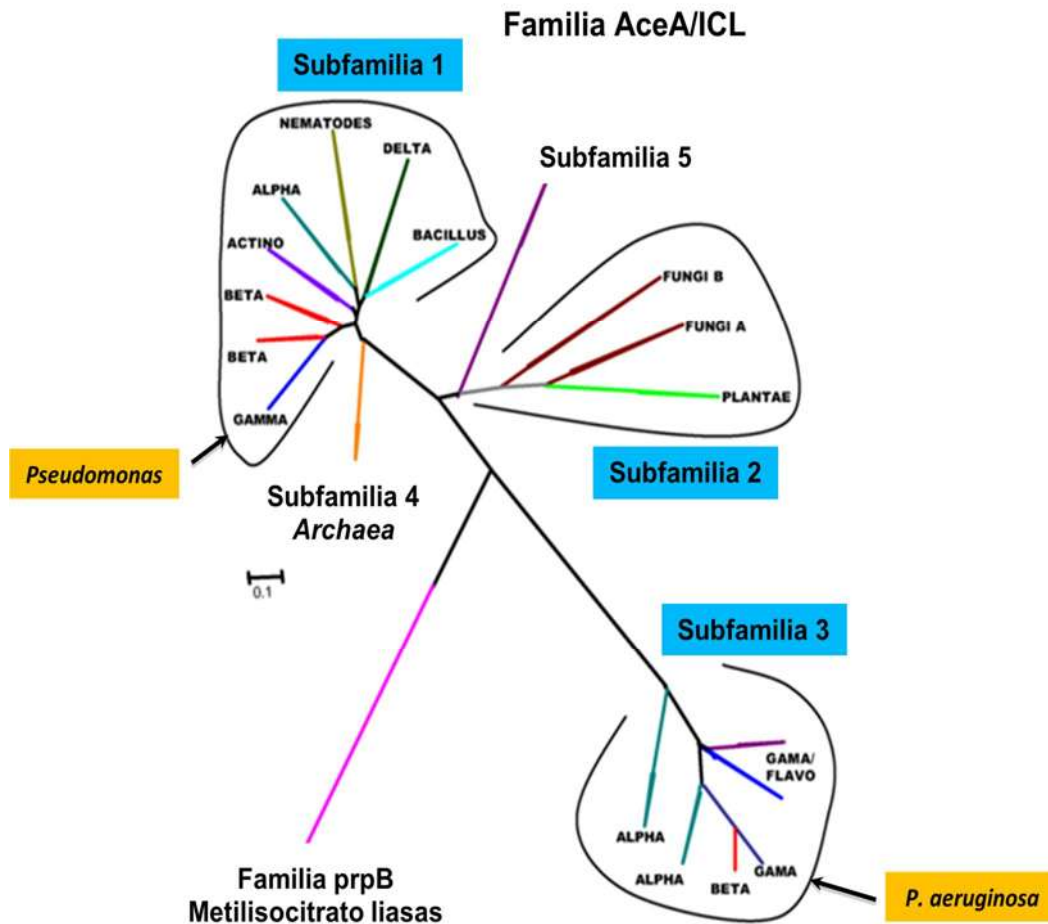


Figura 6. Árbol filogenético de la familia de enzimas AceA/ICL. Se muestran a las cinco subfamilias, cada clado representa la fuente de la ICL de acuerdo al grupo taxonómico. Se indican las ubicaciones de las ICLs de *P. aeruginosa* y de otros miembros del mismo género, las cuales en su mayoría se ubicaron en la subfamilia 1. Modificada de Campos-García *et al.*, 2013.

3.5. Estructura de la ICL

La ICL de varios organismos ya se purificó (Campos-Garcia *et al.* 2013; Eprintsev *et al.* 2014; Crousilles *et al.* 2018; Dolan *et al.* 2018) y la estructura cristalina se elucidó en integrantes de las subfamilias 1, 2 y 3 (Tabla 3), lo que permitió conocer la conformación de la ICL y las diferencias estructurales entre las subfamilias. La mayoría de las ICLs cristalizadas comparten el mismo andamiaje estructural de barril $(\beta/\alpha)_7\beta$, similar al TIM-barrel canónico de $(\beta/\alpha)_8$, excepto en la MtlICL, en donde es un barril $(\beta/\alpha)_8$ inusual (Britton *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2000; Britton *et al.* 2001; Crousilles *et al.* 2018).

Tabla 3. ICLs cristalizadas e ingresadas a la base de datos PBD.

Organismo	No. de acceso (año)*	Características	Referencia
SUBFAMILIA 1			
<i>Escherichia coli</i>	1IGW (2001)	Mutante A219C Ligandos: piruvato, Mg ⁺² y Hg ⁺²	Britton <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1F61 (2000)	Ligandos: Mg ⁺²	Sharma <i>et al.</i> , 2000
	1F8M (2000)	Ligandos: piruvato y Mg ⁺²	Sharma <i>et al.</i> , 2000
	1F8I (2000)	Ligandos: succinato, Mg ⁺² y glioxilato	Sharma <i>et al.</i> , 2000
	6XPP (2020)	Ligandos: Mg ⁺² y 2-metilidenebutanedioato	Kwai <i>et al.</i> , 2021
	7CP1 (2021)	Ligandos: succinato, Mg ⁺² y 2-metilidenebutanedioato	Kwon <i>et al.</i> , 2021
	5DQL (2016)	Ligandos: 4-hidroxi-2-oxobutanoato y Mg ⁺²	Pham <i>et al.</i> , 2017
	7RB1 (2021)	Ligandos: glicerol, glioxilato, Mg ⁺² , dihidroxiacetato y (3E)-3-(hidroxiimino)propionato	Mellot <i>et al.</i> , 2021
	6WSI (2021)	Ligandos: Mg ⁺² , glioxilato, glicerol, di(hidroxietyl)éter, y (2R, 3S)-oxirano-2,3-dicarboxilato ,	Pham <i>et al.</i> , 2021
	6VB9 (2020)	Ligandos: acetato, oxalato, Mg ⁺² , y di(hidroxietyl)éter	Pham <i>et al.</i> , 2021
	6C4C (2018)	3-nitropropanoato, glioxilato, piruvato y Mg ⁺² ,	Ray <i>et al.</i> , 2018
6C4A (2018)	3-nitropropanoato, piruvato, Mg ⁺² ,	Ray <i>et al.</i> , 2018	

		di(hidroxietyl)éter y 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etanesulfonato	
<i>Brucella melitensis</i>	3P0X (2010)	Ligandos: isocitrato, Mg ⁺² y 1,2-etanediol	SSGCID
	3E5B (2008)		SSGCID
	3OQ8 (2010)	Ligandos: 1,2-etanediol, Na ⁺ y malonato	SSGCID
	3EOL (2008)	Ligandos: di(hidroxietyl)éter y glicerol	SSGCID
	7RBX (2021)	Ligandos: 1,2-etanediol, Mg ⁺² , SO ₄ ⁻² y 2-metilidenebutanedioico	Demars <i>et al.</i> , 2021
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	3I4E (2009)		SSGCID
<i>Yersinia pestis</i>	3LG3 (2010)	Residuo modificado: una selenometionina	SSGCID
<i>Bacillus cereus</i>	7CMX (2021)		Kim <i>et al.</i> , 2021 (NP)
	7CMY (2021)	Ligandos: glioxilato, succinato y Mg ⁺²	Kim <i>et al.</i> , 2021 (NP)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	6LRT (2021)	Ligandos: glicerol, isocitrato y Mn ⁺²	Lee y Kim 2020 (NP)
	6LRP (2021)	Ligandos: glicerol y 3,6,9,12,15-pentaohexadecano	Lee y Kim 2021 (NP)
SUBFAMILIA 2			
<i>Aspergillus nidulans</i>	1DQU (2000)		Britton <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium graminearum</i>	5E9H (2016)	Ligandos: ión malonato y Mn ⁺²	Park <i>et al.</i> , 2016
<i>Magnaporthe oryzae</i>	5E9F (2016)	Ligandos: Mg ⁺²	Park <i>et al.</i> , 2016
	5E9G (2016)	Ligandos: glicerol, ácido glioxílico y Mg ⁺²	Park <i>et al.</i> , 2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7EBC (2021)	Ligandos: tetraetilenglicol y Mg ⁺²	Hiragi <i>et al.</i> , 2021
<i>Candida albicans</i>	7EBE (2021)	Ligandos: ácido fórmico y Mg ⁺²	Hiragi <i>et al.</i> , 2021
	7EBF (2021)		Hiragi <i>et al.</i> , 2021
SUBFAMILIA 3			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6G10 (2018)	Ligandos: glioxilato y Ca ⁺²	Crousilles, <i>et al.</i> , 2018

*Número de acceso en la base PDB entre paréntesis el año en que fue liberada en la base de datos.

SSGCID Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease.

NP No publicado.

El plegamiento de un TIM-barrel canónico tiene un arreglo estructural de 8 láminas β que simulan un cilindro y que se interconectan por 8 hélices α . El sitio catalítico se ubica dentro del cilindro, hacia su extremo carboxilo. Es usual que

este dominio forme parte de varias enzimas con diversas funciones biológicas, tales como oxidoreductasas, liasas, isomerasas, hidrolasas y transferasas, lo que ilustra el paradigma de “un plegamiento para muchas funciones”, haciéndolo interesante para el estudio evolutivo de las proteínas. Además, el dominio TIM-barrel regularmente presenta otras estructuras que preceden, interrumpen o continúan después del TIM-barrel (Figura 7) (Wierenga 2001; Nagano *et al.* 2002) y las ICLs de la familia AceA/ICL no son la excepción (Britton *et al.* 2000; Crousilles *et al.* 2018).

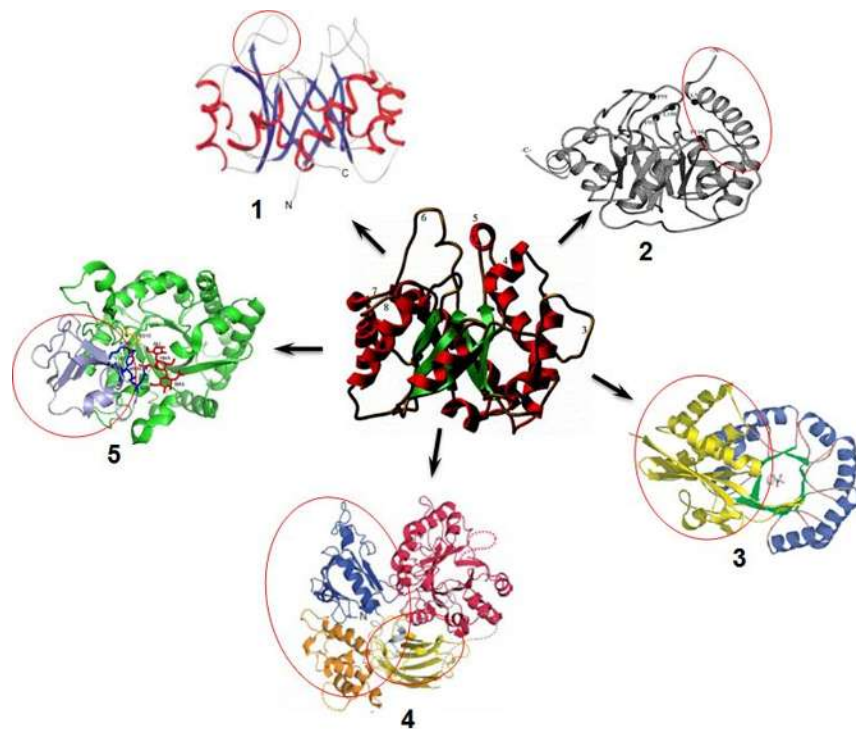


Figura 7. Plasticidad del dominio TIM-barrel. Este dominio estructural está presente en oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas e isomerasas y es común que en la periferia del cilindro se encuentren asas más grandes o dominios adicionales, sin que por ello se altere la actividad del TIM-barrel. Los círculos en rojo indican asas más grandes o dominios y asas adicionales. 1, 1HKM quitinasa; 2, TprC sintasa; 3, eIGPS indigoferol fosfato sintasa; 4, MR mandelato racemasa; 5, PLC- β 2 fosfolipasa C- β 2.

Una característica de los dominios que se insertan en la periferia de un dominio muy conservado, como el TIM-barrel, es que probablemente se relacionan con propiedades específicas de la enzima, como se describe en la Tabla 4; por lo que es posible que el dominio adicional presente en las ICLs de la subfamilias 3 tenga una función específica, como se especula para el dominio II de la ICL de *A. nidulans* (AnICL) de la subfamilia 2, el cual se propone que participa en la localización subcelular de la enzima (Britton *et al.* 2000).

Tabla 4. Propiedades relacionadas a los dominios insertados en la periferia del dominio TIM-barrel.

Enzima	Microorganismo	Dominio removido	Efecto	Referencia
Quitinasa A	<i>Serratia marcescens</i>	Dominio ($\alpha + \beta$)	Disminución de la estabilidad térmica Modificación del pH óptimo	Zees <i>et al.</i> , 2009
Fosforibosil antranilato isomerasa	<i>Thermotoga maritima</i>	Dominio $\alpha 2\beta 3$	Disminución de la estabilidad térmica Pérdida del estado de oligomerización	Thoma <i>et al.</i> , 2000
Indoglicerol fosfato sintasa	<i>Escherichia coli</i>	Dominio $\alpha 0$	Disminución de la solubilidad	Stehlin <i>et al.</i> , 1997
Endo- β -glucanasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Dominio regulatorio C-terminal	Aumento de la estabilidad térmica Pérdida de la capacidad para catalizar la reacción aldol	Liu <i>et al.</i> , 2012
β -glucoronidasa	<i>Aspergillus terreus</i>	Dominio no conservado C-terminal	Aumento de la estabilidad térmica Aumento de la eficiencia catalítica	Liu <i>et al.</i> , 2012

3.5.1. El sitio catalítico de la ICL

Una vez que se conforma el TIM-barrel, la cadena polipeptídica se pliega en una serie de hélices α que van a llevar hacia el extremo carboxilo, posteriormente, estas hélices participarán en las interacciones de apilamiento para la formación de la estructura cuaternaria (Figura 8B) (Britton *et al.* 2000; Shukla *et al.* 2015; Crousilles *et al.* 2018). En la estructura de la ICL, el sitio activo se localiza hacia el extremo carboxilo del TIM-barrel, como es habitual para las enzimas que se conforman por este dominio (Britton *et al.* 2000). Una característica inesperada del sitio activo de la ICL es que tiene la forma y el tamaño para que ajusten moléculas como el piruvato, glioxilato y oxalato (Britton *et al.* 2001). Se observó que la posición de los residuos importantes que forman parte del sitio activo prácticamente es la misma entre las ICLs y su conformación es idéntica o cercanamente idéntica, solo con algunos cambios sutiles y con algunas substituciones usualmente conservativas, por ejemplo, el E159 en la EclCL corresponde al D170 de la AnICL (Britton *et al.* 2001; Campos-Garcia *et al.* 2013).

El motivo de unión al glioxilato se localiza en el sitio activo de la EclCL y se compone de los residuos S91, R232 y W93. En esta misma región también se localiza el sitio de unión al Mg^{+2} , que corresponde a una zona cargada negativamente e incluye a los residuos D108, D157, E159, E186 en la EclCL. Otro elemento que se encuentra en el sitio activo es el motivo SPS (S319, P320, S321), que une al succinato a través de los grupos OH de las cadenas laterales de los residuos de serina (Britton *et al.* 2000; Britton *et al.* 2001). En el sitio activo, entre dos láminas β , se localiza el loop catalítico que se caracteriza por su flexibilidad y por la apariencia de un “lazo desordenado”. En este loop se encuentra un motivo catalítico altamente conservado a través de toda la familia AceA/ICL, el cual se compone por los residuos K193, K194, C195, G196 y H197 (respecto a la EclCL), esta secuencia “KKCGH” se considera como una firma para esta familia y contiene a la cisteína nucleofílica C195, que se relaciona con la catálisis enzimática (Britton *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2008). Las ICLs de la subfamilia 3 tienen un cambio en la firma, la K194 cambia por Q. En la PaICL se

exploró la función que tiene este residuo de Q (Q221, respecto a la PaICL), por lo que se originó una mutante cambiando Q por K, ya que este residuo se conserva en las demás subfamilias, resultando la mutante Q221K, la cual se afectó severamente en la eficiencia catalítica y en la estabilidad térmica de la enzima (Campos-Garcia *et al.* 2013).

La EclCL contiene otra zona de desorden de 16 residuos (K418-F434), a la cual le precede una hélice α y se extiende hasta el extremo carboxilo de la enzima, esta región incluye algunos residuos que se conservan, tales como A424, T429, E430, Q433 y F434 (A526, T532, E533, Q535 y F536 en la AnICL). Esta zona, en la PaICL se conforma por 49 residuos (V482-H531) que originan un lazo desordenado que es más extenso (Britton *et al.* 2000; Britton *et al.* 2001; Crousilles *et al.* 2018). Este elemento estructural se considera como una “tapa” y se caracteriza por su flexibilidad, ya que sufre cambios conformacionales con la unión del sustrato en el sitio activo. Algunas mutaciones en esta región llevan a la pérdida de la función, por lo que esta estructura se relaciona con la función de la enzima (Matsuoka y McFadden 1988; Britton *et al.* 2001; Shukla *et al.* 2015). Los elementos descritos se conservan en los integrantes de las subfamilias 1, 2 y 3 que ya se cristalizaron (Tabla 5).

En la MtICL se determinaron los cambios conformacionales que sufre la enzima durante la catálisis. En el proceso participan dos regiones, la primera región corresponde al loop catalítico (L185-G196), que contiene el motivo KKCGH y la segunda región, que conforma la tapa, consiste del lazo desordenado (P411-428) al final de la enzima de una subunidad adyacente. El loop catalítico es flexible en la conformación abierta, con la unión del sustrato se mueve de 10 Å a 15 Å para pasar a la conformación cerrada. Este movimiento ocasiona que la C191 catalítica se acerque al sustrato y cierre completamente el sitio activo al solvente, lo que bloquea la accesibilidad a los residuos catalíticos y provoca el movimiento de la tapa de la subunidad adyacente, completando la conformación catalítica. Las interacciones electrostáticas de la K189 dentro del parche negativo

dispara movimientos en el loop catalítico para adoptar la conformación cerrada y el residuo E423 de la tapa forma un puente de hidrógeno con la Q394 que ayuda a mantener la apropiada conformación de la tapa durante la conformación cerrada de la enzima (Shukla *et al.* 2015).

Tabla 5. Elementos conservados en ICLs de las subfamilias 1, 2 y 3.

Elemento	EcICL Subfamilia 1	AnICL Subfamilia 2	PaICL Subfamilia 3
Motivo catalítico	K193K194C195G196H197	K204K205C206G207H208	K220 Q 221C222G223H224
Sitio de unión al glioxilato	S91, R232 y W93	S97, R243 y W99	S101, R260 y W103
Sitio de unión al Mg ²⁺	D108, D157, E 159, E186	D114, D168, D170, E197	D117, D184, D186, E213
Sitio de unión al succinato *	S319 P 320 S 321	S425 P 426 S 427	S382 P 383 S 384
Tapa	K418-F434	V521-S538	V482-H531

En negritas se indica los cambios encontrados en los elementos de la ICL.

EcICL, ICL de *E. coli*; AnICL, ICL de *A. nidulans*; PaICL, ICL de *P. aeruginosa*; *motivo SPS

3.5.2. Ensamblaje del homotetrámero de la ICL

En la ICL de *M. oryzae* (MoICL) de la subfamilia 2 se describió la oligomerización de la enzima, de acuerdo a la simetría que se observó en la estructura cristalizada de la misma. En el dímero, los dominios I de los dos monómeros se orientan uno al lado del otro mediante la superficie externa cerca de las láminas β 2, β 1 y β 8, quedando los motivos TIM-barrel en lados opuestos y descubiertos. La dimerización se logra principalmente por el entrecruzamiento de las hélices α del extremo carboxilo, específicamente las hélices α 17 y α 18 quedan "anudadas" con las mismas hélices del otro monómero (Figura 8B), permitiendo que la hélice α 20 del extremo carboxilo se posicione transversa al lado descubierta del barril del otro monómero (Park *et al.* 2016). En la AnICL se forma el "nudo" por el entrecruzamiento de las hélices α 18 y α 19 alrededor de la hélices α 19 y α 18 del otro monómero (Figura 8B), con el subsecuente posicionamiento de las hélices

$\alpha 20$ y $\alpha 21$ sobre la superficie del barril del monómero opuesto. (Britton *et al.* 2000). En la MtlICL, las hélices $\alpha 12$ y $\alpha 13$ son las que participan en estas interacciones de apilamiento, que dan origen a la formación del “nudo”, y la hélice $\alpha 14$ es la que queda transversa sobre el barril del otro monómero. En la EclICL, las hélices $\alpha 12$, $\alpha 13$, $\alpha 14$, $\alpha 15$ son las que participan en el proceso. (Britton *et al.* 2001; Shukla *et al.* 2015). Se propone que el apilamiento de hélices promueve la formación de dímeros estables en otras proteínas, además sugiere que la región del extremo carboxilo de la ICL tiene cierto grado de flexibilidad que le permite participar en la oligomerización de la enzima (Shukla *et al.* 2015). La formación del “nudo” por el entrecruzamiento de hélices α parece ser una interacción que es general en las ICLs (Figura 8A). En la MtlICL se pensó que este tipo de interacción era indispensable para la formación del homotetrámero; sin embargo, la enzima mantuvo su estructura cuaternaria cuando se eliminaron las hélices $\alpha 12$, $\alpha 13$ y $\alpha 14$, por lo que, estos elementos son importantes, pero no indispensables para la formación del homotetrámero. También los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas que se forman entre la interface de los monómeros que conforman al dímero ayudan a la estabilización de la estructura. En la MtlICL, los residuos localizados en la interface que participan en la formación de puentes de hidrógeno son: N75, D98, G103, T105, R123, N126 y R130, además, entre el par iónico D98 y R123 se forma un puente salino (Shukla *et al.* 2015).

El homotetrámero de la ICL se forma por la interacción de más elementos. Los dos dímeros se empaquetan usando la región del extremo amino, el dominio II (cuando está presente) y la superficie del barril de cada monómero. El segmento que sobresale del extremo amino de cada monómero se acomoda en una región cóncava, la cual se rodea por las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$ ubicadas al final del TIM-barrel y hacia abajo del monómero que conforma un dímero diferente (Park *et al.* 2016). El acomodo entre dímeros se da porque muestran complementariedad de forma (Figura 8C), lo cual puede afectar las interacciones entre proteína-proteína y junto con las interacciones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas mantiene a los dímeros unidos. En la MtlICL un puente de hidrógeno entre la H189 con la Y89

mantiene la cadena lateral de este residuo en la posición adecuada para que la hélice α_6 y las hélices del extremo carboxilo, α_{12} , α_{13} y α_{14} , permanezcan en la orientación correcta para que se lleven a cabo las interacciones de apilamiento, lo que contribuye a la estabilización del homotetrámero. Estos residuos se conservan en la EclCL y en la AnlCL, mientras que en la PalCL el residuo de H corresponde a una Q (Shukla *et al.* 2015; Crousilles *et al.*, 2018).

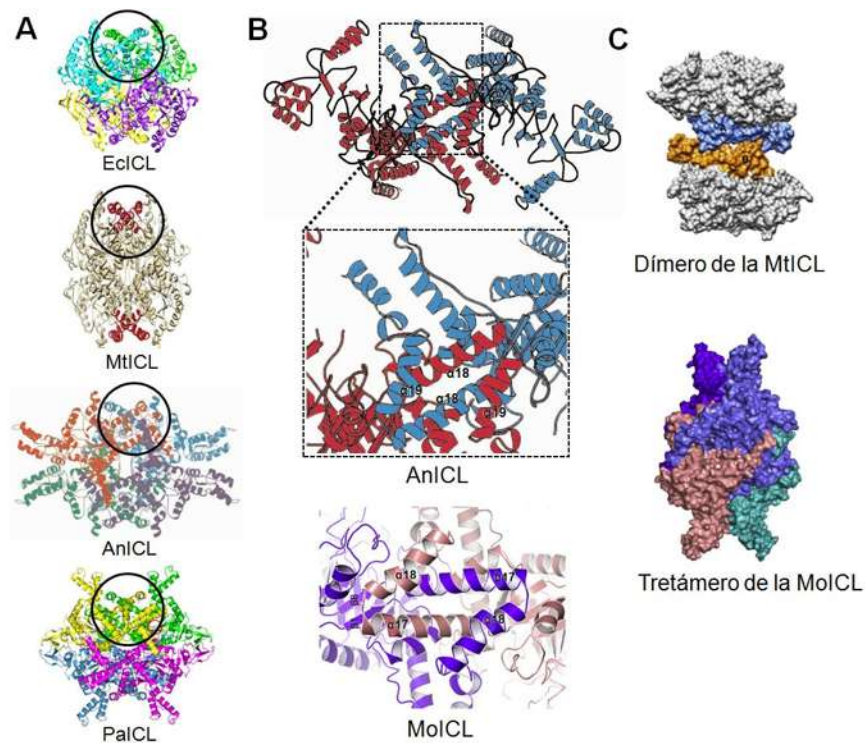


Figura 8. Conformación general de la ICL. A. Estructura cuaternaria de la ICL. Las ICLs tienen una conformación similar con dos regiones con hélices α que se entrecruzan entre dos monómeros para formar dos dímeros. B. Zona de interacción entre dos monómeros para formar el dímero de la ICL. En el acercamiento se observan las hélices α que se ubican en el extremo carboxilo y que se entrecruzan, dando lugar a las interacciones de apilamiento que forman un “nudo”. C. Complementariedad de forma entre los elementos que forman a la ICL. La complementariedad de forma entre los dos monómeros que conforman al dímero y entre los dos dímeros que conforman al homotetrámero, ayuda a que los residuos interactúen. Dentro del círculo se indican las dos regiones donde se da el “nudo” entre dos monómeros de la ICL. EclCL, ICL de *Escherichia coli*; MtICL, ICL de *Mycobacterium tuberculosis*; AnlCL, ICL de *Aspergillus nidulans*; PalCL, ICL de *Pseudomonas aeruginosa*; MolCL, ICL de *Magnaporthe oryzae*.

4. ANTECEDENTES

4.1. Identificación del gen que codifica a la ICL de *P. aeruginosa*

En *P. aeruginosa* el gen que codifica a la ICL se identificó en nuestro grupo de trabajo durante el escrutinio de una biblioteca de mutantes por transposición con *Himar1::Gm^R*. Las mutantes fueron incapaces de asimilar monoterpenos acíclicos como fuente de carbono y energía. Los compuestos que se probaron fueron citronelol, geraniol y sus respectivos ácidos carboxílicos, los cuales generan acetato y acetoacetato como productos de degradación (Díaz-Pérez *et al.* 2007). La mutante A39 se caracterizó por su incapacidad de crecer en acetato, además de los compuestos mencionados y por no presentar mutaciones en el metabolismo central del carbono, que se probó por su crecimiento en glucosa. La caracterización de la mutante A39 mediante Southern blot indicó que la mutante se originó de un solo evento de transposición (Figura 9).

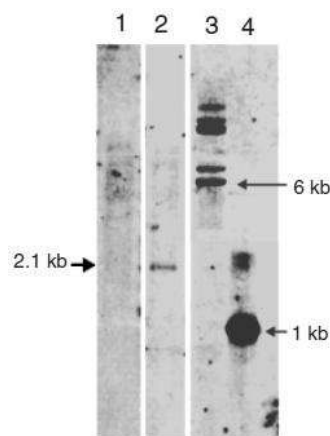


Figura 9. Caracterización de la mutante A39. Hibridación Southern blot. 1. DNA total de PAO1 digerido con *Pst*I; 2. DNA total de A39 digerido con *Pst*I; 3. Plásmido pFAC; 4. Fragmento de PCR de *Himar1::Gm^R*. Modificado de Díaz-Pérez *et al.*, 2007.

El análisis de la secuencia interrumpida por el transposón en la mutante A39 identificó al ORF PA2634 (Figura 10). El análisis de similitud de secuencias indicó que el ORF PA2634 presenta una alta similitud con secuencias de ICLs, por lo tanto, codifica para una probable ICL, involucrada en el ciclo del glioxilato

(Díaz-Pérez *et al.* 2007). De manera inesperada, este análisis expuso que el ORF PA2634 presentó similitud por arriba del 70 % con proteínas homólogas de organismos mayoritariamente fuera su género bacteriano, como con la bacteria psicrófila *Colwellia maris*, *Burkholderia vietnamiensis* y *Azotobacter vinelandii*, mientras que con homólogos dentro de su mismo género, como *Pseudomonas syringae* y *P. fluorescens*, presentó una baja identidad, excepto con la ICL de *P. mendocina*, con la que presentó una identidad del 92%. El ORF PA2634 se nombró como el gen *aceA*, debido a la homología que presentó con genes *aceA* que codifican a ICLs. El gen *aceA* es de 1596 pb y codifica para una proteína de 531 AA con una masa molecular teórica de 58.8 kDa y cuyo estado oligomérico corresponde a un homotetrámero de 231 kDa (Díaz-Pérez *et al.* 2007; Crousilles *et al.* 2018).

El arreglo génico del gen *aceA* en *P. aeruginosa* no corresponde a un operón (Figura 10), ya que los genes adyacentes no están relacionados con el metabolismo del acetato. Río arriba del gen *aceA* se identificó una probable región promotora para el factor sigma 54 y un posible sitio de unión al ribosoma, mientras que río abajo del gen se identificó un probable terminador de la transcripción, por lo que el gen *aceA* cuenta con los elementos necesarios para su transcripción (Díaz-Pérez *et al.* 2007).

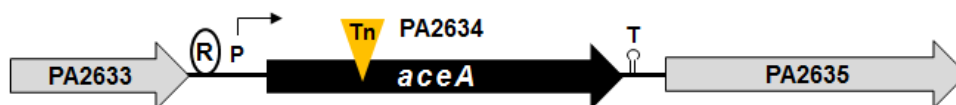


Figura 10. Contexto genómico del gen *aceA* de *P. aeruginosa* PAO1. El gen *aceA* corresponde al ORF PA2634, el cual no se encuentra formando un operón. La región promotora se indicó con la letra P. La horquilla con la letra T corresponde a la región terminadora y representa al represor (R) unido a una región localizada a 441 nt del sitio de inicio de la traducción. Se indica el sentido de la transcripción con la flecha y con el triángulo el transposón que interrumpió al gen *aceA* en la mutante A39.

Para comprobar que el gen *aceA* de *P. aeruginosa* codifica a una ICL, la mutante A39 se complementó con el plásmido pRR2634, el cual corresponde al vector binario pUCP20 con un fragmento *EcoRI* de 2.1 kpb, que comprende al gen *aceA* con su promotor y terminador (Díaz-Pérez *et al.*, 2007), pero no con la región que une a su represor transcripcional, la cual se ubica a 447 nt del sitio de inicio de la traducción del gen (Figura 10) (Dolan *et al.*, 2020). La mutante complementada recuperó la capacidad de asimilar compuestos que generan acetil-CoA como intermediario metabólico, tales como acetato, monoterpenos acíclicos, alcoholes y leucina, indicando que la ICL se relaciona en la asimilación de estos compuestos, canalizando al acetil-CoA hacia el ciclo del glioxilato. Además, a las cepas mutante y complementada, que crecieron en diferentes fuentes de carbono, se les determinó la actividad de ICL en extractos crudos libres de células (Tabla 6). Se observó que cuando la fuente de carbono fue acetato, la mutante no presentó actividad enzimática, mientras que en la mutante complementada la actividad de ICL se recuperó en un nivel mayor en comparación con *P. aeruginosa*, confirmando que el gen *aceA* codifica a la enzima ICL, la cual se relaciona con la utilización de acetato (Díaz-Pérez *et al.* 2007).

La actividad de ICL se probó en el extracto crudo de *P. aeruginosa* crecida en glucosa como única fuente de carbono, y fue solo del 4.7% (Tabla 6). Cuando el extracto se separó por medio de SDS-PAGE no se observó una banda diferencial, mientras que el extracto de *P. aeruginosa* crecida en acetato presentó una actividad de ICL 20 veces mayor a la que se observó en glucosa, y en el SDS-PAGE se observó la presencia de una banda enriquecida del peso molecular esperado de ~60 kDa. Estos resultados indicaron que la expresión del gen *aceA* se reprime por la glucosa y se induce por el acetato, por lo tanto, la glucosa ejerce una represión catabólica en la expresión del gen que codifica a la PaICL. La combinación de la glucosa y el acetato produjo una actividad del 25.9% en *P. aeruginosa* (Tabla 6), lo que confirmó el efecto represor que ejerce la glucosa sobre la expresión del gen *aceA*, este efecto también se observó con el citrato,

que es un intermediario del CAT. Los extractos crudos de *P. aeruginosa* crecidos en leucina o citronelol presentaron actividad de ICL, mientras que en la mutante A39 la actividad fue nula (Tabla 6), sugiriendo que en *P. aeruginosa*, la ICL tiene relación con el catabolismo del acetato, monoterpenos acíclicos y leucina (Díaz-Pérez *et al.* 2007).

Tabla 6. Actividad de ICL en cepas de *P. aeruginosa* crecidas en varias fuentes de carbono. Tomada de Díaz-Pérez *et al.*, 2007.

Fuente de carbono	Actividad de ICL ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína)		
	PAO1	PA39	PA39 (pRR2634)
Acetato	950 (100)	2 (0.21)†	1190 (125)
Glucosa	45 (4.7)	10 (1.0)	906 (95.3)
Leucina	376 (39.6)	18 (1.9)†	731 (76.9)
Citronelol	231 (24.3)	32 (3.3)†	335 (35.2)
Citrato	27 (2.8)	6 (0.6)	784 (82.5)
Glucosa + acetato	246 (25.9)	5 (0.5)	466 (49.0)
Glucosa + leucina	372 (39.1)	7 (0.7)	736 (77.5)
Glucosa + citronelol	160 (16.8)	5 (0.5)	642 (67.6)

*Los cultivo crecidos en medio mínimo M9 con las fuentes de carbono indicadas. Los ensayos de la enzima ICL se realizaron por triplicado y se muestran los promedios.

†La actividad de la enzima en extractos crudos de cultivos que no mostraron crecimiento en la fuente de carbono indicada. Las actividades de la ICL fueron calculadas por triplicado y repetidas por al menos tres experimentos independientes. La desviación estándar fue menor del 5% de los valores medidos. La actividad de ICL expresada como un porcentaje es mostrada entre paréntesis.

4.2. Identificación de aminoácidos importantes en la ICL de *P. aeruginosa*

En la PalCL se identificaron AA que participan en la catálisis y en la estabilidad térmica de la enzima. Por medio de un alineamiento de múltiples secuencias de la región correspondiente al sitio catalítico entre miembros de las 5 subfamilias que conforman a la familia AceA/ICL se ubicó a la firma KKCGH de la familia de proteínas AceA/ICL (Campos-Garcia *et al.* 2013).

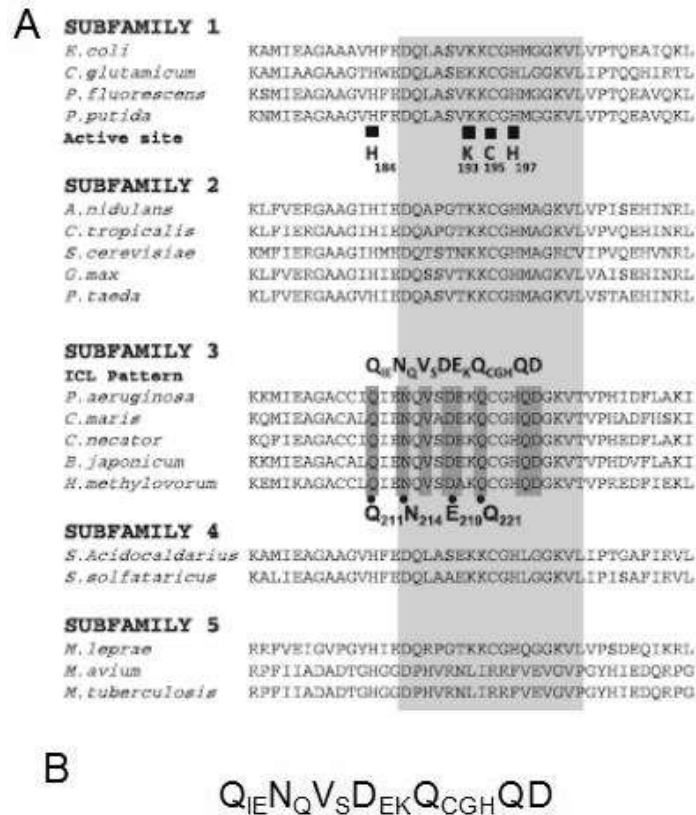


Figura 11. Alineamiento de múltiples secuencias de las regiones catalíticas de las proteínas ICL seleccionadas. A. Alineamiento. Las secuencias se dividieron de acuerdo a las cinco subfamilias de la familia AceA/ICL. El alineamiento muestra la región catalítica de la familia ICL. Los residuos conservados que constituyen el loop catalítico de la ICL están sombreados en gris. Los residuos catalíticos (KKCGH) descritos en *E. coli* se indicaron por medio de cuadros negros (sus posiciones son relativas a la secuencia de la EcICL). La secuencia patrón (Q₁₆E₁₈N₁₉Q₂₁V₅D₆E₈K₁₀CGH₁₁QD) de la subfamilia 3 de ICLs se indicó por medio de áreas sombreadas y los puntos indican a los residuos mutados en este estudio (sus posiciones corresponden a la secuencia de la PalCL). B. La firma propuesta para la subfamilia 3. Modificada de Campos-García *et al.*, 2013.

La región que se analizó en la subfamilia 3 presentó las siguientes sustituciones: H21Q, D214N, A/L216V, S218D, V219E, K221Q, M225Q y G226D (Figura 11), por lo que se propuso como firma de las ICLs de la subfamilia 3 a la secuencia consenso Q_IE_NQ_VS_DE_KQ_{CGH}Q_D, que se localiza en el sitio catalítico (Campos-Garcia *et al.* 2013).

Dentro de la firma propuesta para la subfamilia 3 se observó que los residuos Q211, N214 y Q221 en las demás subfamilias corresponden a H, D y K, respectivamente. Además, dentro de la misma subfamilia 3 el residuo E219 cambia por A en *Hyphomicrobium methylovorum* (Figura 11). Para determinar la función de estos residuos en la PaICL, se propuso cambiarlos por los residuos correspondientes en las demás subfamilias. Mediante mutagénesis sitio dirigida, se generaron los cambios de Q211H, N214D, Q221K y E219A y a las enzimas mutadas se les determinó su comportamiento cinético (Tabla 5), encontrando que en la mutante N214D la actividad enzimática se abatió, por lo que se consideró que el residuo N214 tiene relación con la función enzimática o con la estabilidad estructural. Las mutantes restantes presentaron una cinética de tipo Michaelis-Menten, al igual que la PaICL; sin embargo, su actividad enzimática se vio afectada, reflejándose en la disminución de 2 a 3 veces en la constante k_{cat} (número de recambio) y de entre el 60% al 90% para el parámetro k_{cat}/K_m (eficiencia catalítica) (Tabla 7). La termoestabilidad se evaluó mediante la prueba del $t_{1/2}$ (tiempo de vida media) a 45°C. En la mutante E219A se observó una disminución de aproximadamente el 30% en el valor de este parámetro y de aproximadamente el 60% para las mutantes Q211H y Q221K en comparación con la PaICL (Tabla 7). La disminución de la termoestabilidad en las mutantes E219A, Q211H y Q221K indicó que los residuos E219, Q211 y Q221 tienen relación con la estabilidad térmica de la PaICL (Campos-Garcia *et al.* 2013).

Tabla 7. Constantes cinéticas de la PaICL y de las mutantes sitio dirigidas. Tomada de Campos-García *et al.*, 2013.

Enzima	^a K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	T óptima (°C)	$t_{1/2}$ ^a 45°C
ICL-WT	0.44 ± 0.11	9.81	22.3 (100)	30	40
ICL-E219A*	0.94 ± 0.12*	4.63	4.9 (22)	30	25
ICL-Q211H	0.29 ± 0.07	3.46	11.9 (53)	39	12
ICL-Q221K	0.47 ± 0.08	3.25	6.9 (31)	36	15
ICL-N124D	0.25 ± 0.09	0.56	2.8 (12)	ND	ND

*p/0.05. El porcentaje de los valores de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) son indicados entre paréntesis, $t_{1/2}$ tiempo de vida media de la inactivación térmica.

^a Las constantes cinéticas fueron sujetas a análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Tukey's para el análisis estadístico y las diferencias significativas con respecto a la ICL de tipo silvestre son indicadas.

4.3. Comparación estructural entre las ICLs de *P. aeruginosa* y miembros característicos de las subfamilias 1 y 2

Dentro de las subfamilias 1, 2 y 3 se encuentran ICLs cristalizadas (Britton *et al.* 2000; Britton *et al.* 2001; Crousilles *et al.* 2018), lo que hace posible la comparación estructural entre las subfamilias. La comparación entre las estructuras cristalizadas de la EciCL, la AnICL y la PaICL indica que las ICLs se forman por el dominio I, correspondiente al TIM-barrel. Estructuralmente, la EciCL de la subfamilia 1 ejemplifica a la enzima más simple que se conoce, ya que solo se compone por el dominio 1, el cual contiene al motivo catalítico (Figura 12) (Britton *et al.* 2001). La AnICL es representativa de la subfamilia 2, se conforma por el dominio I y por la inserción de 100 AA, que dan origen al dominio II o “dominio de cabeza” (Figura 12), cuya función propuesta es la de dirigir a la enzima hacia los microcuerpos peroxisomales (Britton *et al.* 2000). La PaICL es la única enzima cristalizada de la subfamilia 3, se conforma por el dominio 1 y una inserción adicional genera al dominio II. Este dominio se localiza en la misma posición que el dominio II de la AnICL; sin embargo, es más pequeño y desordenado (Figura 12), así que es probable que tenga una función diferente en la PaICL (Britton *et al.* 2000; Crousilles *et al.* 2018). De acuerdo a la estructura

cristalográfica de la PaICL se propuso que el dominio II probablemente apuntala al homotetrámero (Figura 12) (Crousilles *et al.* 2018); sin embargo, esto no se comprobó. Otra diferencia que se observa entre la PaICL y las ICs de las subfamilias 1 y 2 es el motivo conformado por las hélices $\alpha 13$ -loop- $\alpha 14$ (motivo extendido, DIII), el cual se proyecta alejándose del núcleo de la enzima y es más grande y estructurado que el correspondiente motivo en la EciCL y en la AniCL. El DIII en el homotetrámero de la PaICL genera una proyección que le da su apariencia distintiva tipo “estrella”; sin embargo, la función de este motivo también se desconoce (Crousilles *et al.* 2018).

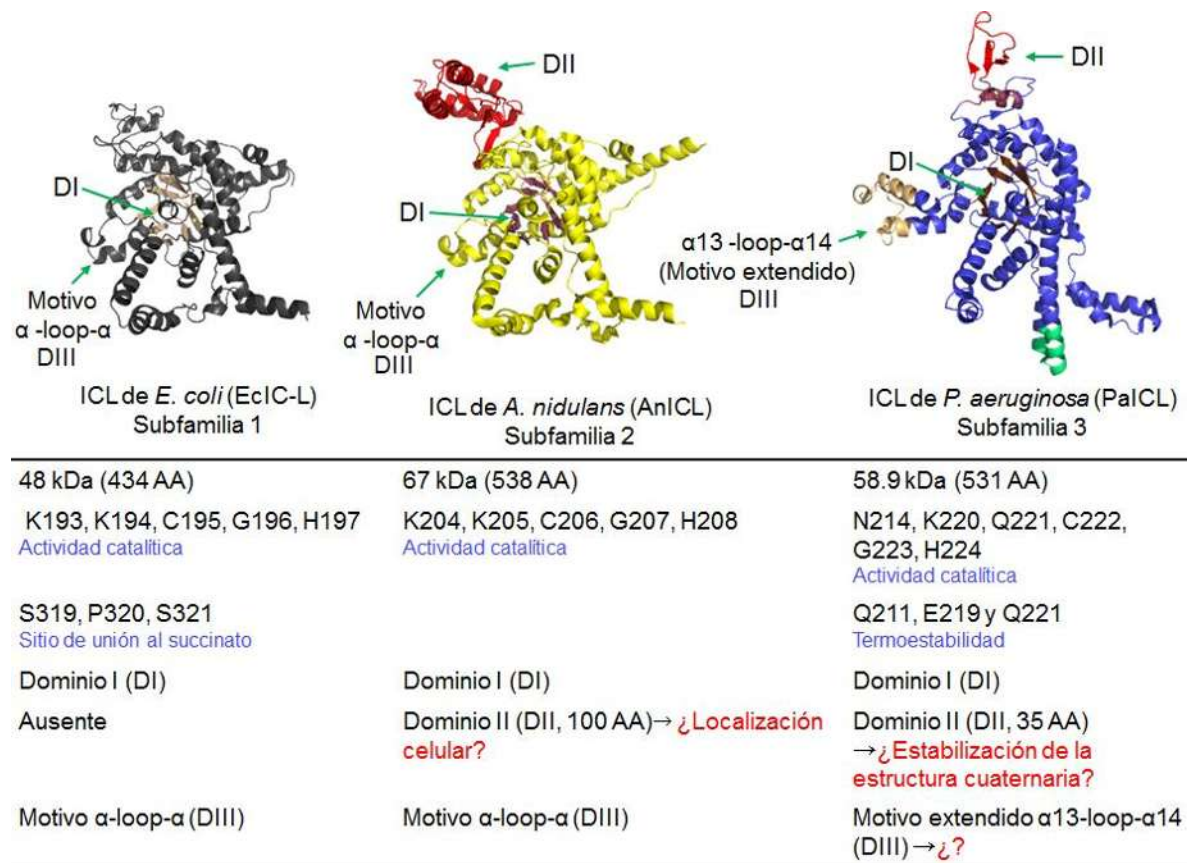


Figura 12. Comparación estructural de la PaICL. La PaICL de la subfamilia 3 se comparó contra miembros característicos de las ICs de las subfamilias 1, 2. Debajo se muestran varias características identificadas en cada enzima. Debajo de los AA se indica la función con la que están relacionados; entre signos de interrogación se indica la probable función que desempeña esa estructura en la IC. DI, dominio I; DII, dominio III; DIII, motivo extendido.

4.4. Importancia del extremo carboxilo en la ICL

Por otro lado, cuando se caracterizó a la PaICL por el grupo del Laboratorio de Biotecnología Microbiana/I.I.Q.B./U.M.S.N.H., se le adicionó a la enzima una etiqueta de histidinas para facilitar su purificación. Se realizaron dos variantes con una etiqueta de 6X-histidinas en cada uno de los extremos de la enzima, después de un examen preliminar para determinar la variante a caracterizar, se observó que la PaICL con la etiqueta en el extremo carboxilo disminuyó su actividad enzimática en comparación a la variante etiquetada en el extremo amino (Figura 13), por lo que la caracterización se realizó con esta última enzima; sin embargo, no se determinaron las causas por las que la variante con la etiqueta en el extremo carboxilo fue menos activa.

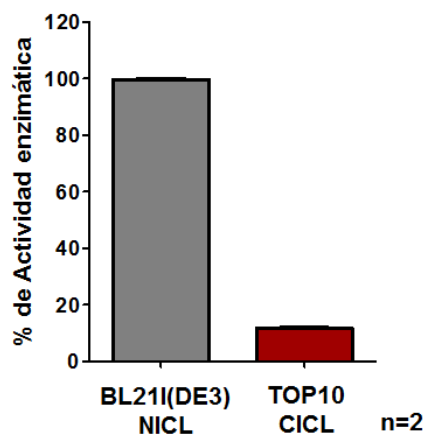


Figura 13. Efecto de la etiqueta de 6X-histidinas sobre la actividad de la PaICL. El fondo genético para la sobreexpresión de la PaICL fue *E coli* BL21(DE3) y *E coli* TOP10 para la PaICL con la etiqueta en el extremo amino (NICL) y en el extremo carboxilo (CICL), respectivamente.

La función del extremo carboxilo de la ICL se estudió en miembros de las subfamilias 1 y 2. Se encontró que puede tener relación con la función enzimática (Tabla 8). En la EcICL, el extremo carboxilo tiene relación con la actividad de la enzima, ya que la delección de la H429 del extremo carboxilo originó la pérdida de la función, al igual que la inserción de un heptapéptido (Gly-Met-Pro-Ala-Gly-Arg-Leu). En la ICL de *P. indigofera*, esta región también presentó relación con la

actividad enzimática, ya que la delección de los AA Phe e His, que se localizan en el extremo carboxilo ocasionaron la pérdida de la función, mientras que la estructura cuaternaria de la ICL no se alteró (Matsuoka *et al.* 1988). En la MtICL, la delección de las hélices α_{12} , α_{13} y α_{14} , que conforman la región del extremo carboxilo, afectó la función de la enzima, pero no su estado de oligomerización, por otro lado, la inserción de un polipéptido que incluye una etiqueta de histidinas no tuvo un efecto aparente sobre su función ni su estado de oligomerización, al igual que en las ICLs de *F. graminearum* y *M. oryzae* (Shukla *et al.* 2015; Park *et al.* 2016). Estos resultados indican que la región del extremo carboxilo de la PaICL probablemente se relaciona con la función de la enzima.

Tabla 8. Modificaciones realizadas en el extremo carboxilo de la ICL.

ICL	Delección	Inserción	Efecto	Referencia
Subfamilia 1				
<i>Escherichia coli</i>	His	Gly-Met-Pro- Ala-Gly-Arg- Leu	Pérdida de la función	Matsuoka y McFadden, 1988
<i>Pseudomonas Indigofera</i>	Phe-His		Pérdida de la función, sin afectar la estructura cuaternaria	Matsuoka y McFadden, 1988
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	α_{12} , α_{13} y α_{14}		Pérdida de la función, sin afectar la estructura cuaternaria	Sukla <i>et al.</i> , 2015
		Leu-Arg-Pro- His-His-Ser- 6XHis	Sin efecto aparente sobre la función y la estructura cuaternaria	Kumar <i>et al.</i> , 2008
Subfamilia 2				
<i>Magnaporthe oryzae</i>		8XHis	Sin efecto aparente sobre la función y la estructura cuaternaria	Park <i>et al.</i> , 2016
<i>Fusarium graminearum</i>		8XHis	Sin efecto aparente sobre la función y la estructura cuaternaria	Park <i>et al.</i> , 2016

Los extremos amino y carboxilo en el protómero de la PaICL se localizan alejados del sitio catalítico (Figura 14A); sin embargo, en el homotetrámero, el extremo carboxilo de una subunidad se localiza cerca del sitio catalítico de la subunidad vecina (Figura 14B), por lo que es probable que cualquier inserción en el extremo carboxilo ocasione una alteración en la función de la PaICL, ya que es posible que pueda obstruir al sitio catalítico, o bien, como la etiqueta se estaría localizando en una zona de amplio contacto entre las subunidades podría ocasionar la desestabilización del homotetrámero, llevando a la pérdida de la función.

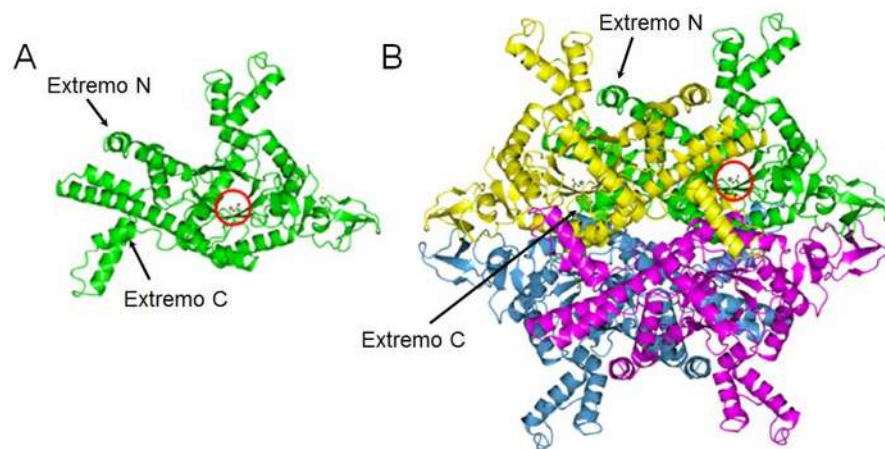


Figura 14. Localización de los extremos amino y carboxilo en la PaICL. A. Ubicación de los extremos amino y carboxilo en el protómero de la PaICL. B. Ubicación de los extremos amino y carboxilo en el homotetrámero de la PaICL. Modificada de Crousilles *et al.*, 2018.

4.5. Participación de la ICL en la patogenicidad de *P. aeruginosa*

La función que desempeña la ICL en la patogenicidad de *P. aeruginosa* se probó a través de varios modelos biológicos, tanto en la infección aguda como crónica, debido a que los microorganismos patógenos usan diferentes factores de virulencia para establecer una infección aguda o para mantener una infección crónica (Lindsey *et al.* 2008; Turner *et al.* 2014).

Lindsey y col. en el 2008 (Lindsey *et al.* 2008) para identificar factores de virulencia que tienen relación con el establecimiento de la infección crónica, propusieron utilizar un cepa aislada de una infección crónica, que ya se adaptó a los pulmones de un paciente con fibrosis quística. La cepa seleccionada fue *P. aeruginosa* FRD1, con la cual generaron una biblioteca de mutantes por inserción de transposón. El escrutinio en plántulas de alfalfa identificó una mutante afectada en el gen *aceA*. Debido a que el aislado FRD1 es avirulento en el modelo de infección pulmonar crónica en rata se construyó la mutante en *P. aeruginosa* PAO1, la cual fue incapaz de crecer en acetato como fuente de carbono. Cuando se probó la virulencia de esta mutante en los modelos antes mencionados, se observó que fue significativamente menos virulenta que *P. aeruginosa* PAO1, ya que solo causó infección en el 30% de las plántulas inoculadas, mientras que en los pulmones de las ratas, después de 14 días post infección, se observó una menor inflamación en los pulmones infectados con la mutante y se recuperó una orden de magnitud menor de unidades formadoras de colonia (UFC) en comparación con PAO1 (Tabla 9), por lo que concluyeron que en mamíferos, la ICL es importante para la virulencia óptima de *P. aeruginosa* (Lindsey *et al.* 2008).

Tabla 9. La ICL es requerida para la virulencia de *P. aeruginosa* en los modelos de alfalfa y de pulmón de rata. Modificada de Lyndsey *et al.*, 2008.

Cepa	Infección de las plántulas (%) [*]	Infección en el pulmón de rata	
		La media de las bacterias (UFC ml ⁻¹ por pulmón) †	La media del % de inflamación‡
PAO1	77 ±17.5	4.54x10 ⁵ ± 5.96x10 ⁵	44.6±7.84 (38.2-55.7)
PAO1 <i>aceA</i>	26 ± 12.1	5.12x10 ⁴ ± 3.34x10 ⁴	11.8±2.27(9.2-14.6)

* El porcentaje de las plántulas de alfalfa con síntomas de maceración (media ± SD). Los datos son representativos de dos experimentos. Significativamente diferente de PAO1 (P<0.001)/

† El número de bacterias recuperado de los pulmones de las ratas. Los valores son la media ± SD por cuatro animales a 14 días post-infección. Los números dentro de los paréntesis representan el rango.

‡Significativamente diferente de PAO1 (P<0.001, t-test). Los valores son la media ± SD por cuatro animales (el rango en el paréntesis) a 14 días post-infección.

Por su parte, Fahnoe y col (2012), durante la identificación de compuestos inhibidores de las enzimas del ciclo del glioxilato, construyó en *P. aeruginosa* mutantes relacionadas con este ciclo. La mutante en la ICL no presentó defectos de crecimiento y fue incapaz de crecer en acetato (Figura 15A). Sin embargo, cuando la mutante se probó en el modelo de septicemia en ratón no presentó diferencia en la virulencia con respecto a *P. aeruginosa* PAO1, pero cuando se utilizó el modelo de infección pulmonar en ratón se obtuvieron resultados similares a los que observó Lyndsey y col. (2009), ya que observó una disminución en la virulencia de la mutante en la ICL. A las 48 h post infección el número de UFC que se recuperaron de esta cepa fue significativamente menor en comparación a *P. aeruginosa* (Figura 15B), mientras que la doble mutante (en la MS y en la ICL) se atenuó severamente en este modelo y se eliminó a las 48 h, a pesar de que las cargas bacterianas a las 2 h post infección fueron iguales para todas las cepas que se probaron (Figura 15B). Esto corroboró el hecho de que la ICL y en general el ciclo del glioxilato son necesarios para que *P. aeruginosa* lleve a cabo la colonización del ambiente pulmonar (Fahnoe *et al.* 2012).

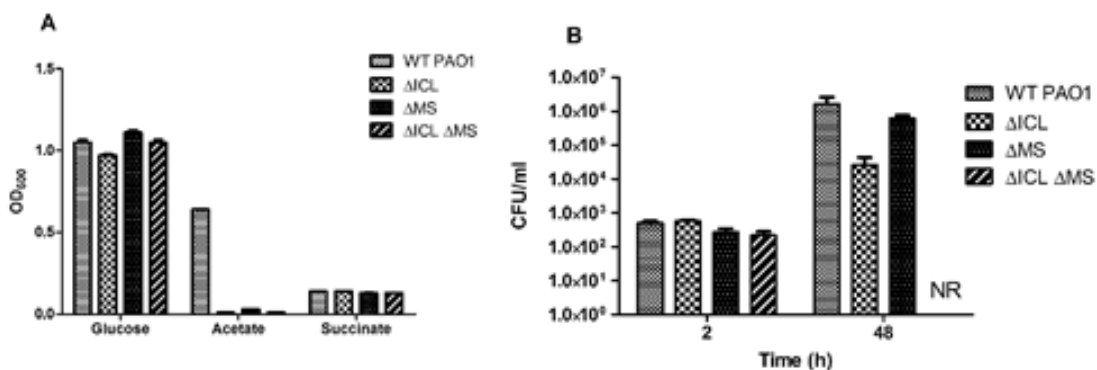


Figura 15. Mutantes de *P. aeruginosa* en el ciclo del glioxilato son deficientes en el crecimiento *in vitro* e *in vivo*. A. La capacidad de *P. aeruginosa* PAO1 y sus mutantes isogénicas en el ciclo del glioxilato para utilizar varias fuentes únicas de carbono fue probada espectrofotométricamente después del crecimiento a 37°C durante toda la noche. B. La capacidad de esas cepas para colonizar y persistir en el modelo de infección en pulmón en roedor fue medida entre 2 y 48 horas post infección por la homogenización del pulmón y la subsecuente determinación de las UFCml⁻¹. NR - colonias no recuperables. Tomada de Fahnoe *et al.*, 2012.

Otra evidencia de la relación que tiene la ICL en la patogenicidad de *P. aeruginosa* es el hecho de que el gen que codifica a la ICL se sobreexpresa tanto en los procesos de infección aguda como crónica (Turner *et al.*, 2014). Además, con frecuencia se recuperan aislados de *P. aeruginosa* que expresan constitutivamente a la ICL provenientes de pacientes con fibrosis quística en etapa crónica, aunque esto no es una característica general (Hagins *et al.*, 2010). Por ejemplo, Turner y col (2014) utilizaron los modelos de infección por herida en ratón para recrear una infección aguda y una infección crónica, para después realizaron el perfil del transcriptoma de *P. aeruginosa* en ambas condiciones y con esos resultados se llevó a cabo la reconstrucción metabólica de la bacteria. Lo que encontraron fue que el gen *aceA* que codifica para la ICL se indujo 24.58 veces y 18.65 veces en los modelos de infección aguda y crónica, respectivamente, en comparación al crecimiento de *P. aeruginosa* en el medio de referencia, el cual fue un medio mínimo con succinato. Además, el gen que codifica para la isocitrato deshidrogenasa, que es la enzima que compite por el sustrato con ICL, se reprimió, lo que favorece el punto de entrada al ciclo del glioxilato (Turner *et al.* 2014).

Por otro lado, Lyndsey y col (2008) investigaron si el gen *aceA* se regula de manera similar en *P. aeruginosa* PAO1 y en el aislado de *P. aeruginosa* FRD1, el cual provino de una infección pulmonar crónica asociada a la fibrosis quística. De manera inesperada, en los extractos crudos libres de células de cultivos crecidos en LB, el cual es un medio que no induce al gen, se encontró que la actividad de ICL en *P. aeruginosa* FRD1 fue significativamente mayor en comparación a *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 16A). Se determinó que la alta actividad de ICL que presentó el aislado se debió al aumento en la transcripción del gen *aceA*, como se pudo comprobar mediante la fusión transcripcional *aceA::lacZ* (Figura 16B). Estos resultados indicaron que en *P. aeruginosa* FRD1 el gen *aceA* no está regulado, por lo que la expresión de la ICL es constitutiva, debido probablemente a la pérdida de un regulador negativo (Lindsey *et al.* 2008).

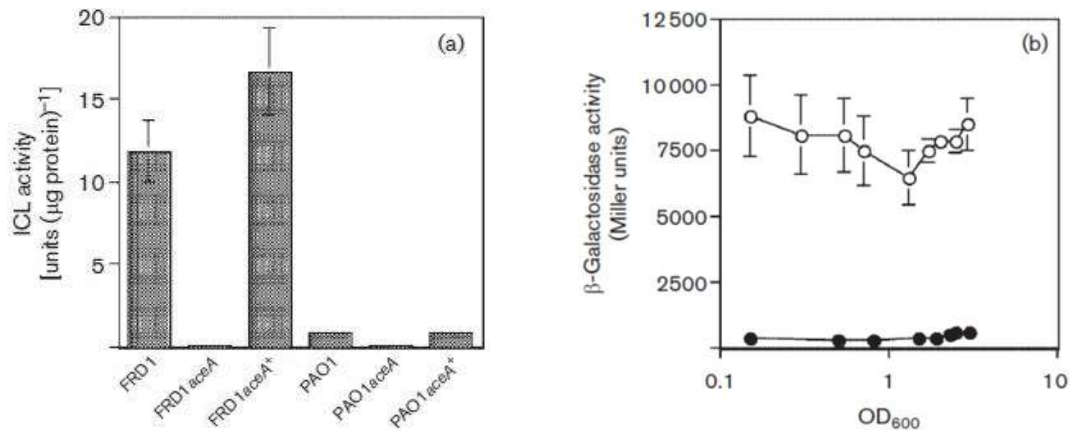


Figura 16. La actividad y la expresión de la ICL están alteradas en FRD1. (a) Actividad de ICL; una unidad cataliza la formación de 1.0 μmol de glioxilato min^{-1} . Los datos representan la media \pm SD de cuatro experimentos. (b) Actividad de β -Galactosidasa. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos conducidos por duplicado. \circ , FRD1; \bullet , PAO1. Tomada de Lyndsey *et al.*, 2009.

Por su parte, Hoboth y col. (2009) mediante cultivos crecidos en caldo LB, a una $\text{DO}_{600 \text{ nm}} \geq 3.0$ y a una concentración de oxígeno $< 1\%$, que son condiciones similares a las encontradas en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, al menos en lo que respecta en términos de un medio rico, en microaerofilia y en altas densidades celulares ($> 1 \times 10^9$ bacterias/mL), observaron que en los aislados de *P. aeruginosa* M25 y M26, provenientes de un paciente con fibrosis quística en etapa crónica, aumentó en el transcrito del gen *aceA*, en comparación a *P. aeruginosa* M1, la cual se aisló del mismo paciente durante la etapa temprana de la enfermedad. Esto fue similar a lo que encontró Lyndsey y col. (2008), ya que en las cepas de *P. aeruginosa* M 25 y M26 la expresión de la ICL fue constitutiva. Además, los cambios en la expresión de la ICL indicaron que durante el progreso de la fibrosis quística surgen cambios adaptativos, que llevan hacia la expresión constitutiva de genes necesarios para las condiciones nutricionales encontradas en las secreciones pulmonares de los pacientes con fibrosis quística, las cuales son ricas en lípidos, favoreciendo el metabolismo del acetil-CoA producido durante el catabolismo de ácidos grasos mediante la vía de la β -oxidación (Hoboth *et al.* 2009).

Los cambios en la expresión del gen que codifica a la ICL se relacionan con el proceso de colonización de *P. aeruginosa*, lo que finalmente conduce al desarrollo de la infección crónica, ya que le dan la ventaja adaptativa de asimilar los ácidos grasos o AA como la leucina presentes en los pulmones de pacientes con fibrosis quística o en las heridas de tejidos suaves del hospedero (Lindsey *et al.* 2008; Turner *et al.* 2014). Por lo que la ICL se considera como un factor de virulencia de tipo crónico y es un potencial blanco terapéutico (Lindsey *et al.* 2008).

5. JUSTIFICACIÓN

La enzima isocitrato liasa (ICL) participa en el establecimiento de la infección en el patógeno oportunista *P. aeruginosa*, y al no haber ortólogos de la enzima en mamíferos, la ICL es un blanco potencial para el desarrollo de antimicrobianos. Además, se demostró que mutantes en la ICL disminuyen la virulencia de *P. aeruginosa*, por lo que es de nuestro interés determinar como la relación estructura-función de la ICL puede afectar la función de la enzima y como esto repercute en la bacteria, para que a futuro, de manera racional, se diseñen antimicrobianos específicos contra la ICL.

6. HIPÓTESIS

El dominio adicional, el motivo extendido y la región del extremo carboxilo de la enzima ICL son esenciales para la funcionalidad de la enzima y la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.

7. OBJETIVO GENERAL

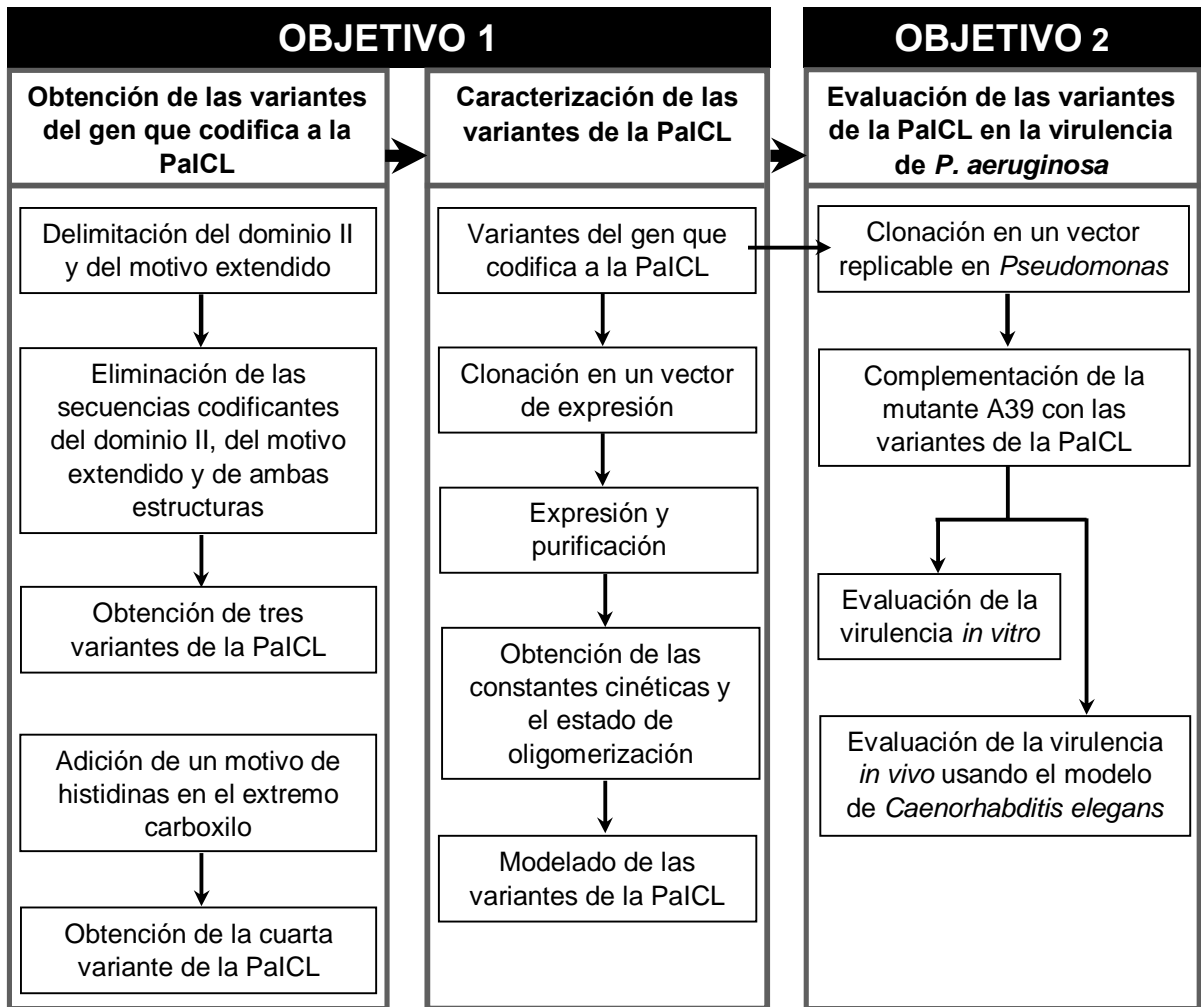
Estudiar la participación del dominio II, el motivo extendido y la región del extremo carboxilo en la función de la enzima ICL y la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.

7.1. Objetivos específicos

1. Establecer si el dominio II, el motivo extendido y la región del extremo carboxilo de la enzima ICL de *P. aeruginosa* PAO1 están involucrados en su función y estado de oligomerización.
2. Determinar la implicación de la estructura-función de la enzima ICL de *P. aeruginosa* PAO1 en la virulencia de esta bacteria.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

La estrategia experimental se dividió en tres partes. La primera parte tuvo como finalidad obtener las variantes del gen que codifica a la PaICL; la segunda parte consistió en la caracterización bioquímica de las variantes de la PaICL y el modelaje molecular de estas y la última parte comprendió la evaluación de las variantes de la PaICL en la virulencia de *P. aeruginosa*, tanto *in vitro* como *in vivo*.



9. RESULTADOS

9.1. Estudio de los dominios periféricos en la estructura-función de la isocitrato liasa (ICL) de *Pseudomonas aeruginosa*



Your submissions

Track your submissions

Study of peripheral domains in structure-function of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa*

Corresponding Author: Jesús Campos-García

World Journal of Microbiology and Biotechnology

3ffb1d63-d067-4528-8160-4150c665537d | v.2.2

[View submission details](#)

Submission has been accepted 15 Sep 23

Your submission has now been accepted by the journal. Your corresponding author jesus.campos@umich.mx will be contacted to complete the next steps.

If you have submitted any articles to us via any other submissions system, e.g. Editorial Manager or eJournalPress, please log in to, or use notification emails from that system for article tracking information. Still have a question? [Contact us](#)

[Your privacy choices/Manage cookies](#) [Help and support](#) [Privacy policy](#) [Terms and conditions](#) [Accessibility statement](#)

SPRINGER NATURE
© 2023 Springer Nature

 Give Feedback

Study of peripheral domains in structure-function of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa*

Díaz-Pérez Alma Laura¹, Díaz-Pérez César², Gaona-García Roxana Yughadi¹, Hernández-Santoyo Alejandra³, Lázaro-Mixteco Pedro E.⁴, Reyes-De La Cruz Homero¹, Campos-García Jesús¹.

¹ Lab. de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México.

²Facultad de Agrobiología, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, Gto., México.

³ Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

⁴ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México.

Corresponding Author:

Jesús Campos-García, Lab. de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. U-3, Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, México. Phone/Fax: (52) 443 3265788. ORCID: 0000-0002-8337-5830.

Email address: jesus.campos@umich.mx

Abstract

The capacity of *Pseudomonas aeruginosa* to assimilate nutrients is essential for niche colonization and contributes to its pathogenicity. Isocitrate lyase (ICL), the first enzyme of the glyoxylate cycle, redirects isocitrate from the tricarboxylic acid cycle to render glyoxylate and succinate. *P. aeruginosa* ICL (PaICL) is regarded as a virulence factor due to its role in carbon assimilation during infection. The AceA/ICL protein

family shares the catalytic domain I, triosephosphate isomerase barrel (TIM-barrel). The carboxyl terminus of domain I is essential for *Escherichia coli* ICL (EcICL) of subfamily 1. PaICL, which belongs to subfamily 3, has domain II inserted at the periphery of domain I, which is believed to participate in enzyme oligomerization. In addition, PaICL has the $\alpha 13$ -loop- $\alpha 14$ (extended motif), which protrudes from the enzyme core, being of unknown function. This study investigates the role of domain II, the extended motif, and the carboxyl-terminus (C-ICL) and amino-terminus (N-ICL) regions in the function of the PaICL enzyme, also as their involvement in the virulence of *P. aeruginosa* PAO1. Deletion of domain II and the extended motif results in enzyme inactivation and structural instability of the enzyme. The His₆-tag fusion at the C-ICL protein produced a less efficient enzyme than fusion at the N-ICL, but without affecting the acetate assimilation or virulence. The PaICL homotetrameric structure of the enzyme was more stable in the N-His₆-ICL than in the C-His₆-ICL, suggesting that the C-terminus is critical for the ICL quaternary conformation. The ICL-mutant A39 complemented with the recombinant proteins N-His₆-ICL or C-His₆-ICL were more virulent than the WT PAO1 strain. The findings indicate that the domain II and the extended motif are essential for the ICL structure/function, and the C-terminus is involved in its quaternary structure conformation, confirming that in *P. aeruginosa*, the ICL is essential for acetate assimilation and virulence.

Keywords:

Bacterial-pathogenesis; isocitrate lyase; *Pseudomonas aeruginosa*; protein structure; TIM-barrel.

Introduction

Nutrient assimilation permits microorganisms to inhabit and thrive in diverse environmental niches, including those within humans, thereby playing a role in the pathogenicity of bacteria (Campilongo et al. 2017; Shukla et al. 2015; Turner et al. 2014). Intracellularly, nutrients are directed towards various metabolic pathways to produce energy, and intermediates support the biological functions and growth of the organisms (Campilongo et al. 2017; Somerville and Proctor 2009). The glyoxylate cycle enables *P. aeruginosa* to assimilate organic compounds, which produce acetyl-CoA as an intermediate (Campos-Garcia et al. 2013). In addition, compounds like leucine, fatty acids, and mucins, which are present in the lungs, serve as sources of carbon

and energy during chronic infection by *P. aeruginosa* (Behrends et al. 2013; Fahnoe et al. 2012; Flynn et al. 2017). The glyoxylate cycle circumvents reactions of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, which releases CO₂, thus enabling the process of gluconeogenesis and biomass generation (Campilongo et al. 2017; Dolan and Welch 2018). Isocitrate lyase (ICL) performs one of the two exclusive reactions of the glyoxylate cycle by catalyzing the retro-aldol cleavage of isocitrate into glyoxylate and succinate (Pham et al. 2017). ICL's role in carbon assimilation is related to the *P. aeruginosa* pathogenicity, as its gene expression upregulates in animal models of acute and chronic infections (Turner et al. 2014). In addition, isolating strains of *P. aeruginosa* that constitutively express ICL is common in patients with cystic fibrosis chronic lung infections. These adaptive changes play an essential role in developing chronic disease, allowing the assimilation of fatty acids or amino acids such as leucine produced by the host (Campos-García 2010; Fahnoe et al. 2012; Hagins et al. 2011; Hoboth et al. 2009; Lindsey et al. 2008). Furthermore, strains with mutated ICL exhibit less virulence in various biological models. All evidence has led to consider ICL as a bacterial virulence factor and a potential therapeutic target because ICL is absent in vertebrates (Fahnoe et al. 2012; Lindsey et al. 2008; Park et al. 2016).

Isocitrate lyase (ICL), an ancient enzyme present in all three-life domains, requires a divalent cation such as magnesium, but to a lesser extent, manganese, for its catalytic activity (Campos-Garcia et al. 2013; Vanni et al. 1990). It belongs to the ICL/PEPM_KPHMT superfamily, whose members have the triosephosphate isomerase barrel (TIM-barrel) structural scaffold (Campos-Garcia et al. 2013). Identification of ICL from *P. aeruginosa* (PaICL) took place during the screening of a mutant library by transposon, finding ORF PA2634 (Díaz-Pérez et al. 2007). ORF2634 was named the *aceA* gene, which encodes the ICL enzyme of 531 amino acids with 58.9 kDa molecular mass (Díaz-Pérez et al. 2007). It has a homotetrameric structure of 231 kDa (Crousilles et al. 2018).

PaICL belongs to subfamily 3 of the AceA/ICL family and has a similar size to members of subfamily 2, which includes ICL from *Aspergillus nidulans* (AnICL). Interestingly, most ICL members from the genus *Pseudomonas* belong to subfamily 1, along with the ICL from *Escherichia coli* (EcICL) (Campos-Garcia et al. 2013).

The EcICL structure includes the TIM-barrel domain or domain I; the C-termini is critical for its enzymatic function (Britton et al. 2001; Matsuoka and McFadden 1988). The AnICL contains domain I and an insertion

of about 100 residues that gives rise to AnICL-domain II, which is located at the periphery of AnICL-domain I and may play a role in the subcellular translocation (Britton et al. 2000).

The PaICL consists of domain I and an added insertion, resulting in domain II. PaICL-domain II is found at the same position as AnICL-domain II but is minor and more disordered; this suggests that it plays a different role in PaICL (Britton et al. 2000; Crousilles et al. 2018). The crystallographic structure of PaICL shows that domain II might support the homotetrameric structure (Crousilles et al. 2018). PaICL differs from ICLs of subfamilies 1 and 2 in that the $\alpha 13$ -loop- $\alpha 14$ (PaICL-extended motif), protruding from the enzyme core, which is longer and more structured than in EcICL and AnICL. The structural differences in PaICL generate projections similar to a star in the homotetramer (Crousilles et al. 2018); nevertheless, the function of the PaICL-extended motif remains unclear.

Enzymes with highly conserved TIM-barrel folding may contain additional structures or domains that interrupt the barrel but do not impact its catalytic activity (Britton et al. 2000). Additional residues, in some cases, play specific roles in oligomerization, solubility, thermal stability, and catalytic activity (Höcker 2005; Stehlin et al. 1997; Thoma et al. 2000). Some domains that shape proteins with other structural scaffolds, have been linked to virulence e.g., the collagen-binding motif of YadA (Tamm et al. 1993).

The carboxyl-terminus in ICL of subfamily 1 is crucial for enzymatic function but not tetramer oligomerization. For instance, in EcICL, deleting the histidine residue at the C-terminal or the peptide insertion leads to loss of function. In the ICL from *Pseudomonas indigofera*, Phe-His deletion at the C-terminal resulted in function loss, although the quaternary structure remained unaffected (Matsuoka and McFadden 1988). A similar phenomenon is observed in the ICL structure of *Mycobacterium tuberculosis* (MtICL). The deletion of the C-terminal region, comprised of $\alpha 12\alpha 13\alpha 14$, resulted in a non-functional ICL, while the tetramer was still maintained (Shukla et al. 2015). Therefore, the ICL-domain II and the ICL-extended motif from the PaICL likely offer a unique characteristic yet to be described.

This study aimed to analyze the function of ICL-domain II, ICL-extended motif, C-termini of the *P. aeruginosa* PaICL, and their relationship with virulence. The results offer insight into the involvement of these protein regions with the function and stability of the enzyme.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions

This study employed the bacterial strains and plasmids listed below: *E. coli* JM101 (Yanisch-Perron et al. 1985), *E. coli* BL21(DE3) (Studier and Moffatt 1986), *P. aeruginosa* PAO1 (Wong and Mekalanos 2000), mutant A39 (Díaz-Pérez et al. 2007), plasmids pGEM-T Easy (Promega), and pCDFDuet-1 (Novagen). The strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C with shaking or on 1.5% LB agar plates at 37°C. In addition, specific assays were performed in the M9 medium (Sambrook and Russell 2001). The following antibiotic concentrations employed for *E. coli* strains were 30 µg/mL streptomycin and 100 µg/mL ampicillin; for *P. aeruginosa*, 200 µg/mL streptomycin, 200 µg/mL carbenicillin, and 100 µg/mL gentamicin.

Mutagenesis by PCR

To perform deletion mutagenesis, we designed, according to the report of Qi and Scholthof (2008), using the *aceA* gene sequence from *P. aeruginosa* PAO1. The forward primer FP315 (5'-TTCCTGGATAAGCGCCTGGCTTCCAACCTGTTCCAG-3') and the reverse primer RC291 (5'-CAGGCGCTTATCCAGGAAGGAGTTGTACAGGTCGCC-3') were used to amplify DNA containing the domain II deletion (75 bp) and the forward primer FV427 (5'-CTGAACTTCGCCGACGAGAAGATCCGCACCTTCCAG-3') and the reverse primer RR392 (5'-CTCGTCGGCGAAGTTCAGGGTCCAGTTGAAGGACGG-3') were used for the deletion of the α 13-loop- α 14 motif deletion (108 bp). The forward primer F6HisNICL (5'-ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACATGTCCGCATATCAG-3') and the reverse primer R6HisNICL (5'-GTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCATGGTCAATCCTTCAAG-3') were used to add the motif containing the hexahistidine (His₆) tag upstream of the *aceA* gene cloned in the pRR2364 plasmid; the primers were designed according to the sequence of the pDuAceA plasmid (Campos-Garcia et al. 2013). Next, the mutagenesis was performed by inverse PCR using pGaceA1 plasmid (Campos-Garcia et al. 2013) or pRR2364 plasmid (Díaz-Pérez et al. 2007) as template and the proofreading Herculase II Fusion DNA polymerase (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. This procedure resulted in the plasmids pGICLADII, pGICLADIII, and pRN-ICL (Figure S1a). The PCR products were then digested to eliminate the template in a reaction consisting of 5 µL PCR product, 2 µL 10x Tango buffer, 5 U *DpnI*

(Fermentas), and 12.5 μ L distilled H₂O. The mixture was incubated overnight at 37°C. Then, 2 μ L of the *DpnI* digestion mixture was transferred to electrocompetent *E. coli* JM101 cells. Deletions were confirmed by DNA sequencing.

Plasmid construction

The mutant *aceA* gene with deleted domain II and extended motif was constructed by replacing a fragment from pGICLADIII plasmid with pGICLADII plasmid to generate pGICLADII/III plasmid (Figure S1b). The expression plasmids with *aceA* gene variants were constructed by replacing a fragment from the pDuAceA plasmid (Campos-Garcia et al. 2013) with a corresponding deleted domain fragment from the pGICL Δ plasmids (Figure S1c). *P. aeruginosa* A39 mutant complement's plasmids were constructed by replacing a domain-deleted fragment from the pCDICL Δ plasmid into the pRR2634 plasmid to generate pRICLADII, pRICLADIII, and pRICLADII/III plasmids (Figure S1d). These plasmids were introduced into competent cells of mutant A39 by heat shock transformation (Chuanchuen et al. 2002).

Expression and Purification of PaICLs variants

The protein expression plasmids were introduced into electrocompetent *E. coli* BL21(DE3) cells. First, the transformed strains with the expression plasmids were grown in 45 mL of LB broth at 30°C for 4 h with shaking; then, protein overexpression was induced by adding isopropyl β -D-1-thio-galactopyranoside (IPTG) at a concentration of 0.2 mM; the cultures were further grown for 12 h at 20-25°C. Finally, the cells were harvested by centrifugation at 4°C. The pellets were resuspended in 1.5 mL Tris-NaCl buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25% glycerol, pH 8.0) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and disrupted by sonication on ice. Protein extracts were centrifuged (8000 rpm, 15 min at 4°C) to obtain cell-free extracts. Recombinant proteins were purified from cell-free extracts by affinity chromatography on TALON[®] metal affinity resin (Takara Bio) according to the protocol (Watanabe and Takada 2004) with slight modifications using buffer A (50 mM MOPS, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM imidazole, pH 8.0). The imidazole was removed from the protein solution by washing the protein through an Amicon ultra-centrifugal filter (Millipore). Protein concentration was quantified using Bradford reagent

(Bio-Rad), and protein extracts were resolved and visualized by 11% polyacrylamide SDS-PAGE (Sambrook and Russell 2001).

Non-gradient blue native PAGE

Non-gradient blue native electrophoresis (BN-PAGE) on 9% polyacrylamide was performed at room temperature as previously reported (Wittig et al. 2006). BN-PAGE gels were run at 100 V for 15 min and then continued at 150 V until the dye reached the bottom of the gel. Gels were stained with Coomassie brilliant blue as described (Yan and Forster 2009).

PaICL oligomer stability was determined as previously described (Rodríguez-Bolaños et al. 2020) with slight modifications: 5 µg of purified ICL was spiked with increasing concentrations of a denaturing compound in a final volume of 10 µL. Protein mixtures were incubated with TEMED for 15 min with SDS, triton-X100, or digitonin for 5 min at room temperature and immediately resolved by non-gradient BN-PAGE.

Dynamic light scattering

Protein samples at 1 µg/µL in Tris-NaCl buffer, 2% glycerol; pH 8.0 were stored at 4°C before dynamic light scattering (DLS) measurements, an aliquot of 150 µL was filtered through 0.2 µm Millipore syringe-tip filter. DLS was performed on a Zetasizer™ uV Malvern, and the samples were analyzed in plastic cuvettes at 25°C using runs of 25 s each. The z-average radius was calculated from the correlation function using the Dispersion Technology Software.

Determination of enzymatic activity in the PaICL variants

Isocitrate lyase enzyme activity was determined as previously described (Campos-Garcia et al. 2013).

Reaction mixtures contained 450 µL reaction buffer, pH 7.8 (50 mM MOPS, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 0.1% phenylhydrazine, 1-4 µg of purified ICL, and 0.25-1 mM hydrated DL-isocitric acid trisodium salt (14.9% H₂O at 97% purity; Sigma). The reaction mixture without substrate was incubated at 30°C for 10 min, and the reaction was initiated by adding isocitrate and setting at 30°C for 10 min. The reaction was stopped by the addition of 250 µL concentrated HCl. Immediately, 1 mL of potassium ferricyanide was added and the

mixture was incubated at 37°C for 10 min. Absorbance was measured at 520 nm, and ICL specific activity was quantified based on glyoxylic acid detection as described (Campos-Garcia et al. 2013).

Determination of the enzymatic activity of PaICL in permeabilized cells

E. coli BL21(DE3) cells harboring the pRICLΔDII, pRICLΔDIII, and pRICLΔDII/III plasmids were grown in LB broth containing 0.2% glucose at 30°C for 4 h with shaking. Protein overexpression was induced by the addition of IPTG (0.2 mM), and the cells were further incubated for 12 h at 20°C-25°C. 100 μL of the cultures were centrifuged at 12000 rpm for 3 min, and the pellets were washed with Tris-NaCl buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25% glycerol, pH 8.0). The pellets were resuspended in 450 μL reaction buffer, pH 7.8 (50 mM MOPS, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT), followed by adding 10 μL of 0.1% SDS and 10 μL chloroform. The mixtures were vortexed for 10 s, and the reaction continued with the addition of phenylhydrazine and isocitric acid, as described above.

Detection of Hexahistidin-tagged proteins

Protein concentration was determined using Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Samples containing hexahistidine-tagged PaICLs were mixed with denaturing buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% glycerol, 4% SDS, 4% β-mercaptoethanol, and 0.0025% bromophenol blue) and incubated at 95°C for 10 min. Protein samples were separated by SDS-PAGE (11%) and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were then blotted with 5% nonfat dry milk in TBS-T (10 mM Tris-HCl; 0.9% NaCl; 0.1% tween-20, pH 7.8) and incubated with anti-His tag antibody (Bio-Rad) for 12 h at 4°C. After the membranes were washed twice and incubated with donkey anti-mouse IgG HRP conjugate (Invitrogen) for 4 h at 4°C, the membranes were washed with TBS-T buffer and developed with Supersignal West Pico Luminol (Pierce; Thermo Fisher Scientific). Images were captured using a ChemiDoc MP system (Bio-Rad).

Molecular modeling and alignment

Three-dimensional structural homology modeling of the domain II, extended motif, and N- and C-terminal His₆-tags inserted into the PaICL was performed using the program Modeller 10.4 (Webb and Sali 2016). The X-ray structure of the ICL from *P. aeruginosa* (PDB No. 6G1O) was used as a template for deleted mutants. For the N- and C-terminal His₆ tagged PaICL models, the X-ray structure of *P. aeruginosa* ICL (PDB No. 6G1O) and an AlphaFold molecular model (AlphaFold ID: AF-Q9I0K4-F1) were used as templates. All structures were validated using Procheck 3.5 (Table S1) (Laskowski et al. 1993). All figures were visualized using PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1 Schrödinger, LLC.

A multiple sequence alignment between thirty-nine ICLs of subfamily 3 members was performed using the T-Coffee web server (<https://tcoffee.crg.eu/>) (Di Tommaso et al. 2011). In addition, the degree of evolutionary conservation of PaICL was conducted in the ConSurf web server (https://consurf.tau.ac.il/consurf_index.php) (Ashkenazy et al. 2016), using the previously obtained ICL-subfamily 3 alignment and the PaICL X-ray structure (PDB No. 6G1O).

Determination of virulence factor production

Assays were performed with bacterial cultures grown in LB broth or M9 medium, supplemented with 0.3% wt/vol sodium acetate and 0.02% wt/vol peptone. Cultures were centrifuged at 12000 rpm for 5 min when cell-free supernatants were required. In all cases, supernatants were used, bacterial culture density (OD_{600 nm}) was measured, and virulence factor production per unit cell density was reported. Each experiment was performed with three independent cultures.

For swimming motility, plates containing 30 mL of 0.3% agar LB were dried for 1 h, then 2 µL of each strain from overnight cultures diluted 1:1000 with LB broth were inoculated to the bottom of the Petri dish using a micropipette tip. Plates were incubated at 37°C for 18 h. Motility was observed as radial zones of bacterial growth, and the diameter of the radial zones was measured.

Pyocyanin was determined as described (Essar et al. (1990)). Briefly, 1.5 mL of cell-free supernatants were extracted with 600 µL of chloroform for 5 min. The sample was centrifuged at 12000 rpm for 5 min, then the organic phase (blue layer) was transferred to another microtube and extracted with 250 µL of 0.2 N HCl for 1 min and centrifuged for 1 min. The aqueous phase (pink layer) was measured at 520 nm, the absorbance value

was multiplied by the molar extinction coefficient of pyocyanin (17.072), and the concentrations were expressed as micrograms of pyocyanin per milliliter.

Pyoverdine was determined as described (Hoegy et al. (2014)). Briefly, 900 μ L of 50 mM pyridine-acetic acid buffer, pH 5.0 was added to 100 μ L of cell-free supernatant and vortexed for 1 min. The absorbance at 380 nm was measured, and the value obtained was multiplied by $\epsilon=16500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Pyochelin was determined by UV-visible spectrophotometry (Hoegy et al. 2014) with slight modifications. Briefly, pyochelin was extracted from 1 mL cell-free supernatants with citric acid to pH 3.0, 500 μ L CH_2Cl_2 was added, vortexed for 5 min, and centrifuged at 12000 rpm for 5 min. The organic phase was then transferred to another microtube and evaporated to dryness using a vacuum centrifuge for 15 min. Finally, the pellet was dissolved with 1 mL of methanol/ H_2O (1:1), the absorbance was measured at 313 nm, and the value was multiplied by $\epsilon=4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Rhamnolipids were quantified according to the colorimetric determination of sugars with orcinol with modifications (Behrens et al. 2016). Briefly, rhamnolipids were extracted from 900 μ L of cell-free supernatant acidified with HCl 6 N, and the sample was stored at 4°C for 24 h. After centrifugation, the pellet was dissolved in 100 μ L of distilled H_2O , and 600 μ L of chloroform-methanol (2:1) was added by vortexing for 10 min. The organic phase was transferred to a clean tube and evaporated to dryness in a vacuum centrifuge. The sample was dissolved in 100 μ L of distilled H_2O , and 900 μ L of freshly prepared orcinol reagent (0.19% orcinol in 53% H_2SO_4) was added. After heating at 80°C for 30 min and cooling for 15 min, the absorbance was measured at 421 nm. The concentration of L-rhamnose in the sample was calculated from a standard curve prepared with the same sugar, $R^2=0.99$.

Survival of *Caenorhabditis elegans*

Survival assays of *C. elegans* were performed using the Bristol N2 strain. Worms were synchronized using treatment with alkaline hypochlorite, as previously reported (Porta-de-la-Riva et al. 2012). L4 worms were placed in 20-well plates containing bacterial cells grown for 12 h and 24 h in either LB broth or M9 supplemented with acetate. Bacterial cells were suspended at $\text{DO}_{600} \sim 0.3$ in liquid kill medium (Kirienko et al. 2014), modified with one part SK broth with three parts S Basal medium+. Plates were incubated and scored

for live worms. The modified liquid kill medium was used as a negative control in the survival assays. Worms were considered dead when they stopped moving when the plate was shaken (Park et al. 2017).

Results

Deletion of domain II and the extended motif in PaICL

Based on three-dimensional alignments between the crystal structures of EcICL (1IGW), AnICL (1DQU), and PaICL (6G10) obtained from the Protein Data Bank (PDB), we determined that in the PaICL structure, domain II and the extended motif are conformed by 25 residues (C291 to P315) and 36 residues (R392 to V427), respectively (Figure 1). Sequence similarity analysis was performed to infer a possible function of PaICL domain II and the extended motif. The sequences of domain II and the extended motif showed similarity only with ICLs from subfamily 3, and even in subfamily 3, these regions are highly variable (Figure S2). Therefore, to determine the function of domain II and the extended motif, we removed the coding sequence of domain II and the extended motif in the gene encoding PaICL by deletion, yielding the *aceA*ΔDII gene, corresponding to deletion from 871 nt to 945 nt, and the *aceA*ΔDIII gene, which was deleted from 1174 nt to 1281 nt (Figures 1 and Figure S1). The *aceA*ΔDII/DIII gene corresponds to the *aceA* gene with the domain II and extended motif deleted, obtained as described in Materials and Methods (Figure S1).

Deletion of domain II and the extended motif results in a non-functional ICL

The N-terminal hexahistidine-tagged PaICL was previously obtained and named N-ICL (Campos-Garcia et al. 2013). Cloning *aceA* gene variants into the pCDFDuet plasmid for heterologous protein overexpression added a His₆-tag to the motif with the sequence MGSSHHHHHSQDP located at the N-terminal. The additional sequence in PaICL variants increased the theoretical molecular weight (MW) by 1.63 kDa; however, on SDS-PAGE, all recombinant proteins showed a higher molecular weight, ~1 kDa to 8 kDa (Table S2). We found that the mutant PaICLs were insoluble when bacterial cultures were induced at 30°C; lowering the induction temperature to 20°C yielded soluble proteins, except for the ICLΔDII/DIII variant, which appeared in the pellet of the protein extract. Although ICLΔDII and ICLΔDIII were obtained as soluble proteins, it was not possible to purify them because they were highly susceptible to degradation during the purification process,

even with the addition of a protease inhibitor (Figure S3). Therefore, the enzymatic activity of ICL Δ DII, ICL Δ DIII, and ICL Δ DII/DIII variants was determined in permeabilized cells as described in Materials and Methods. Cells harboring overexpression plasmids for PaICL variants were grown under induction conditions and glucose was added to downregulate *E. coli aceA* gene expression as previously reported (Sunnarborg et al. 1990). The expression in *E. coli* of the recombinant PaICLs proteins was verified by SDS-PAGE (Figure S4); however, none of the recombinant proteins showed ICL activity, except for the undeleted protein N-ICL (Figure 2a). The functionality of the mutated PaICLs was determined in the *P. aeruginosa* background by complementation of the mutant A39. As expected, ICL Δ DII, ICL Δ DIII, or ICL Δ DII/DIII cloned proteins were unable to restore the ability to assimilate acetate as the sole carbon and energy source, in contrast to the pRR2634 plasmid harboring the WT *aceA* gene (Figure 2b). These results showed that mutant PaICLs were also non-functional in *P. aeruginosa*, confirming that removing domain II and the extended motif resulted in non-functional ICL enzymes.

To explore whether the quaternary structure affection of the ICL mutants is correlated with non-functional enzymes, the oligomerization state of ICL Δ DII, ICL Δ DIII, and ICL Δ DII/III recombinant enzymes was determined by BN-PAGE. Although the expression of mutant PaICLs was demonstrated in SDS-PAGE (Figure S4), on the BN-PAGE gel, the soluble protein extracts of mutant PaICLs, ~200 kDa protein bands were not observed in the recombinant proteins ICL Δ DII, ICL Δ DIII, and ICL Δ DII/DIII (Figure S4), suggesting that although ICL Δ DII, ICL Δ DIII, and ICL Δ DII/DIII are overexpressed, they do not form oligomers. The purified N-ICL migrated around the expected molecular weight of ~200 kDa, confirming that the PaICL is assembled as a homotetramer (Figure 3a).

Role of the C-terminus and N-terminus in the PaICL function

To study the function of the C-terminus of PaICL, we added a polypeptide at the C-terminus as reported for EcICL (Matsuoka and McFadden 1988). The *aceA* gene was cloned into the pTRCHis2A vector since it fused a polypeptide with the sequence MGSSHHHHHSQDPKLAAA at the C-terminus, and the resulting protein was named C-ICL. The N-terminal His₆-tagged into the PaICL was previously obtained as N-ICL (Campos-Garcia et al. 2013). The additional sequence in PaICL increased the theoretical molecular weight by ~3 kDa; however, the recombinant C-ICL showed a higher MW than expected (Figure 3a, Figure S5, and Table S2).

The purification process for N-ICL and C-ICL yielded identical amounts of both recombinant enzymes (Figure 3a, Figure S5).

To know the influence of the motif added at the C-terminus and N-terminus of PaICL, the function of ICLs was evaluated. The enzyme kinetics were determined for N-ICL and C-ICL and showed a Michaelis-Menten-type behavior, as previously reported for N-ICL (Campos-Garcia et al. 2013). The Lineweaver-Burk plot confirmed the enzymatic kinetics, which were linear for both the N-ICL and C-ICL recombinant enzymes (Figure 4). The kinetic parameters determined for N-ICL and C-ICL are shown in Table 1. The K_m parameter was determined by non-linear regression from the Michaelis-Menten plot; this constant was statistically higher for C-ICL than N-ICL. The V_{max} value of C-ICL was lower than that of N-ICL, while the optimal temperature and pH were similar for both enzymes. The efficiency of ICLs was evaluated by the k_{cat} and K_m/k_{cat} constants, which were also statistically lower for C-ICL (Table 1), suggesting that the catalysis performed by C-ICL is less efficient compared to N-ICL. To gain insight into the stability of the enzyme, the half-life ($t_{1/2}$) was measured at 45°C. The $t_{1/2}$ for C-ICL and N-ICL were similar, indicating that the His₆-tag at the C-terminus of PaICL did not affect the enzyme's thermostability. However, when C-ICL performance was tested *in vivo*, it did not affect the phenotype of *P. aeruginosa*, as mutant A39 complemented with pRC-ICL plasmid grew on acetate at the same level as mutant A39 complemented with pRN-ICL or pRR2634 plasmid (Figure 2b).

BN-PAGE was performed to determine whether the His₆-tag at the C-terminus of PaICL affected the oligomerization state of C-ICL. The purified C-ICL showed a MW of ~220 kDa on the BN-PAGE gels, indicating that C-ICL has a homotetrameric conformation as observed for N-ICL (Figure 3a).

To elucidate the effect of the His₆-tag added at the C-terminus and N-terminus of PaICL on the interactions involved in the stability of the PaICL homotetramer, several protein interaction disruptors were evaluated. N-ICL and C-ICL were incubated with compounds that disrupt ionic or hydrophobic interactions and break disulfide bonds. When the enzymes were incubated with DTT, digitonin, or triton X-100 at the concentrations used, neither N-ICL nor C-ICL was affected (Figure S6). However, when the enzymes were incubated with SDS and run on BN-PAGE gels, a decrease in the intensity of the bands of N-ICL and C-ICL homotetramers was observed at all SDS concentrations tested, with the effect being more pronounced for C-ICL (Figure 3b-d). In addition, two bands on the BN-PAGE gel appeared close to the theoretical MW of monomeric and

dimeric PaICL, 58.9 and 119.6 kDa, respectively (Figure 3b-c). The additional bands are dissociated homotetramers of N-ICL and C-ICL as was tested by Western blot (Figure 3c). These results suggest that C-ICL is a less stable enzyme than N-ICL.

Furthermore, ionic interactions play an essential role in stabilizing the quaternary structure of PaICL. The dissociation of the N-ICL and C-ICL homotetramers was verified by Dynamic Light Scattering (DLS) (Figure 5). At 25°C, N-ICL has a polydispersity index of 0.252 and a particle diameter of 9.67 ± 0.32 nm, corresponding to the homotetrameric enzyme (Figure 5a). As previously observed by BN-PAGE, the incubation of N-ICL with SDS resulted in the homotetramer dissociation, appearing smaller conformations than the homotetramer, which correspond to dimers and monomers of the N-ICL (Figure 5b). In addition, DLS results in the function of temperature showed that the N-ICL was more stable than the C-ICL quaternary structure (Figure 5c).

Effect of the C-terminus of PaICL on *P. aeruginosa* virulence

Regarding the role of PaICL in carbon metabolism for gluconeogenesis and replenishing TCA intermediates, we determined whether the motif added at the C- and N-terminus of PaICL modifies *P. aeruginosa* virulence. The virulence of the complemented mutant A39 overexpressing PaICL, C-ICL, or N-ICL was tested by measuring the production of virulence factors, such as pyochelin, pyocyanin, rhamnolipids, pyoverdine, and swimming. Virulence factors were determined in LB and M9 supplemented with acetate culture media, both in early and late stationary phases of growth. The results showed that the PaICL, N-ICL, and C-ICL were essential for growth on acetate (Figure 2b); however, they did not affect the production of siderophores, pyocyanin, rhamnolipids, and motility. There was no statistical difference between PAO1, mutant A39, and complemented mutant A39 (Figures S7 and S8), even though the PaICL variants were overexpressed in mutant A39. The virulence of mutant A39 expressing the recombinant PaICLs was also determined by *C. elegans* survival assays using live bacterial cells obtained from cultures grown under the above conditions. Mutant A39 was unable to kill worms (Figure 6a-b), indicating that mutant A39 was avirulent. Survival kinetics of worms obtained with live bacterial cells grown in LB broth for 12 h and 24 h showed that the mutant A39 expressing the His₆-tag C-ICL or N-ICL exhibited an increased percentage of killed worms than the PAO1 WT strain (Figure 6a-b). Although the worms were less affected when exposed to live bacterial

cells grown for 12 h in LB broth (Figure 6a), the strains exhibited the same behavior as that observed with bacterial cells grown for 24 h (Figure 6b). At 72 h of worms exposure to bacterial cells grown in LB broth for 24 h, the ICL-mutant strain A39 showed ~85% worms survival, while the WT strain showed ~40% worms survival; but interesting, the A39 mutant complemented with both the recombinant N-ICL or C-ICL proteins showed ~10% of worms survival (Figure. 6b).

Discussion

The ICL from *P. aeruginosa* has been extensively studied by biochemical and mutagenesis approaches, indicating its essential role in carbon assimilation and pathogenicity (Behrends et al. 2013; Díaz-Pérez et al. 2007; Fahnoe et al. 2012; Flynn et al. 2017). The kinetic constants of the PaICL enzyme have been determined, amino acids related to function and thermal stability have been identified, and the X-ray crystal structure has been solved at high resolution (Campos-Garcia et al. 2013; Crousilles et al. 2018). Furthermore, according to its phylogenetic relationship, PaICL has been classified into subfamily 3 of the aceA/ICL family. PaICL is closely related to ICLs from psychrophilic marine bacteria and members of the genus *Burkholderia*. In contrast, most ICLs from species of the genus *Pseudomonas* belong to subfamily 1 due to structural differences according to enzyme size, and these structural differences may be related to some specific properties of the enzyme. Within subfamilies 1, 2, and 3, there are crystallized ICLs, which allow the structural comparison between the subfamilies. A comparison of the crystal structures of EcICL, AnICL, and PaICL revealed that PaICL has the additional domain II as ICLs of subfamily 2 and contains an extended motif. Still, the function of these structures is unknown. The C-terminal of some subfamily 1 ICLs is essential for enzymatic activity but not for maintaining the quaternary structure. The C-terminus of PaICL has not been studied, and how the structure-function relationship of PaICL affects *P. aeruginosa* virulence has not been elucidated.

According to the crystal structure of PaICL, the enzyme is composed of the TIM-barrel domain, with the active site located at the C-terminus of the TIM-barrel, as ICLs are typically structured (Britton et al. 2001; Britton et al. 2000). Domain II has been inserted at the periphery of the TIM-barrel, corresponding to $\beta 8$, $\beta 9$, $\beta 10$, and the extended motif corresponds to $\alpha 13$ and $\alpha 14$ (Crousilles et al. 2018). In AnICL, domain II is located at the same position as PaICL-domain II; however, the former is a predominantly helical domain

consisting of 100 residues assembled in α 10- α 14 and β 9 (Britton et al. 2000), whereas PaICL-domain II is shorter, consisting of only 25 residues assembled mainly in β -sheets (Figure 1a-b). AnICL-domain II might be related to the subcellular location of AnICL in peroxisomal microbodies (Britton et al. 2000); whereas PaICL-domain II seems to be related to a completely different function, it might be involved in the maintenance of the quaternary structure of PaICL (Crousilles et al. 2018). These structures of PaICL only showed sequence similarity with ICLs of subfamily 3 (Figure S2); however, in other members of subfamily 3, the protein structures have not been characterized yet, so it was not possible to infer a potential function for domain II and the extended motif by sequence similarity.

One strategy to elucidate their function is to delete the structures of PaICL. Through deletion mutagenesis of fragments, we obtained three PaICL variants: ICL Δ DII, ICL Δ DIII, and ICL Δ DII/DIII (Figure 1Sa). Mutant PaICLs were overexpressed at the same level as N-ICL, as observed in crude extracts resolved by SDS-PAGE. The molecular weight of all PaICL variants was in the range of 1-8 kDa above the theoretical MW (Table S2), which may be due to the basic amino acids of the His₆-tag that delay the mobility of fusion protein bands on SDS-PAGE gels, causing the variation in MW (Guo et al. 2013). The overexpression of mutant PaICLs at 30°C resulted in insoluble protein aggregates, which is a common problem in the production of heterologous proteins due to the misfolding of recombinant proteins caused by high expression levels and the strong temperature dependence of hydrophobic interactions that promote the protein aggregation (Papanephytou and Kontopidis 2014; Wang et al. 2008). The formation of protein aggregates can be avoided by reducing the rate of protein synthesis by lowering the post-induction temperature (Papanephytou and Kontopidis 2014). The 20-25°C induction temperature resulted in soluble protein synthesis; however, these were rapidly degraded as shown in the Western blot of eluted proteins obtained from protein purification (Figure S3). This fact could be a consequence of protein misfolding due to the missing structures in PaICL, as it has been reported that proteins that do not correctly fold after synthesis are recycled by proteolytic enzymes (Olivares et al. 2018).

The function of the overexpressed ICL Δ DII, ICL Δ DIII, and ICL Δ DII/DIII was evaluated in the BL21(DE3) background by permeabilized cells; however, the PaICL enzymes with deleted fragments were non-functional (Figure 2a). Furthermore, mutant A39 complemented with the mutated PaICLs, behaved like the null mutant

A39 in M9 supplemented with acetate (Figure 2b), indicating that domain II and the extended motif are essential for the proper folding and function of PaICL.

PaICL-domain II has been proposed to be structurally relevant, maintaining interactions between adjacent subunits (Figure 7a) (Crousilles et al. 2018). However, in the ICL Δ DII molecular model, the entire interaction surface between adjacent subunits is observed to be lost (Figure 7b), and presumably without these interactions, the PaICL enzyme could rapidly lose stability and be susceptible to degradation, as observed in figure S3.

The extended motif starts in the middle part of helix α 13 and continues to the middle of helix α 14 (Figure 7c); when this motif is deleted, the continuity of these helices is broken (Figure 7d), leaving part of each helix. The remaining residues in this protein region form a single alpha-helix with a double change of direction, which is physically very unstable. This new structure may lead to a loss of conformation of the entire surrounding protein region and subsequent degradation of the whole enzyme (Figure S3).

In previous studies, it was shown that adding a His₆-tag at the N-terminus of ICLs of the aceA/ICL family did not affect neither the function nor structure of these enzymes, e.g., with PaICL and ICL from *Saccharomyces cerevisiae* (Campos-Garcia et al. 2013; Hiragi et al. 2021). We observed that adding a His₆-tag at the N-terminus of PaICL (Figure S9) did not affect the function or structure of the enzyme because the His₆-tag is totally exposed to solvent. The distance between the His₆-tag and the rest of the protein is large enough to interact with each other (Figure S9b); this is consistent with previous results obtained with PaICL (Campos-Garcia et al. 2013); however, the C-terminus of ICL appears to be essential for enzyme function (Matsuoka and McFadden 1988). The importance of the C-terminus of ICL is supported by the fact that the deletion of the histidine at the C-terminus of EcICL resulted in a non-functional enzyme. At the same time, the insertion of a hepta residue peptide had a similar effect. In ICL from *P. indigofera*, the deletion of the Phe-His at the C-terminus of the enzyme caused ICL to lose function, but the quaternary structure remained intact (Matsuoka and McFadden 1988). In MtICL, deleting three α -helices that form the C-terminus region severely impairs the enzymatic function; however, MtICL remains as a homotetramer. The C-terminal region in MtICL, which is involved in conformational changes, possesses 18 residues at the C-terminus, acting as a lid of the catalytic site of the adjacent subunit. Upon substrate binding, the active site loop moves to adopt the closed conformation, which blocks accessibility to the catalytic residues and triggers movement of the C-terminus lid

of the adjacent subunit, completing the catalytic conformation (Shukla et al. 2015). However, the addition of a polypeptide containing a His₆-tag at the C-terminus had no apparent effect on the quaternary structure in MtICL; similar results were obtained with subfamily 2 ICLs from *Magnaporthe oryzae* and *Fusarium graminearum* when a His₈-tag was added at the C-terminus (Park et al. 2016). Therefore, to elucidate the role of the C-terminus in PaICL, a polypeptide containing a His₆-tag was added. N-ICL and C-ICL were purified by affinity chromatography, and their kinetic parameters were determined (Table 1). The affinity for the substrate decreased for C-ICL, as the K_m value was more significant compared to N-ICL, and the parameters V_{max} , k_{cat} , and k_{cat}/K_m were lower for C-ICL, indicating that the enzyme is less efficient in catalysis. The stability of C-ICL was assessed by $t_{1/2}$, which has been used to characterize the stability of enzymes and is related to the thermal resistance of proteins (Bustamante-Vargas et al. 2019; Ünal 2007)). The thermal stability of ICL varies significantly from source to source (Vanni et al. 1990). For N-ICL and C-ICL, $t_{1/2}$ indicated that the stability of both enzymes was similar. These results suggested that the added polypeptide at the C-terminus of PaICL affected the function of PaICL. In the molecular model of PaICL added with a His₆-tag at the C-terminal end (Figure 7d), it was observed that the His₆-tag does not interact directly with the catalytic loop; however, an additional residue (D536) from the His₆-tag forms a repulsive force with residues from the extended motif E418 and D420 (Figure 7d). We hypothesize that repulsive forces limit the extended motif and the flexibility of the C-terminus; the loss of mobility of the C-terminus may affect the movement of the catalytic loop, which is reflected in a change in the values of the kinetic parameters of the enzyme (Table 1).

Regarding the oligomerization of C-ICL and N-ICL, as shown by non-gradient BN-PAGE (Figure 3a), both recombinant enzymes have the molecular mass corresponding to homotetramer, which is in agreement with the quaternary structure of reported ICLs (Eprintsev et al. 2014; Vanni et al. 1990). The His₆-tag linked to recombinant proteins has been described to affect protein stability, interfering with the proper protein folding and oligomerization, promoting aggregation, and affecting structural homogeneity (Kim et al. 2004; Votchitseva et al. 2006); even the His₆-tag may generate truncated forms of protein (Nishino et al. 2023). It might be an obstacle to form an oligomer (Saha et al. 2022), or it can promote a higher order oligomeric state (Singh et al. 2020); however, the His₆-tag in C-ICL and N-ICL did not change its oligomeric state, since a single band appeared when these run on the native gels (Figure 3).

The homotetrameric conformation is the functional form of the ICL, and the C-terminal region appears to be essential for the oligomerization of the enzyme. The process starts with two monomers forming a dimer; in the ICLs from *A. niger* and *M. oryzae*, dimerization is achieved mainly by interlinking α -helices located toward the C-terminus of two monomers, creating a “knot” between these monomers (Britton et al. 2001; Park et al. 2016). H-bonds stabilize the dimer of MtICL, the electrostatic interaction between Asp98 and Arg123 of both monomers, and the shape complementary between monomers. The C-terminal region, through helix swapping of α 12 and α 13 between two adjacent monomers, contributes but is not essential to maintain the homotetrameric structure of the protein (Shukla et al. 2015). Multiple forces can contribute significantly to stabilizing the quaternary structure of proteins, including electrostatic interactions, hydrophobic interactions, and disulfide bonds (Walden et al. 2001). For PaICL, it is unknown which type of interactions are more critical for homotetramer stabilization. For other enzymes that share the structural scaffold of the TIM-barrel, interactions that stabilize their structure have already been determined, e.g., the homotetramer of *Pyrococcus woesei* triosephosphate isomerase is stabilized by hydrophobic interactions, whereas in *Pyrococcus brucei* it is stabilized by two disulfide-bonds (Walden et al. 2001), and in *Plasmodium falciparum* by ionic interactions (Rodríguez-Bolaños et al. 2020). When the N-ICL and C-ICL proteins were incubated with compounds that disrupted inter-residue interactions (Figures 3d and S6), ionic interactions significantly contributed to maintaining the PaICL quaternary structure. The results suggest that the enzyme's C-terminus stabilizes the PaICL homotetramer, as shown in figure 3. As in MtICL, in the PaICL homotetrameric structure, the C-terminus of an adjacent subunit is located close to the catalytic site of the other subunit, extending up the extended motif (Figure 7d). This region of the enzyme appears to be an area of subunit contacts; one of the possible explanations for the more pronounced loss of stability of the C-ICL is that the His₆-tag added at the C-terminus could disrupt the interactions present in this zone. In addition, the importance of the extended motif in the structural stability of PaICL was discussed above, suggesting that repulsive forces are generated between the His₆-tag and the extended motif (Figure 7d). This would likely cause a disruption of the adjacent region to the extended motif and the C-terminal. This change in the mobility of the enzyme could lead to trouble with ionic interactions, and the enzyme could be more susceptible to subunit dissociation, as shown in Figure 3.

N-ICL and C-ICL homotetramers dissociation resulted in dimers and monomers whose native masses are close to the theoretical MW of dimeric and monomeric PaICL. It is reported that the variation of native molecular mass of soluble proteins calculated by BN-PAGE is ~10-20%, especially with basic proteins since negative charges of protein-bound dye cannot sufficiently overcome large amounts of basic residues (Wittig et al. 2006). By DLS, we verify that N-ICL remains a stable homotetramer in solution and, in addition, has a homogeneous particle size, as indicated by the polydispersity index lower than 0.3 (Figure 5). On a scale from 0 to 1, a polydispersity index lower than 0.1 is associated with a high particle size homogeneity, whereas a high index value suggests a broad size distribution (Gaumet et al. 2008). The N-ICL homotetramer dissociation was only accomplished by incubating the enzyme with SDS (Figure 3 and Figure 5), confirming that PaICL homotetramer is stabilized by ionic interactions and is dissociated in dimers and monomers. Additionally, the N-ICL was more stable to temperature than C-ICL (Figure 3 and Figure 5).

The synthesis of virulence factors was determined in the mutant A39 complemented with the PaICL variants from cultures grown in LB and M9 plus acetate for 12 h and 24 h, as previously observed (Martínez-Alcantar et al. 2021), some virulence-associated molecules also accumulated over time. None of the strains tested showed differences compared to *P. aeruginosa* PAO1 (Figures S8); these results are consistent with those observed for the *aceA* mutant derived from *P. aeruginosa* FRD1, which produced pyocyanin and pyoverdine in LB at the same level as FRD1; however, the production of virulence factors in FRD1 was different from *P. aeruginosa* PAO1 (Lindsey et al. 2008). Our results are consistent with Bartell et al. (2017), who used a genome-scale metabolic network reconstruction of *P. aeruginosa* PA14 to elucidate the interconnectivity between virulence factor synthesis and growth. Thus, ICL did not affect virulence factor production, unlike *P. aeruginosa* PA14 grown in LB, where glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which is related to glycolysis, affected pyoverdine production. The enzyme homoserine dehydrogenase, related to amino acid metabolism, also influenced pyoverdine synthesis, but its effect is more evident because it produces L-aspartate 4-semialdehyde, which is a pyoverdine precursor (Bartell et al. 2017).

Worm survival kinetics using live bacterial cells confirmed the phenotype of the PaICL mutants, as our results in *C. elegans* indicated that the A39 mutant is more apathogenic than PAO1 (Figure 6). The phenotype observed in the ICL mutant has been consistently documented in various *in vivo* models, including mammalian and non-mammalian hosts (Depke et al. 2020; Dunn et al. 2009; Fahnoe et al. 2012; Lindsey et

al. 2008; Turner et al. 2014). Interestingly, overexpression of N-ICL and C-ICL increased the virulence in *P. aeruginosa*, determined by survival kinetics in *C. elegans* worms. Mutant A39 was unable to kill worms, indicating that mutant A39 was avirulent. Survival kinetics of worms using live bacterial cells grown in LB broth for 24 h showed that the mutant A39 expressing the His₆-tag C-ICL or N-ICL exhibited an increased percentage of killed worms (~90%) than the PAO1 WT strain (~60%) (Figure 6b). In this context, constitutive expression of ICL is common in *P. aeruginosa* isolated from chronic infection of cystic fibrosis patients (Dunn et al. 2009; Fahnoe et al. 2012; Lindsey et al. 2008). These results indicate that although PaICL plays an essential role in *P. aeruginosa* virulence, the C-terminus of the enzyme does not alter the pathogenicity of the bacteria when using *C. elegans* as a model. Metabolism has been linked to virulence because of the availability of carbon sources that can regulate genes encoding virulence determinants, presumably as an adaption to the host microenvironment (Panayidou et al. 2020; Somerville and Proctor 2009).

Conclusions: Domain II, the extended motif, and the PaICL's C-terminus contribute to stabilizing the homotetramer enzyme. The domain II and the extended motif are essential to obtain a functional PaICL, whereas the polypeptide added at the C-terminus of the PaICL modified the enzyme efficiency. In addition, the ionic interactions are critical for maintaining the PaICL homotetramer structure. In contrast, adding the His₆-tag at the C-terminus renders a protein homotetramer more susceptible to ionic disruptors but do not affect acetate assimilation in *P. aeruginosa* or virulence in the *C. elegans* model, confirming that in *P. aeruginosa*, the ICL is essential for acetate assimilation and virulence.

Acknowledgments

This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México (grant number 256119) and by a grant from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14. Dra. Adela Rodríguez-Romero by DLS measurements.

Statements and Declarations

Funding sources

This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México (grant number 256119) and the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14 grant.

Competing interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Authors' contributions

All authors contributed to the conception and design of the study. Díaz-Pérez A. L., Díaz-Pérez C., Gaona-García R. Y., Hernández-Santoyo Alejandra, Lázaro-Mixteco Pedro E., Reyes-De La Cruz Homero, performed material preparation, data collection, and analysis. The first draft of the manuscript was written by Díaz-Pérez A. L., Díaz-Pérez C., Campos-García J., and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Data Availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules *Nucleic acids research* 44:W344-W350
- Bartell JA, Blazier AS, Yen P, Thøgersen JC, Jelsbak L, Goldberg JB, Papin JA (2017) Reconstruction of the metabolic network of *Pseudomonas aeruginosa* to interrogate virulence factor synthesis *Nature communications* 8:14631
- Behrends V, Ryall B, Zlosnik J, Speert D, Bundy J, Williams H (2013) Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections *Environmental microbiology* 15:398-408
- Behrens B, Engelen J, Tiso T, Blank LM, Hayen H (2016) Characterization of rhamnolipids by liquid chromatography/mass spectrometry after solid-phase extraction *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408:2505-2514
- Britton K et al. (2001) The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 57:1209-1218
- Britton K et al. (2000) The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans* *Structure* 8:349-362
- Bustamante-Vargas C et al. (2019) Thermal inactivation kinetics and thermodynamic properties of immobilised *Aspergillus niger* pectinase in rigid polyurethane foam *International Food Research Journal* 26:1535-1545
- Campilongo R et al. (2017) One ligand, two regulators and three binding sites: How KDPG controls primary carbon metabolism in *Pseudomonas* *PLoS Genetics* 13:e1006839
- Campos-García J (2010) Metabolism of Acyclic Terpenes by *Pseudomonas*. In: Ramos JL, Filloux A (eds) *Pseudomonas: Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 235-253. doi:10.1007/978-90-481-3909-5_8
- Campos-García J, Diaz-Perez C, Diaz-Perez AL (2013) Residues Asn214, Gln211, Glu219 and Gln221 contained in the subfamily 3 catalytic signature of the isocitrate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*

- are involved in its catalytic and thermal properties World Journal of Microbiology and Biotechnology 29:991-999
- Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP (2002) Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells Biotechniques 33:760-763
- Crousilles A, Dolan SK, Brear P, Chirgadze DY, Welch M (2018) Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa* Journal of Biological Chemistry 293:14260-14269
- Depke T, Thöming JG, Kordes A, Häussler S, Brönstrup M (2020) Untargeted LC-MS metabolomics differentiates between virulent and avirulent clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* Biomolecules 10:1041
- Di Tommaso P et al. (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension Nucleic acids research 39:W13-W17
- Díaz-Pérez AL, Román-Doval C, Díaz-Pérez C, Cervantes C, Sosa-Aguirre CR, López-Meza JE, Campos-García J (2007) Identification of the aceA gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine FEMS microbiology letters 269:309-316
- Dolan SK, Welch M (2018) The glyoxylate shunt, 60 years on Annual review of microbiology 72:309-330
- Dunn M, Ramirez-Trujillo J, Hernández-Lucas I (2009) Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis Microbiology 155:3166-3175
- Eprintsev A, Salnikov A, Haba A, Zaichikova M (2014) Isocitrate lyase isozymes and their role in organisms with different levels of organization Biology Bulletin Reviews 4:323-334
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford I (1990) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications Journal of bacteriology 172:884-900
- Fahnoe KC, Flanagan ME, Gibson G, Shanmugasundaram V, Che Y, Tomaras AP (2012) Non-traditional antibacterial screening approaches for the identification of novel inhibitors of the glyoxylate shunt in gram-negative pathogens PLoS One 7:e51732

- Flynn JM, Phan C, Hunter RC (2017) Genome-wide survey of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 reveals a role for the glyoxylate pathway and extracellular proteases in the utilization of mucin Infection and immunity 85:e00182-00117
- Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F (2008) Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics 69:1-9
- Guo J, Xu L, Su Y, Wang H, Gao S, Xu J, Que Y (2013) ScMT2-1-3, a metallothionein gene of sugarcane, plays an important role in the regulation of heavy metal tolerance/accumulation BioMed Research International 2013
- Hagins JM, Scoffield J, Suh S-J, Silo-Suh L (2011) Malate synthase expression is deregulated in the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate FRD1 Canadian journal of microbiology 57:186-195
- Hiragi K et al. (2021) Structural insights into the targeting specificity of ubiquitin ligase for *S. cerevisiae* isocitrate lyase but not *C. albicans* isocitrate lyase Journal of Structural Biology 213:107748
- Hoboth C et al. (2009) Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis The Journal of infectious diseases 200:118-130
- Höcker B (2005) Directed evolution of ($\beta\alpha$) 8-barrel enzymes Biomolecular engineering 22:31-38
- Hoegy F, Mislin GL, Schalk IJ (2014) Pyoverdine and pyochelin measurements Pseudomonas methods and protocols:293-301
- Kim Y et al. (2004) Automation of protein purification for structural genomics Journal of structural and functional genomics 5:111-118
- Kirienko NV, Cezairliyan BO, Ausubel FM, Powell JR (2014) *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*. In: Filloux A, Ramos J-L (eds) Pseudomonas Methods and Protocols. Springer New York, New York, NY, pp 653-669. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_50
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM Joac (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures 26:283-291
- Lindsey TL, Hagins JM, Sokol PA, Silo-Suh LA (2008) Virulence determinants from a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa* include isocitrate lyase Microbiology 154:1616-1627

- Martínez-Alcantar L, Orozco G, Díaz-Pérez AL, Villegas J, García-Pineda E, Campos-García J (2021) Participation of Acyl-Coenzyme A Synthetase FadD4 of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Acyclic Terpene/Fatty Acid Assimilation and Virulence by Lipid A Modification *Frontiers in Microbiology*:3438
- Matsuoka M, McFadden BA (1988) Isolation, hyperexpression, and sequencing of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase in *Escherichia coli* *Journal of bacteriology* 170:4528-4536
- Nishino M, Noda K, Ishibashi M, Uno Y, Nitta Y (2023) Expression and purification of ¹⁵N-labeled Fra a 1, a strawberry allergen, to prepare samples for NMR measurements *Protein Expression and Purification* 210:106296
- Olivares AO, Baker TA, Sauer RT (2018) Mechanical protein unfolding and degradation *Annual review of physiology* 80:413-429
- Panayidou S, Georgiades K, Christofi T, Tamana S, Promponas VJ, Apidianakis Y (2020) *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence *Scientific Reports* 10:9505
- Papaneophytou CP, Kontopidis G (2014) Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review *Protein expression and purification* 94:22-32
- Park H-EH, Jung Y, Lee S-JV (2017) Survival assays using *Caenorhabditis elegans* *Molecules and cells* 40:90
- Park Y, Cho Y, Lee Y-H, Lee Y-W, Rhee S (2016) Crystal structure and functional analysis of isocitrate lyases from *Magnaporthe oryzae* and *Fusarium graminearum* *Journal of Structural Biology* 194:395-403
- Pham TV et al. (2017) Mechanism-based inactivator of isocitrate lyases 1 and 2 from *Mycobacterium tuberculosis* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:7617-7622
- Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J (2012) Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*:e4019
- Qi D, Scholthof K-BG (2008) A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis *Journal of virological methods* 149:85-90

- Rodríguez-Bolaños M, Miranda-Astudillo H, Pérez-Castañeda E, González-Halphen D, Perez-Montfort R (2020) Native aggregation is a common feature among triosephosphate isomerases of different species *Scientific Reports* 10:1-14
- Saha RP, Singh MK, Saha A, Das A (2022) Impact of poly-histidine tag on HlyU protein of *Vibrio cholera* *Journal of Sustainable Science and Transformative Research-Reviews & Letters* 1:9-10
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shukla H et al. (2015) Insight into the structural flexibility and function of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase *Biochimie* 110:73-80
- Singh M, Sori H, Ahuja R, Meena J, Sehgal D, Panda AK (2020) Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein SP0845 *International Journal of Biological Macromolecules* 163:1240-1248
- Somerville GA, Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci* *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73:233-248
- Stehlin C, Dahm A, Kirschner K (1997) Deletion mutagenesis as a test of evolutionary relatedness of indoleglycerol phosphate synthase with other TIM barrel enzymes *FEBS letters* 403:268-272
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes *Journal of molecular biology* 189:113-130
- Sunnarborg A, Klumpp D, Chung T, LaPorte D (1990) Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR* *Journal of bacteriology* 172:2642-2649
- Tamm A, Tarkkanen AM, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P, Skurnik M (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica* *Molecular microbiology* 10:995-1011
- Thoma R, Hennig M, Sterner R, Kirschner K (2000) Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* *Structure* 8:265-276
- Turner KH, Everett J, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M (2014) Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection *PLoS genetics* 10:e1004518

- Ünal MÜ (2007) Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*) Food Chemistry 100:909-913
- Vanni P, Giachetti E, Pinzauti G, McFadden BA (1990) Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 95:431-458
- Votchitseva YA, Efremenko E, Aliev T, Varfolomeyev S (2006) Properties of hexahistidine-tagged organophosphate hydrolase Biochemistry (Moscow) 71:167-172
- Walden H, Bell GS, Russell RJ, Siebers B, Hensel R, Taylor GL (2001) Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase Journal of molecular biology 306:745-757
- Wang L, Maji SK, Sawaya MR, Eisenberg D, Riek R (2008) Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure PLoS biology 6:e195
- Watanabe S, Takada Y (2004) Amino acid residues involved in cold adaptation of isocitrate lyase from a psychrophilic bacterium, *Colwellia maris* Microbiology 150:3393-3403
- Webb B, Sali A (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER Current protocols in bioinformatics 54:5.6. 1-5.6. 37
- Wittig I, Braun H-P, Schägger H (2006) Blue native PAGE Nature protocols 1:418-428
- Wong SM, Mekalanos JJ (2000) Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa* Proceedings of the National Academy of Sciences 97:10191-10196
- Yan L-J, Forster MJ (2009) Resolving mitochondrial protein complexes using nongradient blue native polyacrylamide gel electrophoresis Analytical biochemistry 389:143-149
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors Gene 33:103-119

Figure legends

Fig. 1. Domain II and the extended motif of ICL from *P. aeruginosa* (PaICL). A structure alignment was performed to compare ICL structures. **a)** PaICL (blue) and EcICL (gray). **b)** PaICL (blue) and AnICL (yellow). Domain II of PaICL is shown in red; the extended motif of PaICL is shown in cyan; AnICL domain II is shown in pink.

Fig. 2. PaICL variants relative activity and growth on M9 + acetate. **a)** ICL enzyme activity was measured using permeabilized cells. *E. coli* BL21(DE3) was used as a control. N-ICL: PaICL N-His₆-tag terminal domain. ICLΔDII: PaICL domain II deleted. ICLΔDIII: PaICL extended motif deleted. ICLΔDII/DIII: PaICL domain II and the extended motif deleted. Values are mean ± SEM, n=3. **b)** The PaICL A39 mutant was complemented with all PaICL variants. PaICL-complemented mutants were grown on M9 minimal medium with acetate as the sole carbon source. PAO1: *P. aeruginosa* PAO1. A39/pUCP20: PaICL mutant complemented with empty plasmid pUCP20. A39/pRR2634: PaICL mutant complemented with the *aceA* gene. A39/pRICLΔDII: PaICL mutant complemented with PaICL domain II deleted. A39/pRICLΔDIII: PaICL mutant complemented with PaICL extended motif deleted. A39/pRICLΔDII/DIII: PaICL mutant complemented with PaICL domain II and the extended motif delete. A39/pRNICL: PaICL mutant complemented with the tagged N-terminal end of PaICL. A39/pRCICL: PaICL mutant complemented with a tagged C-terminal end of PaICL. Values are the mean ±SEM, n=3.

Fig. 3. The oligomeric state and ionic destabilization of the N-ICL and C-ICL enzymes. The N-ICL and C-ICL proteins were over-expressed, purified by affinity chromatography, and run in BN-PAGE gels. **a)** BN-PAGE. **b)** BN-PAGE plus SDS treatment. **c)** Western blot of (b) using anti-His antibody. **d)** Ionic interactions in PaICL variants were destabilized by SDS addition, and the oligomerization state was determined by non-gradient BN-PAGE. **b)** Densitometry measurement of BN-PAGE protein bands from (d) using Image J software. Values are the mean ± SEM, n=3. One-way ANOVA was followed by the Bonferroni test. ****P* <0.001.

Fig. 4. N-ICL and C-ICL enzymatic kinetics. a) N-ICL and C-ICL variant kinetic constants were determined by non-linear regression. b) A Lineweaver-Burk plot was performed to verify the Michaelis-Menten behavior. Values are the mean \pm SEM.

Fig. 5. Dissociation of N-ICL by dynamic light scattering. a) Particle size of N-ICL. b) Particle size of N-ICL in the presence of SDS (0.06%). DLS determined the particle size at 25°C. N-ICL was incubated with SDS at a final concentration of 0.06% for 5 min. c) Particle size of N-ICL and C-ICL at 25°C and 45°C temperature.

Fig. 6. Killing of *C. elegans* by *P. aeruginosa* PaICL variants. *C. elegans* worms were exposed to live bacterial cells of PaICL variants grown for 12 h and 24 h in LB broth. a) Live bacterial cells of PaICL variants grown for 12 h. b) Live bacterial cells of PaICL variants grown for 24 h. Values are the mean \pm SEM, n=4.

Fig. 7. Structures and models of *P. aeruginosa* ICL domains. Molecular models of deleted domains in PaICL were modeled using an X-ray structure (PDB accession number: 6G1O). a) Interaction between A and B subunits from PaICL WT (blue) is shown. Domain II and the extended motif are colored in red and cyan, respectively. b) Molecular modeling of the A and B subunits of the double mutant ICL Δ II/DIII is colored magenta. The black circles mark the domain II interaction zone, while the red circles mark the extended motif zones. c) Structure of the PaICL (WT) showing the interaction of the A (blue) and C (yellow) subunits interaction. The zone around the C-terminus of both A and C subunits is marked with a red circle. d) PaICL with the addition of the His₆-tag (25 residues) at the C-terminus is shown. A and C subunits are coral and wine-colored, respectively. The extended motif is cyan-colored. His 6-tag of the C subunit is orange colored. Residues E418 and D420 of PaICL and D536 of His₆-tag are shown in blue and magenta, respectively. Hydrogen bonds are shown as yellow dotted lines.

Figure S1. Plasmid construction.

A) Double deleted *aceA* plasmid construction. pGICLΔDII/DIII plasmid with *aceA* DII and extended motif deleted was constructed by replacing a 0.599 kb *PstI* fragment of the pGICLΔDII plasmids with a 0.491 kb *PstI* fragment from pGICLΔDIII plasmid. **B) *aceA* gene expression plasmids construction.** pCDICLΔDII, pCDICLΔDIII, and pCDICLΔDII/DIII expression plasmids with the His-tag at the N terminus were obtained replacing a *BamHI-HindIII* fragment from pDuAceA by the corresponding *BamHI-HindIII* fragment from pGICLΔDII, pGICLΔDIII or pGICLΔDII/DIII respectively. **C) *P. aeruginosa aceA* gene mutant complementation plasmid construction.** A39 mutant complementation plasmids were constructed by a 1.4 kbp *EcoRV-ScaI* fragment substitution from pRR2634 by the corresponding *EcoRV-ScaI* fragment from pCDICLΔDII, pCDICLΔDIII or pCDICLΔDII/DIII to render the plasmids pRICLΔDII, pRICLΔDIII, and pRICLΔDII/DIII, respectively.

Figure S2. Degree of evolutionary conservation between ICL- subfamily 3 members. A multiple sequence alignment between 39 ICL-subfamily 3 members was used to perform a sequence similarity analysis using the ConSurf web server. PaICL sequence is showed. Low to high sequence similarity scale is represents by green to crimson color respectively. Domain II (black) and extended motif (gray) sequences are underlined.

Figure S3. Degradation from PaICL deleted variants. PaICL deleted variants were over-expressed and purified. The purified proteins were observed in a SDS-PAGE and detected by western blot analysis. NICL: PaICL N-terminal domain tagged. ICLΔDII: PaICL domain II deleted. ICLΔDIII: PaICL extended motif deleted.

Figure S4. Permeabilized cells PaICL relative activity from variants. ICL activity was measured from complete permeabilized cell and the PaICL variants proteins were observed through a SDS-PAGE. MW: Molecular weight marker. *E. coli* BL21DE3: *E. coli* strain control. NICL: PaICL N-terminal domain tagged. ICLΔDII: PaICL domain II deleted. ICLΔDIII: PaICL extended motif deleted. ICLΔDII/DIII: PaICL domain II and extended motif deleted.

Figure S5. Purified NICL and CICL. Purified recombinant proteins were visualized in a SDS-PAGE. MW: Molecular weight marker. NICL: PaICL N-terminal domain tagged. CICL: PaICL C-terminal domain tagged.

Figure S6. C-terminal PaICL hydrophobic interactions and disulfide-bonds destabilization probe by His-Tag motif addition. Hydrophobic interactions destabilization probe was done using DTT in (A) NICL and (B) CICL variant. Disulfide-bonds destabilization probe was performed using digitonin and triton X-100 in (C) NICL and (D) CICL variants. In all cases a BN-PAGE gel from NICL and CICL variants and a densitometry measurement from BN-PAGE bands were performed. The values are the mean \pm SEM of a n=3. One way ANOVA followed by Bonferroni test. *** $P < 0.001$.

Figure S7. Virulence factor production in PaICL variants grown 12 hours. Virulence factor from PaICL variants were determined in: A) Luria-Bertani broth or B) M9 minimum media supplemented with acetate as sole carbon source. PAO1: *P. aeruginosa* PAO1. A39/pUCP20: PaICL mutant complement with empty plasmid pUCP20. A39/pRR2634: PaICL mutant complement with *aceA* gene. A39/pRNICL: PaICL mutant complement with PaICL N-terminal domain tagged. A39/pRCICL: PaICL mutant complement with PaICL C-terminal domain tagged. The values are the mean \pm SEM of a n=3. One way ANOVA followed by Bonferroni test. *** $P < 0.001$.

Figure S8. Virulence factor production in PaICL variants grown 24 hours. Virulence factor from PaICL variants were determined in: A) Luria-Bertani broth or B) M9 minimum media supplemented with acetate as sole carbon source. PAO1: *P. aeruginosa* PAO1. A39/pUCP20: PaICL mutant complement with empty plasmid pUCP20. A39/pRR2634: PaICL mutant complement with *aceA* gene. A39/pRNICL: PaICL mutant complement with PaICL N-terminal domain tagged. A39/pRCICL: PaICL mutant complement with PaICL C-terminal domain tagged. The values are the mean \pm SEM of a n=3. One way ANOVA followed by Bonferroni test. *** $P < 0.001$.

Figure S10. Molecular models of wt and hexahistidine tag added at N-terminal of *P. aeruginosa* ICL. A) Zone of N-terminal end from wt PaICL structure is showed. PaICL subunits B and C are yellow and green colored respectively. B) Model from PaICL with a Hexahistidine tag (14 residues) at N-terminal domain is displayed. Subunit B and D are showed in cobalt-blue and blue colors respectively. Molecular model of PaICL N-terminal hexahistidine tag added was constructed using AlphaFold molecular model (AlphaFold ID: AF-Q9I0K4-F1) as template.

Table 1. Kinetic parameters of NICL and CICL.

Enzyme	K_m (mM)	V_{max} (μ mol/min mg enzyme)	Optimal temperature ($^{\circ}$ C)	Optimal pH	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	$t_{1/2}$ at 45 $^{\circ}$ C (min)
NICL	0.44 \pm 0.07	8.20 \pm 0.16 (100)	31.12 \pm 1.03	7.78 \pm 0.004	4.10 \pm 0.08 (100)	9.37 \pm 0.050 (100)	17.50 \pm 0.25
CICL	0.48 \pm 0.04**	6.99 \pm 0.058** (85)	30.86 \pm 0.43	7.81 \pm 0.04	3.50 \pm 0.03** (85)	7.21 \pm 0.061* (77)	16.49 \pm 1.72 ns

The values are the mean \pm SEM of a n=3. One way ANOVA followed by T-Student test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. ns: without statistical significance.

Table S1. Comparison and quality data of models from *P. aeruginosa* ICL domains.

	Ramachandran plot quality (%)			
	Core	Allowed	General	Disallowed
DII	95.4	4.2	0.4	0.0
Extended motif DIII	95.7	4.1	0.2	0.0
NICL	96.2	3.6	0.2	0.0
CICL	96.2	3.4	0.4	0.0

Ramachandran plot qualities shows percentage (%) of residues belonging to the core, allowed, generally allowed and disallowed region of the plot.

Table S2. Molecular weight of PaICL variants.

ICL	Theoretical MW with the added amino acids ¹ (kDa)	Experimental MW ² (kDa)
NICL	60.95	68.54±0.24 (7.56)
ICLADII	58.2	59.4±0.5 (1.2)
ICLADIII	56.83	60.4±1.3 (3.57)
ICLADII/DIII	54.18	56.4±0.4 (2.22)
CICL	62.12	70.77±0.66 (8.65)

¹Compute pI/MW tool (https://web.expasy.org/compute_pi/)

²BioCaptMW

In parenthesis is indicated the increase in molecular weight.

The data are the mean ± SEM of n=6.

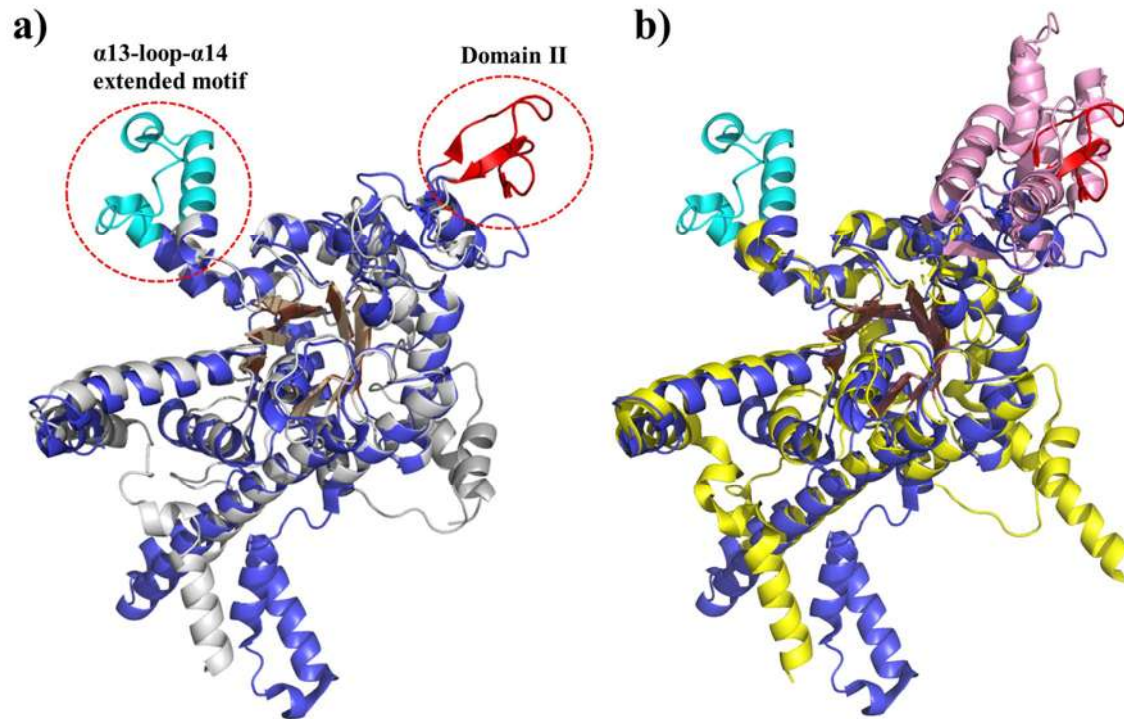


Figure 1

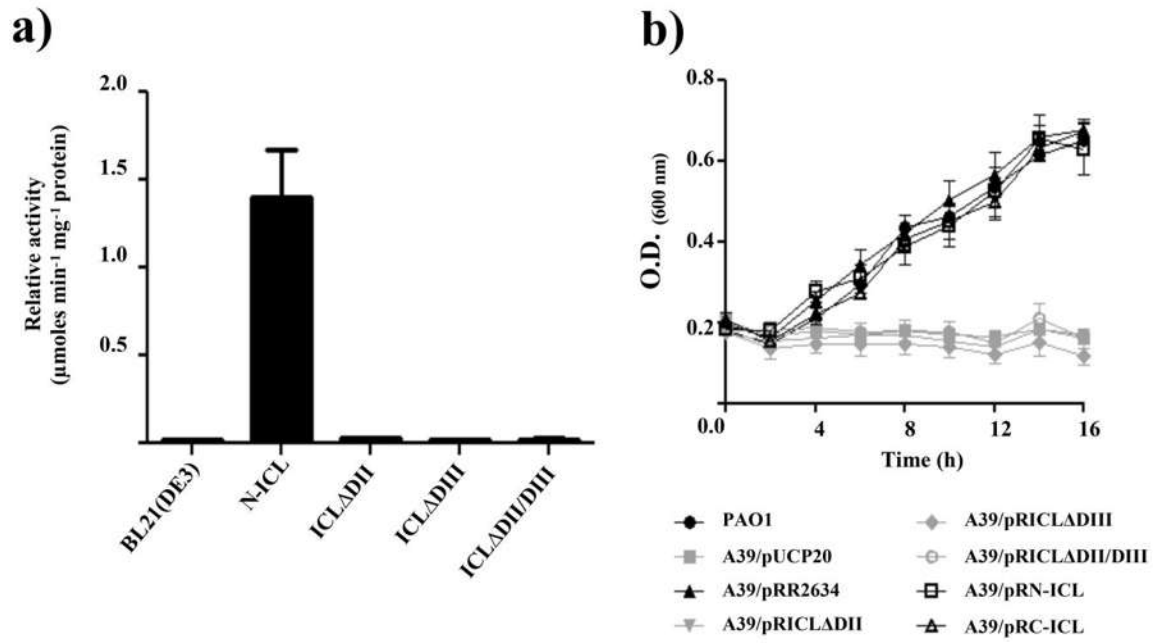


Figure 2

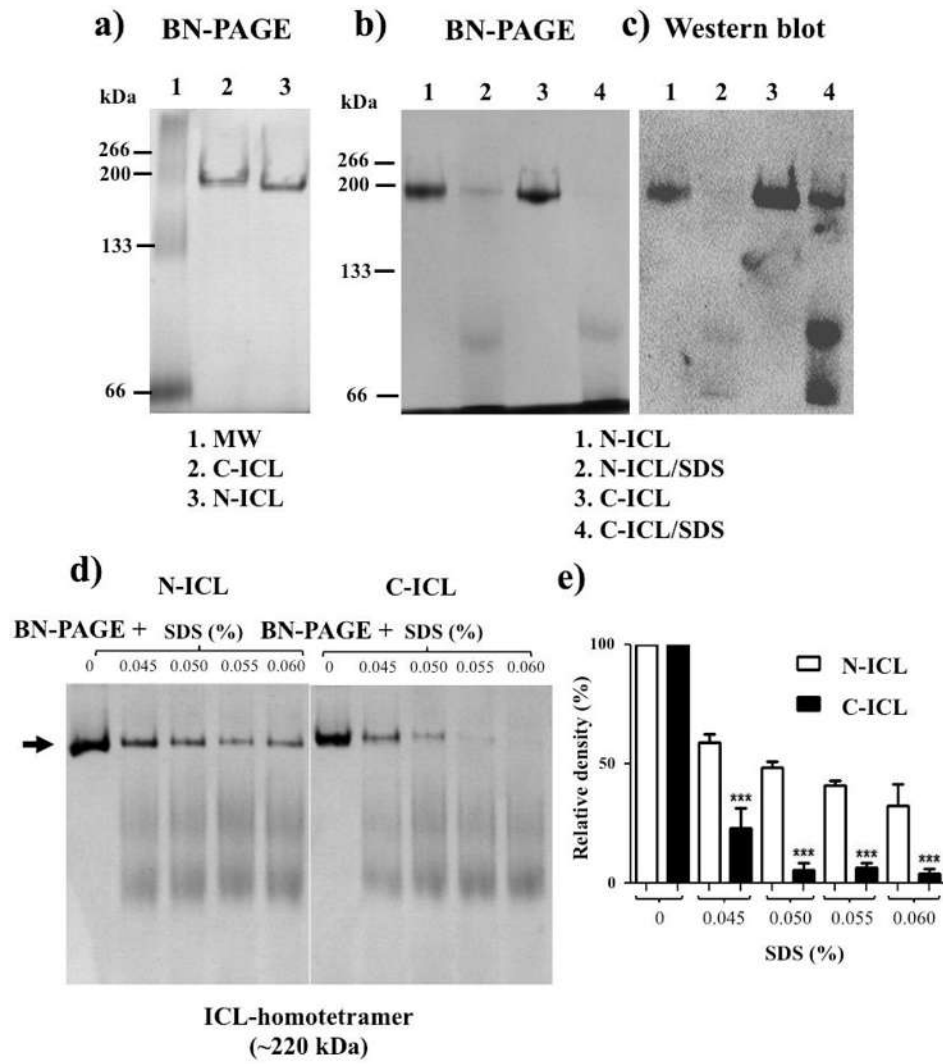


Figure 3

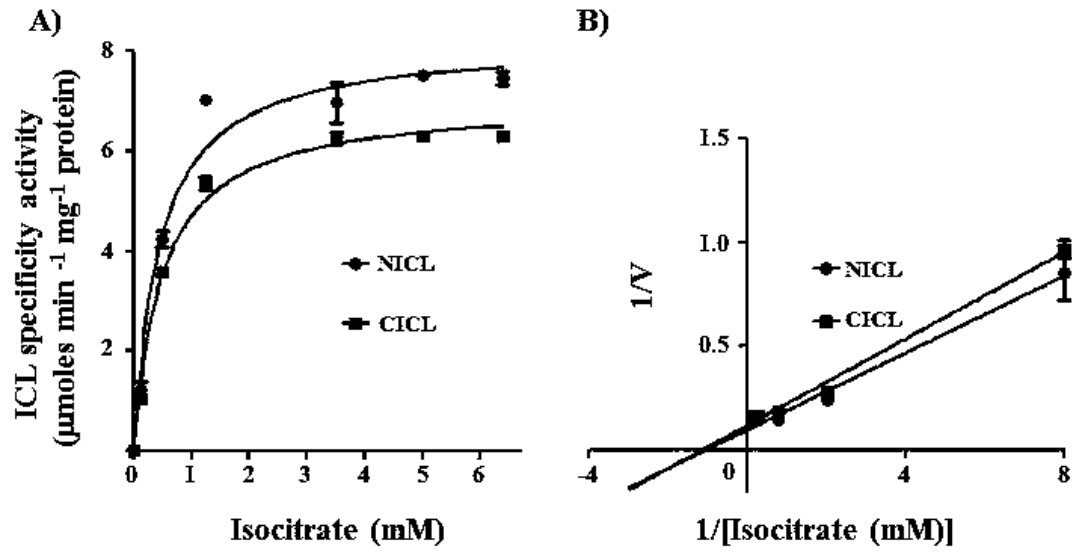


Figure 4

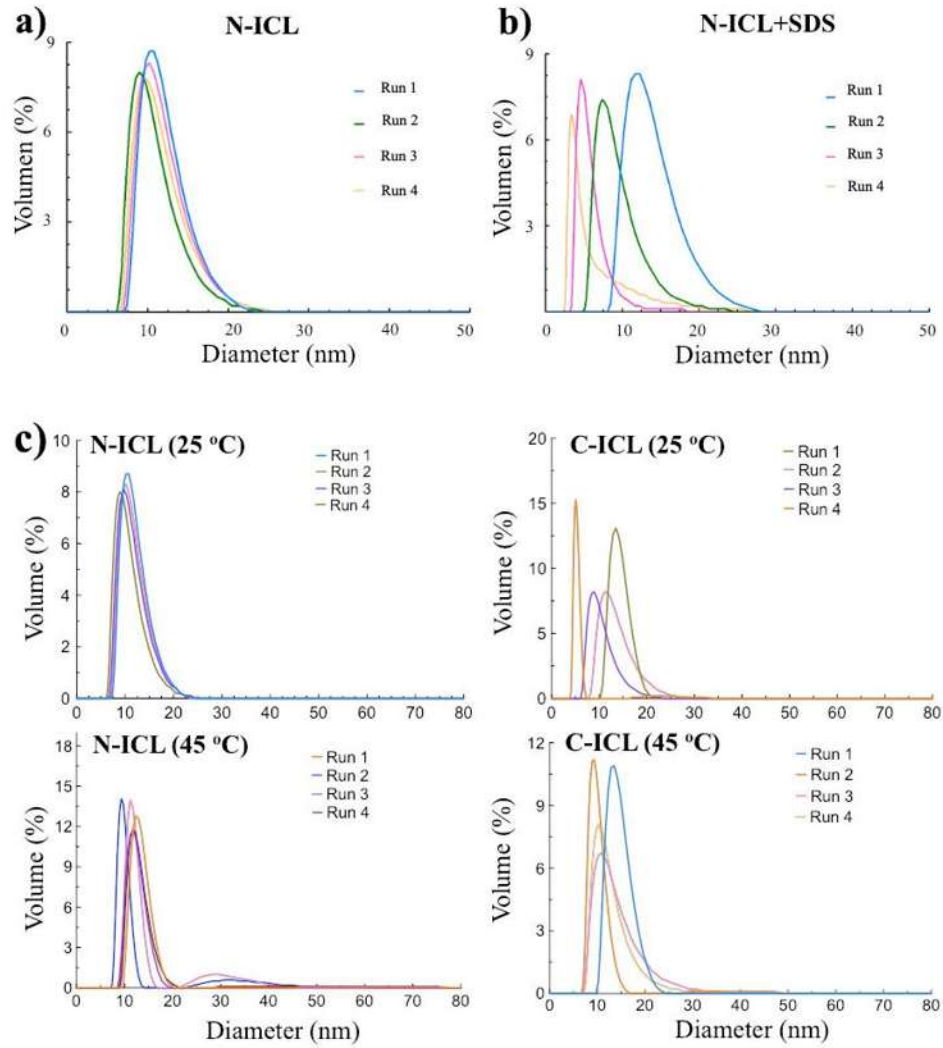


Figure 5

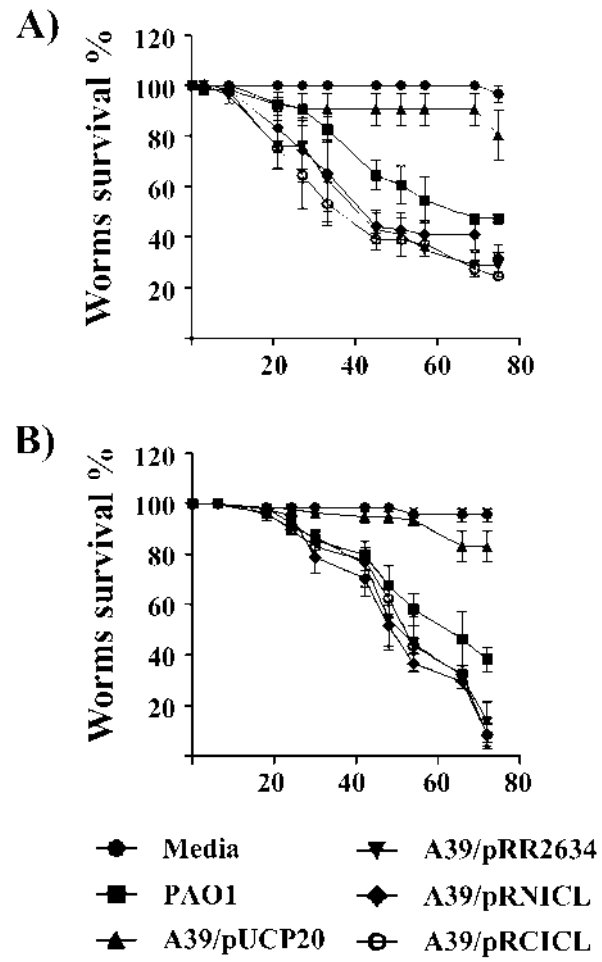


Figure 6

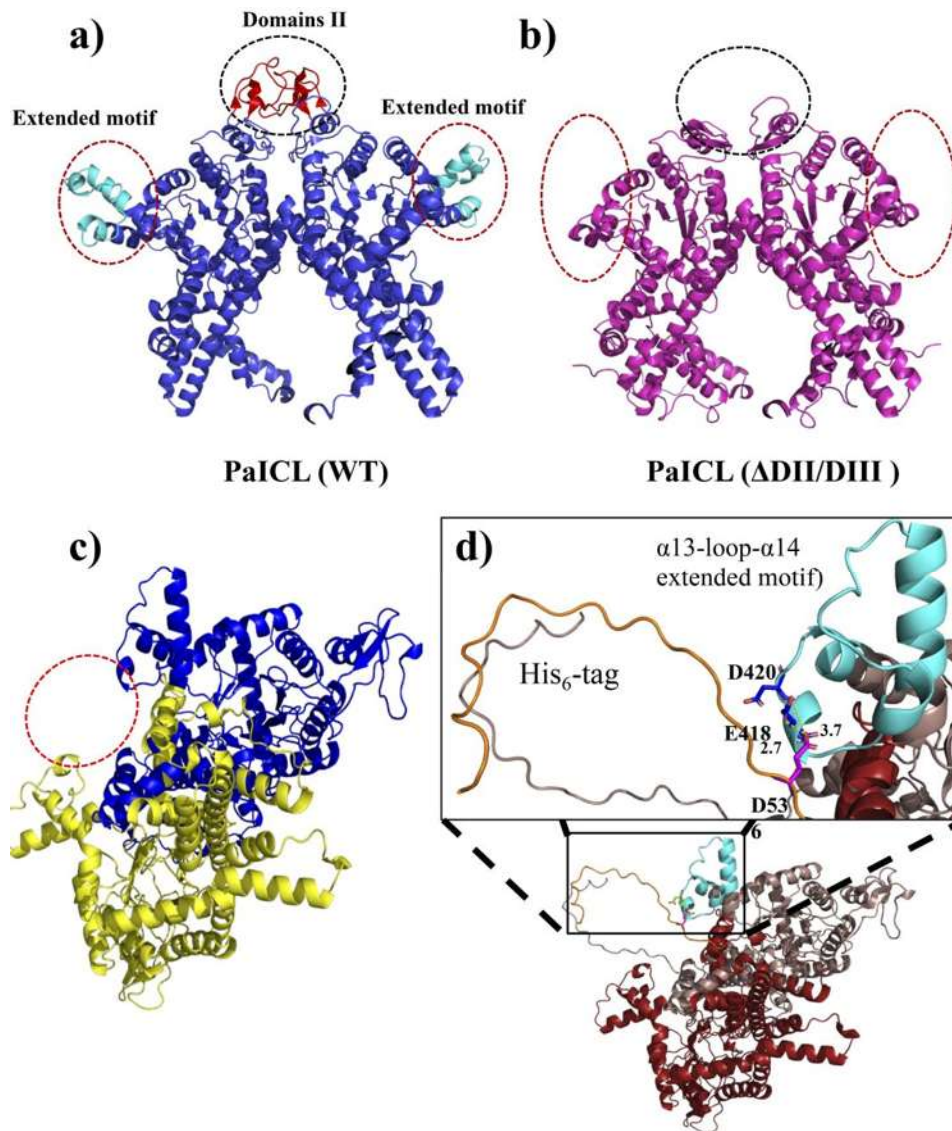


Figure 7

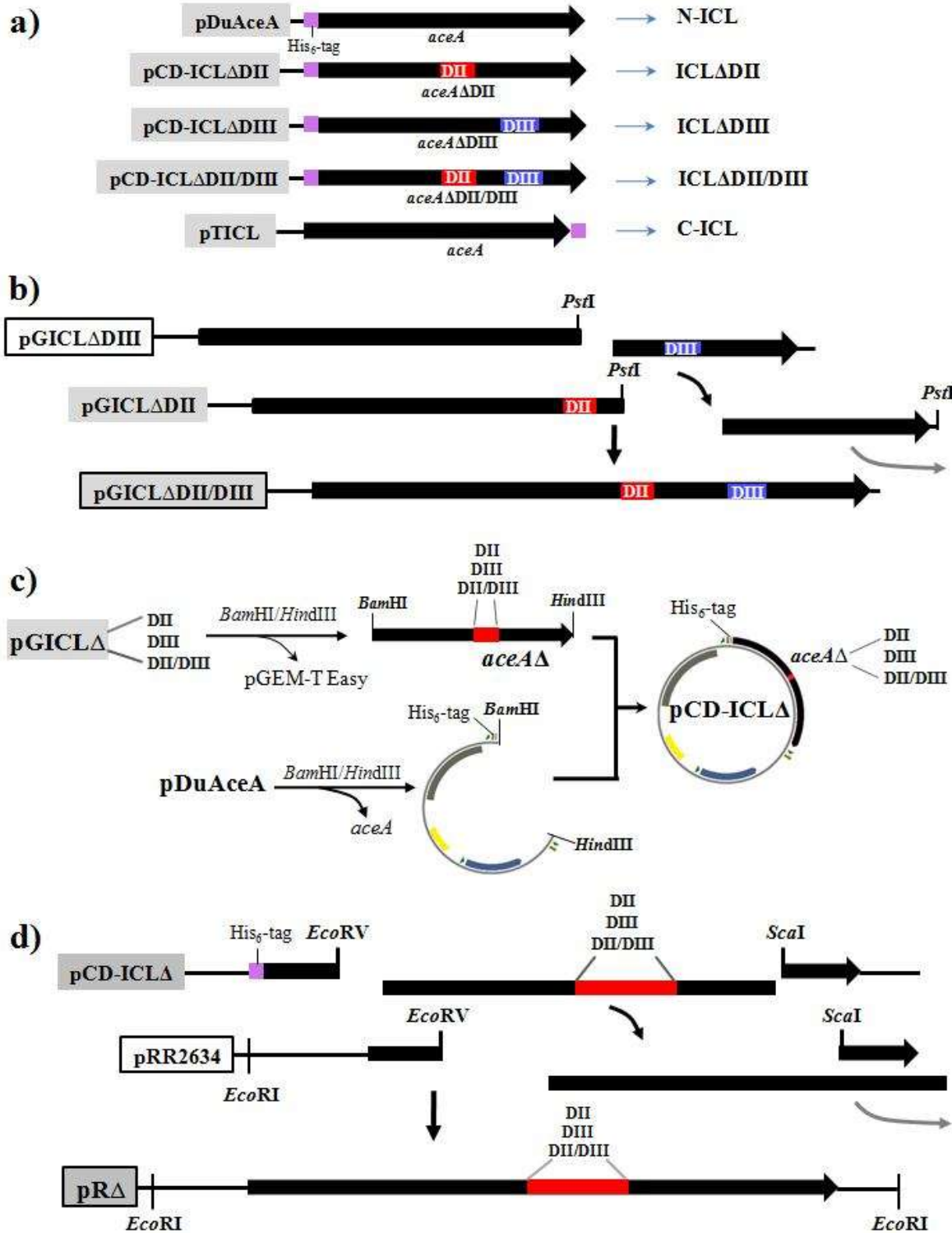


Figure S1

**Legend:**

The conservation scale:



Variable Average Conserved

e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.

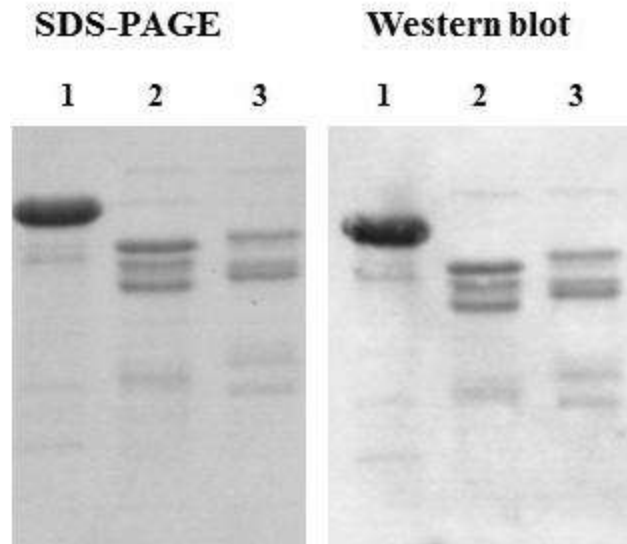
b - A buried residue according to the neural-network algorithm.

f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).

s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).

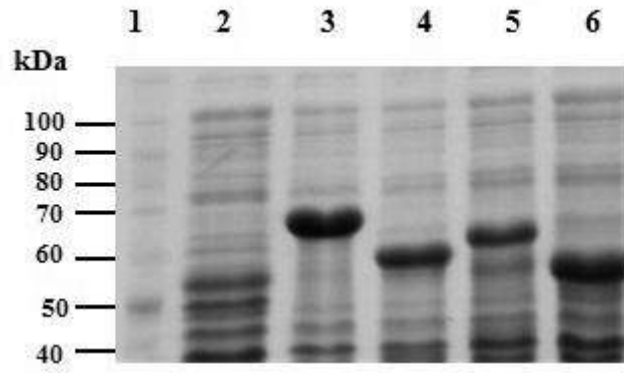
X - Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

Figure S2



1. NICL
2. ICLADII
3. CLADIII

Figure S3



1. MW
2. *E. coli* BL21(DE3)
3. NICL
4. ICL Δ DII
5. ICL Δ DIII
6. ICL Δ DII/DIII

Figure S4

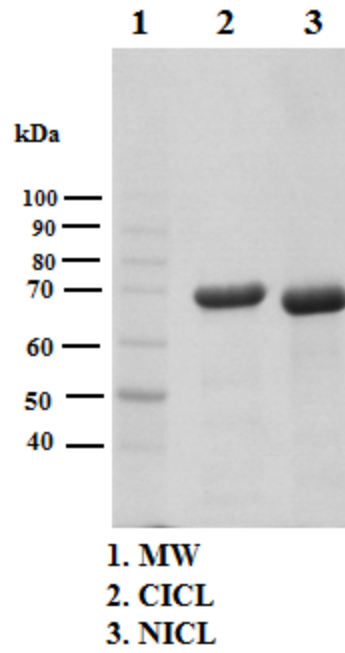


Figure S5

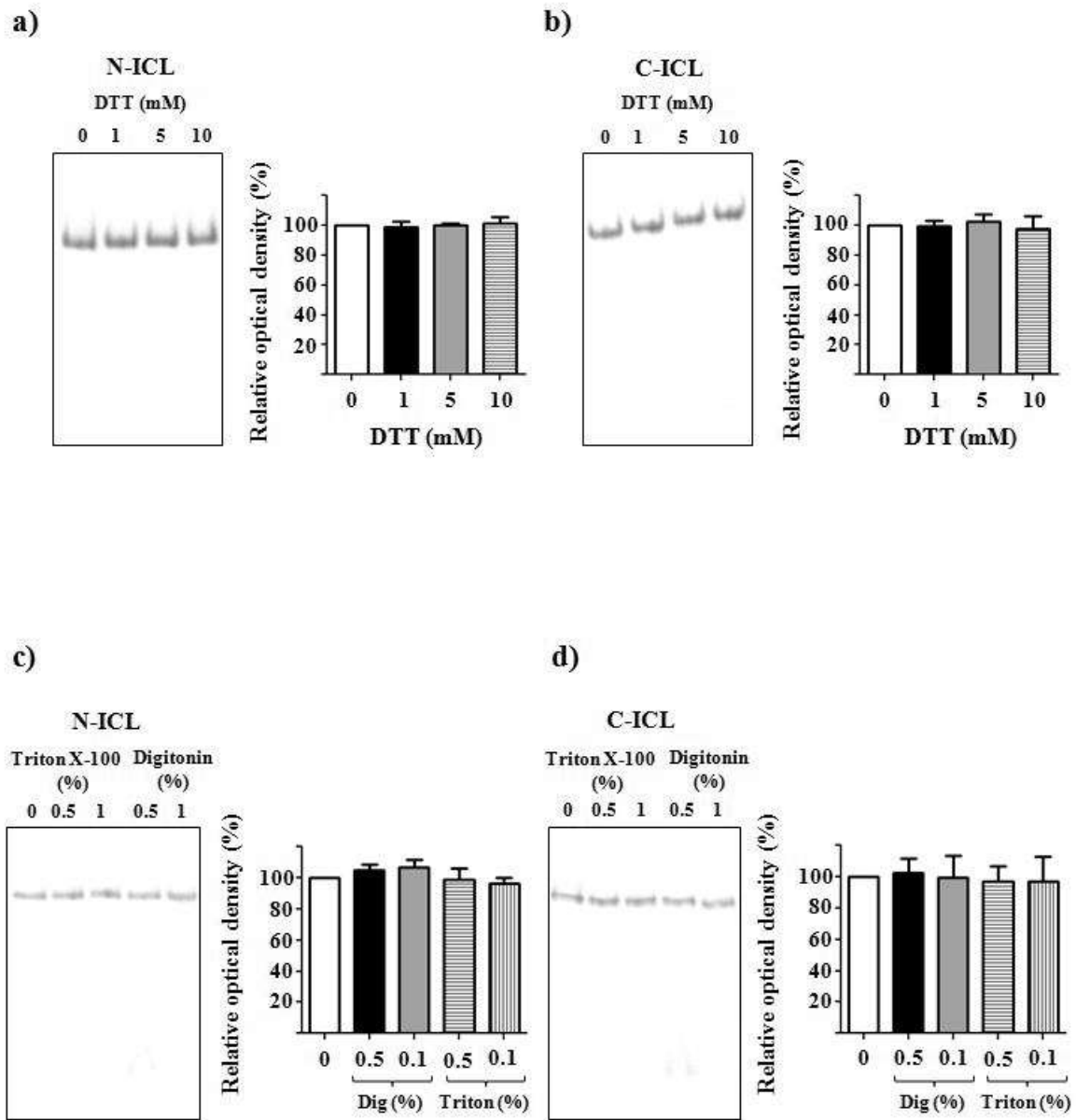


Figure S6

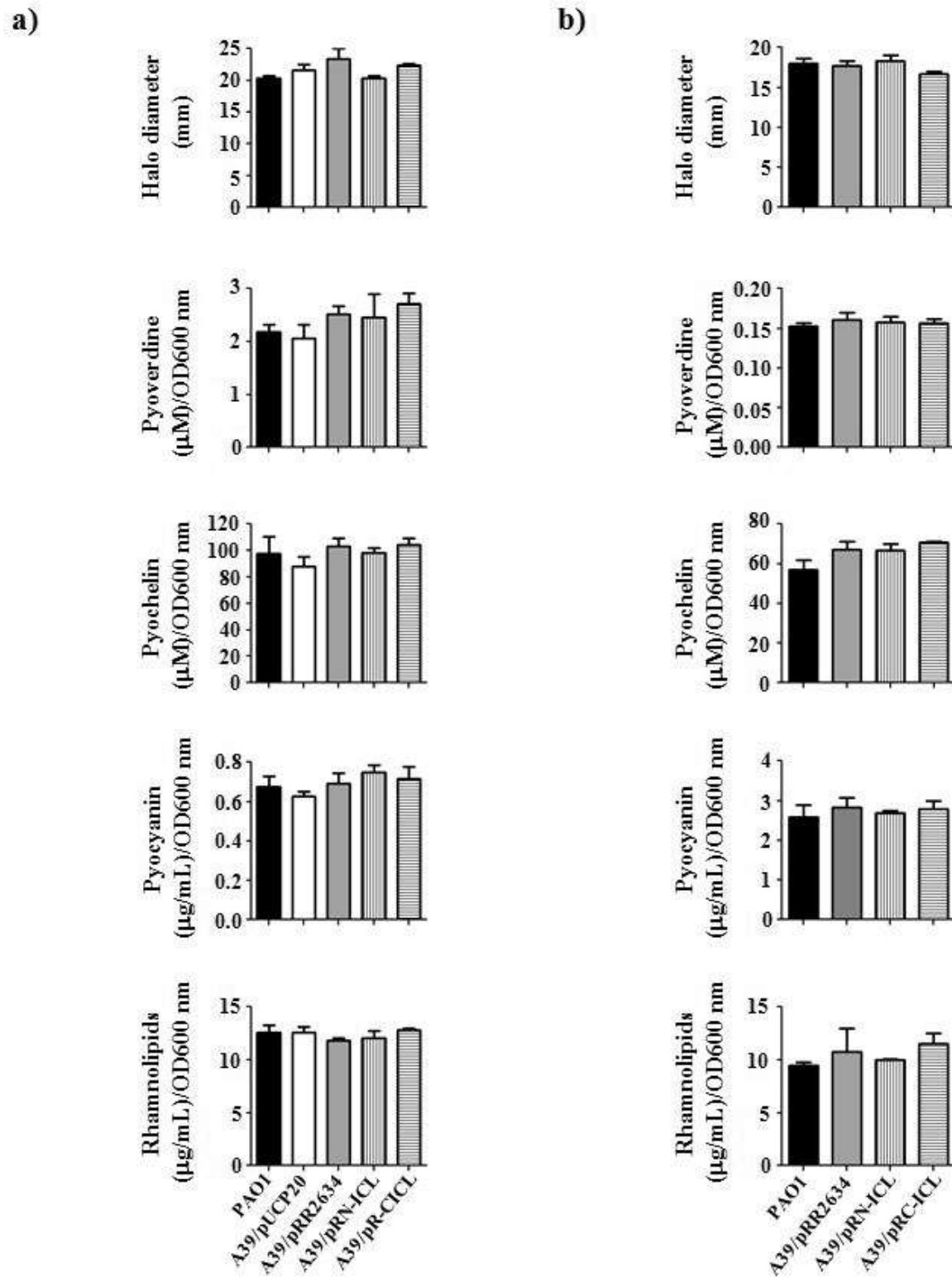


Figure S7

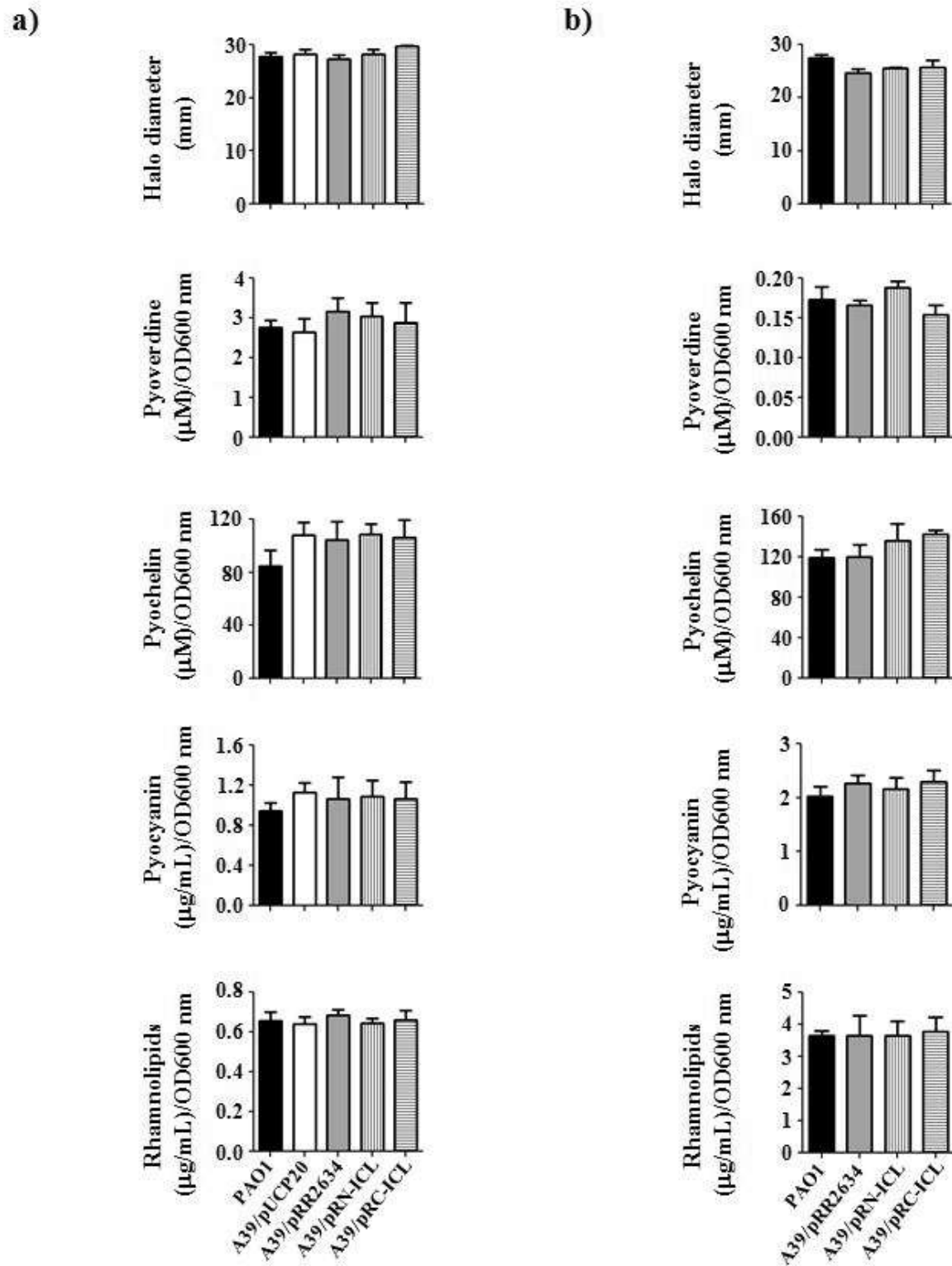
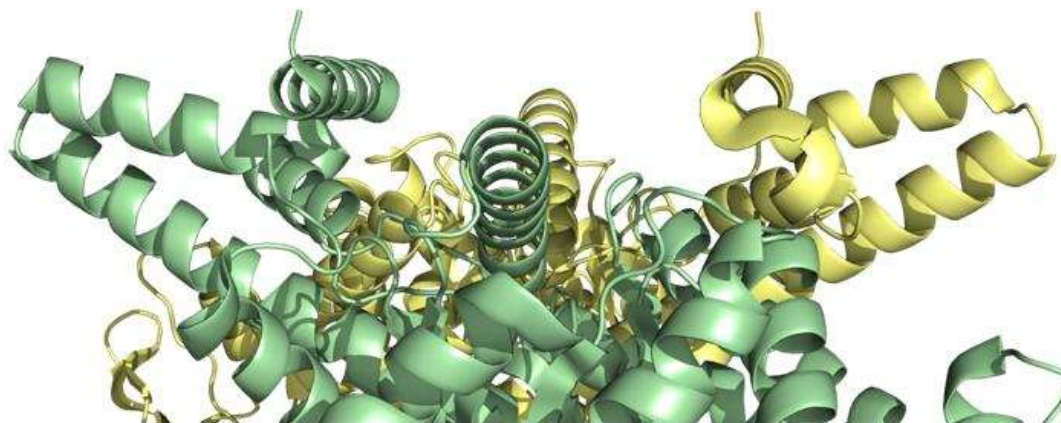


Figure S8

a)



b)

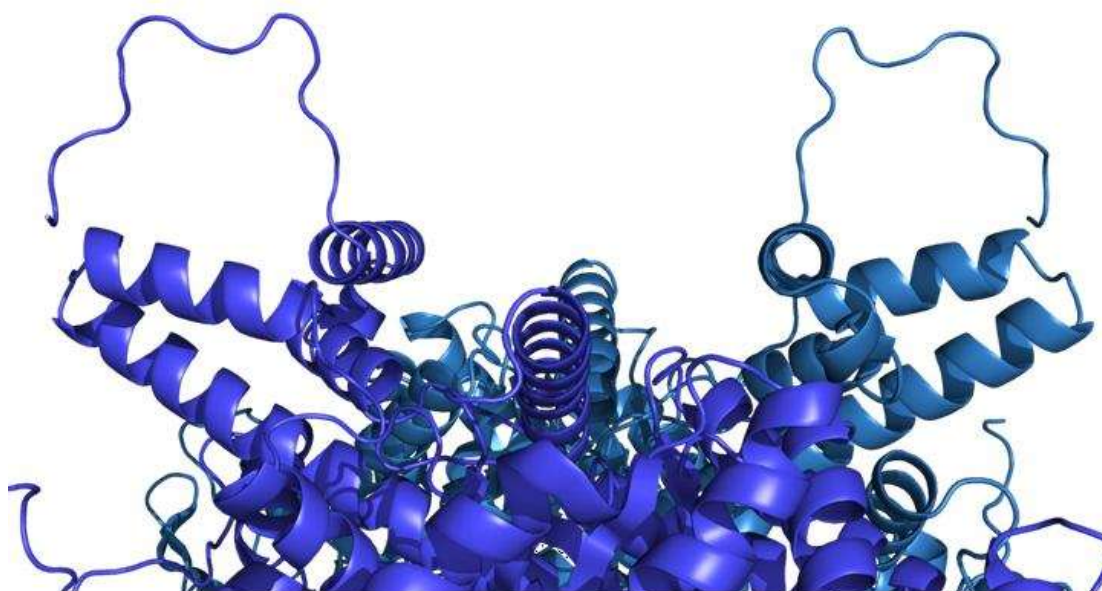


Figure S9

10. DISCUSIÓN

La ICL de *P. aeruginosa* se estudió ampliamente mediante aproximaciones bioquímicas y mutagénesis, lo que llevó a evidenciar su función en la asimilación de carbono y en la patogenicidad de la bacteria (Díaz-Pérez *et al.*, 2007; Fahnoe *et al.*, 2012; Behrends *et al.*, 2013; Flynn *et al.*, 2017). Las constantes cinéticas de la enzima se determinaron y se identificaron los AA que tienen relación con la función y la estabilidad térmica y también la estructura cristalina de la enzima se resolvió con alta resolución (Campos-García *et al.*, 2013; Crousilles *et al.*, 2018). Además, la PaICL se clasificó de acuerdo a su relación filogenética dentro de la subfamilia 3 de la familia de proteínas AceA/ICL (Campos-García *et al.*, 2013). La PaICL se relaciona cercanamente con las ICLs de bacterias psicrófilas marinas y con miembros del género *Burkholderia*, mientras que la mayoría de las ICLs de especies del género *Pseudomonas* pertenecen a la subfamilia 1, debido a sus diferencias estructurales de acuerdo al tamaño de las enzimas. Estas diferencias estructurales podrían relacionarse con algunas características particulares de la enzima. Dentro de las subfamilias 1, 2 y 3 hay ICLs cristalizadas, lo cual permite la comparación estructural entre las subfamilias. La comparación entre las estructuras cristalizadas de la EcICL, AnICL y PaICL mostró que la PaICL tiene un dominio adicional (dominio II), como las ICLs de la subfamilia 2, además de un motivo extendido; sin embargo, la función de estas estructuras se desconoce. El extremo carboxilo de la PaICL no ha sido estudiado y tampoco se ha elucidado como la relación estructura-función de la PaICL afecta la virulencia de *P. aeruginosa*.

De acuerdo a la estructura cristalizada de la PaICL, la enzima está compuesta por el dominio del TIM-barrel, en donde se localiza el sitio activo hacia el extremo carboxilo del barril conformado por las láminas β , como usualmente se estructuran las ICLs (Britton *et al.*, 2000; Britton *et al.*, 2001). En la periferia del TIM-barrel se inserta el dominio II, el cual corresponde a las láminas β 8, β 9 y β 10 y el motivo extendido corresponde a las hélices α 13 y α 14 (Crousilles *et al.*, 2018). El dominio II en la AnICL se localiza en la misma posición que el dominio II de la

PaICL; sin embargo, el primero es un dominio principalmente helicoidal, compuesto por 100 residuos que forman a las hélices α_{10-14} y a la lámina β_9 (Britton *et al.*, 2000), mientras que el dominio II de la PaICL es más pequeño, dado que se compone por solo 25 residuos que se ensamblan principalmente en láminas β (Figura 1a-b del capítulo 1). El dominio II de la AnICL podría relacionarse con la localización subcelular de la enzima en los cuerpos peroxisomales (Britton *et al.*, 2000), mientras que el dominio II de la PaICL parece tener una función completamente diferente, ya que podría participar en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la enzima (Crousilles *et al.*, 2018). Estas estructuras de la PaICL solo exhibieron similitud de secuencia con otras ICLs de la subfamilia 3 (Figura S2 del capítulo 1); sin embargo, el dominio II y el motivo extendido tampoco se han caracterizado en los otros miembros de la subfamilia 3, por lo tanto, no fue posible deducir una posible función para estas estructuras por medio de un análisis de la similitud de secuencias. Una estrategia para elucidar la función del dominio II y del motivo extendido fue eliminarlos de la PaICL. Por medio de mutagénesis por delección (Figura 1Sa del capítulo 1) se obtuvieron las tres variantes de la PaICL: ICL Δ DII, ICL Δ DIII and ICL Δ DII/DIII.

Las ICLs mutadas se sobreexpresaron al mismo nivel que la NiCL, como se observó en los extractos crudos resueltos por SDS-PAGE. El peso molecular de todas las variantes de la ICL estuvieron en un rango de 1 a 8 kDa por encima del peso molecular teórico (Tabla S2 del capítulo 1), lo que podría deberse a los AA básicos de la etiqueta de 6X-Histidinas, que retardan la movilidad de las proteínas de fusión en el SDS-PAGE, esto ocasiona la desviación en la determinación del peso molecular (Gou *et al.*, 2013). La sobreexpresión de las ICLs mutadas a 30°C produjo agregados proteicos insolubles, lo cual es un problema común en la producción de proteínas heterólogas, debido al mal plegamiento de las proteínas recombinantes, ocasionado por el alto nivel en la expresión y a la fuerte dependencia de la temperatura de las interacciones hidrofóbicas, que promueven la reacción de agregación (Wang *et al.*, 2008; Papanephytou y Kantopidis, 2014). La formación de los agregados proteicos puede evitarse si se reduce la velocidad

de síntesis de las proteínas mediante la disminución de la temperatura de inducción (Papaneophytou y Kantopidis, 2014). La inducción entre 20°C a 25°C resultó en la síntesis de proteínas solubles; sin embargo, éstas se degradaron rápidamente, como se observó en el Western blot de las proteínas obtenidas después de su purificación (Figura S3 del capítulo 1). Esto pudo ser una consecuencia del mal plegamiento de las proteínas, que resultó por las estructuras faltantes en la PalCL, ya que se reporta que las proteínas que no se pliegan adecuadamente después de su síntesis son removidas para su reciclamiento a través de las enzimas proteolíticas (Olivares et al., 2018).

La función de las ICLΔDII, ICLΔDIII e ICLΔDII/DIII sobreexpresadas se evaluó en BL21(DE3) por medio de células permeabilizadas; sin embargo, las enzimas con los fragmentos faltantes no fueron funcionales (Figura 2a del capítulo 1). Además, la mutante A39 complementada con las ICLs mutadas se comportó como la mutante nula A39 en medio mínimo M9 con acetato (Figura 2b del capítulo 1), lo que indicó que el dominio II y el motivo extendido son indispensables para el correcto plegamiento y la función de la PalCL.

El dominio II de la PalCL se propuso que es estructuralmente relevante, ya que podría estar manteniendo interacciones entre subunidades adyacentes (Figura 7a del capítulo 1) (Crousilles *et al.*, 2018). Sin embargo, en el modelo molecular de la ICLΔDII/DIII se puede observar que se pierde toda la superficie de interacción entre las subunidades adyacentes (Figura 7b del capítulo 1), y probablemente, sin estas interacciones, la PalCL rápidamente perdería su estabilidad y es susceptible a la degradación, como se observa en la figura S3 del capítulo 1.

El motivo extendido comienza en medio de hélice $\alpha 13$ y continua hasta la parte media de la hélice $\alpha 14$ (Figura 7c del capítulo 1), cuando este motivo se elimina, la continuidad de estas hélices se pierde (Figura 7d del capítulo 1), dejando solo una parte de cada una de ellas. Los residuos restantes en esta

región de la enzima forman una sola hélice con un doble cambio de dirección, lo cual es físicamente inestable. Esta nueva estructura probablemente lleva a la pérdida de la conformación de la región circundante de la enzima y a su subsecuente degradación, como se observa en la figura S3 del capítulo 1.

Las etiquetas de histidinas adicionadas en el extremo amino de las ICLs de la familia de proteínas aceA/ICL en estudios previos se observó que no afectan la función ni la estructura de estas enzimas, por ejemplo con la PalCL y en la ICL de *S. cerevisiae* (Campos-García *et al.*, 2013; Hiragi *et al.*, 2021). La adición de la etiqueta 6X-Histidinas extremo amino de la PalCL (Figura S9 del capítulo 1) no afectó la función ni la estructura de la enzima, dado que la etiqueta de 6X-Histidinas quedó completamente expuesta al solvente y la distancia entre esta y el resto de la proteína es lo suficientemente grande como para que puedan interactuar una con otra (Figura S9b del capítulo 1). Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente con la PalCL (Campos-García *et al.*, 2013); sin embargo, el extremo carboxilo de la ICL parece ser esencial para la función de la enzima (Matsuoka y McFadden, 1988). La importancia del extremo carboxilo de la ICL se fundamenta por el hecho de que la eliminación de la histidina localizada en el extremo carboxilo de la EclCL provocó la pérdida de la función de la enzima, y la inserción de un heptapéptido tuvo un resultado similar. En la ICL de *P. indigofera*, la eliminación del dipéptido Phe-His, situado en el extremo carboxilo resultó en la pérdida de la función de la enzima; sin embargo, la estructura cuaternaria no se alteró (Matsuoka y McFadden, 1988). En la MtlCL, la delección de las 3 α -hélices que conforman la región del extremo carboxilo afectaron la función enzimática; sin embargo, la MtlCL permaneció como un homotetrámero. Este hecho se debió a que la región del extremo carboxilo en la MtlCL se relaciona con cambios conformacionales, los últimos 18 residuos del extremo carboxilo de una subunidad funcionan como una tapa del sitio catalítico de una subunidad adyacente. Con la unión del sustrato, el loop del sitio activo se mueve adoptando la conformación cerrada, lo cual bloquea la accesibilidad a los residuos del sitio catalítico e impulsa el movimiento de la tapa del extremo carboxilo de la subunidad

adyacente, completando la conformación catalítica (Shukla *et al.*, 2015). Sin embargo, la adición en el extremo carboxilo de un polipéptido que contiene una etiqueta de 6X-Histidinas no tuvo un efecto aparente ni en la función ni en la estructura de la enzima, resultados similares se observaron con las ICLs de *M. oryzae* y *F. graminearum*, pertenecientes a la subfamilia 2, cuando se les adicionó una etiqueta de 8X-Histidinas en el extremo carboxilo (Park *et al.*, 2016). Por lo tanto, para elucidar la función del extremo carboxilo en la PaICL, se le adicionó un polipéptido, el cual contiene una etiqueta de 6X-Histidinas. La NICL y la CICL se purificaron por medio de cromatografía de afinidad y se les determinaron sus parámetros cinéticos (Tabla 1 del capítulo 1). La afinidad por el sustrato disminuyó en la CICL, ya que el valor de su K_m fue mayor al de la K_m de la NICL, los parámetros V_{max} , k_{cat} y k_{cat}/K_m fueron menores para la CICL, lo que indicó que la enzima fue menos eficiente para llevar a cabo la catálisis enzimática. La estabilidad de la CICL se probó mediante la determinación del $t_{1/2}$, el cual es un parámetro que se usa para caracterizar la estabilidad de las enzimas y se relaciona con la resistencia térmica de las proteínas (Bustamante-Vargas *et al.*, 2019; Ünal, 2007). La estabilidad térmica de la ICL varía significativamente de una fuente a otra (Vanni *et al.*, 1990), para la NICL y la CICL, el $t_{1/2}$ a 45°C indicó que la estabilidad para ambas enzimas fue similar. Estos resultados sugirieron que el polipéptido adicionado en el extremo carboxilo de la PaICL afectó la función de la enzima. En el modelo molecular de la PaICL con una etiqueta de 6X-Histidinas en el extremo carboxilo (Figura 7d del capítulo 1), se observó que la etiqueta no interactúa directamente con el loop catalítico; sin embargo, un residuo adicional (D536) de la etiqueta de 6X-Histidinas forma fuerzas de repulsión con los residuos E418 y D420 localizados en el motivo extendido (Figura 7d del capítulo 1). Las fuerzas de repulsión que se originaron podrían limitar al motivo extendido y la flexibilidad del extremo carboxilo; la pérdida de movilidad del extremo carboxilo podría afectar el movimiento del loop catalítico, lo cual se reflejaría como un cambio en los valores de los parámetros cinéticos de la enzima (Tabla 1 del capítulo 1).

En lo que concierne a la oligomerización de la CICL y de la NICL, ambas enzimas están en el rango de homotetrámeros, como se observó por medio de BN-PAGE sin gradiente (Figura 3a), lo cual corresponde a la estructura cuaternaria de la mayoría de las ICLs reportadas (Vanni *et al.*, 1990; Eprintsev *et al.*, 2014). La etiqueta de 6X-Histidinas unida a las proteínas recombinantes puede afectar la estabilidad de las proteínas, ya que puede interferir con el apropiado plegamiento de la proteína y con la oligomerización o promover la agregación, lo que afecta la homogeneidad estructural (Kim *et al.*, 2004; Votchitseva *et al.*, 2006), incluso, la etiqueta de 6X-Histidinas podría generar formas truncadas de las proteínas (Nashino *et al.*, 2023). Particularmente, con largos polipéptidos que contienen una etiqueta de 6X-Histidinas se observó que pueden ser un obstáculo para formar un oligómero (Saha *et al.*, 2020), o al contrario, pueden promover un estado oligomérico de orden superior (Singh *et al.*, 2020); sin embargo, la etiqueta de 6X-Histidinas en la CICL y en la NICL no cambió su estado oligomérico, ya que una sola banda apareció cuando las enzimas se resolvieron en el gel nativo (Figura 3a).

El homotetrámero es la forma funcional de la ICL y la región del extremo carboxilo parece tener relación en la oligomerización de la enzima. El proceso comienza con dos monómeros formando un dímero, en las ICLs de *A. nidulans* y *M. orizae*, la dimerización se logra principalmente a través del entrelazado de las hélices α localizadas hacia el extremo carboxilo de dos monómeros, que forman un “nudo” entre estos monómeros (Britton *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2016). El dímero de la MtlICL se estabiliza por puentes de hidrógeno y por la interacción electrostática entre el Asp98 y la Arg123 de ambos monómeros, además, la complementariedad de forma entre los monómeros contribuye a mantenerlos junto. La región del extremo carboxilo mediante el solapamiento de las hélices α 12 y α 13 entre dos monómeros adyacentes, contribuye, pero no es esencial para mantener la estructura homotetramérica de la enzima (Shukla *et al.*, 2015). Múltiples fuerzas contribuyen significativamente para estabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas, incluyendo las interacciones electrostáticas, las

interacciones hidrofóbicas y los puentes disulfuro (Walden *et al.*, 2001). Para la PaICL no se conoce que clase de interacciones son más críticas para la estabilización del homotetrámero. Para otras enzimas que comparte el andamiaje estructural del TIM-barrel ya se determinaron cuales son las interacciones que estabilizan la estructura, por ejemplo, el homotetrámero de la triosafosfato isomerasa de *Pyrococcus woesei* se estabiliza por interacciones hidrofóbicas, en *Pyrococcus brucei* se estabiliza por dos puentes disulfuro (Walden *et al.*, 2001) y en *Plasmodium falciparum* se estabiliza por interacciones iónicas (Rodríguez-Bolaños *et al.*, 2020). Cuando la NiICL y la CiICL se incubaron con los compuestos que alteran las diferentes interacciones (Figura 3d y S6 del capítulo 1), se observó que las interacciones iónicas contribuyeron significativamente para mantener la estructura cuaternaria de la PaICL. Los resultados sugirieron que el extremo carboxilo de la enzima participa en la estabilización del homotetrámero de la PaICL (Figura 3a del capítulo 1). Como en la MtICL, en la estructura homotetramérica de la PaICL, el extremo carboxilo de una subunidad vecina se localiza cerca del sitio catalítico de otra subunidad, extendiéndose hacia el motivo extendido (Figura 7d del capítulo 1). Esta región de la enzima parece ser un área de extensos contactos entre las subunidades; una de las posibles explicaciones para la mayor pérdida de la estabilidad de la CiICL es que la etiqueta de 6X-Histidinas en el extremo carboxilo podría ocasionar la disrupción de las interacciones presentes en esta zona. Además, la relevancia del motivo extendido en la estabilidad estructural de la PaICL ya se mencionó antes, sugiriendo que se originan fuerzas de repulsión entre la etiqueta de 6X-Histidinas y el motivo extendido (Figura 7d del capítulo 1), probablemente esto podría causar una disrupción en el área adyacente al motivo extendido y al extremo carboxilo. Este cambio en la movilidad de la enzima podría provocar que se rompan las interacciones iónicas y la enzima podría ser más susceptible a la disociación de las subunidades (Figura 3 del capítulo 1). La disociación de los homotetrámeros de N-ICL y la C-ICL resultó en dímeros y monómeros, cuyas masas nativas fueron cercanas al peso molecular del monómero y dímero de la PaICL. La variación en las masas nativas de las proteínas solubles calculadas por BN-PAGE está en el

rango de ~10% al 20%, especialmente con las proteínas básicas, ya que la gran cantidad de los residuos básicos no puede ser fácilmente superados por las cargas negativas del colorante unido a la proteína (Wittig *et al.*, 2006). Por medio de DLS, se verificó que la NICL permaneció en solución como un homotetrámero estable, además de tener un tamaño de partícula homogéneo, como se indicó por el índice de polidispersidad, que fue menor de 0.3 (Figura 5). En una escala de 0 a 1, un índice de polidispersidad menor a 0.1 se asocia a un alta homogeneidad en el tamaño de la partícula, mientras que un alto valor en el índice sugiere una distribución más amplia en el tamaño de la partícula (Gaumet *et al.*, 2008). La disociación del homotetrámero de la NICL se logró únicamente al incubarse a la enzima con SDS (Figura 3 y 5), lo que confirmó que el homotetrámero de la PaICL se estabilizó por interacciones iónicas y que se disoció en dímeros y monómeros.

El metabolismo se ha interconectado con la virulencia, ya que la disponibilidad en la fuente de carbono puede regular genes que codifican para determinantes de virulencia, probablemente como una adaptación al microambiente del hospedero (Somerville y Proctor, 2009; Panayidou *et al.*, 2020). La síntesis de los factores de virulencia se determinó en la mutante A39 complementada con las variantes de la PaICL, a partir de cultivos en LB y M9 con acetato crecidos durante 12 h y 24 h, como se observó anteriormente (Martínez-Alcántar *et al.*, 2021), algunos de las moléculas asociadas a la virulencia también se acumularon con el tiempo. Ninguna de las cepas que se probaron presentó diferencias con respecto a *P. aeruginosa* PAO1 (Figuras S8 del capítulo 1). Estos resultados son consistentes a lo que se observó con la mutante en el gen *aceA* derivada de *P. aeruginosa* FRD1, la cual en LB produjo piocianina y pioverdina al mismo nivel que FRD1; sin embargo, la producción de los factores de virulencia en FRD1 es diferente a *P. aeruginosa* PAO1 (Lindsey *et al.*, 2008). Los resultados también concuerdan a lo reportado por Bartell *et al.* (2017), que usó una reconstrucción de la red metabólica a escala de genoma en *P. aeruginosa* PA14 para elucidar la interconectividad entre la síntesis de los factores de virulencia y el crecimiento. La ICL no afectó la producción de los factores de virulencia, a

diferencia la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que participa en la glucólisis, la cual afectó la producción de pioverdina cuando *P. aeruginosa* P14 creció en LB. La enzima homoserina deshidrogenasa, relacionada con el metabolismo de AA, también influyó en la síntesis de la pioverdina, pero su efecto fue más evidente, ya que genera el L-aspartato 4-semialdehído, el cual es un precursor de la pioverdina (Bartell *et al.*, 2017).

Las cinéticas de supervivencia de *C. elegans* con células bacterianas vivas corroboró el fenotipo de la mutante en la PaICL, ya que los resultados que se obtuvieron con *C. elegans* indicaron que la mutante A39 es menos patogénica que PAO1 (Figura 6 del capítulo 1). El fenotipo que se observó en la mutante en la ICL ha sido consistentemente documentado en varios modelos *in vivo*, incluyendo hospederos mamíferos y no mamíferos (Lindsey *et al.*, 2008; Dunn *et al.*, 2009; Fahnoe *et al.*, 2012; Depke *et al.*, 2020). Interesantemente, la sobreexpresión de las PaICL, NiICL y CiICL aumentó la virulencia de *P. aeruginosa*, determinada por las cinéticas de supervivencia con *C. elegans*. La mutante A39 fue incapaz de matar a los nematodos, lo que indicó que la mutante en la ICL fue avirulenta. Las cinéticas de los nematodos con células bacterianas vivas crecidas en LB durante 24 h mostraron que la mutante A39 que sobreexpresó a la CiICL o a la NiICL exhibió un mayor porcentaje de nematodos muertos (~90%) que la cepa de PAO1 (~60%) (Figura 6b). En este contexto, la expresión constitutiva de la ICL es común en aislados de *P. aeruginosa* provenientes de la infección crónica de pacientes con fibrosis quística (Lindsey *et al.*, 2008; Dunn *et al.*, 2009; Fahnoe *et al.*, 2012). Estos resultados indicaron que aunque la PaICL es esencial en la virulencia de *P. aeruginosa*, el extremo carboxilo de la enzima no alteró la patogenicidad de la bacteria con el modelo de *C. elegans*.

11. CONCLUSIONES

El dominio II, el motivo extendido y el extremo carboxilo de la PaICL contribuyen para estabilizar al homotetrámero de la enzima. El dominio II y el motivo extendido son esenciales para obtener una enzima funcional, mientras que el polipéptido que se adicionó en el extremo carboxilo de la PaICL modificó la eficiencia de la enzima. Las interacciones iónicas son críticas para mantener la estructura cuaternaria de la PaICL. En contraste la adición de una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo de la ICL provocó una enzima más susceptible a un disruptor iónico, pero no afectó la asimilación de acetato en *P. aeruginosa* o la virulencia en el modelo de *C. elegans*.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J., A. Zavala, C. Diaz-Perez, C. Cervantes, A. Diaz-Perez y J. Campos-Garcia. 2006. **The atu and liu clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa***. Applied and environmental microbiology. 72(3): 2070-2079.
- Ahn, S., J. Jung, I.-A. Jang, E. L. Madsen y W. Park. 2016. **Role of glyoxylate shunt in oxidative stress response**. Journal of Biological Chemistry. 291(22): 11928-11938.
- Basta, D. W., M. Bergkessel y D. K. Newman. 2017. **Identification of fitness determinants during energy-limited growth arrest in *Pseudomonas aeruginosa***. MBio. 8(6): e01170-01117.
- Bibbins, M., P. J. Sheffield, L. D. Gainey, T. Mizote y I. F. Connerton. 1998. **Promoter analysis of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (acu-3) from *Neurospora crassa***. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. 1442(2-3): 320-325.
- Bonilla, C. Y. 2020. **Generally stressed out bacteria: Environmental stress response mechanisms in gram-positive bacteria**. Integrative and Comparative Biology. 60(1): 126-133.
- Britton, K., I. Abeysinghe, P. Baker, V. Barynin, P. Diehl, S. Langridge, B. McFadden, S. Sedelnikova, T. Stillman y K. Weeradechapon. 2001. **The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase**. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 57(9): 1209-1218.
- Britton, K., S. Langridge, P. Baker, K. Weeradechapon, S. Sedelnikova, J. De Lucas, D. Rice y G. Turner. 2000. **The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans***. Structure. 8(4): 349-362.
- Campilongo, R., R. K. Fung, R. H. Little, L. Grenga, E. Trampari, S. Pepe, G. Chandra, C. E. Stevenson, D. Roncarati y J. G. Malone. 2017. **One ligand, two regulators and three binding sites: How KDPG controls primary carbon metabolism in *Pseudomonas***. PLoS Genetics. 13(6): e1006839.
- Campos-Garcia, J., C. Diaz-Perez y A. L. Diaz-Perez. 2013. **Residues Asn214, Gln211, Glu219 and Gln221 contained in the subfamily 3 catalytic**

signature of the isocitrate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in its catalytic and thermal properties. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29: 991-999.

Crousilles, A., S. K. Dolan, P. Brear, D. Y. Chirgadze y M. Welch. 2018. **Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*.** Journal of Biological Chemistry. 293(37): 14260-14269.

Chen, S.-J., X. Wu, B. Wadas, J.-H. Oh y A. Varshavsky. 2017. **An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes.** Science. 355(6323): eaal3655.

Cheng, K. K., X. B. Zhao, J. Zeng y J. A. Zhang. 2012. **Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives.** Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 6(3): 302-318.

Choi, S., C. W. Song, J. H. Shin y S. Y. Lee. 2015. **Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives.** Metabolic engineering. 28: 223-239.

da Silva Cruz, A. H., M. Brock, P. F. Zambuzzi□Carvalho, L. K. Santos□Silva, R. F. Troian, A. M. Góes, C. M. de Almeida Soares y M. Pereira. 2011. **Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells.** The FEBS Journal. 278(13): 2318-2332.

Daniel, J., H. Maamar, C. Deb, T. D. Sirakova y P. E. Kolattukudy. 2011. **Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages.** PLoS pathogens. 7(6): e1002093.

Díaz-Pérez, A. L., C. Díaz-Pérez y J. Campos-García. 2016. **Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites.** Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 15: 1-29.

Díaz-Pérez, A. L., C. Román-Doval, C. Díaz-Pérez, C. Cervantes, C. R. Sosa-Aguirre, J. E. López-Meza y J. Campos-García. 2007. **Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine.** FEMS microbiology letters. 269(2): 309-316.

- Doelle, H. W. (2014). **Bacterial metabolism**, Academic Press.
- Dolan, S. K., G. Pereira, R. Silva-Rocha y M. Welch. 2020. **Transcriptional regulation of central carbon metabolism in *Pseudomonas aeruginosa***. *Microbial biotechnology*. 13(1): 285-289.
- Dolan, S. K. y M. Welch. 2018. **The glyoxylate shunt, 60 years on**. *Annual review of microbiology*. 72: 309-330.
- Dunn, M., J. Ramirez-Trujillo y I. Hernández-Lucas. 2009. **Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis**. *Microbiology*. 155(10): 3166-3175.
- Ebel, F., M. Schwienbacher, J. Beyer, J. Heesemann, A. A. Brakhage y M. Brock. 2006. **Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development**. *Fungal Genetics and Biology*. 43(7): 476-489.
- Eprintsev, A., A. Salnikov, A. Haba y M. Zaichikova. 2014. **Isocitrate lyase isozymes and their role in organisms with different levels of organization**. *Biology Bulletin Reviews*. 4: 323-334.
- Fahnoe, K. C., M. E. Flanagan, G. Gibson, V. Shanmugasundaram, Y. Che y A. P. Tomaras. 2012. **Non-traditional antibacterial screening approaches for the identification of novel inhibitors of the glyoxylate shunt in gram-negative pathogens**. *PLoS One*. 7(12): e51732.
- Festa, R. A., F. McAllister, M. J. Pearce, J. Mintseris, K. E. Burns, S. P. Gygi y K. H. Darwin. 2010. **Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteome of *Mycobacterium tuberculosis***. *PloS one*. 5(1): e8589.
- Gainey, L., K. Kölblle y I. F. Connerton. 1991. **Isolation and expression of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (*acu-3*) from *Neurospora crassa*: evidence for a second constitutive isozyme**. *Molecular and General Genetics MGG*. 229: 253-260.
- Hagins, J. M., R. Locy y L. Silo-Suh. 2009. **Isocitrate lyase supplies precursors for hydrogen cyanide production in a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa***. *Journal of bacteriology*. 191(20): 6335-6339.

- Hiragi, K., K. Nishio, S. Moriyama, T. Hamaguchi, A. Mizoguchi, K. Yonekura, K. Tani y T. Mizushima. 2021. **Structural insights into the targeting specificity of ubiquitin ligase for *S. cerevisiae* isocitrate lyase but not *C. albicans* isocitrate lyase.** Journal of Structural Biology. 213(3): 107748.
- Hoboth, C., R. Hoffmann, A. Eichner, C. Henke, S. Schmoldt, A. Imhof, J. Heesemann y M. Hogardt. 2009. **Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis.** The Journal of infectious diseases. 200(1): 118-130.
- Kim, Y., I. Dementieva, M. Zhou, R. Wu, L. Lezondra, P. Quartey, G. Joachimiak, O. Korolev, H. Li y A. Joachimiak. 2004. **Automation of protein purification for structural genomics.** Journal of structural and functional genomics 5:111-118.
- Kim, H., J.-Y. Hwang, J. Shin y K.-B. Oh. 2019. **Inhibitory effects of diketopiperazines from marine-derived *Streptomyces puniceus* on the isocitrate lyase of *Candida albicans*.** Molecules. 24(11): 2111.
- Knorr, S., M. Sinn, D. Galetskiy, R. M. Williams, C. Wang, N. Müller, O. Mayans, D. Schleheck y J. S. Hartig. 2018. **Widespread bacterial lysine degradation proceeding via glutarate and L-2-hydroxyglutarate.** Nature communications. 9(1): 5071.
- Kumar, R. y V. Bhakuni. 2008. **Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyase (MtbIcl): role of divalent cations in modulation of functional and structural properties.** Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 72(3): 892-900.
- Lam, O., J. Wheeler y C. M. Tang. 2014. **Thermal control of virulence factors in bacteria: a hot topic.** Virulence. 5(8): 852-862.
- Lee, Y.-V., H. A. Wahab y Y. S. Choong. 2015. **Potential inhibitors for isocitrate lyase of *Mycobacterium tuberculosis* and non-*M. tuberculosis*: a summary.** BioMed research international. 2015.
- Li, X., Y. Hou, L. Yue, S. Liu, J. Du y S. Sun. 2015. **Potential targets for antifungal drug discovery based on growth and virulence in *Candida albicans*.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 59(10): 5885-5891.

- Lindsey, T. L., J. M. Hagins, P. A. Sokol y L. A. Silo-Suh. 2008. **Virulence determinants from a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa* include isocitrate lyase.** Microbiology. 154(6): 1616-1627.
- Lopez-Boado, Y. S., P. Herrero, M. T. Fernandez, R. Fernandez y F. Moreno. 1988. **Purification of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*.** Yeast. 4(1): 41-46.
- Marrero, J., K. Y. Rhee, D. Schnappinger, K. Pethe y S. Ehrt. 2010. **Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for *Mycobacterium tuberculosis* to establish and maintain infection.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 107(21): 9819-9824.
- Masiewicz, P., A. Brzostek, M. Wolański, J. Dziadek y J. Zakrzewska-Czerwińska. 2012. **A novel role of the PrpR as a transcription factor involved in the regulation of methylcitrate pathway in *Mycobacterium tuberculosis*.**
- Matsuoka, M. y B. A. McFadden. 1988. **Isolation, hyperexpression, and sequencing of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase in *Escherichia coli*.** Journal of bacteriology. 170(10): 4528-4536.
- Miller, S. P., R. Chen, E. J. Karschnia, C. Romfo, A. Dean y D. C. LaPorte. 2000. **Locations of the regulatory sites for isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase.** Journal of Biological Chemistry. 275(2): 833-839.
- Muñoz-Elías, E. J. y J. D. McKinney. 2005. ***Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence.** Nature medicine. 11(6): 638-644.
- Murima, P., M. Zimmermann, T. Chopra, F. Pojer, G. Fonti, M. Dal Peraro, S. Alonso, U. Sauer, K. Pethe y J. D. McKinney. 2016. **A rheostat mechanism governs the bifurcation of carbon flux in mycobacteria.** Nature communications. 7(1): 12527.
- Nagano, N., C. A. Orengo y J. M. Thornton. 2002. **One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions.** Journal of molecular biology. 321(5): 741-765.

- Nishino M., K. Noda, M. Ishibashi, Y. Uno y Y. Nitta. 2023. **Expression and purification of ¹⁵N-labeled Fra a 1, a strawberry allergen, to prepare samples for NMR measurements.** Protein Expression and Purification 210:106296.
- Nishijyo, T., D. Haas y Y. Itoh. 2001. **The CbrA–CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*.** Molecular microbiology. 40(4): 917-931.
- Oh, M.-K., L. Rohlin, K. C. Kao y J. C. Liao. 2002. **Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*.** Journal of Biological Chemistry. 277(15): 13175-13183.
- Owen, O. E., S. C. Kalhan y R. W. Hanson. 2002. **The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function.** Journal of Biological Chemistry. 277(34): 30409-30412.
- Panayidou, S., K. Georgiades, T. Christofi, S. Tamana, V. J. Promponas y Y. Apidianakis. 2020. ***Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence.** Scientific Reports. 10(1): 9505.
- Park, Y., Y. Cho, Y.-H. Lee, Y.-W. Lee y S. Rhee. 2016. **Crystal structure and functional analysis of isocitrate lyases from *Magnaporthe oryzae* and *Fusarium graminearum*.** Journal of Structural Biology. 194(3): 395-403.
- Perinbam, K., J. Chacko, A. Kannan, M. Digman y A. Siryaporn. 2020. **A shift in central metabolism accompanies virulence activation in *Pseudomonas aeruginosa*.** mBio. 11(2): e02730-02718.
- Pham, T. V., A. S. Murkin, M. M. Moynihan, L. Harris, P. C. Tyler, N. Shetty, J. C. Sacchettini, H.-I. Huang y T. D. Meek. 2017. **Mechanism-based inactivator of isocitrate lyases 1 and 2 from *Mycobacterium tuberculosis*.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 114(29): 7617-7622.
- Poncet, S., E. Milohanic, A. Mazé, J. N. Abdallah, F. Aké, M. Larribe, A.-E. Deghmane, M.-K. Taha, M. Dozot y X. De Bolle. 2009. **Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria.** Bacterial Sensing and Signaling. 16: 88-102.
- Rodríguez-Bolaños, M., H. Miranda-Astudillo, E. Pérez-Castañeda, D. González-Halphen y R. Perez-Montfort. 2020. **Native aggregation is a common**

feature among triosephosphate isomerases of different species. Scientific Reports 10(1): 1-14.

- Saha R. P., M. K. Singh, A. Saha y A. Das. 2022. **Impact of poly-histidine tag on HlyU protein of *Vibrio cholera*.** Journal of Sustainable Science and Transformative Research-Reviews & Letters 1:9-10.
- Schink, S. J., D. Christodoulou, A. Mukherjee, E. Athaide, V. Brunner, T. Fuhrer, G. A. Bradshaw, U. Sauer y M. Basan. 2022. **Glycolysis/gluconeogenesis specialization in microbes is driven by biochemical constraints of flux sensing.** Molecular Systems Biology. 18(1): e10704.
- Sharma, V., S. Sharma, K. H. Zu Bentrup, J. D. McKinney, D. G. Russell, W. R. Jacobs y J. C. Sacchettini. 2000. **Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*.** Nature structural biology. 7(8): 663-668.
- Shin, D.-S., S. Kim, H.-C. Yan y K.-B. Oh. 2005. **Cloning and expression of isocitrate lyase, a key enzyme of the glyoxylate cycle, of *Candida albicans* for development of antifungal drugs.** Journal of microbiology and biotechnology. 15(3): 652-655.
- Shukla, H., V. Kumar, A. K. Singh, N. Singh, M. Kashif, M. I. Siddiqi, M. Y. Krishnan y M. S. Akhtar. 2015. **Insight into the structural flexibility and function of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase.** Biochimie. 110: 73-80.
- Singh M., H. Sori, R. Ahuja, J. Meena, D. Sehgal y A. K. Panda. 2020. **Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein SP0845.** International Journal of Biological Macromolecules 163:1240-1248.
- Somerville, G. A. y R. A. Proctor. 2009. **At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 73(2): 233-248.
- Sonnleitner, E., M. Valentini, N. Wenner, F. e. Z. Haichar, D. Haas y K. Lapouge. 2012. **Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*.** PloS one. 7(10): e44637.

- Tetrick, M. A. y J. Odle. 2020. **What constitutes a gluconeogenic precursor?** The Journal of Nutrition. 150(9): 2239-2241.
- Thomas, G., K. Lamle y B. R. Howard. 2009. **Crystallization and preliminary x-ray diffraction of a halophilic archaeal malate synthase.** American Journal of Undergraduate Research. 8(2): 15-23.
- Turner, K. H., J. Everett, U. Trivedi, K. P. Rumbaugh y M. Whiteley. 2014. **Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection.** PLoS genetics. 10(7): e1004518.
- Uchida, M., M. Ueda, T. Matsuki, H. Okada, A. Tanaka y S. Fukui. 1986. **Properties of isocitrate lyase from an alkane-utilizable yeast, *Candida tropicalis*.** Agricultural and biological chemistry. 50(1): 127-134.
- Ünal M. Ü. 2007. **Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*).** Food Chemistry 100:909-913.
- Vanni, P., E. Giachetti, G. Pinzauti y B. A. McFadden. 1990. **Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 95(3): 431-458.
- Votchitseva Y. A., E. Efremenko, T. Aliev y S. Varfolomeyev. 2006. **Properties of hexahistidine-tagged organophosphate hydrolase.** Biochemistry (Moscow) 71:167-172.
- Wendisch, V. F., M. Spies, D. J. Reinscheid, S. Schnicke, H. Sahm y B. J. Eikmanns. 1997. **Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes.** Archives of microbiology. 168: 262-269.
- Wierenga, R. 2001. **The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes.** FEBS letters. 492(3): 193-198.