

0058/
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS FACULTAD DE QUÍMICA

297/15

DESENCADENAMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA TRANSICIÓN
ALOSTÉRICA EN LA GLUCOSAMINA 6-FOSFATO DESAMINASA DE

Escherichia coli.

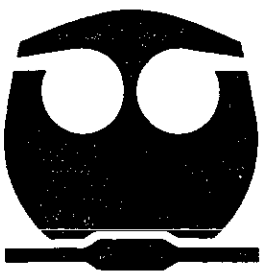
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

BIOL. SAMUEL LARA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO L. CALCAGNO



MÉXICO D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Calcagno quien desde el primer día que llegue al laboratorio me ha brindado su amistad y apoyo en todo momento.

A Myriam Altamirano que me ha impulsado a seguir en este camino.

A Gabriela Montero, Laura Alvarez, Roberto Lara, Guadalupe Maldonado y todos aquellos con los que he compartido momentos agradables y difíciles en nuestro antiguo laboratorio 6.

A la Dra. Amelia Farrés, a mi comité tutorial y a mi jurado de examen.

A mis amigos Agustin García, Leticia Arena, Katya Franco y Claudia, en la distancia.

Con mucho cariño a mis familiares y especialmente a mis abuelitas Lolita y Rafa. A mis tíos Joel, Lucy, Martha, Lulú. A todos mis primos.

Con mi corazón a Magdalena González mi mamá y a Patricio Lara mi padre. A mis tres hermanos Toño, May y Ulises.

A Margarita Morán y su familia.

A quién he visto en tutoriales, en congresos y con quien he compartido toda esta etapa, en las buenas y en las malas, a mi mejor amiga Gabriela Montero Morán.

A mi familia de Bethel.

Dedico esta tesis a:

*A Magdalena González por tu lucha, por tu fe,
por tu ejemplo, por tu forma de ser. A Patricio
Lara en quien siempre encuentro un amigo. A mis
hermanos Antonio, Marcos y Ulises.*

A Gabriela M. M. M.

A mis abuelos, a mi familia y a mis amigos.

JURADO:

Presidente Dr. Eduardo Bárzana García
Vocal Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Vocal Dr. Enrique Galindo Fentanes
Vocal Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Secretario Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero
Suplente Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Suplente Dr. Guillermo Mendoza Hernández

TUTOR:

Dr. Mario L. Calcagno

COMITE TUTORIAL:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Dr. Eduardo Horjales
Dr. Mario L. Calcagno

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Mario L. Calcagno, en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina. UNAM

ÍNDICE

	página
Abreviaturas	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	
<i>Aminoazúcares, La GlcN y la GlcNAc</i>	8
<i>Transporte de la GlcN y otros aminoazúcares en E. coli: el sistema PTS.</i>	9
<i>Las enzimas del metabolismo de aminoazúcares en E. coli. Los operones divergentes nagE-BACD.</i>	11
<i>Regulación de la expresión de las proteínas del metabolismo de aminoazúcares. El represor NagC.</i>	12
<i>La Glucosamina 6P desaminasa</i>	14
<i>El sitio activo de la Glucosamina 6P desaminasa.</i>	23
<i>El mecanismo catalítico de la Glucosamina 6P desaminasa.</i>	24
<i>El sitio alostérico de la Glucosamina 6P desaminasa.</i>	25
<i>Otros residuos importantes de la Glucosamina 6P desaminasa</i>	29
Objetivos	32
Resultados y Discusión	33
Artículo	34
“On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6 phosphate Deaminase from <i>Escherichia coli</i> .”	
Samuel Lara-González, Henry B. F. Dixon, Guillermo Mendoza-Hernández, Myriam M. Altamirano and Mario L. Calcagno.	

Artículo en preparación	44
“A site-directed-mutant of <i>Escherichia coli</i> glucosamine 6-phosphate deaminase that functionally locks the enzyme in the allosteric <i>R</i> -state” Samuel Lara-González, Enrique Rudiño-Piñera, Eduardo Horjales and Mario L. Calcagno.	
Consideraciones finales y conclusiones	67
Perspectivas	71
Referencias	73

ABREVIATURAS

Ca²⁺ calcio

CD dicroísmo circular

DTNB 5',5'-ditiobis-(2-nitro ácido benzoico)

Fru6P D-fructosa 6-fosfato

GlcN glucosamina

GlcN6P D-glucosamina 6-fosfato

GlcNc6P desaminasa glucosamina 6-fosfato desaminasa

GlcN6P sintasa glucosamina 6 fosfato sintasa

GlcNAc *N*-acetilglucosamina

GlcNAc6P *N*-acetil glucosamina 6-fosfato

GlcNAc6P desacetilasa *N*-acetilglucosamina 6 fosfato desacetilasa

ManNAc *N*-acetilmanosamina

MWC modelo alostérico concertado de Monod, Wyman y Changeux

NANA ácido *N*-acetilneurámico

NTCB 2-nitro-5-(tiocianato)ácido benzoico

ORF marco de lectura abierto

PTS sistema transportador de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato

UDP-GlcNAc UDP-*N*-acetilglucosamina

GlcN-ol-6P 2-desoxi-2-aminoglucitol 6-fosfato

RESUMEN

La enzima alostérica Glucosamina 6-*P* desaminasa (EC 3.5.99.6) de *Escherichia coli* es una (2R) aldol-cetol isomerasa y amino transferasa que cataliza la reacción de isomerización y desaminación de D-glucosamina 6-fosfato en D-fructosa 6-fosfato y amonio. La enzima funcional es un hexámero de subunidades idénticas de 266 residuos, cuyo activador alostérico es la *N*-acetil glucosamina 6-fosfato. Se ha resuelto la estructura cristalográfica de esta enzima en ambos conformeros R y T. El sitio alostérico, se localizan en la interfase entre monómeros adyacentes. El grupo fosfato del activador alostérico se une por puentes salinos con los residuos Arg158 y Lys160 y por puentes de hidrógeno al nitrógeno de la cadena principal del residuo 152 y al O γ de la Ser151 de una subunidad, mientras que la única interacción con la subunidad adyacente es con el grupo amino N-terminal.

En este trabajo se han estudiado los residuos de unión del grupo fosfato del activador alostérico. El grupo amino N-terminal ha sido estudiado por modificación química mediante una reacción específica de transaminación. Esta reacción de modificación nos permitió obtener el correspondiente α -cetoácido de la Met1 que posteriormente fue reducido a alcohol. La enzima transaminada presenta una cinética de tipo mixto *K/V* con el equilibrio desplazado al conformero R. Mientras que la enzima que porta el grupo hidroxiterminal recupera el comportamiento de la enzima silvestre. Estos resultados demuestran que el grupo amino N-terminal actúa desprotonado uniéndose al grupo fosfato de la GlcNAc6*P* por puente de hidrógeno. Los experimentos cinéticos en función del pH con la enzima silvestre y las enzimas modificadas químicamente en el grupo N-terminal muestran que el grupo amino N-terminal también es responsable de la dependencia de la cooperatividad homotrópica de la enzima frente al pH. Los residuos en las posiciones 158 y 160 fueron estudiados por mutagénesis dirigida. Diferentes mutantes en ambas posiciones se construyeron (Arg158-Ala, Arg158-Leu, Lys160-Ala y Lys160-Glu). El comportamiento cinético de las mutantes y los experimentos de unión de la GlcNAc6*P* muestran que estas enzimas no unen al activador alostérico. Las mutantes se comportan cinéticamente como bloqueadas en el conformero R. Sin embargo, la existencia de ambos conformeros alostéricos R y T ha sido comprobada por ensayos de unión del inhibidor competitivo y por cristalografía. El papel de estos residuos es fundamental en la unión del activador alostérico y en la estabilización del conformero T.

ABSTRACT

Glucosamine 6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6), is an allosteric enzyme which catalyses the regulated step of amino sugar degradation in *Escherichia coli*. It is a (2R)-aldose-ketose isomerase and amino-transferase, catalysing the isomerization and deamination of D-glucosamine 6-phosphate into D-fructose 6-phosphate and ammonium ion. The functional form of the enzyme is a hexamer of six identical subunits with a length of 266 residues. *N*-acetyl-D-glucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) allosterically activates the enzyme. GlcN6P deaminase has been crystallised in either R or T conformation. The allosteric site is located in a crevice between two adjacent subunits. The allosteric activator is bound to the enzyme through its phospho ($-OPO_3^{2-}$) group. It is salt-linked to residues Arg158 and Lys160 and hydrogen bonded to the backbone carbonyl of residue 152 and to the O_γ of Ser151 of one subunit, from the facing subunit it is bound to the N-terminal amino group.

In the present work residues Lys160, Arg158 and the N-terminal amino group were studied. The N-terminal amino group was studied with a specific non-enzymic transamination reaction, and we further reduced the product to obtain the corresponding enzyme with a terminal hydroxy group. The transaminated enzyme shows a mixed *K/V* allosteric activation pattern and the allosteric equilibrium of this enzyme is displaced to the R state. The deaminase with a terminal hydroxy group recovers the catalytic activity and allosteric activation pattern for the unmodified enzyme. The kinetic study against pH of the modified and the wild type enzymes show that protonation of the N-terminal amino group causes the loss of co-operativity at low pH. In conclusion, the N-terminal amino group participates on the allosteric transition in its unhydrated form. The interaction of the N-terminal amino group with the phospho group of allosteric activator is a hydrogen bond.

Site directed mutagenesis were used to study the function of Arg158 and Lys160 residues. A set of mutants was constructed Arg158-Ala, Arg158-Leu, Lys160-Ala and Lys160-Glu. Mutants on both positions behave as locked in the R state. Kinetic and binding experiments show that these mutants do not bind the allosteric activator. However, binding experiments of the competitive inhibitor (GlcN-ol-6P) and crystallographic studies have showed the existence of both allosteric conformers R and T. These residues bind the phospho group of the allosteric activator and stabilise the T allosteric conformer.

INTRODUCCIÓN

Aminoazúcares, la GlcN y la GlcNAc.

Todas las bacterias que se conocen, a excepción de los micoplasmas, tienen una pared de peptidoglicano, también conocida como mureína, glicopéptido o mucopéptido. Esta región contiene cadenas largas de polisacáridos con la unidad repetitiva β -1,4-*N*-acetilglucosamina- β -1,4-*N*-ácido acetilmurámico. Estas cadenas además se encuentran entrecruzadas por oligopéptidos cortos (1).

Los aminoazúcares, por tanto, son componentes de las estructuras de la superficie celular de las bacterias y forman parte del esqueleto estructural de peptidoglicanos tanto en las bacterias gram-positivas como en las gram-negativas, así como también de la capa externa de lipopolisacáridos y las cápsulas de polisacáridos de las bacterias gram-negativas.

Los aminoazúcares son abundantes en la naturaleza y no son exclusivos de las paredes celulares de las bacterias, sino que también forman parte de diferentes biopolímeros. La mayoría de los glicoconjugados (carbohidratos unidos covalentemente a proteínas o lípidos; glicoproteínas y glicolípidos) contienen aminoazúcares. Se conocen diferentes estructuras de carbohidratos unidos a proteínas. Algunas de ellas son muy comunes, pero no universales. Los carbohidratos unidos a residuos de serina o treonina frecuentemente contienen el disacárido galactosa- β (1,3)-*N*-acetilgalactosamina. Los carbohidratos unidos a residuos de asparagina comúnmente contienen el trisacárido manosa- β (1-4)-*N*-acetylglucosamina- β (1-4)-*N*-acetilglucosamina. Los carbohidratos unidos a asparagina usualmente incluyen el carbohidrato ácido *N*-acetilneurámico (NANA) (1).

El papel de los carbohidratos en las propiedades de las proteínas no se conoce en su totalidad y puede ser tan diverso como: 1) Mantener la conformación estructural de una proteína, 2) Determinar el tiempo de vida media de glicoproteínas y células circulantes (2), 3) En el caso de glicoconjugados de la superficie celular, se ha propuesto que controlan la permeabilidad de la membrana, regulan el metabolismo y la división celular (3, 4).

Funcionan como receptores para hormonas y patógenos (4), entre otros. La rigidez de la estructura de estos carbohidratos, su solubilidad en agua y su gran variedad de configuraciones posibles los hacen ideales para cumplir estas funciones.

Además de su papel estructural y funcional, los aminoazúcares son utilizados por las bacterias como fuente de energía, dado que proveen a la célula tanto de carbono como de nitrógeno. A excepción de la *N*-acetilmanosamina (ManNAc) que es metabolizada lentamente, la glucosamina (GlcN), la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el NANA, se utilizan como fuente de carbono por *Escherichia coli*. En especial, la GlcNAc produce velocidades de crecimiento comparables a las producidas por la glucosa (ver figura 1).

Se ha demostrado que algunas bacterias son capaces de degradar las complejas cadenas de oligosacáridos de los glicoconjugados de la superficie celular de mamíferos. Muchas bacterias, entre ellas *E. coli*, pueden usar el ácido siálico como fuente de carbono y nitrógeno.

Transporte de la GlcN y otros aminoazúcares en E. coli: el sistema PTS.

El sistema de la fosfotransferasa (PTS) cataliza el transporte acoplado a fosforilación de una variedad de azúcares. Este sistema requiere de una enzima II azúcar-específica, fosfoenolpiruvato y dos proteínas acarreadoras del grupo fosforilo: enzima I y Hpr. Para la glucosa y otros azúcares se necesita además una tercera proteína acarreadora de grupos fosforilo o enzima III que permite la transferencia del grupo fosforilo del fosfo-HPr a la enzima II y al azúcar.

La célula toma la GlcN a través del sistema genérico transportador de hexosas PTS, codificado en el gen *manXYZ*; este sistema produce GlcN6P intracelular. La GlcNAc puede ser transportada y fosforilada al interior de *E. coli* por dos sistemas PTS distintos. Uno es el sistema codificado por un par de genes muy relacionados *ptsM* y *ptsL*, este sistema también interviene en el transporte de manosa y otras hexosas. El segundo sistema está codificado por el gen *nagE* (*ptsN*). La expresión del gen *nagE* produce un transportador específico

para la GlcNAc del sistema fosfotransferasa (PTS): EIICBA^{Nag} (7). NagE tiene características de proteína de membrana y presenta homología con la permeasa para lactosa, con la proteína transportadora específica para glucosa (enzima II^{Glc}) y con la proteína fosfoacarreadora específica para glucosa (enzima III^{Glc}) (8).

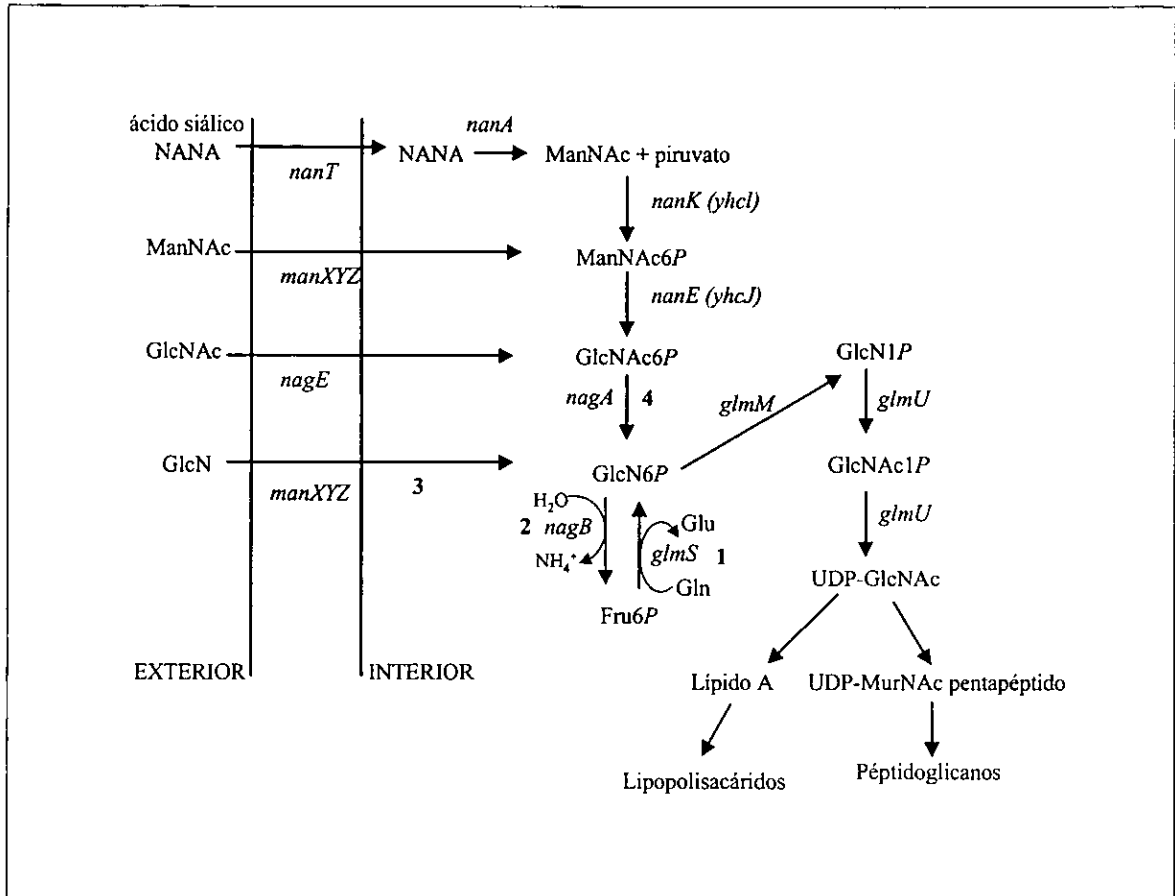


Figura 1. Metabolismo de los aminoazúcares en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) y la vía biosintética (genes *glm*). La GlcN6P puede ser generada por cuatro diferentes reacciones: 1) transferencia del grupo amida de la glutamina a la Fru6P; 2) reacción reversa de la GlcN6P desaminasa; 3) fosforilación de la glucosamina por una hexocinasa y 4) desacetilación de la GlcNAc6P (Tomado de referencias 5, 6).

Otros aminoazúcares como la ManNAc también son transportados por la enzima codificada en el gen *manXYZ* del sistema PTS, produciendo ManNAc6P intracelular. Esta hexosamina se convierte posteriormente en GlcNAc6P. El ácido siálico es captado en el exterior celular como NANA y transportado al interior como ManNAc. El uso de la GlcN,

GlcNAc, el NANA y la ManNAc como fuente de carbono requiere en común de las enzimas catabólicas codificadas por los genes *nagBA* (5) (ver figura 1).

Las enzimas del metabolismo de aminoazúcares en E. coli. Los operones divergentes nagE-BACD.

En ausencia de aminoazúcares en el medio, la enzima responsable de la síntesis *de novo* de aminoazúcares en *E. coli* es la glucosamina 6 fosfato sintasa (GlcN6P sintasa) (L-glutamina: D-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, EC 2.6.1.16), codificada en el gen *glmS*. Se requieren de cuatro etapas sucesivas para la síntesis de UDP-GlcNAc a partir de Fru6P (ver figura 1). La primera de estas reacciones es catalizada por la GlcN6P sintasa, la cual es un dímero de subunidades idénticas de 68 kDa con propiedades de aminotransferasa que convierte a la Fru6P en GlcN6P o Glc6P dependiendo de la presencia o ausencia de glutamina (9). La enzima posee dos dominios estructurales, el dominio N-terminal, que es una glutaminasa que hidroliza glutamina en glutamato y amonio y el dominio C-terminal, una isomerasa, que cataliza la isomerización cetosa-aldosa y utiliza el nitrógeno para la síntesis de GlcN6P (10). El producto de la enzima, la GlcN6P, es utilizado posteriormente en la síntesis de UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). La UDP-GlcNAc se utiliza como donador de aminoazúcares en diversas reacciones de transferencia durante la síntesis de peptidoglicanos, de lipopolisacáridos de la capa externa, del antígeno común enterobacterial, de las glicoproteínas con enlaces *N*- y *O*- glicosídicos y algunos antígenos O de bacterias gram-negativas. En la biosíntesis de aminoazúcares la GlcN6P sintasa es una enzima clave en la utilización del nitrógeno amida (Nε2) de la glutamina. Un posible papel de esta enzima en humanos es el de desensibilizar al sistema transportador de glucosa activado por insulina (11).

El crecimiento de *E. coli* en un medio con aminoazúcares como única fuente de carbono, induce la expresión de las enzimas necesarias para la toma y absorción de los aminoazúcares, codificadas en los operones divergentes *nagE* y *nagBACD* localizados a 15 min en el mapa genético de *E. coli*. Los genes *nagA* y *nagB* codifican para dos enzimas, la GlcN6P desaminasa y la *N*-acetilglucosamina 6 fosfato desacetilasa (GlcNAc6P

desacetilasa), esta última, es una proteína homotetramérica con estructura α/β , cuyas subunidades pesan de 41 kDa. La GlcNAc6P desacetilasa sigue un mecanismo secuencial ordenado uni-bi (12). Ambas enzimas son necesarias para la degradación de GlcNAc6P hasta Fru6P. En la figura 1 se muestran las vías catabólicas y anabólicas del metabolismo de aminoazúcares en *E. coli*.

Regulación de la expresión de las proteínas del metabolismo de aminoazúcares. El represor NagC.

Los genes para la biosíntesis (*glmS*) y degradación (*nagB*) de la GlcN6P presentados anteriormente se expresan coordinadamente, de manera que en presencia de aminoazúcares se inducen las enzimas catabólicas y disminuye la expresión de la glucosamina sintasa. Se ha demostrado, por el análisis de la expresión de diferentes combinaciones entre los genes *nagE*, *nagB*, o *nagA*, con el gen *lacZ*, que los tres genes *nag* son inducidos en paralelo cerca de 20 veces cuando se usa GlcNAc como única fuente de carbono (13). Bajo estas mismas condiciones la concentración de la enzima GlcN6P sintasa disminuye cerca de tres veces; esta regulación tiene lugar a nivel transcripcional (14).

La expresión de los genes para la desaminasa y la desacetilasa es controlada por una proteína represora codificada por el gen *nagC*. NagC es un regulador transcripcional que junto con Mlc controla la expresión de varios genes del sistema fosfotransferasa (PTS) en *E. coli*. Ambos represores son miembros de la familia de proteínas llamadas ROK (represores, ORF, cinasas) e *in vitro* son capaces de compartir operadores (15, 7).

NagC controla tres grupos de genes del regulón *nag*, los operones divergentes *nagE-BACD*, el operón *glmUS* y el operón *manXYZ*. Estos tres grupos de genes están implicados en el metabolismo de los aminoazúcares GlcNAc y GlcN. En ausencia de aminoazúcares en el medio, NagC reprime los operones divergentes *nagE-BACD*, necesarios para el catabolismo de GlcNAc6P. NagC se une a dos operadores que se superponen con los promotores divergentes *nagE-B*, formando un asa de represión en el DNA. Existen otros dos sitios de unión para el represor NagC corriente arriba del operon *manXYZ*, que

codifican para un segundo transportador para la GlcNAc y el principal transportador de GlcN, así como otras hexosas. En condiciones normales los genes *manXYZ* son débilmente reprimidos por la proteína NagC (16).

La proteína NagC también participa en la regulación de la biosíntesis de los aminoazúcares. El operón *glmUS* codifica las proteínas que sintetizan la GlcN6P y la UDP-GlcNAc, esta última es el principal precursor de los componentes de la pared celular. En este operón existen sitios de unión para el represor NagC, dos corriente arriba del gen *glmU*, cuya eliminación evita la activación de la expresión de *glmU* en ausencia de aminoazúcares, lo que permite concluir que NagC es necesario para la expresión de *glmU*, funcionando como activador; más aún, la localización de un segundo sitio distal para NagC sugiere la existencia de una secuencia activadora corriente arriba para los genes *glmU* y *glm* (17).

Resulta inusual la localización del gen para NagC dentro del operón *nagBACD*, dado que la mayoría de los represores o activadores transcripcionales se expresan en genes aislados, que si bien se localizan cerca de los loci que controlan (por ejemplo *araC* y *lacI*) se transcriben a partir de su propio promotor. Los análisis por Northern-blot (RNA) muestran que el gen *nagC* se expresan como parte de un RNAm policistrónico *nagBACD*, pero también se puede expresar a partir de dos promotores localizados corriente arriba del gen *nagA* que son tan fuertes como el promotor para el gen *nagB* y específicos para *nagC* (18). Sin embargo, cuando se utiliza como única fuente de carbono a la GlcNAc6P la expresión de los genes *nagB* y *nagA* es fuertemente inducida (veinte veces) mientras que la inducción del gen *nagC* es mínima (dos veces). Se ha propuesto que el gen *nagC* esta sujeto a un mecanismo de traducción de bajo nivel de manera que la cantidad de proteína NagC se mantiene baja a pesar de los altos niveles de transcripción (18).

El mecanismo de activación de los genes del catabolismo de aminoazúcares también se conoce en *Candida albicans*. *C. albicans* es una levadura diploide y un patógeno oportunista capaz de producir diferentes tipos de infecciones en el tracto gastrointestinal, respiratorio y genital. Normalmente, existe como comensal y se vuelve patógena cuando el huésped se encuentra inmunodeprimido. Resulta interesante que las especies no patógenas

de *Candida* y otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* no son capaces de utilizar la GlcNAc como fuente de carbono, curiosamente las mucosas de los sitios de infección son ricas en aminoazúcares como la GlcNAc (19).

Durante los primeros minutos de inducción de *Candida albicans* con GlcNAc se observa la activación de los genes del catabolismo para la GlcNAc: GlcNAc-cinasa, GlcNAc-desacetilasa y GlcN6P desaminasa, alcanzándose niveles constantes de producción de las enzimas en la primera hora y en las primeras tres horas se observa la formación de tubos germinales. La organización de genes en acúmulos es común en bacterias y menos frecuente en eucariontes, en este caso, el uso de GlcNAc como fuente de carbono es una vía alternativa, de modo que la presencia de un sistema de transcripción bidireccional es un mecanismo efectivo capaz de coordinar la expresión de genes adyacentes. Los genes *nag1*, *dac1* y *hxl1* están presentes en un solo locus y están sujetos a activación transcripcional en respuesta a un solo inductor, la GlcNAc (20). Sin embargo, la organización de estos genes en *C. albicans* es bastante diferente a la que encontramos en *E. coli*, *nag1* y *dac1* comparten un promotor divergente, mientras que un tercer gen *hxl1* corriente debajo de *nag1* tiene un promotor independiente. Los tres genes *dac1*, *hxl1* y *nag1* se regulan a nivel transcripcional por la GlcNAc, su nivel de transcripción, una vez activados alcanza el equilibrio a los 30 min. Este proceso de regulación por GlcNAc es mediado, al menos, por dos factores de transcripción (20).

La Glucosamina 6 fosfato desaminasa.

La GlcN6P desaminasa (E.C. 3.5.99.6) degrada reversiblemente a la GlcN6P, formando Fru6P y amonio. Fue descrita por primera vez por Leloir y Cardini en 1956 usando extractos de riñón de cerdo y observando la desaparición de GlcNAc6P y GlcN6P (21). Posteriormente en 1958, Comb y Roseman purificaron la enzima a partir de *E. coli* y riñón de cerdo, concluyendo que una μmol de GlcN6P es convertida a una μmol de Fru6P y una μmol de amonio y además que la GlcNAc6P actúa como un activador de la reacción y no como un intermediario de esta (22).

La GlcN6P desaminasa pertenece a la clase (2-R) aldo-cetosa isomerasas. Las enzimas de este grupo catalizan la toma de un hidrógeno del C2 de la aldosa y lo transfieren al C1 de la cetosa (o lo opuesto en la reacción reversa) presentando como intermediario de la reacción un *cis*-enediol. Dos casos especiales en esta clase de enzimas son la GlcN6P desaminasa y la GlcN6P sintasa, ya que ambas enzimas son aldosa-cetosas isomerasas y amino transferasas.

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es una proteína homohexamérica, compuesta por subunidades de 266 aminoácidos y 29.7 kDa (ver figura 2). Se conoce la secuencia nucleotídica del gen *nagB* que codifica para la desaminasa en *E. coli* (8) y en otros organismos (23). La enzima silvestre de *E. coli* y un gran número de mutantes, así como las de mamíferos han sido purificadas por cromatografía de afinidad alostérica (24, 25, 26, 27, 28). Este método de purificación utiliza un análogo del activador alostérico unido a agarosa, la *N*-6-aminohexanoil-D-glucosamina 6 fosfato agarosa, desarrollada por Calcagno y col. en 1984.

1	MRLIPLTTAE QVGKWAARHI VNRINAFKPT ADRPFVLGLP TGGTPMPTYK ALVEMHKAGO
61	VSEFKHVVTFN MDEYVGLPKE HPESYYSEMHRNFFDHVDIP AENINLLNGN APDIDAECRQ
121	YEEKIRSYGK IHLFMGGVGN DGHIAFNEPA SSLASRTNIK TLTHDTRVAN SREFFDNDVNO
181	VPKYALITVGV GTLLDAEEVM ILVLGSQKAL ALQAAVEGCV NHMWTISCLQ LHPKAIMVCD
241	EPSTMELKVK TLRVFNELEA ENIKGL

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Se muestran en rojo los residuos del sitio activo, en azul los residuos del sitio alostérico, sombreado en gris los residuos de la tapa del sitio activo (residuos 158-187) y dentro de una caja los residuos que forman parte del asa catalítica que constituyen el contacto más directo que comunica al sitio activo con el sitio alostérico (residuos 136-158).

La forma funcional de la enzima es el hexámero cuya masa es de 178 kDa. En *E. coli* B (cepa ATCC11303) presenta un punto isoeléctrico de 6.0-6.1, una constante de sedimentación de 9.0 S, una k_{cat} por subunidad en el sentido de formación de Fru6P y amonio de 300 s^{-1} y de 76 s^{-1} en el sentido inverso (24). La enzima que actualmente

sobreexpresamos en el laboratorio, proviene de la cepa K12, presenta un K_m para la GlcN6P de 0.75 mM y una k_{cat} de 158 s⁻¹ por subunidad (29).

Esta enzima presenta cooperatividad homotrópica positiva frente a su sustrato con un número de Hill de 2.7 a pH 7.7. Este comportamiento homotrópico puede describirse con el modelo alostérico concertado de MWC (30), para el caso de una unión no exclusiva del sustrato. La actividad de la desaminasa es regulada alostéricamente como respuesta a la unión del activador la GlcNAc6P, cuyo efecto es el incremento de la actividad enzimática aumentando la afinidad de la enzima por su sustrato sin afectar la velocidad máxima. De esta forma, a concentraciones saturantes del activador alostérico la enzima describe una cinética hiperbólica, comportamiento que se ajusta al modelo de MWC para el caso de fijación exclusiva. Este tipo de comportamiento se conoce como de tipo K. Del ajuste al modelo de MWC se obtienen los siguientes parámetros: L de 8.85×10^5 y c de 0.025 (29).

La GlcN6P desaminasa también se ha purificado y estudiado en otros organismos. La enzima purificada a partir de *C. albicans* (cepa SC5314), tiene un peso molecular en condiciones desnaturizantes de 28,000 y en condiciones nativas de 43,000; por lo que, se propone que funcionalmente es un dímero (31). Esta enzima presenta una identidad del 47% con la secuencia de aminoácidos de la desaminasa de *E. coli* (31).

En mamíferos se ha demostrado, por análisis de cDNA en hamster, que la GlcN6P desaminasa se localiza principalmente en riñón e intestino delgado, en concentraciones menores en bazo, testículos, ovarios, cerebro, pulmón y corazón y, en niveles muy bajos en músculo esquelético e hígado. Resultados similares se han encontrado con el uso de anticuerpos policlonales para una proteína de fusión de la GlcN6P desaminasa de hámster (32). En los eritrocitos humanos también se ha demostrado la presencia de las enzimas catabólicas para la GlcNAc: GlcNAc cinasa, GlcNAc6P desacetilasa y GlcN6P desaminasa (33).

Bajo condiciones fisiológicas, la desaminasa sintetiza fructosa 6 fosfato, siendo su papel biológico el proveer hexosas a la vía glucolítica. La GlcN6P desaminasa es la única enzima

que puede facilitar la transferencia de hexosaminas provenientes de macromoléculas estructurales como glicoproteínas y glicolípidos a la vía glucolítica. Esta posibilidad de funcionar como una fuente de energía está estrechamente relacionada con la localización que se ha encontrado para la GlcN6P desaminasa. Esta enzima, tanto en el riñón como en el intestino delgado, se localiza en el epitelio transportador cuya tasa metabólica es una de las más altas en el organismo (32). En el cerebro la desaminasa se localiza en las neuronas y se concentra principalmente en las terminales, que son la región más demandante de energía de las neuronas, debido a los procesos de exocitosis y endocitosis de las vesículas sinápticas (32). De igual forma, la movilidad dinámica de los espermatozoides consume una gran cantidad de energía y los espermatozoides poseen una alta concentración de esta enzima (34).

En mamíferos la GlcN6P desaminasa ha sido purificada a partir de riñón de perro. Esta enzima es un hexámero de 180 kDa y subunidades idénticas de 30.4 kDa. Presenta cooperatividad homotrópica positiva frente a su substrato (coeficiente de Hill de 2.1 a pH 8.8) la que desaparece a concentraciones saturantes del activador alostérico, produciéndose una activación de tipo K . A concentraciones saturantes la K_m para el substrato es de 0.25 mM y presenta un k_{cat} de 42 s^{-1} por sitio, estimándose gráficamente una K_{dis} para la GlcNAc6P de $14 \mu\text{M}$. El comportamiento cinético de esta enzima al igual que la de *E. coli*, se ajusta al modelo alostérico de MWC (25).

La GlcN6P desaminasa purificada de riñón de bovino presenta una cinética interesante y poco usual. Se comporta como un sistema alostérico de tipo V , en el que el valor de la k_{cat} se incrementa conforme aumenta la concentración del activador alostérico. Esta enzima es un hexámero de 210 kDa con 32.5 kDa y 289 residuos por monómero, presenta un punto isoeléctrico de 5.9. En ausencia del activador alostérico presenta una actividad catalítica muy baja y describe una cinética de tipo hiperbólica. La adición de concentraciones crecientes del activador alostérico activa a la enzima modificando su constante catalítica (k_{cat}), en donde a concentraciones saturantes encontramos un incremento de 27 veces sobre la V_{max} . A partir de estos datos se calculó una constante de disociación para la GlcNAc6P

de 25 μM . El inhibidor competitivo GlcN-ol-6P, un análogo del estado de transición, presenta una constante de inhibición de 4 μM (27).

Se han descrito recientemente en mamíferos la presencia de dos genes que codifican para la GlcN6P desaminasa. La existencia de estos dos genes puede explicar los datos experimentales que se han encontrado en nuestro laboratorio con respecto a la desaminasa de bovino (27). Durante la purificación de esta enzima y bajo ciertas condiciones se obtienen dos formas de la proteína con diferentes pesos moleculares y diferente comportamiento cinético, que varía de un sistema *K* para la variante ligera a uno del tipo *V* para la variante pesada (35). La presencia de dos monómeros con pesos diferentes fue inicialmente interpretada por Lara-Lemus y col. como una variación causada por proteólisis, posiblemente con alguna función reguladora debido a los cambios significativos que se observan en el patrón de activación alostérica de la enzima (27).

En ratón se ha detectado la presencia de la GlcN6P desaminasa en diferentes tejidos como: cerebro, riñón, hígado, músculo, ovario, y testículo (36). En condiciones desnaturizantes esta enzima tiene una masa correspondiente a la de un monómero de 33 kDa (37). En este organismo se han reportado dos secuencias de cDNA para la GlcN6P desaminasa. Una de estas secuencias codifica para una enzima larga de 289 residuos con una identidad del 96% con su homólogo en genoma humano (36, 37); (Genbank, código de acceso: AF088903, AF160355). El segundo gen codifica para una GlcN6P desaminasa corta de 276 residuos con una identidad del 97% con su homólogo en genoma humano (38); (Genbank, código de acceso: AK_015527).

De la misma forma a la que se ha descrito en ratón, en el genoma humano se encuentran dos genes que codifican para la GlcN6P desaminasa localizados en el cromosoma 4 y 5 respectivamente: un gen corto, que codifica una enzima de 276 residuos y un gen largo, que codifica para una enzima de 289 residuos (GenBank códigos de acceso: NT_006489 y NT_022978) (39) (35). Actualmente, la GlcNP desaminasa de humano es un tema de intenso trabajo en nuestro laboratorio, la enzima GlcNP desaminasa humana producto del

gen largo se ha expresado en *E. coli* y se está trabajando en la clonación y expresión del gen corto.

La GlcN6P desaminasa más estudiada es la de *E. coli* que ha sido caracterizada en detalle (24) por modificación química (40) y exhaustivamente con mutantes sitio específicas (41), (26, 28, 42), incluso se conoce la estructura tridimensional de los conformeros T y R (43, 44).

Después de su caracterización cinética uno de los primeros trabajos realizados con esta enzima fue el estudio de la reactividad de los residuos de cisteína frente a reactivos como el 5',5'-ditiobis-(2-nitro ácido benzoico, DTNB). Encontrándose que de los cuatro residuos de Cys por monómero, sólo dos de ellos se encuentran expuestos al disolvente y son por tanto reactivos; además su reactividad disminuye por unión de los ligandos homotrópicos y heterotrópicos (40). Estos dos residuos de Cys fueron identificados posteriormente cuando fueron cianilados con 2-nitro-5-(tiocianato)ácido benzoico (NTCB) en condiciones nativas y la cadena polipeptídica fue escindida específicamente en los grupos cianilados mediante hidrólisis alcalina. Este procedimiento permitió identificar a las Cys 118 y 239 como los residuos reactivos frente a DTNB en la proteína nativa. Mutantes sitio específicas en las cuales se reemplazó a estas Cys por residuos de Ser mostraron un comportamiento muy similar al de la enzima silvestre (45).

En trabajos posteriores con el uso de técnicas espectrofotométricas ha sido posible conocer más propiedades de la desaminasa. Por ejemplo, utilizando dicroísmo circular (CD), en combinación con métodos empíricos de predicción de estructura secundaria, fue posible determinar el contenido de estructura secundaria de la desaminasa y ubicarla como una enzima de la familia α/β (41). Esta técnica espectrofotométrica de CD ha sido usada extensivamente y ha permitido determinar por ejemplo, una K_d 36 μ M para el activador alostérico en presencia de concentraciones saturantes del inhibidor competitivo, glucitolamina 6-fosfato (GlcN-ol-6P). La curva de unión de GlcNAc6P a la GlcN6P desaminasa, seguida por CD, a concentraciones saturantes del inhibidor es hiperbólica y sigmoïdal en ausencia de Glc-ol-6P, demostrándose que el inhibidor desplaza el equilibrio

al confórmero R (42). Esta técnica también permitió detectar un residuo de Tyr en el sitio alostérico, el cual fue estudiado por absorbancia en el ultravioleta siguiendo el corrimiento al rojo típico de residuos de Tyr en presencia o ausencia de ligantes homotrópicos o heterotrópicos. El análisis de estos experimentos junto con análisis teóricos de la secuencia peptídica de la proteína (accesibilidad de superficie) permitieron proponer a la Tyr254 y a la Tyr121 como residuos importantes en el sitio alostérico y en la transición alostérica (42). El papel de estos dos aminoácidos se discute más adelante.

Actualmente disponemos de la estructura tridimensional de esta enzima por difracción de rayos X para el confórmero R y T. Las estructuras han sido depositadas en el Protein Data Bank con los siguientes códigos: 1DEA, 1HOR, 1HOT para el estado R y 1CD5 para el estado T (43, 44). La enzima fue cristalizada por difusión de vapor en gotas colgantes, usando sales de fosfato como agente precipitante. El cristal pertenece al grupo espacial R32, con una celda $a=b=125.9 \text{ \AA}$, $c=223.2 \text{ \AA}$. Los cristales del complejo enzima--2Pi, tienen dos monómeros por cada unidad asimétrica, con un contenido de disolvente del 52% (46). Los otros complejos usados: enzima-activador-Pi y enzima-inhibidor- Pi son isomorfos con respecto al primero (44). Los cristales que se usaron para la estructura de la forma T se obtuvieron con acetato de sodio como agente precipitante, pertenecen al grupo espacial P6₃22, con una celda de $a=129.81 \text{ \AA}$, y $c=139.11 \text{ \AA}$, con un contenido del 78% de solvente (43).

El hexámero puede describirse como un trímero de dímeros, con un eje cristalográfico de simetría tres y tres ejes no cristalográficos de orden dos perpendiculares al eje de orden tres (44) (ver figura 3).

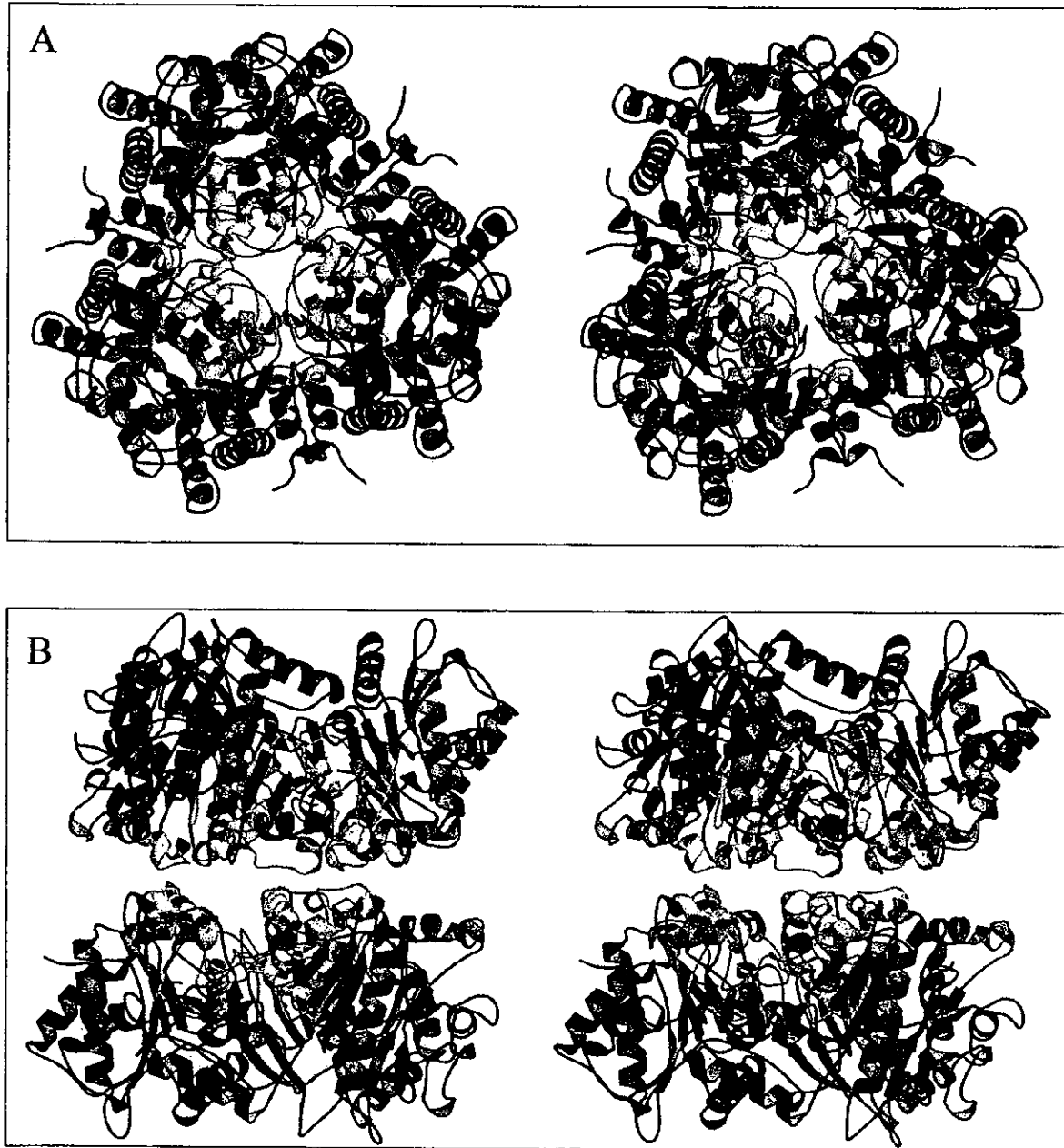


Figura 3. Estereopar donde se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. En A, se muestra el hexámero observándose desde arriba el eje de simetría de orden tres. En B, vista lateral del hexámero, la enzima tiene un arreglo de dímero de trímeros. En rojo oscuro se muestran los residuos del módulo externo y en azul claro los residuos del módulo interno. La tapa del sitio activo en magenta y en amarillo el asa (residuos 144-154) que conecta al sitio activo y al sitio alostérico. El código de colores presentado es el mismo que se usará en las siguientes figuras. Esta figura fue realizada con los programas Molscript y Raster3D (47, 48).

El monómero es una estructura abierta α/β dominada por una hoja central de siete hebras β paralelas, rodeada en ambos lados por ocho hélices- α y una hélice 3_{10} . Las hélices se han numerado secuencialmente del 1-8 y las hebras de la hoja β de la A-G. La hebra C continúa en su extremo C-terminal formando parte de una segunda hoja β antiparalela de tres cadenas (A', B' y C'). La hélice- α 5 se encuentra entre las cadenas B' y C', es muy flexible y presenta muy pocos contactos con el resto de la molécula. La hélice 4, que es hidrofílica también tiene pocos contactos que se restringidos a las posiciones Cys118 y Tyr121. La topología del monómero se asemeja a un dominio de unión de NAD con tres adiciones: La secuencia N-terminal, residuos 1-35; en el extremo C-terminal los residuos 243-266 y un segmento que comprende los residuos 141-188 (44).

El plegamiento del monómero en el conformero T es idéntico al del estado R. La zona de la tapa del sitio activo (residuos 158-187) y los residuos 163-182 son las regiones que presentan las mayores diferencias entre ambos conformeros. Esta región está altamente desordenada en el conformero T, lo que es indicativo de su alta flexibilidad (43) (ver figura 4).



Figura 4. Estereopar del monómero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* en el conformero R. Se representa al inhibidor competitivo GlcN-ol-6P ocupando el sitio activo.

El sitio activo de la GlcN6P desaminasa.

El sitio activo se forma entre dos asas situadas en el extremo C-terminal de las hebras B y E. El fosfato del sitio activo esta unido por puente salino a la Lys208 y Arg172 y por puentes de hidrógeno al asa formada por los residuos 40-44 (44). El inhibidor competitivo se encuentra unido de forma extendida con su O5 apuntando hacia el Nε2 de la His143. Esta histidina está en contacto a través de su Nδ1 con el Oδ1 del Asp141 y el Oε1 del Glu148. El residuo Asp72 se encuentra orientado hacia el hidrógeno en C2 del azúcar y hace un puente de hidrógeno con el O1 del inhibidor (44) (ver figura 2 y 5).

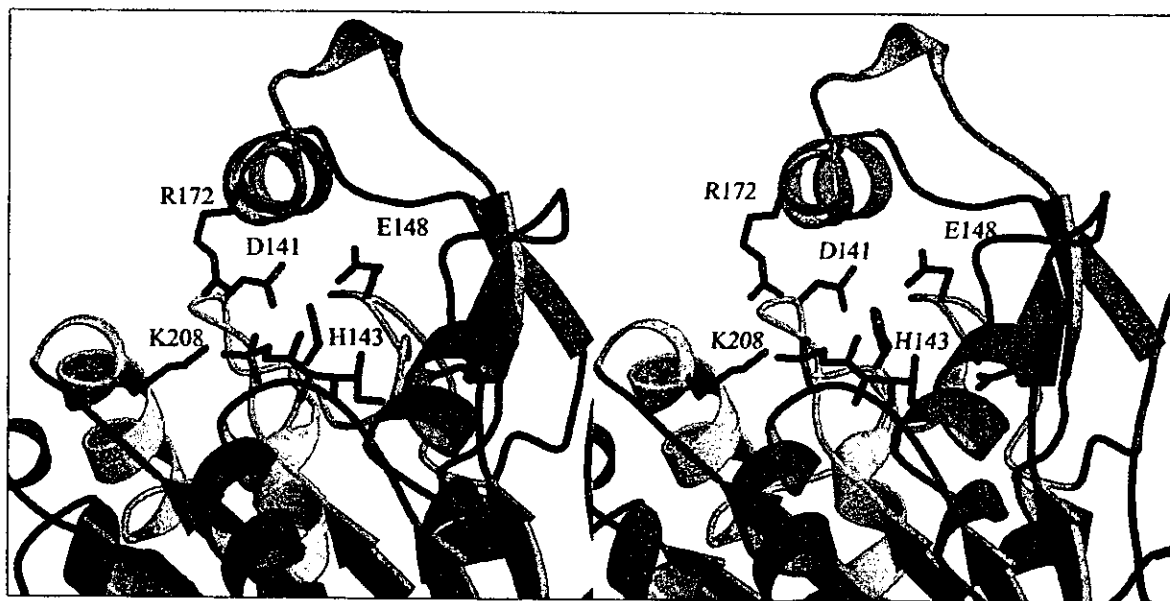


Figura 5. Detalle del sitio activo de la GlcN6P desaminasa. Se muestra el inhibidor competitivo unido al sitio activo, los residuos catalíticos y los de unión descritos en el texto.

El mecanismo catalítico de la GlcN6P desaminasa

La enzima une la forma piranosa del sustrato y posteriormente lo abre. El modelado de la GlcN6P en el sitio activo muestra al átomo O5 del anillo del azúcar en contacto con el Nε2 de la His143. Este residuo se encuentra rodeado de dos grupos ácidos, el de Asp141 y el de Glu148, ambos en contacto con el Nδ1 de la His143. Este arreglo es importante en la catálisis de la apertura del anillo, un arreglo similar se ha encontrado en la D-xilosa isomerasa (49). En la conformación cerrada del sustrato, el modelo muestra al residuo Asp72 estabilizando la carga positiva del grupo amonio de la GlcN6P (44).

Una vez abierto, el sustrato se une de forma similar a la mostrada por el inhibidor competitivo. En esta orientación, el carboxilato del Asp72 se encuentra en posición óptima para abstraer un ion de hidrógeno en C2 del sustrato, catalizando la enolización del aminoazúcar para formar un intermediario *cis*-enol-amonio. Subsecuentemente, este intermediario se convierte en el correspondiente enol-amonio cuando el protón regresa al aminoazúcar en la posición O1 (44). Existen dos interpretaciones posibles de cómo puede darse la siguiente etapa. En una de ellas, un protón del grupo amonio puede ser tomado de nuevo por Asp72 formándose una *cis*-enol-amina (2-amino-2-desoxi-D-arabino-hex-2-enitol 6-fosfato), la que posteriormente toma el protón de Asp72 en la posición C1 *pro*-R, que al rearreglarse forma la fructosimina 6 fosfato (2-desoxi-2-imino-D-arabino-hexitol 6-fosfato). El grupo imino reacciona entonces con una molécula de agua produciendo un carbinol-amonio, un intermediario inestable. Alternativamente, se puede llegar a este intermediario si el enlace π entre C1 y C2 del intermediario *cis*-enol-amonio es atacado por una molécula de agua en la cara *re* del intermediario (44).

La estructura del intermediario *cis*-enol-amonio es muy similar a la del inhibidor competitivo. Este intermediario se descompone en Fru6P y NH₃. Se ha demostrado que el sustrato para la enzima es el ion amonio, de forma que el amonio formado en esta etapa debe tomar al protón, lo más factible, es que lo tome del carboxilo del Asp72 para liberarse como ión amonio (44).

El sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa.

El sitio alostérico existe sólo en el conformero R, donde se encuentra situado entre las caras enfrentadas de dos monómeros adyacentes. El fosfato de la molécula del activador alostérico se liga de la misma forma que el fosfato inorgánico: presenta contactos mediante puentes salinos con Arg158 y Lys160 y por puente de hidrógeno al nitrógeno de la cadena principal del residuo 152 y al O γ de la Ser151 de subunidad(44). La única interacción del grupo fosfato con la subunidad adyacente es por un puente de hidrógeno al grupo amino N-terminal, el cual se encuentra desprotonado durante la transición alostérica, la protonación de este grupo es responsable de la pérdida de cooperatividad a pH de 6 de la enzima (29). El átomo O3 del activador alostérico se encuentra unido por un puente de hidrógeno al carbonilo del esqueleto principal a nivel del residuo 159. La parte hidrofóbica del grupo acetilo se une por contactos de van der Waals con el residuo Ile159. La densidad de electrones observada permite distinguir al anómero α del activador alostérico como la forma que se une al sitio alostérico(44) (ver figura 2 y 6).

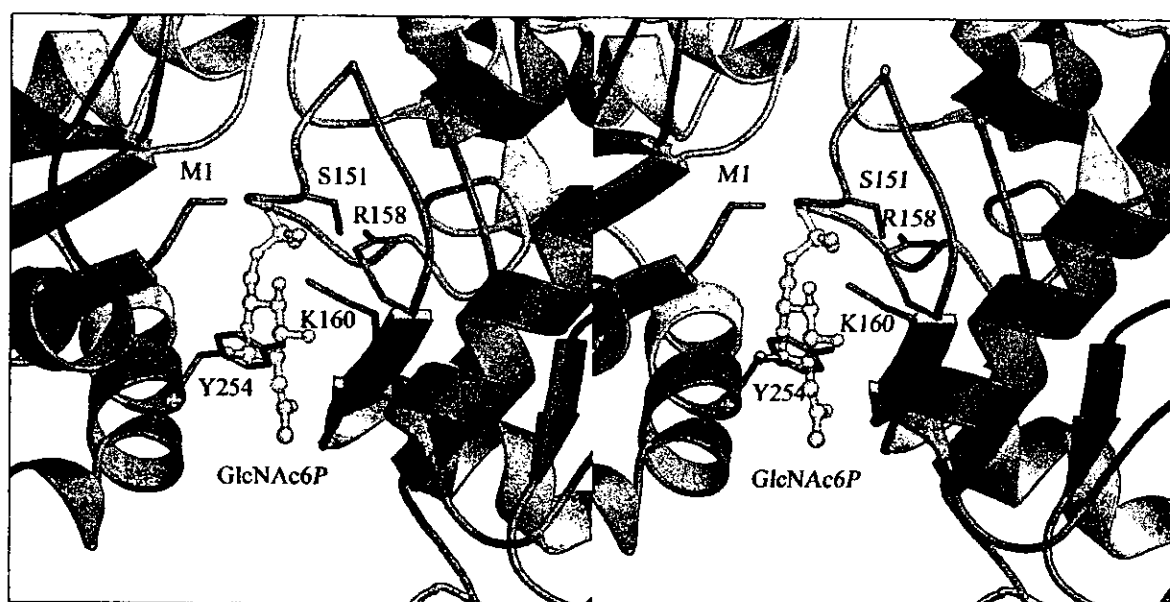


Figura 6. Detalle del sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa. Se representan los residuos importantes del sitio alostérico y al centro, transparente, la molécula de GlcNAc6P.

De acuerdo a la estructura, en el conformero T, los residuos del sitio alostérico no se encuentran en la posición correcta para unir a la GlcNAc6P. En esta conformación, el grupo amino terminal está a más de 10 Å de los residuos con carga Lys160 y Arg158 de la subunidad adyacente y se une por puente de hidrógeno al oxígeno carbonílico de la Ala150 de la subunidad vecina. El sitio alostérico se encuentra ensanchado en el conformero T, en esta región se acumulan cargas positivas que son neutralizadas con la unión del grupo fosfato de la GlcNAc6P en el conformero R. La repulsión electrostática de estas cargas en el estado T es parcialmente responsable de la forma abierta del sitio alostérico, similar a lo descrito en la hemoglobina (43) (ver figura 7).

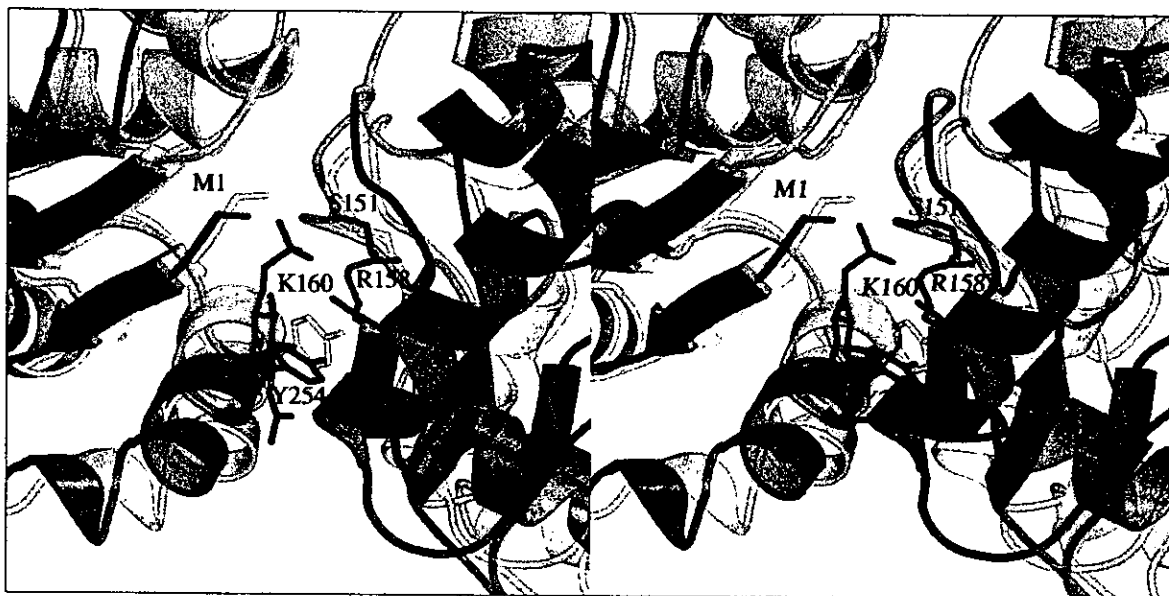


Figura 7. Estereopar del sitio alostérico, superposición de los conformeros R y T, los residuos de unión al activador alostérico y la estructura en colores sólidos corresponden al estado R, el estado T se muestra transparente. Nótase el movimiento de las cadenas laterales de los residuos Arg158 y Lys160, las que desaparecen de la imagen porque en el conformero T interaccionan con Glu148. Se muestran también los residuos Met1 y Tyr254 de la subunidad vecina.

Un residuo importante en el sitio alostérico es la Tyr254, que interacciona por puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de la Thr161 en el conformero R, mientras que en T hace el mismo tipo de interacción pero con la Pro149. La Tyr254 funciona como un interruptor y se describe más adelante (28) (ver figura 6 y 7).

En el estado T, Glu148 forma una puente salino con Lys160 y un puente de hidrógeno con Arg158, los dos residuos básicos que son esenciales para estabilizar la carga del grupo fosfato del activador alostérico. Se ha propuesto que Glu148 junto con Asp141 forman parte de los grupos que se encargan de polarizar a la His143 durante la catálisis (44). Sin embargo, estudios recientes mediante mutagénesis y modificación química de los residuos 143, 141 y 148 han permitido distinguir al residuo Glu148 como el más importante durante la activación de la His143 (50). Durante la transición alostérica la cadena lateral de este residuo sufre un gran cambio conformacional acoplado a la deformación del asa 144-154. En el estado T la cadena lateral de Glu148 apunta directamente hacia Lys160 y se encuentra a 8 Å del átomo N δ 1 de la His143. En esta posición neutraliza las cargas positivas del sitio alostérico (43) (ver figura 8).

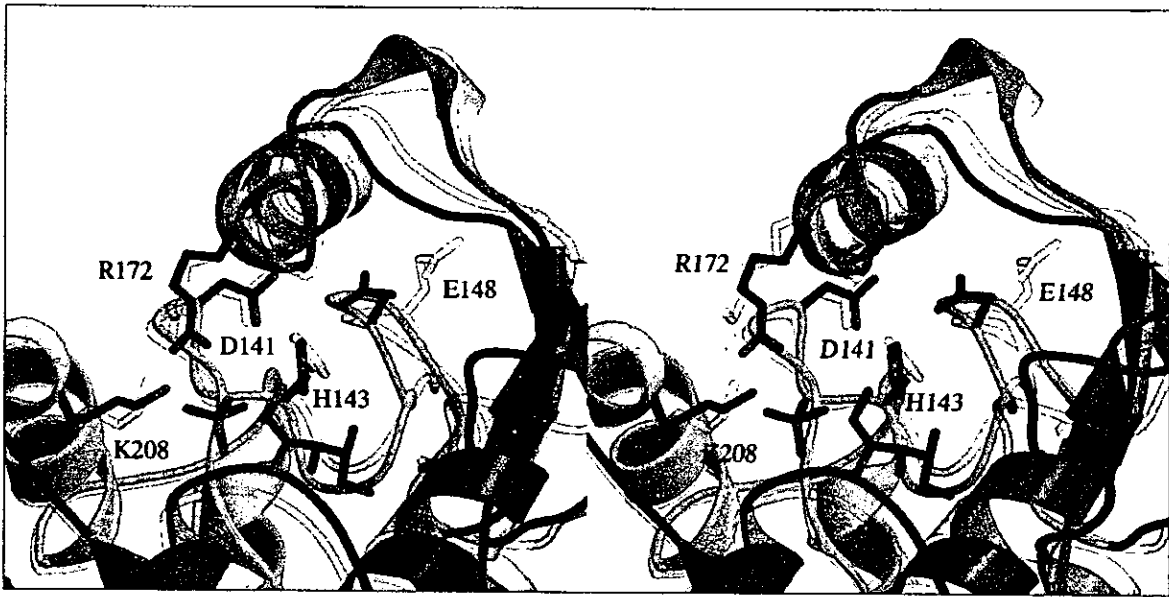


Figura 8. Superposición en el sitio activo de los conformeros R y T. Nótese el cambio que experimenta durante la transición alostérica el residuo E148. Se muestra en colores sólidos el conformero R y transparente el conformero T.

El cambio conformacional alostérico provoca en cada monómero dentro del hexámero una rotación de 13.1° alrededor de un solo eje, paralelo al eje de simetría de orden tres y muy cercano al residuo 197 de cada monómero. El hexámero en ambas conformaciones presenta interacciones intermonoméricas limitadas a tres regiones: 1) cercana al eje de simetría de orden tres, entre los residuos 216 y 232. 2) cerca al eje de simetría de orden dos, entre los

residuos 244 y 250, y 3) En el sitio alostérico, ubicado entre monómeros adyacentes (43). El cambio conformacional en el monómero puede describirse como el movimiento entre dos cuerpos rígidos, un módulo interno y un módulo externo (43).

El módulo interno presenta los contactos intersubunidad del hexámero y se compone de tres segmentos: 1) un motivo hélice-asa-hélice (residuos 207-233) (que mantienen unido al hexámero alrededor del eje tres, 2) una asa que estabiliza los contactos intermonoméricos cercana al eje de simetría dos (residuos 244-253) y 3) un giro unido por puentes de hidrógeno a la estructura anterior (residuos 137-143). El resto de la estructura forma parte del módulo externo, con la excepción del asa conformada por los residuos 144-154 y aquellos residuos altamente desordenados en el conformero T (con factores B mayores a 50 Å²) (ver figura 3).

En la transición alostérica, el módulo interno rota 5.6° alrededor de un solo eje para cada subunidad, mientras que el módulo externo rota 13°. Se ha denominado núcleo del hexámero a los seis módulos internos. El asa conformada por los residuos 136-158 es el motivo que comunica de forma más directa al sitio activo y al sitio alostérico, que al igual que la base de la tapa del sitio activo (residuos 158-162 y 183-187) presenta un cambio conformacional independiente del módulo interno o externo (43). La mayor diferencia entre los conformeros T y R se presenta en el sitio activo, que tiene una conformación más abierta en el conformero T(43).

También existen cargas positivas que se repelen en el sitio activo, se trata de los residuos que unen al grupo fosfato del sustrato: Lys208 y Arg172. La unión del fosfato del sustrato transforma la repulsión en atracción desencadenando la transición de T a R desde el sitio activo (43).

El carácter rígido del módulo externo es esencial para generar la misma conformación del estado R cuando la transición alostérica es desencadenada desde el sitio activo o desde el sitio alostérico(43).

Otros residuos importantes de la GlcN6P desaminasa.

Recientemente, se ha caracterizado el papel de algunos residuos de la GlcN6P desaminasa mediante mutaciones sitio específicas, por ejemplo los residuos Tyr121 y Tyr254. Mutaciones en la posición 121 alteran la afinidad de la enzima por el activador alostérico, incrementando la K_{dis} y produciendo modificaciones complejas. En estas mutantes la unión de GlcNAc6P es bifásica, es decir las mutantes se comportan asimétricamente frente al activador alostérico, donde la mitad de los sitios alostéricos muestran una afinidad casi normal para la GlcNAc6P mientras que la otra mitad muestra una afinidad por lo menos un orden de magnitud menor. Este comportamiento puede describirse como una activación alostérica de la mitad de los sitios. En cuanto a la transición homotrópica en estas mutantes, no se encontraron grandes alteraciones. En conclusión, la mutación del residuo Tyr121 interfiere con el cambio conformacional local generado por la unión de la GlcNAc6P, durante la transición alostérica. Mas aún, la presencia de un grupo aromático en esta posición es estructuralmente necesaria para mantener la estabilidad de la enzima durante la transición alostérica (26).

El estudio de las mutantes Tyr254-Phe y Tyr254-Trp han demostrado el papel de la tirosina 254 en los contactos intersubunidad del sitio alostérico y en el mecanismo de la transición alostérica. Se ha propuesto que este residuo funciona como un interruptor de dos posiciones ya que a través de su grupo hidroxilo mantiene contactos alternativos con residuos de la subunidad vecina que varían con la transición alostérica. El contacto en T es con el CO de la cadena principal del residuo Pro149 y forma parte de las interacciones que ayudan a mantener el estado T. Durante el rearrreglo de la estructura cuaternaria que acompaña la transición alostérica, el interruptor se mueve a su segunda posición, eliminándose con ello una de las interacciones que estabilizan al conformero T. En esta nueva posición la Tyr254 interacciona con el carbonilo de la cadena principal del residuo Thr161. El residuo Thr161 forma parte del motivo que constituye la tapa del sitio activo, conectándose así el sitio catalítico con el alostérico. De esta forma, el cambio del interruptor a su segunda posición en el conformero R contribuye a fijar la tapa sobre el sitio catalítico (28)

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudio de los residuos del sitio alostérico que unen el grupo fosfato de la GlcNAc6P en la Glucosamina 6 fosfato desaminasa de *Escherichia coli*.

Objetivos particulares

Construcción de enzimas modificadas específicamente en el grupo amino N-terminal, por transaminación de la Metionina 1 y su posterior reducción.

Construcción de mutantes sitio específicas de los residuos Arginina 158 y Lisina 160.

Análisis multidisciplinario, cinético y fisico-químico, de las mutantes sitio específicas y de las enzimas modificadas por métodos químicos para determinar la función de cada uno de estos residuos durante la transición alostérica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los residuos de unión del sitio alostérico que han sido estudiados en este trabajo comprenden el grupo amino N-terminal (Met1), la Arg158 y la Lys160. La conformación correcta de estos residuos para unir el grupo fosfato de la GlcNAc6P la encontramos en el conformero R. En el sitio alostérico, que se ubica entre dos subunidades, el grupo amino N-terminal forma el único contacto de una subunidad con el grupo fosfato de la GlcNAc6P (Met1 a la izquierda en la figura 6). Mientras que los contactos que unen al activador alostérico de la subunidad vecina comprenden las cadenas laterales de los residuos Ser151, Arg158 y Lys160 (residuos a la derecha en la figura 6).

Los resultados y la metodología se presentan en dos artículos. El primero, presenta el trabajo realizado en el grupo amino N-terminal. El segundo, presenta los resultados sobre las mutantes sitio específicas de los residuos Arg158 y Lys160.

El primer artículo se titula: “On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6 phosphate Deaminase from *Escherichia coli*”. En este artículo se estudio el grupo amino N-terminal por modificación química. Se utilizó una reacción no enzimática de transaminación específica para el grupo amino terminal (51) con la que convertimos el grupo N-terminal de la Met1 en un grupo 2-oxo-4-(metiltio)butirilo (figura 2, artículo 1). El producto de esta reacción la llamamos enzima transaminada. La enzima transaminada fue modificada químicamente en condiciones de aminación reductiva (para reconstituir el grupo amino N-terminal “enzima reaminada”). La enzima transaminada también fue sometida a una reacción de reducción con borohidruro transformando el grupo 2-oxo en 2-hidroxi; el producto de esta reacción la llamamos enzima transaminada-reducida (52).

La enzima transaminada pierde afinidad por el activador alostérico presentando una constante de disociación por este ligando diez veces mayor que el valor de la enzima silvestre. A diferencia de la enzima silvestre que presenta un patrón de activación de tipo K , la enzima transaminada sigue un patrón de activación de tipo mixto $K-V$ (figura 3 artículo 1). A concentraciones saturantes del activador esta enzima es siete veces menos activa que

la enzima silvestre (Tabla 1 artículo 1). La enzima transaminada-reducida recupera las propiedades de la enzima silvestre. El patrón de activación alostérica en esta enzima es al igual que la enzima silvestre de tipo *K* (figura 4 artículo 1). La afinidad por el activador alostérico y la constante catalítica también se recuperan. Sin embargo, esta enzima es menos cooperativa en comparación con la enzima silvestre (Tabla 1 artículo 1). La enzima transaminada, la enzima transaminada-reducida, la enzima reaminada y la enzima silvestre se utilizaron para analizar la dependencia de la cooperatividad frente al pH (en un rango de pH de 6-9). La enzima silvestre muestra un máximo de cooperatividad a pH 8 y un mínimo a pH 6. La enzima reaminada se comporta igual que la enzima silvestre solo que no alcanza el mismo valor de h_{\max} . La enzima transaminada no es cooperativa en el rango estudiado. La enzima transaminada-reducida presenta un valor de h_{\max} superior a 2 en el rango estudiado (figura 5 artículo 1). Estos experimentos muestran que el grupo amino N-terminal está involucrado en la dependencia de la cooperatividad con respecto al pH. Dos experimentos adicionales fueron realizados para comprobar que las reacciones de modificación empleadas en este trabajo no provocaban cambios en la estructura cuaternaria de la enzima. Uno de ellos fue la reconstitución del grupo amino N-terminal (enzima reaminada). Esta enzima recupera las características de la enzima silvestre. El otro fue el uso de la cromatografía de replegamiento (Tabla 1 artículo 1) (53).

El segundo artículo es un manuscrito en preparación y lleva por título: “A site-directed-mutant of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase that functionally locks the enzyme in the allosteric *R*-state”. En este manuscrito se estudia por mutagénesis dirigida la función de los residuos Arg158 y Lys160. Se construyeron diferentes mutantes en estas posiciones Lys160-Ala, Lys160-Glu, Arg158-Ala y Arg158-Leu.

Las curvas de velocidad inicial contra la concentración de sustrato para las cuatro mutantes son hiperbólicas y no se observa ningún efecto en presencia de concentraciones saturantes del activador alostérico (figura 1A artículo 2). El valor de K_m para las mutantes es próximo al valor encontrado en la enzima silvestre. Sin embargo, se observa una disminución en la constante catalítica por lo menos de 30 veces (Tabla 1 artículo 2). Estas enzimas se comportan cinéticamente como bloqueadas en el conformero R. Se realizaron

experimentos de unión del activador por dicroísmo circular en el UV cercano para explorar la capacidad de estas mutantes para unir al activador alostérico. A concentraciones tan altas como 25-50 mM se encontró que la GlcNAc6P produce inhibición competitiva en las mutantes (figura 1B artículo 2). Sin embargo, la curva de fracción de saturación frente a la concentración del inhibidor competitivo GlcN-ol-6P muestra cooperatividad. Este último experimento comprueba que las mutantes aún presentan transición alostérica. Otra evidencia de que estas enzimas (por lo menos Lys160-Glu) presentan ambos conformeros R y T se obtuvo con los experimentos de cristalización de la mutante Lys160-Glu. Se resolvió la estructura cristalográfica de ambos conformeros R y T para la mutante Lys160-Glu. La presencia de un comportamiento cinético bloqueado en el conformero R y la existencia de ambos conformeros R y T puede explicarse de dos formas. Las mutantes alteran el equilibrio alostérico T/R (disminución drástica del valor de L) o alteran la afinidad diferencial por el sustrato cíclico (aumento del parámetro c del ajuste al modelo MCW).

JMB



**On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric
Function of Glucosamine-6-phosphate Deaminase
from *Escherichia coli***

Samuel Lara-González, Henry B. F. Dixon, Guillermo Mendoza-
Hernández, Myriam M. Altamirano and Mario L. Calcagno

On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6-phosphate Deaminase from *Escherichia coli*

Samuel Lara-González¹, Henry B. F. Dixon², Guillermo Mendoza-Hernández¹, Myriam M. Altamirano^{3*} and Mario L. Calcagno^{1*}

¹Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional
Autónoma de México, P.O. Box
70-159, Mexico City, D.F.
04510, Mexico

²Department of Biochemistry
University of Cambridge
Tennis Court Road, Cambridge
CB2 1QW, UK

³Centre for Protein
Engineering, Medical Research
Council, Hills Road
Cambridge, CB2 2QH, UK

Glucosamine-6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6) from *Escherichia coli* is an allosteric enzyme of the K-type, activated by N-acetylglucosamine 6-phosphate. It is a homohexamer and has six allosteric sites located in clefts between the subunits. The amino acid side-chains in the allosteric site involved in phosphate binding are Arg158, Lys160 and Ser151 from one subunit and the N-terminal amino group from the facing polypeptide chain. To study the functional role of the terminal amino group, we utilized a specific non-enzymic transamination reaction, and we further reduced the product with borohydride, to obtain the corresponding enzyme with a terminal hydroxy group. Several experimental controls were performed to assess the procedure, including reconditioning of the enzyme samples by refolding chromatography. Allosteric activation by N-acetylglucosamine 6-phosphate became of the K-V mixed type in the transaminated protein. Its kinetic study suggests that the allosteric equilibrium for this modified enzyme is displaced to the R state, with the consequent loss of co-operativity. The deaminase with a terminal hydroxy acid, obtained by reducing the transaminated enzyme, showed significant recovery of the catalytic activity and its allosteric activation pattern became similar to that found for the unmodified enzyme. It had lost, however, the pH-dependence of homotropic co-operativity shown by the unmodified deaminase in the pH range 6–8. These results show that the terminal amino group plays a part in the co-operativity of the enzyme and, more importantly, indicate that the loss of this co-operativity at low pH is due to the hydronation of this amino group.

© 2000 Academic Press

Keywords: N-terminal transamination; allosteric transition; allosteric-site chromatography; terminal hydroxy acid; refolding chromatography

*Corresponding authors

Permanent address: M. M. Altamirano, Instituto de Fisiología Celular, UNAM P.O. Box 70-242, México City, 04510, Mexico.

Abbreviations used: GlcN6P, glucosamine 6-phosphate; GlcNAc6P, N-acetylglucosamine 6-phosphate; GlcN-ol-6P, 2-deoxy-2-aminogluco-6-phosphate; Fru6P, fructose 6-phosphate.

† Formerly classed as EC 5.3.1.10, but the Nomenclature Committee of the IUBMB have published a proposal to class it as EC 3.5.99.6.

E-mail addresses of the corresponding authors: mma@mcrc-lmb.cam.ac.uk; calcagno@bq.unam.mx

Introduction

Glucosamine-6-phosphate deaminase, (2-amino-2-deoxy-D-glucose-6-phosphate aminohydrolase (ketol isomerizing) EC 3.5.99.6)† from *Escherichia coli*, catalyses the conversion of glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) into fructose 6-phosphate (Fru6P) and ammonia. It is an allosteric enzyme, activated by N-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) (Comb & Roseman, 1958; Midelfort & Rose, 1977; Calcagno *et al.*, 1984). The allosteric properties of this enzyme have been satisfactorily described by the symmetry allosteric model (MWC model, Monod *et al.*, 1965), as previously shown (Calcagno *et al.*, 1984; Altamirano *et al.*, 1995). The

enzyme behaves as a typical *K*-system, in which the allosteric activator exclusively binds to the R form. On the other hand, GlcN6P and Fru6P, substrates for the direct and reverse reaction respectively, are allosteric non-exclusive binding ligands, with greater affinity for the conformational state defined as R. The allosteric activation of this enzyme is a consequence of the change in the apparent affinity of the protein for its sugar-phosphate substrates (Altamirano *et al.*, 1995). The structure of this enzyme in its allosteric states R and T has been obtained from crystallographic data at 2.1 Å and 2.3 Å resolution, respectively (Oliva *et al.*, 1995, and PDB entries 1dea, 1hor, 1hot; Horjales *et al.*, 1999, and PDB entry 1cd5). The enzyme is a hexamer of identical subunits, arranged as a dimer of trimers with an internal 32 symmetry. Active sites appear as crevices in each subunit and allosteric sites are located in clefts between adjacent subunits around the 3-fold axis of the molecule. The structure of several complexes with active and allosteric sites occupied by ligands was solved and both sites were unequivocally identified as being in the R conformational state. Figure 1(a) shows the relevant structural details of the allosteric site, with a bound molecule of the allosteric activator, GlcNAc6P. Important intersubunit contacts in the allosteric site (enzyme in the R-state) are established through the phospho group of the bound ligand. This appears linked to the N-terminal amino group of one subunit, that shown on the left of Figure 1(a), and to the side-chains of Ser151, Arg158 and Lys160, in addition to the main-chain nitrogen atom of residue 152, of the other chain.

The chain shown on the left in Figure 1, besides being bonded to the phospho group of the ligand, contributes to the allosteric site with an essential contact residue, Tyr254. This is not directly involved in GlcNAc6P binding but it forms an interchain bond through its hydroxy group. This intersubunit bond plays a role in the functional coupling of active and allosteric sites, switching its contacts with the facing subunit, alternating between two different positions in the allosteric transition (Montero-Morán *et al.*, 1998; Horjales *et al.*, 1999). The structural model of the enzyme in its T state (PDB entry 1cd5) shows that the N-terminal amino group is hydrogen-bonded to the main-chain carbonyl group of Ala150 in the facing subunit (Figure 1(b)). This inter-subunit contact disappears in the transition from T to R. This particular arrangement of the phosphate-binding residues in the allosteric cleft suggests that the terminal amino group may also have a role in the propagation of conformational changes to the whole molecule. The allosteric site also binds inorganic phosphate, although its K_d is three orders of magnitude higher than the K_d for GlcNAc6P; in consequence, it behaves as a low-affinity allosteric activator, stabilizing the R allosteric state of the enzyme. The forces driving the T → R transition are primarily associated with binding of the phosphate group, so

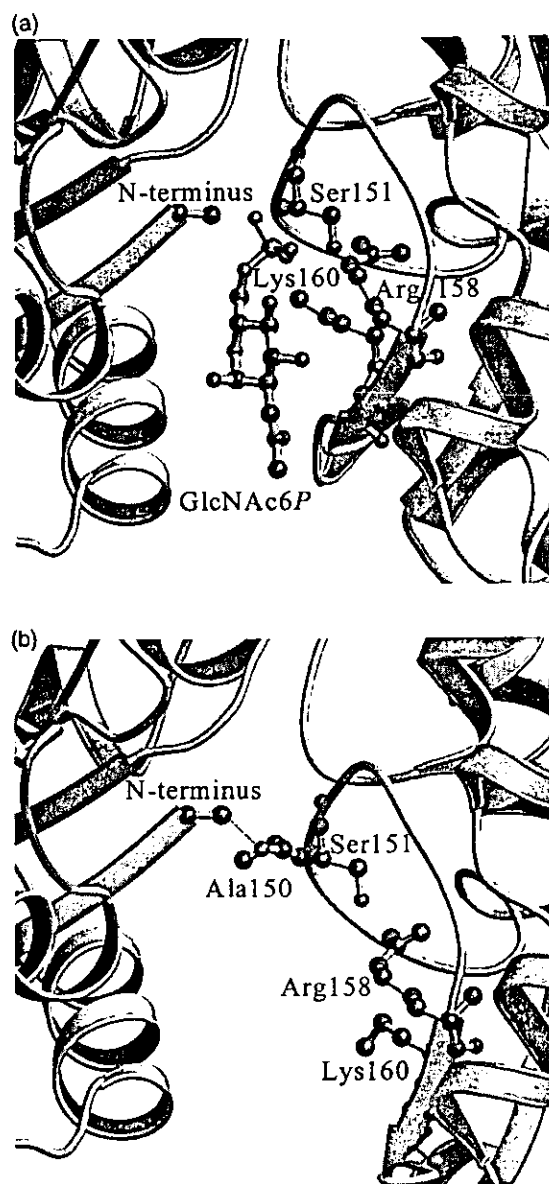


Figure 1. The allosteric site of *E. coli* GlcN6P deaminase, from crystallographic data. (a) A molecule of GlcNAc6P appears bound to the site and the residues involved in binding of its phospho group are represented. These are Arg158, Lys160 and Ser151 from one of the polypeptide chain appearing at the right side and the N-terminal amino group of the facing subunit, at the left. The allosteric conformation of the enzyme corresponds to the R state (PDB 1hot, Oliva *et al.*, 1995). (b) The intersubunit cleft of the in the GlcN6P deaminase when the enzyme is in the T state (PDB 1cd5, Horjales *et al.*, 1999). The allosteric site is not functional and the phospho-binding groups appear far apart. In this allosteric conformation, the N-terminal amino group is hydrogen-bonded to CO group from Ala150 of the facing polypeptide chain.

the study of its interactions can give information on the transition. In the cleft where the allosteric effector binds, there is a cluster of positive charges that probably makes the R conformation unstable when the allosteric site is empty; this could be one of the triggering mechanisms for the propagation of the quaternary conformational change (Horjales *et al.*, 1999). It is therefore interesting to know if the terminal amino group is hydronated (protonated) in the physiological pH range, thus significantly contributing to the accumulation of positive charges in the allosteric site of the enzyme in the R state. Site-directed mutagenesis cannot be used to study the functional role of the terminal amino group, so chemical modification seems the best approach. We therefore removed the N-terminal group by transamination, thus avoiding the structural disruption of removing the entire residue. This non-enzymic reaction with glyoxylate specifically converts the terminal residue into a 2-oxoacyl group (Dixon & Fields, 1972; Dixon, 1984) and provides a method for the selective modification of proteins under non-denaturing and mild conditions. This chemical modification procedure has been used by several authors to demonstrate the functional role of the N-terminal amino group of several enzymes (Brown *et al.*, 1978; Dijkstra *et al.*, 1984; Hammack *et al.*, 1998). Dijkstra *et al.* (1984) transaminated the N terminus of pancreatic phospholipase A₂ and characterized the modified proteins kinetically and by X-ray crystallography, thus providing good evidence for the selectivity of the reaction. More recently, Hammack *et al.* (1998) used this approach to establish the role of the N-terminal amino group in the folding pathway of cytochrome *c*. These authors obtained the specific and quantitative transamination of an N-terminal threonine, a residue that could also be transformed into the same product by periodate oxidation (Dixon, 1984). In the present work we used this approach to transaminate the terminal methionine of *E. coli* GlcN6P deaminase and we further modified the resulting 2-oxoacyl group by reducing it to the corresponding alcohol (Figure 2). The kinetic study of these chemically modified GlcN6P deaminases reveals that either an amino or a hydroxy group at the terminal position can establish the intersubunit interactions determining the low-affinity properties of the active site in the T form. It demonstrates that the hydronation of the terminal amino group is responsible for the loss of homotropic co-operativity of *E. coli* GlcN6P deaminase at pH values below 7.0.

Results and Discussion

Oligomeric state of the modified GlcN6P deaminases

The native GlcN6P deaminase was chemically transaminated, modifying its N-terminal methionine residue to a 2-oxo-4-(methylthio)butyryl group; this product is called the transaminated enzyme,

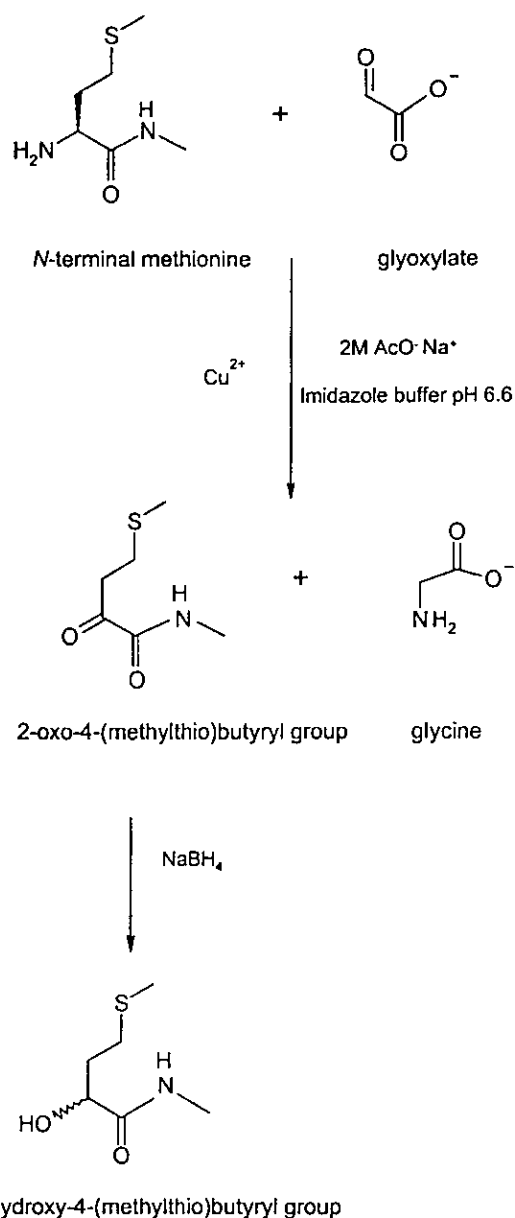


Figure 2. Transamination and reduction of the N-terminal methionine of *E. coli* GlcN6P deaminase. Each of the groups named is shown on N-2 of the Arg2 residue.

below. Borohydride reduction of this gave the corresponding 2-hydroxy derivative; the resulting preparation is called the transaminated-reduced or OH-terminal enzyme. Both modified GlcN6P deaminases are hexameric proteins, as shown by pore-gradient PAGE under native conditions and by gel-filtration (Superdex S-200 column, not shown), thus proving that the intersubunit contacts involving the N-terminal amino group are not critical for the stability of the hexamer.

Assessment of the transamination reaction

The yield of the transamination reaction was calculated by measuring the phenylthiohydantoin derivative of methionine formed after a single cycle of Edman cleavage. The reaction was not stoichiometric, and the yield was calculated on the basis of the amount of phenylthiohydantoin formed from unreacted polypeptide chains. The amount of 2-oxo groups formed by transamination was also determined (see Experimental Procedures). A value of 0.95 reactive carbonyl group per polypeptide chain was found, thus confirming that the chemical modification involved only the terminal amino groups. As an additional verification of the procedure, we submitted a sample of the purified transaminated enzyme to reductive amination to restore the terminal amino group. Reamination was performed by treating the transaminated protein with cyanoborohydride in the presence of ammonia buffer, to obtain reductive amination of the 2-oxoacyl terminal group (Borch *et al.*, 1971). The reaminated enzyme was purified from the reaction mixture by allosteric-site affinity chromatography, using an immobilized allosteric ligand (as described in Experimental Procedures). The reaminated deaminase, which was retained by the affinity gel, was eluted with GlcNAc6P and analysed by a single cycle of Edman cleavage in the sequencing machine. The phenylthiohydantoin obtained was characterized as that from methionine, and corresponded to a yield of 96%. The catalytic constant, the K_m value for GlcN6P and the allosteric activation pattern for this regenerated enzyme were similar to that of the unmodified enzyme. Moreover, its co-operativity is lower (Table 1). This may be because reamination yields both the D and L-enantiomers of the methionine residue, so does not exactly regenerate the unmodified enzyme.

The role of the N-terminal amino group in GlcNAc6P binding

Transamination markedly reduced the affinity of the enzyme for its allosteric activator. This property was exploited to obtain a 96% transaminated enzyme, using allosteric-site affinity chromatography to get rid of the unreacted molecules and even hexamers with any unreacted chain (as shown by Edman analysis). The measurement of GlcNAc6P binding by direct subtractive methods (equilibrium dialysis, ultracentrifugation) is not feasible because of the high K_d value for GlcNAc6P in the transaminated enzyme. This constant can be calculated from titration of the protein with the ligand, as followed by circular dichroism spectrometry at 274 nm (Altamirano *et al.*, 1994). The curve obtained gives the fraction of the enzyme in the R conformation and the data were fit to the corresponding equation, derived from the MWC model. The value found for K_d was $0.33(\pm 0.08)$ mM, which is an order of magnitude

higher than the values found for the unmodified protein (Montero-Morán *et al.*, 1998; Figure 3) and for the transaminated-reduced enzyme. The contribution of the terminal amino group to the free energy of binding phosphate groups at the allosteric site is small and can be estimated as 5.4 kJ mol⁻¹. This suggests that its interaction with the phospho group is an uncharged hydrogen bond.

Kinetics of transaminated GlcN6P deaminase

The transaminated deaminase is active and it is still capable of activation by GlcNAc6P, as shown in Figure 3. In the absence of GlcNAc6P, the enzyme displays homotropic co-operativity, which is lower than that reported for the native enzyme (Figure 3 and Table 1). In contrast with the unmodified enzyme, which behaves as a typical allosteric K-enzyme, k_{cat} values for the transaminated deaminase increase with activator concentration, i.e. the modified enzyme became a mixed K-V allosteric protein. The limit value for k_{cat} at saturating activator concentration is one-seventh the value for the unmodified enzyme. The curve of velocity against substrate concentration obtained in the absence of the activator, fits well to the MWC equation for a mixed K and V allosteric system (Monod *et al.*, 1965). When the fitted values were

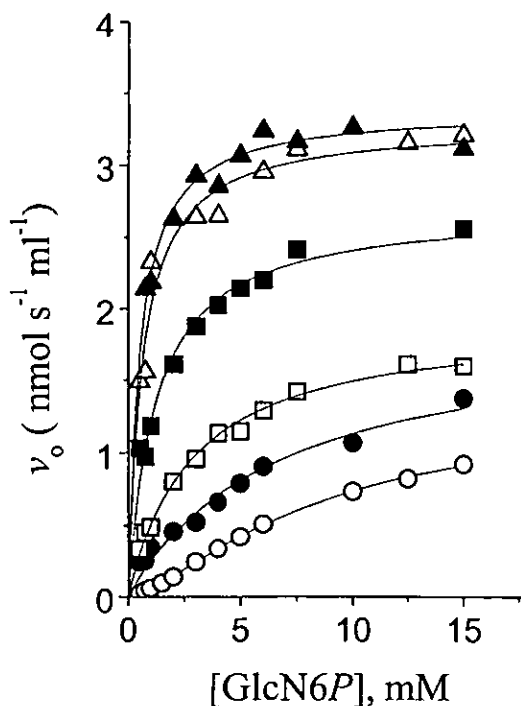


Figure 3. Activation of transaminated GlcN6P deaminase by the allosteric activator, GlcNAc6P. Initial velocities plotted against substrate concentration at the following GlcNAc6P concentrations: (○) 0; (●) 0.1 mM; (□) 0.5 mM; (■) 2.0 mM; (△) 5 mM; (▲) 10 mM. The curves were fit to hyperbolic kinetics except (○), which was fitted to the MWC equation (Monod *et al.*, 1965).

Table 1. Kinetic and binding properties of unmodified and N-terminal modified GlcN6P deaminases

	K_m^a (mM)	k_{cat}^a (s^{-1})	f_{max}^b	L^c	c^c	$K_d^{GlcNAc6P}^d$ (mM)
Unmodified	0.75 ± 0.05	158 ± 8	2.9 ± 0.1	$8.85 \times 10^5 \pm 1.04 \times 10^4$	0.025 ± 0.0002	0.035 ± 0.005
Transaminated	0.5 ± 0.04	23 ± 5	1.3 ± 0.1	3.0 ± 0.5	0.26 ± 0.05	0.33 ± 0.08
Transaminated reduced	0.7 ± 0.08^e	24.8 ± 3.0^e	1.1 ± 0.1^e	$14,400 \pm 1450$	0.05 ± 0.005	0.029 ± 0.009
Reaminated*	1.1 ± 0.1	159 ± 12	2.5 ± 0.2			
	1.3 ± 0.6^e	153 ± 6^e	2.3 ± 0.2^e			
	1.0 ± 0.08	105 ± 2	2.5 ± 0.2	$3.98 \times 10^4 \pm 0.52 \times 10^4$	0.04 ± 0.01	Not determined

Data given by Calcagno *et al.* (1984) correspond to the GlcN6P deaminase prepared from the chromosomal copy of a different *E. coli* strain (*E. coli* B, ATCC11303) and are somewhat different from the values obtained for the cloned, overproduced enzyme studied here.

^a Determined in the presence of a saturating concentration of GlcNAc6P. Data were fit to hyperbolic kinetics.

^b Data were fit to the Hill equation.

^c Data were fit to the MWC equation (Monod *et al.*, 1965). L is the MWC allosteric constant, the ratio $[T \text{ form}]/[R \text{ form}]$ when ligands are absent; c is a measure of the lower substrate affinity of the T state in comparison with the R state (K_m^R/K_m^T). For data fitting, other parameters were fixed (n , number of sites = 6) or determined from the fit to the hyperbola in independent experiments performed at saturating GlcNAc6P concentration (K_m^R , k_{cat}).

^d From CD titration data.

^e From a sample submitted to a cycle of unfolding in 8 M urea and renaturation by refolding chromatography.

compared with the reported MWC parameters for the unmodified enzyme, it appears that the loss of homotropic co-operativity of the transaminated enzyme was due to a drastic decrease of the allosteric constant L , which became five orders of magnitude smaller, and to an increase in the non-exclusive binding constant c , which becomes one order of magnitude higher (Table 1). The transaminated enzyme behaves as its allosteric equilibrium favoured the R state. A change in the differential affinity of the allosteric conformers for GlcN6P (the K_m^R/K_m^T ratio) is apparent as an increase of the MWC c parameter. These changes that accompany the suppression of the N-terminal amino group suggest that its inter-subunit contacts could play a significant role in stabilising the quaternary structure of the enzyme in its T state.

In order to determine if the chemical treatment produced misfolded and functionally altered states of the enzyme, a sample of transaminated deaminase was denatured in 8 M urea and renatured by refolding chromatography. This powerful refolding technique was initially tested with *E. coli* GlcN6P deaminase, which can be refolded with 100% yield from urea-denatured samples (Altamirano *et al.*, 1997, 1999). As shown in Table 1, the unfolding-refolding cycle did not produce significant kinetic changes, so the existence of unspecific effects altering the native state of the modified enzymes can be ruled out.

Kinetics and binding properties of the transaminated-reduced GlcN6P deaminase

Reduction of the terminal carbonyl group of the transaminated deaminase restores most of its kinetic and allosteric properties; the reduced enzyme closely resembles the unmodified protein, and it did not change after a cycle of denaturation and minichaperone-assisted refolding. (Table 1). The enzyme with a hydroxy group in place of the terminal amino group displays the same allosteric activation pattern as the unmodified enzyme, behaving as a pure K -system (Table 1 and Figure 4). The affinity of the allosteric site for GlcNAc6P is the same as for the unmodified enzyme, within experimental error. The OH-terminal deaminase, however, is less co-operative towards GlcN6P than the unmodified enzyme, as shown by the lower h_{max} values and the change of MWC parameters (Table 1). Although the restoration by reduction of the allosteric control of the transaminated enzyme does not quantitatively reproduce the allosteric kinetics of the unmodified enzyme, comparison of data presented in Table 1 strongly suggests that the intersubunit interactions of the N-terminal amino group, i.e. its contact with the activator phospho group in the R state and the neighbouring polypeptide chain in the T conformer, can also be made by the uncharged hydroxy group. Hence the interactions of the terminal amino group may involve its unhydrated form. The reaminated enzyme obtained from the trans-

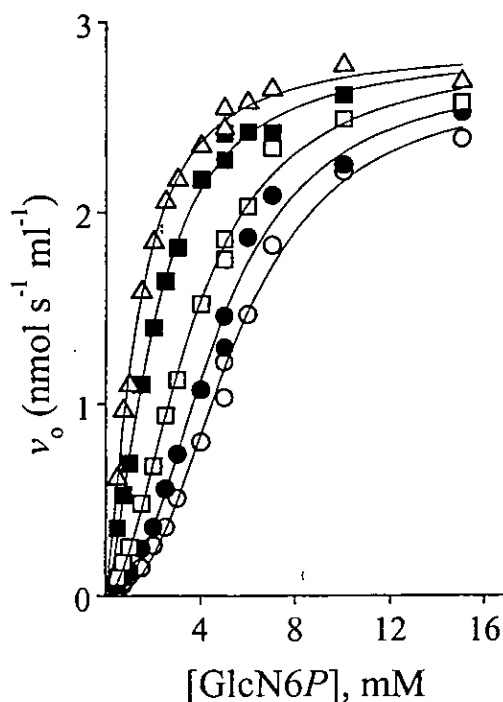


Figure 4. Curves of initial velocity against substrate concentration obtained with transaminated enzyme that was further modified by reduction with borohydride. Data were obtained in the absence of the allosteric activator GlcNAc6P (○), or in its presence in the concentrations: (●) 0.010 mM; (□) 0.025 mM; (■) 0.050 mM; (△) 0.100 mM. The parameters obtained are shown in Table 1.

aminated deaminase by reductive amination as an additional assessment of the techniques used, is also as active and co-operative as the OH-terminal form (Table 1).

Are cross-links formed? Possible side-reactions

The 2-oxoacyl terminal group contains a highly reactive carbonyl group and this might form a ketimine with a nearby lysine 6-amino group in the protein. This reaction, which is reversible, would produce internal cross-linkages in each polypeptide chain between neighbouring subunits. The equilibrium could be modified by ligand binding, shifting it towards hydrolysis of the bond, so the observed allosteric V -type activation pattern and the low k_{cat} of the transaminated isomerase might be a consequence of this side-reaction.

Analysis of the structural model of the T allosteric form of *E. coli* GlcN6P deaminase shows that the closest lysine 6-amino group in the neighbouring subunit is that of Lys160, and it appears at a distance of 10.2 Å from the C-2 of Met1. This is a phosphate-binding residue of the allosteric site, which moves away from the N terminus in the $T \rightarrow R$ transition (Horjales *et al.*, 1999). If this amino group

were involved in ketimine formation, the transaminated enzyme should form stable inter-chain cross-links upon reduction with cyanoborohydride (Borch *et al.*, 1971). Transaminated enzyme was reduced using cyanoborohydride under the same conditions described for the aminative reduction, but omitting the ammonia buffer. This new transaminated-reduced preparation migrates in SDS-PAGE as a single band with the same mobility as the isomerase subunit, so no inter-chain links appear to have been present.

Intrachain bridges are also unlikely in view of the distances to the nearest amino groups. The only lysine residue within 17 Å of the terminal nitrogen atom, i.e. the expected position of the oxygen atom of the reactive carbonyl group, is Lys234, whose 6-amino group is 11.7 Å away and interacts with water molecules. Hence, if we exclude drastic folding alterations, imine formation appears impossible.

Effect of pH on homotropic co-operativity in the native and modified deaminases

Figure 5 shows the effect of pH on the homotropic co-operativity of unmodified and N-terminal transaminated GlcN6P deaminases, as evaluated from their h_{max} values. The unmodified enzyme displays its maximal homotropic co-operativity in the pH range 7.7-8.0 at 30°C. The curve of h_{max} against pH resembles a titration curve with a pK_a of 6.8. Co-operativity decreases at low pH and the enzyme exhibits hyperbolic kinetics at pH 6.0, as shown in Figure 5. At this pH, the apparent K_m value for GlcN6P was 10 mM and it did not change in the presence of 5 mM allosteric activator. The transaminated enzyme is essentially non-co-operative over the pH range 6-9. On the other hand, the transaminated-reduced preparation, which partially recovered the allosteric properties lost by transamination, displays homotropic co-operativity, but it is essentially constant over the pH range explored (Figure 5). This finding strongly points to the terminal $-NH_2$ as the group whose hydration is the responsible for the loss of the homotropic co-operativity of the unmodified enzyme at low pH.

Figure 5 shows the h_{max} for the reaminated enzyme as a function of pH in the range 6.0-7.7. Reamination did not produce an enzyme identical with the unmodified protein; its main difference consists in the lower homotropic co-operativity of the N-terminal reconstructed enzyme, which is the same as found for the OH-terminal deaminase (Figure 5 and Table 1). This discrepancy could be related to the scrambled chirality at C-2 of the N-terminal residues as previously discussed.

Refolding with immobilized minichaperone did not change significantly the kinetic properties of any of the chemically modified proteins prepared for this research. Refolding could have increased the folding homogeneity of the molecular population in our assays, excluding denaturation as a consequence of chemical handling of the enzyme.

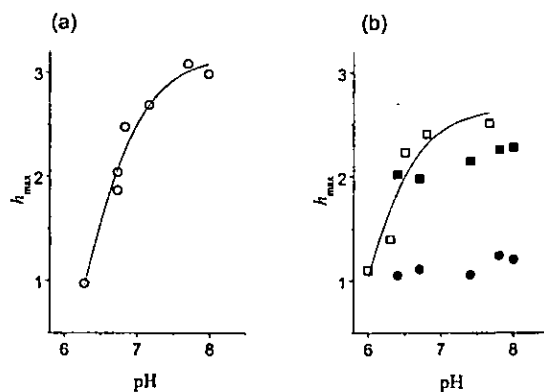


Figure 5. Change of the homotropic co-operativity of GlcN6P with pH for (a) the unmodified GlcN6P deaminase and (b) for the deaminases that were chemically modified at the N-terminal amino group. Maximal Hill coefficients (h_{max}) are shown as a function of pH. (O) Unmodified protein; (●) transaminated enzyme; (■) transaminated-reduced enzyme (OH-terminal); (□) reaminated enzyme, i.e. enzyme reconstituted by reductive amination of the transaminated protein.

The good agreement between data from refolded and untreated samples proves that the chemical procedures described here are gentle enough to be useful as research tools.

The unmodified enzyme at pH 6.0 behaves as if it exists mainly in the R state or in a state close to it. If the loss of co-operativity at low pH was due to the displacement of the allosteric equilibrium towards the T state, i.e. if protons displace the $R \rightarrow T$ equilibrium as an allosteric inhibitor would, an increase of homotropic co-operativity would be expected. The opposite effect was found, and the enzyme looks more acidic in its R state. Our results suggest that this change in the enzyme pI that occurs associated with the allosteric transition, is caused by the hydration of the N-terminal amino group. This is an unexpected result, because the addition of a positive charge to an empty allosteric site must make it quite unstable and would favour the conformation that increases the distance between these charges. The structural basis of this property of *E. coli* GlcN6P deaminase and its functional significance *in vivo* deserve further examination. The knowledge of the R conformer structure without any ligand in the allosteric site will be of value for understanding the stabilization of the R state of the enzyme at low pH values.

Experimental Procedures

Reagents

Most chemicals and biochemicals were from Sigma-Aldrich S.A. de C.V, Mexico. The affinity gel used for GlcN6P deaminase purification, *N*-(6-aminohexanoyl)-glucosamine-6-*P* agarose, was prepared by immobilising GlcN6P in ECH-Sepharose (Pharmacia), as described (Calcagno *et al.*, 1984). *N*-Acetylglucosamine 6-*P* and

2-deoxy-2-aminoglucitol 6-phosphate (GlcN-ol-6P), were synthesized and purified as described (Altamirano *et al.*, 1995).

Agarose-immobilized minichaperone (refolding gel) for refolding chromatography, was prepared and used as described (Altamirano *et al.*, 1997).

Enzyme purification methods

GlcN6P deaminase was purified from an overproducing strain, using allosteric-site affinity chromatography as described (Montero-Morán *et al.*, 1998). The same chromatographic gel was also used to get rid of the unreacted or partially reacted enzyme molecules after the transamination reaction and to purify the enzyme whose allosteric properties were restored by reduction (see below). The purity of the preparations was verified by SDS-PAGE. The N-terminal modified enzymes were purified as described below. The enzyme concentration was calculated using the molar absorption coefficient of $20.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 278 nm for the unmodified enzyme (Altamirano *et al.*, 1994). Concentration data always refer to the hexameric protein.

Enzyme assays

GlcN6P deaminase was assayed in the direction of Fru6P formation by the colorimetric measurement of fructose at fixed times as described (Calcagno *et al.*, 1984). The progress of the reaction was always kept below 5% conversion of the initial substrate. Measurements were made at pH 8.0, 30 °C, in 50 mM Tris-HCl buffer, except in the experiments in which pH was varied. In this case, 50 mM, 25 mM Tris and 25 mM ethanolamine was the buffer used. This buffer minimizes the change of ionic strength with pH (Ellis & Morrison, 1982). Kinetic data were analysed by non-linear regression using the program Origin 4.1 (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA).

Measurement of the dissociation constants

The dissociation constant of GlcNAc6P was determined by near-UV CD difference spectroscopy in an Aviv CD spectrometer model 62DS, using 0.5 cm light-path cells and a protein sample dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) and 30 °C. Details of the procedure were as described (Altamirano *et al.*, 1994).

Chemical transamination of the N-terminal methionine residue

Unmodified GlcN6P deaminase was specifically transaminated at the N-terminal residue using glyoxylate in the presence of Cu^{2+} as a catalyst according to the procedure of Dixon & Fields (1972) (Figure 2). The pure enzyme (0.5 mg ml^{-1}) was incubated with 0.1 M sodium glyoxylate in a solution of 2.5 M sodium acetate and 5 mM CuSO_4 . The reaction mixture also contained a saturating concentration (0.2 mM) of the dead-end inhibitor GlcN-ol-6P, in order to shift the allosteric equilibrium to the R conformation and stabilize the enzyme. (We found that the addition of this ligand improved the reaction yield nearly tenfold.) The pH of the solution was finally adjusted to 6.5 using acetic acid and the mixture was left at 20 °C for 72 hours. The yield of the reaction was calculated by Edman cleavage of the polypeptide chains that remained unreacted. Analyses were

performed in an automatic sequencing machine (Beckman-Porton Protein Sequencer, model LF 3000). The best transamination yields, close to 60%, were obtained using the conditions described here. The yields were lower at higher temperature (30 °C) or when Ni^{2+} substituted for Cu^{2+} and the acetate buffer was 2.0 M, pH 6.8. The treated protein was thoroughly dialysed against a buffer containing 40 mM Tris-HCl (pH 7.7) and 5 mM triethylenetetramine dihydrochloride, i.e. trientine (Dixon, 1986), a powerful copper chelator, and subsequently chromatographed on a column of *N*-(6-aminohexanoyl)glucosamine-6P-agarose. The modified enzyme, which had lost its affinity for the immobilized ligand, emerged in the void volume and separated from the unmodified or partially modified hexamers. In a typical preparation, 35% of the protein treated was recovered in the excluded peak. The enzyme in this fraction has been shown to be 93% transaminated. The amount of carbonyl groups formed by transamination was determined by reacting the modified protein with 2,4-dinitrophenylhydrazine (described as the second Method by Dixon & Fields, 1972). The absorbance of the corresponding hydrazone was determined at 540 nm in 0.2 M NaOH to produce a red shift of the absorption maximum, using an ϵ value of $16.9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sibley & Lehninger, 1949).

Reamination of the transaminated enzyme

The transaminated protein (2.8 μM) was dissolved in 1.5 M ammonium bicarbonate solution (pH 8.5) and treated at room temperature for two hours with 0.1 M sodium cyanoborohydride. The reaction mixture was then dialysed against Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.7, 20 °C), and loaded onto a column of *N*-(6-aminohexanoyl)glucosamine-6P-agarose. The retained fraction was eluted from the column with 10 mM GlcNAc6P (pH 7.7), concentrated and stored as described above.

Preparation of the GlcN6P deaminase with a terminal hydroxy group

A second modified enzyme was prepared by treating the transaminated enzyme with borohydride, to introduce a terminal hydroxy group (Figure 2). A 1.2 μM solution of transaminated protein in 50 mM potassium borate buffer pH 9.5, was treated with several additions of NaBH_4 , to reach a nominal concentration of nearly 40 mM. After one hour, the pH of the preparation was adjusted to 7.7 with 1 M Tris-HCl and then dialysed against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7. These are well-known conditions for the reduction of carbonyl groups to the corresponding alcohol, in this case to transform the 2-oxoacyl group into a 2-hydroxyacyl group. The reduced enzyme, which upon this procedure recovered the affinity for the allosteric activator, was purified by affinity chromatography, as described above. Only the highly retained fraction (nearly 10% of the eluted protein) was used for the following experiments, to be sure that we got rid of the mixed protein hexamers, with intermediate degrees of transamination-reduction. This was verified by Edman analysis, which gave no detectable amount of the methionine derivative. The hydroxy-terminal enzyme (transaminated and reduced with borohydride) is expected to contain a 2-hydroxy-4-(methylthio)butyryl group replacing the N-terminal methionine residue, because the formation of a 2-hydroxyacyl group by reduction of the terminal 2-oxoacyl group is the only plausible reaction under the stated conditions. Transaminated and transa-

minated-reduced enzymes were concentrated by ultrafiltration and stored in 50% glycerol at -20°C .

Reconditioning with Immobilized minichaperone

The samples of modified enzymes to be reconditioned were treated at room temperature in 8 M urea containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.7) and 2 mM EDTA. After 30 minutes, the sample was diluted 100 times in the same Tris-EDTA buffer (final concentration 0.47 μM , 0.09 mg/ml) and refolded following the originally described protocol (Altamirano *et al.*, 1997), except that the residence time of the sample in the refolding resin was reduced to 15 minutes. The renatured proteins were then concentrated by ultrafiltration under pressure.

Acknowledgments

M.L.C. and S.L.G. are grateful for the valuable technical assistance of Laura I. Alvarez, and many helpful discussions with Juan-Pablo Pardo, Eduardo Horjales and Rosario Muñoz-Clares (UNAM, Mexico). This research received support from the programs PAPIIT-DGAPA (IN-220896) and PAEP from the Universidad Nacional Autónoma de México and from CONACYT, Mexico (grant 25258-N). M.L.C. acknowledges the National Council for Science and Technology (CONACYT), Mexico, and The Royal Society, UK, for support for a stay in the Department of Biochemistry of the University of Cambridge, UK, as a guest of H.B.F.D. A graduate student fellowship from CONACYT to S.L.G. is also acknowledged.

References

- Altamirano, M. M., Hernández-Arana, A., Tello-Solís, S. & Calcagno, M. L. (1994). Spectrochemical evidences for the presence of a tyrosyl residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **220**, 409-413.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E. & Calcagno, M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr121. *Biochemistry*, **34**, 6074-6082.
- Altamirano, M. M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A. & Fersht, A. R. (1997). Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 3576-3578.
- Altamirano, M. M., Garcia, C., Possani, L. D. & Fersht, A. R. (1999). Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotechnol.* **17**, 187-191.
- Borch, R. F., Bernstein, M. D. & Durst, H. D. (1971). The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2897-2904.
- Brown, L. R., De Marco, A., Richarz, R., Wagner, G. & Wuthrich, K. (1978). The influence of a single salt bridge on static and dynamic features of the globular solution conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor. ^1H and ^{13}C nuclear-magnetic-resonance studies of the native and the transaminated inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **88**, 87-95.
- Calcagno, M. L., Campos, P. J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine 6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **787**, 165-173.
- Comb, D. G. & Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* **232**, 807-827.
- Dijkstra, B. W., Kalk, K. H., Drenth, J., de Haas, G. H., Egmond, M. R. & Slotboom, A. J. (1984). Role of the N terminus in the interaction of pancreatic phospholipase A_2 with aggregated substrates. Properties and crystal structure of transaminated phospholipase A_2 . *Biochemistry*, **23**, 2759-2766.
- Dixon, H. B. F. (1984). N-terminal modification of proteins. A review. *J. Protein Chem.* **3**, 99-108.
- Dixon, H. B. F. (1986). The chemistry of trientine. In *Orphan Diseases and Orphan Drugs* (Scheinberg, I. H. & Walshe, J. M., eds), pp. 23-32, Manchester University Press, Manchester, UK.
- Dixon, H. B. F. & Fields, R. (1972). Specific modification of NH_2 -terminal residues by transamination. *Methods Enzymol.* **25**, 409-419.
- Ellis, K. J. & Morrison, J. F. (1982). Buffers of constant ionic-strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87**, 405-426.
- Hammack, B., Godbole, S. & Bowler, B. E. (1998). Cytochrome *c* folding traps are not due solely to histidine-heme ligation: direct demonstration of a role for N-terminal amino group-heme ligation. *J. Mol. Biol.* **275**, 719-724.
- Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt, R. C. & Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamine 6-phosphate deaminase: the structure of the T-state at 2.3 Å-resolution. *Structure*, **7**, 527-537.
- Midelfort, C. & Rose, I. A. (1977). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate isomerase. *Biochemistry*, **16**, 1590-1596.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
- Montero-Morán, G. M., Horjales, E., Calcagno, M. L. & Altamirano, M. M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic, homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*, **37**, 7844-7849.
- Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. & Horjales, E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure*, **3**, 1323-1332.
- Sibley, J. A. & Lehninger, A. L. (1949). Determination of aldolase in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **177**, 859-865.

Edited by A. Fersht

(Received 10 December 1999; received in revised form 30 May 2000; accepted 9 June 2000)

ARTICULO EN PREPARACION.

A site-directed-mutant of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase that functionally locks the enzyme in the allosteric *R*-state

Lara-González Samuel[‡], Enrique Rudiño-Piñera[§], Eduardo Horjales[§] and Mario L. Calcagno[‡].

[‡]Laboratorio de Fisicoquímica y Diseño de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), P.O. Box 70-159, Ciudad Universitaria, Mexico City, D.F., 04510, Mexico and [§]Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), P.O. Box 510-3, Cuernavaca, MOR, 62271, Mexico.

RUNNING TITLE:

INTRODUCTION

Glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6P deaminase, E.C. 5.3.1.10), from *Escherichia coli* is an allosteric enzyme catalysing the regulated step in the pathway of *N*-acetylglucosamine utilisation. This step consists in the isomerisation and deamination of glucosamine 6-phosphate (GlcN6P), giving fructose-6-phosphate (Fru6P) and ammonia (1). Its physiological activator is *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P), a metabolite that increases its concentration in the cells when they are cultured in the presence of GlcNAc (2). Allosteric activation follows exclusive-binding kinetics; this is consistent with the structural evidence that the allosteric site exists only in the R allosteric conformer, which is the one displaying high affinity for the substrate. The allosteric properties of this enzyme have been adequately described by the symmetry allosteric model (MWC model) (3, 4). Deaminase is a *perfect K system*, that is, the allosteric transition causes an increase in the enzyme affinity for substrate without a discernible change in the catalytic constant. The enzyme is an hexamer of identical subunits, arranged as a dimer of trimers with internal 32 symmetry and has six allosteric sites located in the clefts between adjacent subunits. Both neighbouring subunits contribute to the structure of the GlcNAc6P binding site, which binds the activator. Phosphate ion can also bind to the allosteric site, stabilising the R conformation, but its K_d is three orders of magnitude higher than the corresponding value for GlcNAc6P. The same interactions are involved in binding of the free phosphate ion or the phospho group of GlcNAc6P, but the latter is also bound through its sugar moiety, by additional contacts in the allosteric site. The amino acid residues involved in phosphate binding are the charged groups Arg158 and Lys160. the O γ from Ser151 and the main-chain nitrogen from residue 152. All these contacts belongs to one of the facing subunits, the one contributing to allosteric-site structure with the base of the active-site lid (5). The facing subunit contributes to GlcNAc6P binding in the allosteric site through the terminal amino group. This interaction, an uncharged hydrogen bond, has been shown to be responsible for the pH-dependence

of homotropic co-operativity and it is also essential in the proper coupling of allosteric transition (6). The phospho group in GlcNAc6P molecule builds around it all the needed interactions for allosteric function. Indeed, the comparison of the 3D models of GlcN6P deaminase complexed with inorganic phosphate or GlcNAc6P, overlaps within a rmsd of 0.122 Å (5). The allosteric-site residues that bind allosteric phosphate group through ionic interactions, Lys160 and Arg158, are also part of the base of the active-site lid. This motif encompasses the segment 158-187 (β -strand 158-161; rigid connection 161-164, α -helix, 164-174; β -turn 174-184 and β -strand 184-187). This motif has been shown to be a key motif that functionally links the active and allosteric sites. Moreover, Lys160, which is part of the allosteric site in the R state of the enzyme, appears salt-linked to Glu148, an active-site residue, when the enzyme is in the T allosteric state (5, 7). These set of evidences, point Lys160 and Arg158 as two key residues in the allosteric function of *E. coli* GlcN6P deaminase. In the present research we explored its functional role by means of a crystallographic and kinetic study of some site-directed mutants involving these two residues.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Biochemicals. Most chemicals were from Sigma-Aldrich S.A. de C.V., Mexico. GlcNAc6P was prepared by acetylation of GlcN6P and purified by ion-exchange chromatography as described (8). The affinity gel, *N*-6-aminohexanoyl glucosamine-6-*P* agarose was prepared as described (9). GlcNAc6P and 2-amino-2-deoxy D-glucitol 6-*P* (GlcN-ol-6P), were synthesised and purified as described (8). The same procedure was used to prepare ³H-labeled GlcN-ol-6P. In this case, ³H sodium borohydride (Amersham) with a specific activity of 326 GBq mmol⁻¹ was used to reduce GlcNAc6P. The obtained [1-³H]-GlcN-ol-6P was purified by ionic-exchange chromatography as described (8). The final product had a specific activity of 1.21 GBq mmol⁻¹

Site-directed mutagenesis. Specific mutations were constructed by the mutagenic oligonucleotide method of Kunkel as previously described (10). The *nagB* gene cloned in the phagemid vector pTZ18R downstream to the *lac* promoter, pTZ18R(*nagB*), were used as the starting material (8). The mutants enzymes constructed were, at residue 160 Lys (AAA) to Glu (GAA) and at residue 158 Arg (CGT) to Leu (CTT). Other mutants, Lys 160 to Ala (GCG) and Arg158 to Ala (GCG), were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis, using Stratagene QuickChange® reagents as described by the manufacturer, to mutate the *nagB* gene inserted in the vector pTZ18R.

Phagemids carrying the mutations were verified by sequencing of the entire gene. These vectors were used to transform *E. coli* cells from the strain IBPC590R which are Δ *nag* and Δ *lacI* and expresses the deaminase constitutively (11).

Enzyme purification. Mutant forms of the enzyme at the allosteric site lost most of its affinity for the immobilised allosteric-site ligand and they could not be purified by allosteric-site affinity chromatography as previously described (12). These mutant forms of the enzyme were purified by anion exchange chromatography. The ammonium sulphate fraction (40-55 % saturation) obtained as described (4), was dialysed against 40 mM Tris-acetate buffer (pH 8.5) and applied to 16/10 a Mono-Q column (Amersham-Pharmacia) equilibrated with the same buffer. The enzymes were eluted with a linear concentration gradient of potassium acetate (0 - 0.4 M) prepared in 40 mM Tris-acetate buffer (pH 8.5). Both mutant deaminases eluted at nearly 0.2 M salt concentration. The fractions containing each enzyme were re-chromatographed on the same column and under the same conditions. The purity of the enzymes was verified by SDS-PAGE. The integrity of the hexamer was demonstrated by analytical molecular exclusion chromatography in a Superdex-200 FPLC column (Amersham-Pharmacia) using 50 mM Tris-HCl buffer containing 150 mM potassium acetate (pH

7.5)

Enzyme assays. GlcN6P deaminase was assayed in the direction of Fru6P formation, as previously reported (12). The progress of the reaction was always kept below 5% conversion of the initial substrate. Measurements were made at pH 8.0, at 30 °C in 50 mM Tris-HCl buffer. Kinetic data were fitted by non-linear regression analysis using the program Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA).

Sulfhydryl group analysis. Sulfhydryl groups were determined spectrophotometrically with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as described (13). The enzyme at final concentration of 0.25 mg mL⁻¹ was added into a mix of 0.1 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA buffer (pH 7.7) and a 1000-fold molar excess of DTNB. The stoichiometry of the reaction and the corresponding second-order rate-constant for the reaction were calculated, and the effect of saturation with GlcN-ol-6P on the reaction rate was established.

CD titration of the enzyme with GlcNAc6P and GlcN-ol-6P

The binding curve for GlcNAc6P was obtained by near-UV CD spectrometry in an Aviv CD 62DS spectropolarimeter using 0.5-cm light-path cells. Protein samples (3.5-4 μM) were dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7. Details of the procedure were described elsewhere (14, 15).

Direct binding measurements

The dissociation constants for the allosteric activator was obtained by direct measurement of the amount of ³H-labelled ligand bound to the protein which was separated by ultracentrifugation as described (9).

Crystallisation and structure determination of Lys160-Glu enzyme in its T and R conformational states

Crystallisation of the Lys160-Glu mutant enzyme in its T or R state, was obtained by the hanging-drop technique. Crystals grown at 18 °C in 0.95 M sodium tartrate, 100 mM HEPES and 0.6 mM GlcN-ol-6P (pH 7.0) had the typical appearance of R-state crystals, while those showing T-form morphology grew at 4 °C in 2.28 M sodium acetate and 100 mM HEPES buffer (pH 7.0). In both cases the cryoprotectant solution contained the same salts and at the same concentrations as the reservoir solution but dissolved in 40% sucrose. X-ray diffraction data were collected on SSRL Beam Line 7-1, using a wavelength of 1.08 Å at 113 K. Data were also obtained using a 18 cm image plate detector with a crystal-detector distance of 140 mm. Frames were collected over an oscillation range of 1.5 deg. Both data sets were collected at 1.94 Å. These data were processed and integrated with DENZO/XDISP (16) and scaled with programs from the CCP4 suite (17), giving a $R_{\text{sym}} = 0.083$ for the R mutant form, applying the R32 space group. The R_{sym} in the highest resolution limit (2.30 to 2.36 Å) is 0.362 with a completeness of 0.792. The conformer in the T state presented a $R_{\text{sym}} = 0.085$ in a P6322 space group; the R_{sym} in the range between 2.10 - 2.16 Å is 0.315 with a completeness of 0.961.

Both structures were determined using the wild-type T and R conformers (18) (5) as models for the molecular replacement method with XPLOR (19). The initial solutions were subjected to a rigid body minimisation followed by a simulated annealing, starting at 3000 K and cooling in 25 K steps up to a final temperature of 300 K. Before a visual correction of the model using a $2fo-fc$ map, a new annealing plus the addition of GlcN-ol-6P to the R-form structure, were run. It produced a significant error reduction for this conformer. Finally, search and addition of water molecules in the model was performed (for details see figure 2).

C α superimpositions were performed with the program O (Jones *et al.*, 1991). A preliminary super-

imposition (LSQ-EXP) was initially carried out and later improved (LSQ-IMP) by excluding in each cycle the atoms whose calculated root-mean-square deviation (RMSD) gave distances to its partner greater than 0.50 Å.

RESULTS

GlcN6P deaminase with replacements at Lys160 and Arg158 positions, behave as allosterically locked in the R state

The mutant forms of GlcN6P deaminase obtained by the replacements of residues Lys160 and Arg158 lost their affinity for the allosteric activator and did not display homotropic co-operativity. The corresponding velocity versus substrate curves were hyperbolic, even when saturating concentrations of the allosteric activator were present (Figure 1A). In all cases, hyperbolic curves were obtained; the absence of co-operativity was verified over a wide range of substrate concentration by using the very sensitive plot described by Acerenza and Mizraji (20). Figure 1(C). The K_m value for Lys160-Ala is similar to the value reported for the wild-type enzyme; for the other mutant forms described here, somewhat higher K_m values were found. This is the expected behaviour for deaminase mutants locked in the R allosteric state. The four mutant forms described here displayed k_{cat} values lower than those reported for the wild-type enzyme (Table 1). The replacements at position 160 produced enzymes 30 times less active, while with replacements at position 158 produced enzymes with k_{cat} values one order of magnitude lower than the wild-type GlcN6P deaminase.

GlcNAc6P binding to the mutant GlcN6P deaminases

The allosteric activator had no effect on the activity of these mutant enzymes and none of them was bound to the allosteric-site affinity-gel that is the basis of the standard purification method for

GlcN6P deaminase (4). GlcNAc6P binding to Lys160-Glu and Arg158-Leu mutant deaminases was explored over a wide concentration range by near-UV CD titration. Spectral changes were detected only at high activator concentration (25-50 mM). Under these conditions, the activator produces competitive inhibition (Lys160-Glu $K_i = 25.3 \pm 2.5$ mM; Arg158-Leu, $K_i = 11.01 \pm 1.6$ mM). It is most probable that the CD change measured comes from the induced fit in the active site that binds the allosteric activator (Figure 1B and Table 1). This low affinity of the mutant enzymes for GlcNAc6P precludes the use of direct binding measurements. Conversely, the affinity for GlcN-ol-6P is high, and binding of the 3H-labelled ligand was measured by ultracentrifugation. The curve of fractional saturation for GlcN-ol-6P versus the concentration of this ligand was obtained for the Lys160-Glu mutant deaminase. It displays positive co-operativity (Hill coefficient, 1.6 ± 0.2); its $[\text{GlcN-ol-6P}]_{0.5}$ was 9.7 μM which is four times higher than the value of the wild type enzyme.

Structure of the Lys160-Glu mutant deaminase

The structural models of the Lys160-Glu confirmed that crystals with either R or T morphology were actually in these conformational states. The mutant in the T state shows both active and allosteric sites free of ligands; the general structure of the model is similar to that of the wild type T form (rmsd of 0.173 Å, 239 residues were included, with the exception of residues 80; 161-183 and 264-266). Indeed, with exception of the point mutation Lys160-Glu, the mutant in the T state looks as a typical wild-type T-state deaminase (Figure 3). On the other hand, the R form of Lys160-Glu GlcN6P deaminase presents its allosteric site unfilled, while the active-site is occupied by the GlcN-ol-6P, which shows the same conformation that appears in the corresponding complex of the wild type GlcN6P deaminase (Figure 3). This is the first solved structure of this enzyme in which the R state presents an empty allosteric site. The whole structure is essentially identical to the wild-type deaminase in the R state, except the mutated residue (rmsd of 0.231 Å, 260 residues were included

with the exception of residues 261-266), Table 3.

DISCUSSION

Mutant deaminases at positions 158 and 160 behaves R-locked enzymes

The four mutant forms of GlcN6P deaminase involving the positions 158 and 160, present hyperbolic kinetics, even in the absence of the allosteric activator and has K_m^{GlcN6P} values that are close to that for the wild-type enzyme (Table 1). Since these mutant enzymes present the expected kinetics for the enzyme in the R state, it is not surprising the lack of kinetic changes upon GlcNAc6P addition. Moreover, CD titration with this ligand demonstrated that it is not bound to the allosteric site. The small binding detected at very high activator concentrations correlates with competitive inhibitory effect, thus indicating that GlcNAc6P is bound to the catalytic site under these conditions.

The four mutants behave as if they were locked in the R state or in a conformation close to it. However, they are less active and their k_{cat} values are considerably lower than those for the wild-type deaminase. The mutant form Lys160-Glu present a specificity constant (k_{cat}/K_m) nearly 50 times lower than the corresponding value for the wild-type enzyme (Table 1). The replacement Arg158-Leu is less active, its specificity constant is 1/500 of the wild-type value. These changes are mainly due to the lower k_{cat} values for the mutants, while the corresponding K_m values for GlcN6P are equal (Lys160-Ala, Arg158-Ala) or somewhat higher (Lys160-Glu, Arg158-Leu) than the K_m^{GlcN6P} for the wild-type deaminase. These results are consistent with a rapid-equilibrium random mechanism for the mutant enzymes, for which K_m^{GlcN6P} values are true dissociation constants. This also suggests that the active-site distortion produced by these mutations affects structures mainly involved in catalysis. Arg158, the residue whose replacement produces the greatest k_{cat} change, is located between the C-terminal side of the loop 136-157 that contains catalytic residues (7), and the N-terminal end of the short β -strand (158-162) which is part of the base of the active-site lid. Accordingly to this analysis,

we found that the mutation at the position 160, which is more distant to the catalytic loop, produced the smallest change in k_{cat} .

Lys160-Glu appear as R-locked in kinetic experiments but it crystallises in the T state

Ligand-free Lys160-Glu deaminase crystallises as the T conformer although it displays R-type kinetics. The complex of this mutant enzyme with the dead-end inhibitor, GlcN-ol-6P, appears in the R state, even with the empty allosteric site. This particular complex, the one with the active site occupied and the allosteric site empty, does not produce crystals on the wild-type enzyme (E. Horjales, unpublished). This apparently inconsistent result could be a consequence of the drastic change in the allosteric properties of the mutant. A decrease of the T/R ratio (that is, L , the allosteric constant in MWC model) without entirely abolishing the existence of the T state could explain the R-type kinetics of the mutant enzymes and the crystallisation of the ligand free Lys160-Glu enzyme in the T state. Nevertheless, this assumption cannot account for the homotropic co-operativity observed for GlcN-ol-6P binding. It seems more plausible to assume that the mutation abolishes the differential affinity for GlcN6P (that is, K_m^R and K_m^T are nearly equal, and MWC c parameter approaches to 1). In support of this assertion, numerical simulation experiments using the MWC general equation, the allosteric parameter $c = 1$, K_m^{GlcN6P} from this paper and the same L values found for the wild-type enzyme, we obtained a kinetic pattern that is indistinguishable from that for the fully-activated enzyme. The homotropic co-operativity for GlcN-ol-6P binding can be accounted for, assuming that $K_i^R > K_i^T$ for this competitive inhibitor. This implies that the mutation altered the differential affinity for the cyclic hemiacetalic substrate but did not affect so drastically the differential affinity for an open-chain ligand, which is considered a transition-state analogue (7). Similarly to the c parameter, we defined $d = K_i^R / K_i^T$. The numerically simulated and fitted equation was:

$$v_o/V = \frac{L c \alpha (1 + c \alpha + d\theta)^5 + \alpha (1 + \alpha + \theta)^5}{L (1 + c\alpha + d\theta)^6 + (1 + \alpha + \theta)^6}$$

The other parameters have the usual meaning in MWC equations, L is MWC (3) allosteric constant, $\alpha = [\text{GlcN6P}]/K_R$ (assuming that $K_R = K_m$) and c is the ratio K_R/K_T .

One of the most conspicuous tertiary-changes in the T→R transition of the wild-type enzyme, is the displacement of the side chain of Glu148 towards the active site, thus breaking the salt linkage between the carboxylate of this group and the ϵ -ammonio group of Lys160 (5, 7). This displacement reduces the positive charges in the allosteric site, thus stabilising the T state of the enzyme which is the dominant species in the absence of ligands. In this study we found that the kinetic behaviour of Lys160-Glu and Lys160-Ala deaminases are identical, in spite of the fact that the former mutation replaces a positive charge by a negative one in the allosteric site. This result discards that the possible formation of a salt bridge between the neighbouring subunits in the allosteric site (Glu160 with the N-terminal ammonio group or Arg2 from the facing subunit) could be the cause of the R-locked behaviour of the mutant enzymes.

ACKNOWLEDGEMEN

We wish to thank to the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL) for data collection time. This work is based upon research conducted at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), which is funded by the Department of Energy (BES, BER) and the National Institutes of Health (NCRR, NIGMS). We wish to thank Sonia P. Rojas-Trejo for assistance during the mutant Lys160-Glu crystallization. This study has been supported by DGAPA-UNAM (Grant IN201295). Enrique Rudiño-Piñera and Samuel Lara-González are awarded with CONACyT Ph.D. fellowship.

Table 1: kinetics constants for the wild-type enzyme and mutants of the allosteric site.

	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	$K_i^{GlcNAc6P}$ (mM)
Wild-type ^a	155 ± 7	0.75 ± 0.05	n.d.
Lys160-Glu	2.2 ± 0.04	1.4 ± 0.1	25.3 ± 2.5
Lys160-Ala	5.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	n.d.
Arg158-Leu	0.8 ± 0.02	1 ± 0.1	11.01 ± 1.6
Arg158-Ala	0.6 ± 0.02	3.4 ± 0.3	n.d.

^a Data for the wild-type were taken from Lara-González et al. (6).

Table 2. Mutant and wild-type reacting sulfhydryl groups with DTNB in the absence or presence of GlcN-ol-6P.

	Thiols in the absence of GlcN-ol-6P ^a	Thiols en the presence of GlcN-ol-6P ^a
Wild-type	1.8 ± 0.05	0.2 ± 0.03
Lys160-Glu	1.7 ± 0.07	0.5 ± 0.03
Lys160-Ala	0.9 ± 0.03	0.7 ± 0.03
Arg158-Leu	2.3 ± 0.05	2.1 ± 0.03
Arg158-Ala	0.6 ± 0.03	0.5 ± 0.03

^a Data are average from at least four determinations.

Table 3. Crystallographic study of Lys160-Glu GlcN6P deaminase. Data collection and refinement statistics ^a

Conformer	T	R
Monomers in the asymmetric unit	1	2
Active-site ligand.	Free	GlcN-ol-6P
Allosteric-site ligand	Free	Free
Other ligands found in the AU.	None	None
Cryo-collecting / X-ray source /Wavelength	Yes SSRL 7-1/1.08Å	Yes/SSRL 7-1/1.08Å
Cryoprotectant	Sucrose 35%	Sucrose 35%
Space Group	P6 ₃ 22	R32
Cell parameters a = b, c (Å)	127.11,140.03	124.78,221.83
a = b, γ	90°, 120°	90°, 120°
Resolution	50-2.20 Å	50-2.30 Å
Highest resolution bin	(2.20-2.29Å)	(2.30-2.41Å)
<i>R</i> _{sym} all data (highest resolution bin)	0.085 (0.267)	0.083(0.220)
Completeness (highest resolution bin)	93.4%(96.4%)	79.2%(88.0%)
Multiplicity (all data)	3,2	2,5
I/s(I) (highest resolution range)	8.0 (3.2)	7.4 (2.0)
Number of reflections	36911	22639
Rigid body minimisation	<i>R</i> = 0.314	<i>R</i> = 0.316
Annealing (T _i = 3000 K)	<i>R</i> = 0.268 <i>R</i> _{free} = 0.287	<i>R</i> = 0.276 <i>R</i> _{free} = 0.306
Ligand search or manual corrections	<i>R</i> = 0.219 <i>R</i> _{free} = 0.233	<i>R</i> = 0.249 <i>R</i> _{free} = 0.279
Water molecules search	<i>R</i> = 0.218 <i>R</i> _{free} = 0.233	<i>R</i> = 0.216 <i>R</i> _{free} = 0.270
Water molecules (in A.U.)	185	422
Relation # of reflections /parameters	3,36	1,22

^aThe test data set for R_{free} calculations was randomly selected to contain 10% of the whole data set. The rigid body minimisations were performed directly using as starting model the R and T structures previously reported by our group (PDB codes 1hot and 1cd5). At each step of the refinement procedure, manual adjustments were performed using both $2fo-fc$ and $fo-fc$ electron-density maps.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1.

Effects of the allosteric activator on the activity of mutant Lys160-Glu. (A) Initial velocities were plotted versus substrate concentration at different GlcNAc6P concentrations: (▲) none; (▼) 2 mM. Assays were performed at enzyme concentration of 20 nM in 200 μ l of 50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 7.7) at 30 °C, as described elsewhere (12). (B) Double reciprocal plot of kinetic data at different [GlcNAc6P]: (▲) none; (●) 25 mM; (○) 50 mM, the plot shows the competitive inhibition of enzyme Lys160-Glu by GlcNAc6P. (C) A sensitive method to detect cooperativity was used to analysed data from (A) in the absence of GlcNAc6P; the plot of the global dissociation quotient is shown (20).

Figure 2

Average isotropic B-factors for main-chain atoms of the T and R allosteric conformers of *E. coli* GlcN6P deaminase, plotted for the full sequence of a single monomer.

A: B-factors for the T allosteric conformer of the enzyme. *Thick continuous line:* data for the Lys160-Glu mutant form of the enzyme at 2.20 Å-resolution. *Dashed line:* wild type factors at 2.20 Å-resolution (PDB code 1fs6). **B.** B-factors for the R allosteric conformer. *Thick continuous line:* data for the Lys160-Glu mutant form of the enzyme with active-site occupied by GlcN-ol-6P and the allosteric site free. Resolution: 2.30 Å. *Thin continuous line:* data for the wild type enzyme in the R state with both active and allosteric sites occupied. Resolution: 2.15 Å (PDB code 1fqo). *Dashed line:* data corresponding to the wild type enzyme in the R-form with only the allosteric site occupied. Resolution: 2.20 Å (PDB code 1frz).

Figure 3

Comparison of the structure of the wild-type and Lys160-Glu mutant form of GlcN6P deaminase in either allosteric conformational state, by means of the superimposition of the C α trace. **A:** enzyme in the T state. The wild-type enzyme is represented in blue (PDB code 1fs6) , and the Lys160-Glu mutant in red. **B:** GlcN6P deaminase in the R state. The blue trace corresponds to the wild-type enzyme with both sites (catalytic and allosteric) occupied by ligands (PDB code 1fqo). The orange trace represents the wild-type enzyme with only the allosteric site occupied by its ligand (PDB code 1frz). The Lys160-Glu mutant form appears in red. This structure presents the active-site occupied by the dead-end inhibitor, GlcN-ol-6P.

The RMSD value for the superimpositions of the enzymes in the T-form shown in panel A, was 0.173 Å (residues 80, 161-183 and 264-266 were excluded from the calculation). For the superimposition of both wild-type structures shown in panel B and the Lys160-Glu mutant enzyme, gave a RMSD of 0.231Å (excluding residues 261-266) and 0.231Å (excluding residues 260-266) respectively.

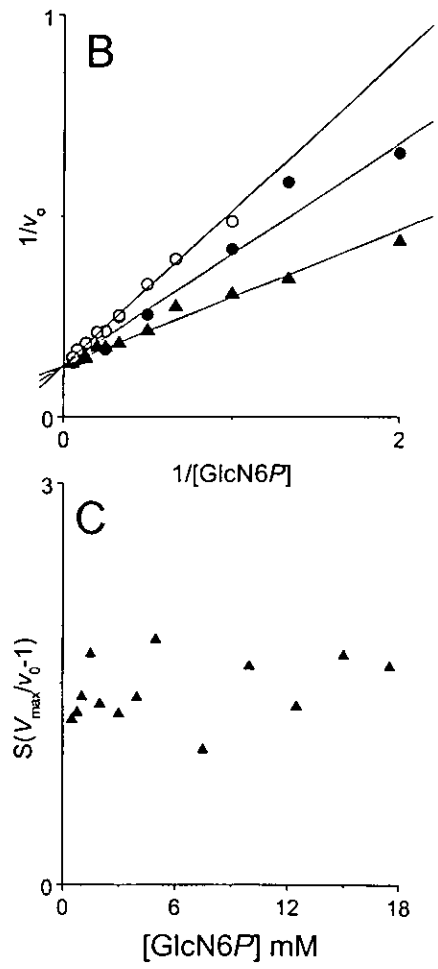
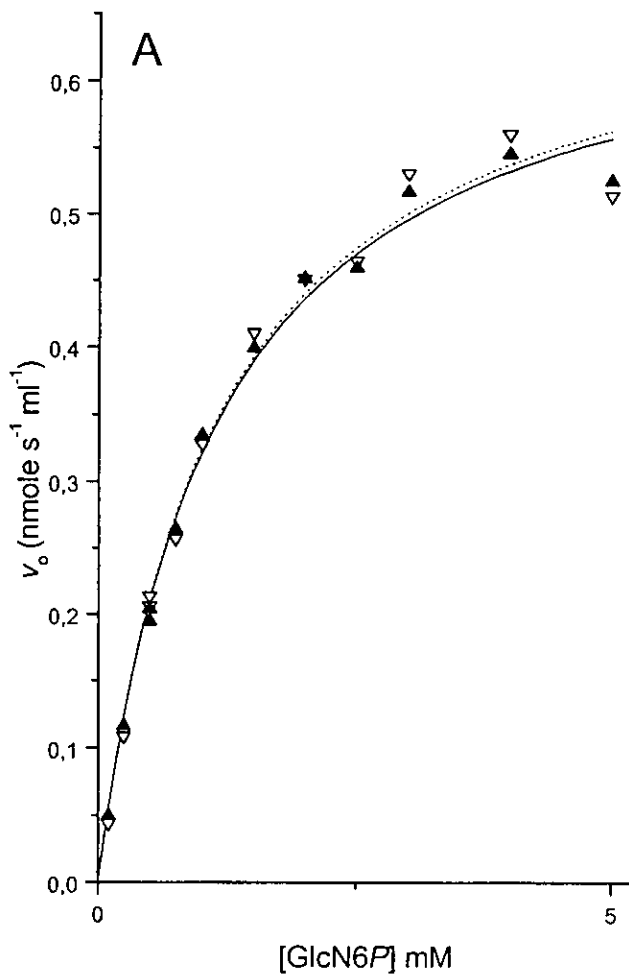


Figure 1

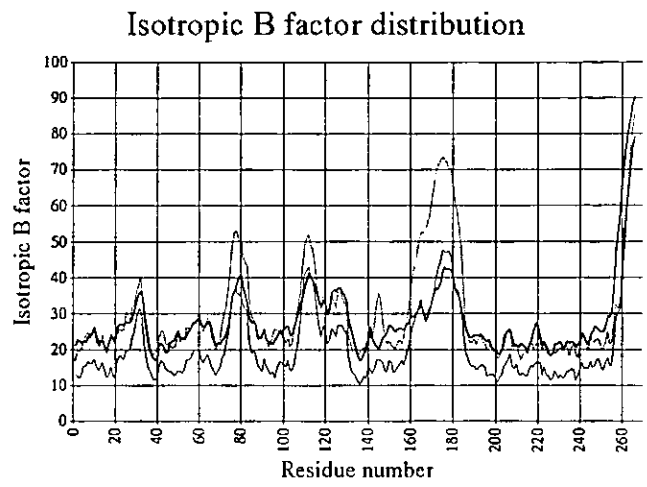
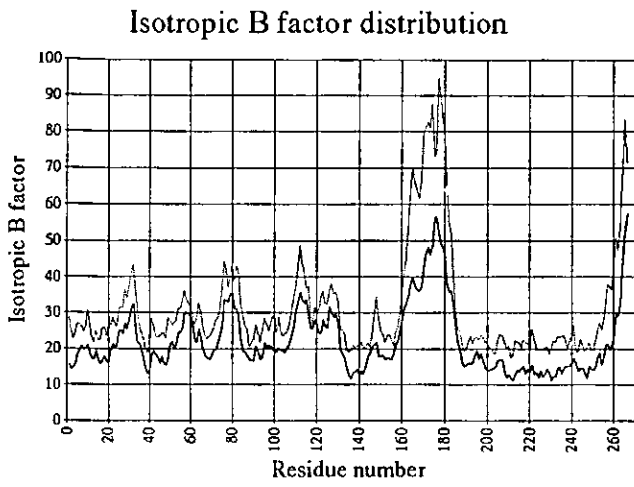


Figure 2



Figure 3

REFERENCES

1. Comb, D. G., and Roseman, S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 807-827.
2. Plumbridge, J. A. (1990) *Journal of Bacteriology* 172, 2728-35.
3. Monod, J., and Wyman, J. C., J. P. (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.
4. Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G., and Suástegui, J. (1984) *Biochimica Et Biophysica Acta* 787, 165-73.
5. Oliva, G., Fontes, M. R., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., and Horjales, E. (1995) *Structure* 3, 1323-32.
6. Lara-Gonzalez, S., Dixon, H. B., Mendoza-Hernandez, G., Altamirano, M. M., and Calcagno, M. L. (2000) *Journal of Molecular Biology* 301, 219-27.
7. Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J. A., and Calcagno, M. L. (2001) *Biochemistry* 40, 10187-10196.
8. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E., and Calcagno, M. L. (1995) *Biochemistry* 34, 6074-82.
9. Montero-Morán, G. M., Horjales, E., Calcagno, M. L., and Altamirano, M. M. (1998) *Biochemistry* 37, 7844-9.
10. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*, 2nd ed. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
11. Plumbridge, J. A., Cochet, O., Souza, J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., and Badet, B. (1993) *Journal Of Bacteriology* 175, 4951-6.
12. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Hernández-Arana, A., and Calcagno, M. (1991) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1076, 266-72.
13. Altamirano, M. M., Mulliert, G., and Calcagno, M. (1987) *Archives of Biochemistry & Biophysics* 258, 95-100.

14. Altamirano, M. M., Hernandez-Arana, A., Tello-Solis, S., and Calcagno, M. L. (1994) *European Journal Of Biochemistry* 220, 409-13.
15. Fasman, G. D. (1996) *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York.
16. Otwinowski, Z. (1993) *Proceedings of the CCP§ study weekend Jan. 29-30*, 56-62.
17. Collaborative Computational Project, N. (1994) *Acta Crystallog* 50.
18. Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt, R. C., and Oliva, G. (1999) *Structure Fold Des* 7, 527-37.
19. Brunger, A. T. (1992) *XPLOR: version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR.*, Yale University Press, New Haven and London.
20. Acerenza, L., and Mizraji, E. (1997) *Biochimica et Biophysica Acta* 1339, 155-66.

CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

Al igual que la mayoría de las enzimas alostéricas, el sitio regulador de la GlcN6P desaminasa se localiza en la zona de interfase entre dos subunidades (ver figura 6); por lo que, la unión del efector alostérico es capaz de estabilizar directamente los cambios estructurales cuaternarios a favor del conformero R. El cambio en la estructura cuaternaria asociado a un cambio local en la región de interfase entre dos subunidades parece ser común en las proteínas alostéricas y se ha observado en enzimas como la fosfofructocinasa, la aspartato transcarbamilasa y la glucógeno fosforilasa (54-56).

En la GlcN6P desaminasa al igual que en otras enzimas alostéricas hay residuos cargados positivamente como Lys y Arg que forman parte de los sitios de unión del grupo fosfato tanto del modulador alostérico, como del sustrato. Por ejemplo, en la fosfofructocinasa tres argininas forman parte de los residuos encargados de unir el grupo fosfato del sustrato en el sitio activo, 243, 162 y 252. Mientras que los residuos de Arg 25, 21 y 154, unen el grupo fosfato del inhibidor alostérico. El asa 6-F acopla ambos sitios, catalítico y alostérico, durante la transición entre T y R (55). En la desaminasa los residuos con carga positiva Lys 208 y Arg172 unen el grupo fosfato del sustrato, mientras que en el sitio alostérico los residuos con carga positiva Arg158 y Lys160 y los residuos Ser151, Ser152 y Met1 son los encargados de unir el grupo fosfato del activador alostérico. En esta enzima el asa 144-154 conecta al sitio activo con el alostérico (ver figura 6) (43).

El grupo amino N-terminal.

Anteriormente se había propuesto que el grupo fosfato del activador alostérico se unía por puente salino con el grupo amino N-terminal (44). Los resultados del estudio por modificación química realizados con el grupo amino N-terminal, con las enzimas transaminada y transaminada-reducida, nos permiten concluir que el grupo amino N-terminal participa desprotonado durante la transición alostérica. La interacción por medio de la cual este grupo une al grupo fosfato de la GlcNAc6P es por puente de hidrógeno. Esta conclusión se basa en el hecho de que la enzima con el grupo OH-terminal (transaminada

reducida) se comporta como la enzima silvestre desde el punto de vista cinético (K_m , k_{cat}), de unión de ligandos y patrón de alostérico de activación. El grupo amino N-terminal en la enzima silvestre participa en la estabilización del conformero T. Esto se demuestra por que la enzima transaminada presenta una constante alostérica L disminuida en más de 5 ordenes de magnitud (del ajuste al modelo MCW). Del análisis de la dependencia de la cooperatividad frente al pH realizado con las diferentes enzimas modificadas químicamente junto con la enzima silvestre. Se puede concluir que el grupo amino N-terminal participa desprotonado a pH óptimo de cooperatividad y que la protonación de este grupo es responsable de la pérdida de cooperatividad a pH 6.

Proponemos además que el grupo amino N-terminal funciona como un interruptor de dos posiciones como se ha propuesto con anterioridad para el residuo Tyr254 (28). El interruptor, constituido por el grupo amino N-terminal, interacciona con el residuo Ala150 en el conformero T estabilizándolo. Mientras que, en el conformero R interacciona con el grupo fosfato de la GlcNAc6P participando indirectamente en la fijación de la tapa del sitio activo. La alteración de cualquiera de estos dos interruptores produce enzimas con comportamiento de tipo mixto K/V , que si bien son capaces de unir al activador alostérico y, por tanto, de ser activadas alostéricamente, presentan una activación ineficiente. La función de estos residuos durante la transición alostérica es fundamental en la transmisión de la señal a todo el hexámero.

Los residuos Lys160 y Arg158.

En la enzima silvestre, en el conformero R, los residuos Lys160 y Arg158 unen el grupo fosfato del activador alostérico, mientras que en el estado T ambos interaccionan con el residuo Glu148 (por puente salino con Lys160 y puente de hidrógeno con Arg158) (43). Ambos residuos forman parte de una región con carga positiva en la zona del sitio alostérico como consecuencia de la proximidad de diferentes residuos como Arg2, Arg23, Arg158 y Lys160 entre otros (43). Como se ha demostrado la sustitución de uno de los dos residuos por un residuo sin carga (Ala), apolar (Leu) o con la carga opuesta (Glu) es suficiente para desplazar el equilibrio alostérico en favor del estado R. Las mutantes

generadas en ambos residuos se comportan cinéticamente como bloqueadas en el conformero R, no unen al activador alostérico y presentan transición alostérica. Estos resultados nos permiten señalar la función de estos residuos en la enzima. Ambos residuos con carga positiva y su posición en la estructura cuaternaria son importantes en el proceso de reconocimiento y unión del activador alostérico. Esto se concluye por el hecho de que las mutantes en estas posiciones no unen al activador alostérico y que aún cuando nosotros añadimos una carga positiva adicional en cualquiera de las mutantes (por protonación del grupo amino-terminal) el sitio alostérico no se reconstituye. Además, ambos residuos están estabilizando al conformero T ya que las mutantes presentan el equilibrio alostérico desplazado hacia el conformero R. La estabilización se da por dos tipos de interacciones que se eliminan con las mutaciones. Si analizamos las interacciones que tienen los residuos Lys160 y Arg158 en el conformero T de la enzima silvestre, ambos residuos interactúan con el aminoácido Glu en la posición 148, estabilizando este estado conformacional. Glu148 es un residuo clave del sitio catalítico y su papel y función han sido analizados a detalle (50). La eliminación de cualquiera de las dos cargas del sitio alostérico elimina por tanto una de las interacciones que estabilizan el estado tenso de la enzima, una interacción que afecta la estructura terciaria dentro de cada subunidad. La otra interacción que eliminamos con las mutaciones en las posiciones 158 y 160, tiene efecto a nivel de la estructura cuaternaria de la enzima. Las propiedades electrostáticas en el sitio alostérico son fundamentales en el proceso de desencadenamiento de la transición alostérica de forma concertada de R a T cuando el sitio alostérico está vacío. El cúmulo de cargas positivas en esta región es una de las interacciones que estabilizan o tensan a la enzima en el estado T. Este último punto puede comprobarse por los resultados de este trabajo, ya que las mutantes que se estudiaron tienen el equilibrio desplazado hacia el estado R. Estos resultados enfatizan la importancia de las interacciones que presentan estos residuos en la interfase entre las subunidades manteniendo la estructura del estado T, es decir, en la estabilización del conformero de menor afinidad y de menor catálisis. Este tipo de comportamiento también ha sido observado en otras enzimas, como la hemoglobina y la fosfofructocinasa, donde la pérdida de una de las interacciones iónicas de la zona de contacto entre las subunidades (que estabilizan la estructura cuaternaria) es suficiente para desplazar el equilibrio en favor del estado R (54).

En otras enzimas alostéricas se han hecho intentos por obtener formas permanentemente bloqueadas. Por ejemplo en la fosfofructocinasa, se probaron seis diferentes mutantes sitio específicas de las que sólo dos de ellas presentan comportamiento de enzima bloqueada en el estado T (57). Nuestro trabajo con los residuos del sitio alostérico nos ha permitido construir diferentes enzimas bloqueadas en el estado R, que si bien presentan una disminución en la k_{cat} , la constante de afinidad K_m no es afectada y el activador alostérico no ejerce ningún cambio en la actividad de estas enzimas. Estas mutantes son potencialmente útiles para ser utilizadas en experimentos *in vivo*, así como para estudiar la transición alostérica por construcción de enzimas con estructura cuaternaria híbridas (ver más adelante).

PERSPECTIVAS

Uno de los aportes de este trabajo a nuestro laboratorio es el uso de la cromatografía de replegamiento. Se ha demostrado que el uso de esta técnica permite regenerar una muestra completamente inactiva de GlcN6P desaminasa en enzima activa con todos sus parámetros cinéticos normales (53, 58). En este trabajo se ha usado esta técnica con la finalidad de comprobar que el método de modificación química que se usó es un método suave que no provoca daños al plegamiento de nuestra enzima. En esta ocasión se modificó a la enzima silvestre por transaminación en condiciones no desnaturizantes de acuerdo al método descrito por Dixon y col. (51). En este trabajo se ha demostrado que las mutantes en los residuos 158 y 160 de una de las caras del sitio alostérico se comportan como enzimas siempre activas, esto es, congeladas en el estado R. Además, también se ha demostrado que la pérdida de una carga positiva en el sitio, e incluso la adición de una carga negativa, produce mutantes incapaces de unir al activador alostérico. Uno de los posibles caminos a seguir en el estudio de la transición alostérica en la GlcN6P desaminasa es el uso de estas mutantes en la construcción de enzimas híbridas por combinación de subunidades silvestres y subunidades mutadas.

Existen varios ejemplos del uso de este enfoque. Se puede mencionar la construcción de una proteasa híbrida constituida por el subdominio amino terminal del factor de coagulación Xa y el subdominio carboxilo terminal de la tripsina (59). Un ejemplo más claro y apegado a nuestro trabajo es la construcción de híbridos en la lactato deshidrogenasa (60). En este trabajo se estudió la activación homotrópica desde subunidades con actividad de lactato deshidrogenasa con el uso del oxamato (inhibidor competitivo) a subunidades con actividad de malato deshidrogenasa. Para esta misma enzima se ha estudiado también la activación heterotrópica con proteínas híbridas (61). En este sentido los trabajos realizados hasta el momento, consisten en la construcción de las proteínas híbridas por sobreexpresión de ambas subunidades (silvestre y mutantes) en la misma célula. Posterior a esto deben purificarse las diferentes especies híbridas. Nosotros proponemos un nuevo enfoque, que consiste en mezclar a las enzimas ya purificadas, tanto silvestre como mutantes, desnaturizarlas y replegarlas por cromatografía de

replegamiento, para obtener enzimas híbridas. Este enfoque promete ser mucho más sencillo, dado que contamos con enzimas puras a homogeneidad a concentraciones tan altas como 50 mg ml^{-1} y tenemos montada la técnica de cromatografía de replegamiento. Como primer enfoque sobre el tema, podemos construir híbridos manejando adecuadamente la proporción de enzimas a combinar. Contamos con un conjunto de enzimas mutantes construidas y estudiadas que nos permitirán estudiar efectos heterotrópicos (mutantes en los residuos 160 y 158, producto de este trabajo) y homotrópicos (mutantes que no unen al sustrato y mutantes que no catalizan la reacción). Enzimas híbridas en las que contemos con una proporción 5:1 (silvestre:mutante o viceversa) serán el punto de partida.

REFERENCIAS

1. Cantor, R. C., and Schimmel, R. P. (1980) *Biophysical Chemistry, part I: The Conformation of Biological Macromolecules.*, W. H. Freeman and Company, New York.
2. Drickamer, K. (1991). Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* 67, 1029-32.
3. Fermini, B., and Nathan, R. D. (1991). Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* 260, H735-43.
4. Glick, G. D., Toogood, P. L., Wiley, D. C., Skehel, J. J., and Knowles, J. R. (1991). Ligand recognition by influenza virus, The binding of bivalent sialosides. *Journal of Biological Chemistry* 266, 23660-9.
5. Plumbridge, J., and Vimr, E. (1999). Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181, 47-54.
6. Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1996). Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 32-9.
7. Plumbridge, J. (2001). DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of nagE, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 29, 506-14.
8. Rogers, M. J., Ohgi, T., Plumbridge, J., and Söll, D. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* nagE and nagB genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* 62, 197-207.
9. Badet, B., Vermoote, P., Haumont, P. Y., Lederer, F., and LeGoffic, F. (1987). Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* 26, 1940-8.
10. Teplyakov, A., Obmolova, G., Badet-Denisot, M. A., and Badet, B. (1999). The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Science* 8, 596-602.

11. Traxinger, R. R., and Marshall, S. (1991). Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10148-54.
12. Souza, J. M., Plumbridge, J. A., and Calcagno, M. L. (1997). N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*: purification and molecular and kinetic characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340, 338-46.
13. Plumbridge, J. A. (1990). Induction of the nag regulon of *Escherichia coli* by N-acetylglucosamine and glucosamine: role of the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in expression of the regulon. *Journal of Bacteriology* 172, 2728-35.
14. Plumbridge, J. A., Cochet, O., Souza, J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., and Badet, B. (1993). Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 175, 4951-6.
15. Titgemeyer, F., Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M. H. (1994). Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*. 140, 2349-54.
16. Plumbridge, J., and Kolb, A. (1995). Nag repressor-operator interactions: protein-DNA contacts cover more than two turns of the DNA helix. *Journal of Molecular Biology* 249, 890-902.
17. Plumbridge, J. (1995). Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the glmUS operon and requires two separated NagC binding sites. *EMBO Journal* 14, 3958-65.
18. Plumbridge, J. (1996). How to achieve constitutive expresión of a gene within an inducible operon: the example of the nagC gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178, 2629-2636.
19. Biswas, M., Singh, B., and Datta, A. (1979). Induction of N-acetylmannosamine catabolic pathway in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 585, 535-42.

20. Kumar, M. J., Jamaluddin, M. S., Natarajan, K., Kaur, D., and Datta, A. (2000). The inducible N-acetylglucosamine catabolic pathway gene cluster in *Candida albicans*: discrete N-acetylglucosamine-inducible factors interact at the promoter of NAG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14218-23.
21. Leloir, L. F., and Cardini, C. E. (1956). Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochimic et biophysic acta* 20, 33-42.
22. Comb, D. G., and Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *Journal of Biological Chemistry*. 232, 807-827.
23. Arreola, R., Morante, L., Rojas, S., Alvarez-Añorve, L. I., Lara-González, S., Calcagno, M. L., and Horjales, E. (1999). 1D9T Human Glucosamine-6-Phosphate Deaminase Isomerase At 1.75 A. *Protein Data Bank*.
24. Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G., and Suástegui, J. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 787, 165-73.
25. Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C. A., Altamirano, M. M., and Calcagno, M. L. (1992). Purification and characterization of glucosamine-6-phosphate deaminase from dog kidney cortex. *Archives of Biochemistry And Biophysics* 297, 213-20.
26. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E., and Calcagno, M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* 34, 6074-82.
27. Lara-Lemus, R., and Calcagno, M. L. (1998). Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1388, 1-9.
28. Montero-Morán, G. M., Horjales, E., Calcagno, M. L., and Altamirano, M. M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* 37, 7844-9.

29. Lara-Gonzalez, S., Dixon, H. B., Mendoza-Hernandez, G., Altamirano, M. M., and Calcagno, M. L. (2000). On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 301, 219-27.
30. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology* 12, 88-118.
31. Natarajan, K., and Datta, A. (1993). Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* 268, 9206-14.
32. Wolosker, H., Kline, D., Bian, Y., Blackshaw, S., M., C. A., Fralich, T. J., Schnaar, R. L., and H., S. S. (1998). Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB Journal* 12, 91-99.
33. Weidanz, J. A., Campbell, P., DeLucas, L. J., Jin, J., Moore, D., Roden, L., Yu, H., Heilmann, E., and Vezza, A. C. (1995). Glucosamine 6-phosphate deaminase in normal human erythrocytes. *British Journal of Haematology* 91, 72-9.
34. Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V. I., Sesay, A. K., and Lai, F. A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364-8.
35. Arreola, R., Álvarez-Añorve, L., Mendoza-Hernández, G., Horjales, E., Calcagno, M. L., and Lara-Lemus, R. (2001). Mammal glucosamine 6-phosphate deaminases: two genes and two isoenzymes with different allosteric properties. *in press*.
36. Amireault, P., and Dube, F. (2000). Cloning, sequencing, and expression analysis of mouse glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA/oscillin). *Molecular Reproduction and Development* 56, 424-35.
37. Montag, M., van der Ven, K., Dorbecker, C., and van der Ven, H. (1999). Characterization of testicular mouse glucosamine 6-phosphate deaminase (GNPDA). *FEBS Letters* 458, 141-4.

38. Carninci, P., Shibata, Y., Hayatsu, N., Sugahara, Y., Shibata, K., Itoh, M., Konno, H., Okazaki, Y., Muramatsu, M., and Hayashizaki, Y. (2000). Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Research* 10, 1617-30.
39. Shevchenko, V., Hogben, M., Ekong, R., Parrington, J., and Lai, F. A. (1998). The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* 216, 31-8.
40. Altamirano, M. M., Mulliert, G., and Calcagno, M. (1987). Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258, 95-100.
41. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Hernández-Arana, A., and Calcagno, M. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1076, 266-72.
42. Altamirano, M. M., Hernandez-Arana, A., Tello-Solis, S., and Calcagno, M. L. (1994). Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* 220, 409-13.
43. Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt, R. C., and Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure Folding and Design* 7, 527-37.
44. Oliva, G., Fontes, M. R., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., and Horjales, E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* 3, 1323-32.
45. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., and Calcagno, M. L. (1992). Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their functional role by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31, 1153-8.

46. Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Dauter, Z., Wilson, K., Garratt, R. C., and Oliva, G. (1992). Crystallization and preliminary crystallographic studies of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology* 226, 1283-6.
47. Kraulis, P. J. (1991). Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 24, 946-950.
48. Merritt, E. A., and Bacon, D. J. (1997). Raster3D: Photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymology* 277, 505-524.
49. Blow, D. M., Collyer, C. A., Goldberg, J. D., and Samart, O. S. (1992). Structure and mechanism of D-xylose isomerase. *Faraday Discuss* 93, 67-73.
50. Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J. A., and Calcagno, M. L. (2001). On the Multiple Functional Roles of the Active Site Histidine in Catalysis and Allosteric Regulation of *Escherichia coli* Glucosamine 6-Phosphate Deaminase. *Biochemistry* 40, 10187-10196.
51. Dixon, H. B. F., and Fields, R. (1972). Specific Modification of NH₂-Terminal Residues by Transamination. *Methods in Enzymology* 25, 409-419.
52. Borch, R. F., Bernstein, M. D., and Durst, H. D. (1971). The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of American Chemical Society* 93, 2897-2904.
53. Altamirano, M. M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A. M., and Fersht, A. R. (1997). Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3576-8.
54. Johnson, L. N., and Barford, D. (1990). Glycogen phosphorylase. The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins. *Journal of Biological Chemistry* 265, 2409-12.
55. Schirmer, T., and Evans, P. R. (1990). Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* 343, 140-5.
56. Mattevi, A., Rizzi, M., and Bolognesi, M. (1996). New structures of allosteric proteins revealing remarkable conformational changes. *Current Opinion in Structural Biology* 6, 824-9.

57. Kundrot, C. E., and Evans, P. R. (1991). Designing an allosterically locked phosphofructokinase. *Biochemistry* 30, 1478-84.
58. Altamirano, M. M., Garcia, C., Possani, L. D., and Fersht, A. R. (1999). Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotechnology* 17, 187-91.
59. Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Kresse, G. B., Bode, W., Huber, R., and Engh, R. A. (1998). New enzyme lineages by subdomain shuffling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9813-8.
60. Fushinobu, S., Ohta, T., and Matsuzawa, H. (1998). Homotropic activation via the subunit interaction and allosteric symmetry revealed on analysis of hybrid enzymes of L-lactate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 2971-6.
61. Fushinobu, S., Kamata, K., Iwata, S., Sakai, H., Ohta, T., and Matsuzawa, H. (1996). Allosteric activation of L-lactate dehydrogenase analyzed by hybrid enzymes with effector-sensitive and -insensitive subunits. *Journal of Biological Chemistry* 271, 25611-6.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA