

00528  
48



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**CONSTRUCCION DE UNA MUTANTE SITIO ESPECIFICA  
COMO SENSOR ESTRUCTURAL DE LA TRANSICION  
ALOSTERICA DE LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO  
DESAMINASA DE *E. coli*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :

**MARIA DEL PILAR HINOJOSA OCAÑA**



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

2003



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

**VOCAL:** DR. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

**SECRETARIO:** DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

**1er.SUPLENTE:** DR. FRANCISCO JAVIER PLASCENCIA DE LA PARRA

**2o SUPLENTE:** DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN



---

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
DIRECTOR DE TESIS



MARÍA DEL PILAR HINOJOSA OCAÑA  
SUSTENTANTE

## **TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con la asesoría del Dr. Ismael Bustos Jaimes.**

**Este proyecto contó con el apoyo del proyecto 41328-Q del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).**

*Lo único cierto son nuestros sueños y nuestros recuerdos.*

Alejandro Dolina

A

## AGRADECIMIENTOS

Muy en especial al Dr. Ismael Bustos Jaimes, por tener confianza en mí, dedicarme todo su tiempo, enseñarme a ver las cosas de una forma sencilla, demostrarme que todo tiene una explicación y sentido en la vida y hay que afrontarlas, y sobretodo por darme la oportunidad de conocerlo y saber que es una GRAN persona. Gracias por todos los momentos que vivimos juntos algunos divertidos y otros difíciles pero siempre muy intensos. Gracias por todo, sin tu ayuda nunca lo hubiera logrado.

Con profundo respeto y admiración al Dr. Mario L. Calcagno, por el gran apoyo que me ha dado para la elaboración de este trabajo. Gracias por transmitirme parte de su inmenso conocimiento, pero sobre todo hacerme sentir parte de la comuna.

A mis grandes compañeros Sergio y Gilberto por ayudarme durante todo el proyecto y convertir los momentos tediosos y difíciles en situaciones divertidas.

A todos y cada uno de los integrantes del "Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas" por hacerme sentir como en casa.

A mi maestro y amigo el I.Q. Marcelino Gómez Velasco, por ayudarme a crecer y fortalecer mi interior, enseñarme que para vivir plenamente es necesario entregarme por completo a la vida y luchar por mis metas, las cuales se logran con esfuerzo y dedicación. Por todos sus consejos, tiempo y charlas muchas gracias. "Lo importante en la vida es ..."

Pasaron tragedias, fiestas, exámenes, accidentes, viajes y Chío siempre junto a mí. Su ayuda fue indispensable para lograr este objetivo. Gracias por todo y por ser como una hermana.

A los miembros del Jurado, por sus correcciones, sugerencias y atinados comentarios.

A la Facultad de Química y a la UNAM, por mi formación.

## DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelo, un hombre ejemplar que con sus acciones, alegría y entusiasmo me enseñó que la vida vale la pena y hay que vivirla intensamente. Le agradezco la oportunidad que me dio de despedirme y demostrarle lo importante que ha sido para mí. Fue y seguirá siendo una gran inspiración para mí.

A mis padres por preocuparse en todo momento de mi formación, darme tanto amor, cuidados y buenos ejemplos, pero sobre todo por haberme inculcado amor y respeto por la vida. Todo lo que hago es resultado de cada uno de sus esfuerzos y de su amor por mí.

A Eduardo por enseñarme con su ejemplo el significado de honestidad, responsabilidad, fortaleza y tenacidad. Por demostrarme que no existe ningún obstáculo que impida llegar a mis objetivos.

A Manuel Díez de Bonilla quien ha ido de la mano conmigo en todo momento. Tus consejos y acciones me ha hecho comprender que sin importar el entorno, siempre hay que ser auténticos.

A mis Abuelitas Cristina y Dulce por haberme dedicado tantos cuidados, cariños y oraciones.

A mis tíos y primos por ser una gran familia, por confiar en mí. Son una parte muy importante de mi formación ya que me ayudaron a comprender qué es amar y sentirse amada.

Annel y Claudia, pueden pasar los años, cambiar nuestros intereses, nuestras ocupaciones, circunstancias de la vida; pero nuestra amistad nunca cambiará.

Alejandra, Itzel, Berenice y Manzana por permitirme compartir una etapa muy importante de mi vida con ustedes. Por su cariño, sus consejos, su apoyo, por reír conmigo y también por haber secado muchas veces mi lágrimas. Por la complicidad y lo divertido de estar juntas.

A Ernesto, Miguel, Toño, José Luis y Goyo, porque compartimos algo más que la química. Por los momentos increíbles en la Facultad, por los días, las clases, palabras de aliento, las historias, las confidencias, los apapachos cuando los necesitaba y sus conversaciones.

A todos mis amigos, Adriana, Gaby, Deysi, Isaac, Minerva, Leonardo, Arturo, René, Héctor y Oscar, que han compartido alguna parte de mi vida. Se ha aligerado el peso con todos ustedes.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Antecedentes</b>	3
• <i>Aminoazúcares</i>	3
• <i>Glucosamina-6-fosfato desaminasa</i>	6
• <i>Control alostérico</i>	12
• <i>Sitio alostérico</i>	14
• <i>Sitio activo</i>	17
• <i>Mecanismo</i>	18
• <i>Modelo concertado Monod-Wyman-Changeux (MWC)</i>	20
• <i>El modelo secuencial simple de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF)</i>	24
• <i>Fluorescencia</i>	25
• <i>Tipos de fluorescencia</i>	27
• <i>Fuentes de interferencia en fluorescencia</i>	29
<b>Objetivos</b>	31
<b>Justificación</b>	32
<b>Metodología y material</b>	33
• <i>Reactivos</i>	33
• <i>Plásmidos y mutagénesis</i>	33
• <i>Transformación</i>	34
• <i>Expresión de la enzima recombinante en <u>E. coli</u></i>	35
• <i>Purificación de la glucosamina-6-fosfato desaminasa</i>	35
• <i>Cuantificación de la enzima</i>	36
• <i>Determinación de velocidad enzimática</i>	37
• <i>Ajuste de la cinética</i>	38
• <i>Fluorescencia</i>	38
<b>Resultados</b>	40
• <i>Mutagénesis</i>	40
• <i>Expresión, purificación y cuantificación de la enzima</i>	40
• <i>Caracterización cinética</i>	42
• <i>Resumen de la caracterización cinética</i>	50
• <i>Fluorescencia</i>	50
<b>Conclusiones</b>	59
<b>Perspectivas</b>	60
<b>Bibliografía</b>	61

## RESUMEN

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (EC 3.5.99.6) es una enzima alostérica que cataliza la isomerización y desaminación de la glucosamina 6-fosfato para producir fructosa 6-fosfato y amonio. Esta enzima es un paso regulado en la vía de degradación de *N*-acetilglucosamina. La enzima ha sido caracterizada tanto cinética como estructuralmente y su comportamiento puede ser explicado en los términos del modelo simétrico de Monod-Wyman-Changeux. La glucosamina-6-fosfato desaminasa ha sido cristalizada en sus estados T y R de baja y alta afinidad por el sustrato, respectivamente. Sin embargo, la naturaleza de la transición cuaternaria de esta enzima no ha sido comprendida a nivel estructural. No se conocen los desencadenantes estructurales que permiten a la enzima transitar del estado T al estado R a través de la unión de ligandos, ya sea en el sitio activo o en el sitio alostérico. Tampoco ha sido posible comprobar experimentalmente que la transición cuaternaria de esta enzima sea un evento concertado, como lo propone el modelo simétrico. En esta investigación nos proponemos estudiar la transición alostérica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* a través de un residuo de triptofano colocado en una región que nos puede dar información de los cambios estructurales que ocurren en la enzima durante la transición cuaternaria. El triptofano es un residuo que puede ser utilizado como sonda fluorescente ya que su espectro de emisión se modifica al cambiar el ambiente electrónico que lo rodea. Estos cambios están asociados a los cambios estructurales de la enzima.

**La mutación de lisina 234 por triptofano no afectó significativamente el comportamiento cinético de la enzima. Esta mutante presenta señales de fluorescencia asociadas aparentemente al cambio cuaternario de la enzima. Este estudio hace notoria la existencia de distintas conformaciones estructurales para el estado de alta afinidad (R) de la glucosamina-6-fosfato desaminasa.**

## ANTECEDENTES

### AMINOAZÚCARES

Los aminoazúcares son monosacáridos en donde uno o más de sus grupos hidroxilo se encuentran sustituidos por aminas primarias, o secundarias al estar sustituidas por un acetilo. Son componentes de la superficie celular de las bacterias y forman parte del esqueleto estructural de péptidoglicanos en eubacterias (pared celular), así como también de la capa externa de lipopolisacárido de las bacterias gram-negativas.

Los aminoazúcares son abundantes en la naturaleza y no son exclusivos de las paredes celulares de la bacterias, también forman parte de diferentes biopolímeros simples o complejos. Son constituyentes de la quitina, que es un homopolímero de *N*-acetil- $\beta$ -glucosamina (GlcNAc) con uniones  $\beta$  1-4, y también se encuentran en diversas proteínas glicosiladas. La mayoría de los glicoconjugados (carbohidratos unidos covalentemente a proteínas o lípidos: glicoproteínas y glicolípidos) de las superficies celulares de mamíferos contienen aminoazúcares, incluyendo residuos de ácido siálico. El papel de los carbohidratos en las propiedades de las proteínas, no se conoce en su totalidad y su papel puede ser tan diverso como: 1) mantener la conformación estructural de una proteína, 2) determinar el tiempo de vida media de glicoproteínas y células circundantes (Drickamer, 1991), 3) controlar la permeabilidad de la membrana, 4) regular el metabolismo y la división celular (Fermín y Nathan, 1991; Glick y col. 1991) y 5) funcionan como receptores de hormonas y patógenos.

Los aminoazúcares como la  $\beta$ -glucosamina (GlcN) y la *N*-acetil- $\beta$ -glucosamina (GlcNAc) se utilizan como fuente de carbono por *E. coli*. En especial, la GlcNAc

promueve velocidades de crecimiento comparables a las producidas por la glucosa. El crecimiento de *E. coli* en un medio con aminoazúcares como única fuente de carbono, induce la expresión de las enzimas necesarias para el metabolismo de los aminoazúcares, codificadas en el operón divergente *nag* (Figura 1). Los genes *nagB* y *nagA* codifican para dos enzimas, la glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) y la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa (GlcNAc6P desacetilasa), respectivamente.

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) codificada en el gen *glmS* (Figura 2).

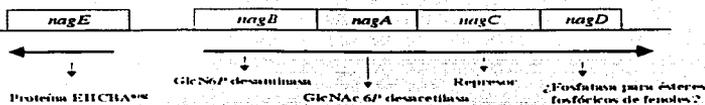


Figura 1. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (tomado de Plumbridge J.A., 1992).

El metabolismo de GlcN y GlcNAc se puede llevar a cabo por los procesos catabólicos en que se utilizan los genes del operón *nag* y por los procesos anabólicos que se llevan a cabo por las proteínas de los genes *glm*. Ambos aminoazúcares son introducidos por los genes *manXYZ* y *nagE* respectivamente que forman parte del sistema de fosfotransferasa (PTS). Durante el tránsito por la membrana son fosforilados y posteriormente se degradan hasta Fru6P y amonio por los productos de los genes *nagA* y *nagB*. Cuando la GlcN y la GlcNAc están presentes en el medio son utilizados para la formación de

péptidoglicanos y lipopolisacáridos. En ausencia de aminoazúcares, el gen *glmS* es esencial ya que se encarga de la generación de GlcN6P. El gen *glmM* codifica para la enzima responsable de la conversión de GlcN6P en glucosamina 1-fosfato (GlcN1P) mientras que el gen *glmU* codifica para la enzima responsable de la acetilación de la GlcN1P formando *N*-acetilglucosamina 1-fosfato (GlcNAc1P) y posteriormente se sintetiza UDP-GlcNAc, el cuál se utiliza como donador de aminoazúcares en diversas reacciones de transferencia durante la síntesis de peptidoglicanos. La *N*-acetilmanosamina (ManNAc) entra a la célula por acción del transportador manXYZ acoplado al sistema PTS, produciendo *N*-acetilmanosamina 6-fosfato (ManNAc6P). El ácido *N*-acetilneurámico (NANA) entra a la célula por un sistema simporte codificado por *nanT*. Dentro de la célula una aldolasa (*N*-acetilneuraminato liasa, *nanA*) rompe al NANA generando ManNAc y piruvato. Las vías de degradación del NANA, ManNAc y GlcNAc convergen a nivel de la GlcNAc6P.

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 (Plumbridge y Vimr, 1999 y Plumbridge, 1989).

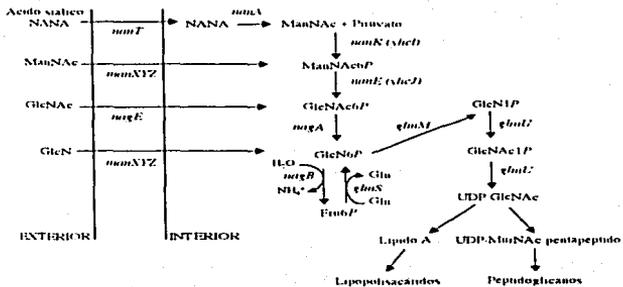


Figura 2. Metabolismo de los aminoazúcares en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) la vía biosintética (genes *glm*). (Tomado de Plumbridge y Vimr, 1999 y Mengin-Lecreux y Heijernoort, 1996).

### GLUCOSAMINA- 6-FOSFATO DESAMINASA

La enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6 antes EC 5.3.1.10), cataliza la isomerización y desaminación reversible de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y ion amonio (Comb y Roseman, 1958; Midelfort y Rose, 1977; Calcagno y col., 1984).

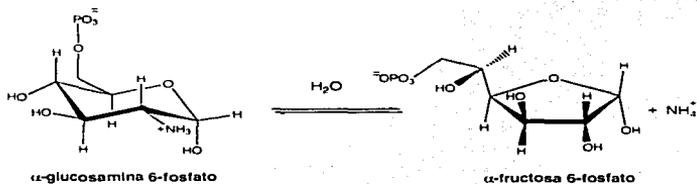


Figura 3. Reacción en la que la GlcN6P desaminasa participa.

La enzima fue descrita inicialmente por Leloir y Cardini en 1956 y ha sido identificada en diversas especies de animales, protozoarios, hongos y bacterias. Las GlcN6P desaminasas de *Escherichia coli* (Altamirano, y col.,1991), *Candida albicans* (Natarajan, y Datta, 1993), de riñón canino (Lara-Lemus y col., 1992) y bovino (Lara-Lemus, 2001), así como de espermatozoides de *Metaericetus auratus* (Parrington, J. y col.,1996) han sido purificadas. Se conocen, entre otros, los genes de las GlcN6P desaminasas de *Caenorhabditis elegans*, *Micoplasma capricolum*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi* y *Bacillus subtilis*.

La desaminasa en mamíferos está presente en concentraciones considerables en espermatozoides maduros. En un principio Parrington y Lai identificaron a la desaminasa como el factor desencadenante de oscilaciones de los niveles intracelulares de calcio en el ovocito durante la fecundación por lo que la llamaron "oscilina". Finalmente se demostró que la verdadera oscilina había sido copurificada con la desaminasa de espermatozoide y que la GlcN6P desaminasa carece de la función que le había sido atribuida (Wolny y col., 1999).



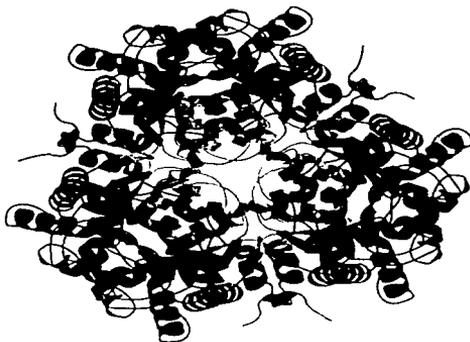
Figura 4. Monómero de GlcN6P desaminasa de *E. coli*. En el conformero R. Se representa al inhibidor competitivo, GlcN-ol-6P, ocupando el sitio activo. (Tomado de Lara González, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

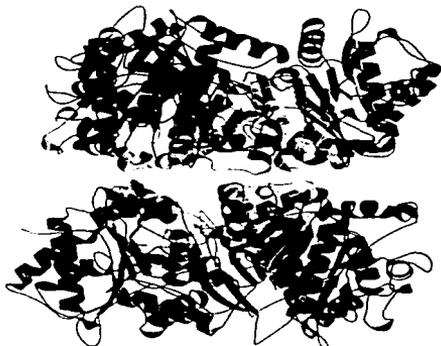
La GlcN6P desaminasa es una proteína homohexamérica (Calcagno y col., 1984), su estructura primaria es conocida por la secuencia de nucleótidos del gen *nagB* (Rogers y col., 1988). Su secuencia de aminoácidos (Rogers y col., 1988) nos muestra que cada cadena de proteína está formada por 266 aminoácidos y cuenta con un peso de 29.7 kDa aproximadamente (Figura 4). Se ha buscado homología con otras proteínas, pero no se ha encontrado similitud significativa, excepto las GlcN6P desaminasas de otras especies y el gen putativo de la galactosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*.

Existen 2 genes de la GlcN6P desaminasa en mamíferos, que difieren en longitud y comparten identidad en 240 residuos. La secuencia larga en mamíferos (humanos, ratón y hamster, que tienen una elevada identidad entre sí) tiene 289 residuos aminoácidos, 23 más que la enzima de *E. coli* y es homóloga con la enzima bacteriana sólo en la secuencia de los residuos 1 a 258. Este segmento contiene todos los grupos relevantes para la catálisis y los contactos entre las subunidades en la molécula de desaminasa bacteriana y su plegamiento es prácticamente igual. El segmento 258-289 de la enzima de mamífero forma el extremo C terminal y no tiene una contraparte homóloga con las desaminasas de otros microorganismos.

El hexámero de la GlcN6P desaminasas está arreglado como un dímero de trímeros (Figuras 5 y 6) con un eje cristalográfico de orden 3, con una simetría interna 32 (Oliva y col., 1995).



**Figura 5.** Se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* observándose desde el eje de simetría de orden tres (Tomada de Lara-González, 2001).



**Figura 6.** Se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, vista lateral, teniendo un arreglo de dímero de trímeros (Tomada Lara-González, 2001).

La glucosamina-6-fosfato desaminasa pertenece a la clase (2-R) aldo-cetosa isomerasas. Presenta en *E. coli* (cepa ATCC11303) 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 Fru6-P y amonio de  $300 \text{ s}^{-1}$  y de  $76 \text{ s}^{-1}$  en el sentido inverso. La enzima es activada alostéricamente por *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Ésta se une al sitio alostérico para aumentar la afinidad aparente de la enzima por su sustrato, la GlcN6P, lo que acompaña de la pérdida de la cooperatividad homotrópica. A concentraciones saturantes de GlcNAc6P, la GlcN6P desaminasa presenta una cinética hiperbólica. Este comportamiento es característico de los llamados sistemas *K* (Monod y col., 1965), debido a que al incrementar sucesivamente la concentración del activador, los valores de  $S_{0.5}$  disminuyen (efecto *K*), mientras que los valores de  $V_{max}$  no se modifican, esto significa que el control alostérico opera por medio de la modificación de la afinidad aparente de la enzima por su sustrato sin cambio en su constante catalítica (Calcagno y col., 1984). En un sistema *K* la activación, ya sea homotrópica o heterotrópica, cambia la afinidad de la enzima por el sustrato sin que se modifique la  $k_{cat}$ , y por lo tanto la  $V_{max}$  de la reacción. La presencia del efector es suficiente para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato y a su vez el sustrato modifica la afinidad de la enzima por el efector (Monod y col., 1965). La enzima que sobreexpresamos en el laboratorio, proviene de la cepa K12, presenta una  $K_m$  para la GlcN6P de 0.5 mM y una  $k_{cat}$  de  $158 \text{ s}^{-1}$  por subunidad (Lara-González y col., 2000).

La GlcN6P desaminasa de *E. coli*, se puede dividir estructuralmente en 2 zonas generales: la zona interna y la zona externa. La zona interna es responsable de la mayoría

de los contactos intermonoméricos del hexámero funcional y consta de tres segmentos: un motivo hélice-asa-hélice (residuos 207 a 233) que unen el hexámero en la zona del eje de orden 3, un asa-hélice que establece los contactos intermonoméricos cerca del orden 2 (residuos 244 a 253) y una vuelta que esta unida por puentes de hidrógeno al fragmento anterior (residuos 137 a 143). Los residuos restantes (1 a 136, 144 a 206, 234 a 243 y 254 a 266) forman la zona externa, a diferencia de la zona interna rota durante la transición alostérica (Rudiño, 2001), (Figura 7).

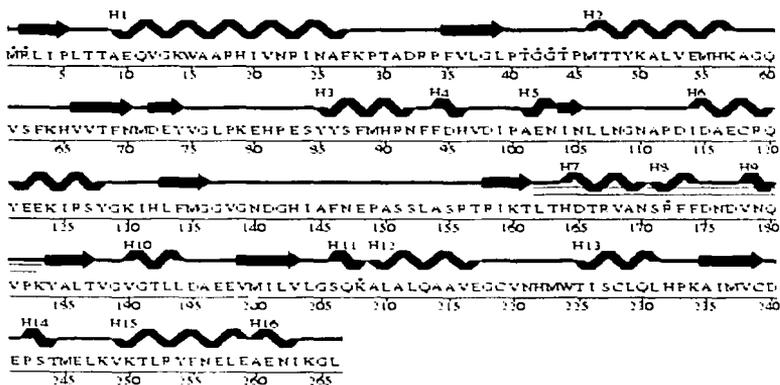


Figura 7. Arquitectura de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. El motivo correspondiente a la tapa del sitio activo se muestra subrayado. Los asteriscos señalan aquellos residuos que interactúan con el sustrato.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTROL ALOSTÉRICO

El control alostérico de algunos procesos químicos y fisiológicos es esencial en las funciones celulares, juega un papel importante en la regulación metabólica, en la respuesta celular, expresión o represión de genes y comunicación celular entre otras. La regulación en las propiedades de unión de una proteína alostérica puede describirse como un equilibrio entre dos estados conformacionales diferentes: un estado T y un estado R.

En la transición de un estado a otro participan cambios conformacionales a nivel de la estructura cuaternaria, que promueven modificaciones locales en la estructura terciaria de la unidad monomérica, y alteran las propiedades de unión de ligandos (Altamirano y col., 1991).

La transición alostérica de T a R en la desaminasa ocurre cuando la GlcNAc6P se une al sitio alostérico (Figura 8) o por la unión de sustratos al sitio activo. Las fuerzas que dirigen la transición, están asociadas a la unión del grupo fosfato como consecuencia de la presencia de residuos cargados positivamente que provienen del módulo externo e interno y del asa catalítica y que forman la estructura de sitio activo. Por lo que la unión del grupo fosfato produce un rearrreglo estructural que dispara la transición alostérica.

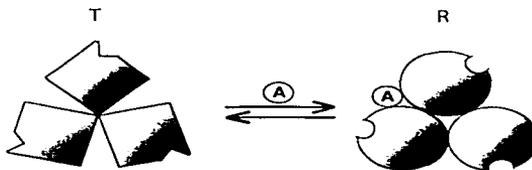


Figura 8. Esquema de la transición alostérica provocada por la unión de una molécula de activador.

El sitio alostérico tiene cargas positivas que se distribuyen a lo largo de ambas subunidades. La presencia de cargas negativas del grupo fosfato genera atracción entre el módulo externo y dos monómeros vecinos. Una vez más, esto genera el carácter rígido del módulo externo que es esencial para generar la misma conformación en el estado R, cuando la transformación está dirigida por fuerzas aplicadas en cada una de las dos diferentes regiones de la molécula. Los cambios conformacionales no solamente afectan al movimiento relativo del módulo interno y externo, sino que requiere una delicada regulación electrostática. En el estado T, el Glu148 neutraliza las cargas positivas en el sitio alostérico, mientras que en el estado R el grupo fosfato del activador alostérico neutraliza la carga y el Glu148 queda libre para girar hacia el sitio activo. (Horjales y col., 1999).

Los cambios en la estructura cuaternaria son el resultado de cambios a nivel de la estructura terciaria de cada subunidad, que están asociados a la unión del sustrato o del efector alostérico. Los cambios conformacionales del conformero T a R se describen como un movimiento relativo de dos entidades rígidas dentro de cada monómero, que modifican el sitio activo. Sin embargo, la conformación capaz de unir al efector alostérico sólo es generada en el conformero R. Dos diferentes mecanismos desencadenan este proceso, uno desencadenado por el sitio catalítico y otro en el sitio alostérico.

Se conoce la estructura de la forma R de la enzima *E. coli*, a partir de datos cristalográficos de difracción de rayos X a 2.1 Å. Se resolvieron los complejos enzima-P (fosfato inorgánico ocupando los sitios activo y alostérico), enzima-GlcNAc6P y enzima-

2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-*P* (GlcN-ol-6*P*). Este último ligando es un inhibidor sin salida, que ocupa el sitio activo (Oliva y col.,1995). Más recientemente se obtuvo el modelo de la forma T a 2.2 Å de resolución, en ausencia de ligandos (Horjales y col., 1999). La estructura de la forma R y sus complejos muestran inequívocamente los sitios alostérico y activo de la enzima. La comparación de la conformación R con la forma T demuestra el cambio global que experimenta la proteína en la transición alostérica.

La enzima tiene 6 sitios alostéricos, los cuales se encuentran en los espacios entre las subunidades que forman cada trímero. De este modo, los sitios de unión del activador alostérico se encuentran formados por dos monómeros vecinos. Este hecho hace notar que se establecen contactos importantes entre subunidades al unirse este ligando.

Se considera que la GlcNAc6*P* se une exclusivamente al estado R (estado de mayor afinidad por los sustratos) y el único capaz de unir al activador. Ambos efectos, la cooperatividad homotrópica y la activación por GlcNAc6*P* en la GlcN6*P* desaminasa pueden explicarse satisfactoriamente en el marco del modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC). El modelo de MWC es esencialmente un modelo en equilibrio y su aplicación en procesos cinéticos es posible bajo la suposición de que la enzima tiene una cinética en equilibrio rápido y no una cinética en estado estacionario.

### *SITIO ALOSTÉRICO*

En el conformero T, los residuos del sitio alostérico no se encuentran en posición correcta para unir la GlcNAc6*P*. En esta conformación, el grupo amino terminal está a más de 10 Å de los residuos Arg158 y Lys160 de la subunidad adyacente y se une por un 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. Se puede describir el sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa (Figura 9) en el conformero R, 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 $\gamma$  de la Ser 151 (Oliva y col., 1995). La única interacción del grupo fosfato con la subunidad adyacente es por un puente de hidrógeno al grupo 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 (Lara-González y col., 2000).



**Figura 9.** Detalle del sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa. Se representan los residuos importantes del sitio alostérico y al centro, transparente, la molécula de GlcNAc6P (Tomada de Lara-González, 2001).

En el sitio alostérico el átomo O3 del activador alostérico se encuentra unido por un puente de hidrógeno al carbonilo del esqueleto principal a nivel del residuo Ile159. La parte hidrofóbica del grupo acetilo se une por contactos de van der Waals con este residuo. La densidad de electrones observada permite distinguir al anómero  $\alpha$  del activador alostérico como la forma que se une al sitio alosterico (Olivia, G. y col., 1995).

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, por lo tanto la Tyr254 funciona como un interruptor (Montero-Morán y col., 1998).

Otro residuo importante es la Tyr121 que se encuentra asociada a cambios estructurales y funcionales producidos por la unión del sustrato (Altamirano y col., 1994).

El cambio conformacional alostérico provoca en cada monómero dentro del hexámero una rotación de  $13.1^\circ$  alrededor de un sólo eje, paralelo al eje de simetría de orden tres y muy cercano al residuo 197 de cada monómero. El hexámero durante la transición alostérica 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.
- 3) En el sitio alostérico, ubicado entre monómeros adyacentes (Horjales y col., 1999).

### SITIO ACTIVO

El sitio activo (Figura 10) se forma entre dos asas situadas en el extremo C-terminal de las hebras B y E (Figura 7). El fosfato del sitio activo está unido por puente salino a la Lys208 y Arg172 y por puentes de hidrógeno al asa formada por los residuos 40-44 (Oliva y col., 1995). El inhibidor competitivo se encuentra unido de forma extendida con su O5 apuntando hacia el N $\epsilon$ 2 de la His 143. Esta histidina está en contacto con el O $\delta$ 1 del Asp141 y el O $\epsilon$ 1 del Glu. El residuo Asp72 se encuentra orientado hacia el hidrógeno en C2 del azúcar y hace un puente de hidrógeno con el O1 del inhibidor.

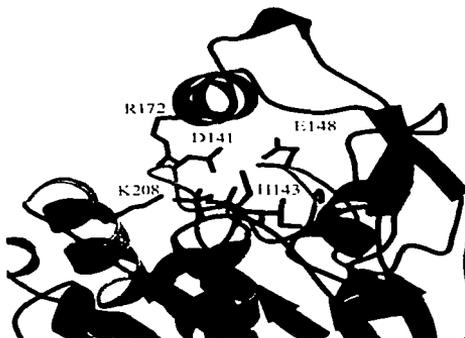


Figura 10. Detalle del sitio activo de la GlcN6P desaminasa. Se muestra el inhibidor competitivo unido al sitio activo (Tomado de Lara-González, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

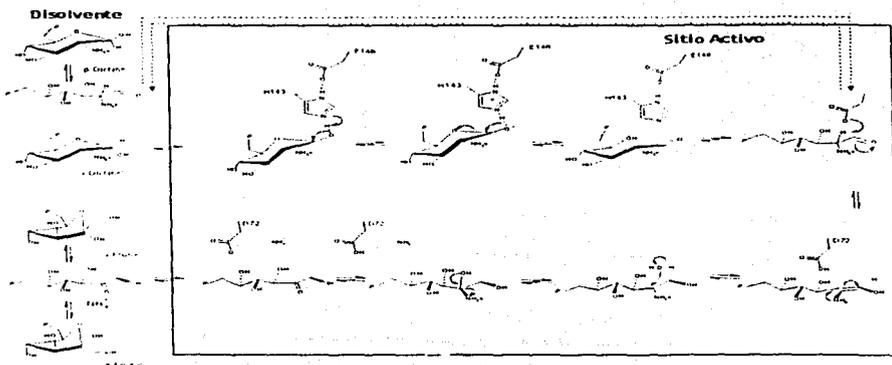
## MECANISMO

Midelfort y Rose (1977) propusieron un mecanismo catalítico basado en el mecanismo general de las isomerasas cetoaldólicas (Rose, 1975). Con base a la estructura del complejo enzima-GlcN-ol-6P se propuso un mecanismo catalítico (Oliva y col., 1995) que ha sido completado con datos cinéticos en el que se puntualiza la importancia de los residuos del sitio catalítico, His143 y Glu148 en la apertura del anillo del sustrato (Montero-Morán y col., 2001).

Este mecanismo (Figura 11) comienza con la apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P por el residuo His143. En este punto, el carboxilato del residuo de Asp72 sustrae el protón de C2 y de manera concertada, se lleva a cabo la enolización entre C1 y C2 (formación del *cis*-enol-amino).

Subsecuentemente, este intermediario se convierte en el correspondiente enol-amonio cuando el protón regresa al aminoazúcar en la posición O1. Existen dos interpretaciones sobre cómo puede darse la siguiente etapa. En una de ellas, un protón del grupo amino puede ser tomado de nuevo por Asp 72 formándose una *cis-enol-amina* (2-amino-2desoxi-D-arabino-hex-2-enitol 6-fosfato), la que posteriormente toma el protón de Asp72 en la posición C1 pro-R que al arreglarse 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  $\pi$  entre C1 y C2 del intermediario *cis*-enol-amonio es atacado por una molécula de agua en la cara *re* del intermediario.

La estructura del intermediario *cis*-enol-amonio es muy similar a la del inhibidor competitivo. Este intermediario se descompone en Fru6P y NH<sub>3</sub>. Se ha demostrado que el sustrato para la enzima es el ion amonio, de forma que el amoniaco formado en esta etapa debe tomar un protón. Lo más factible, es que lo tome del carboxilo del Asp72 para liberarse como ión amonio (Olivia y col., 1995).



**Figura 11. Mecanismo de reacción propuesto para la enzima GlcN6P desaminasa. Las líneas punteadas corresponde al equilibrio de unión de la forma aldehído del sustrato (tomado de Montero-Morán y col., 2001).**

La interacción cooperativa ocurre entre dos sitios separados, el enlace del ligando en un sitio induce un cambio en la estructura alrededor de la proteína que es transmitido por un canal polipeptídico. (Robert, 2000) Este concepto de transmitir un cambio estructural en la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

proteína resultando una comunicación entre los sitios es llamado "alostería" y las enzimas que presentan dicho efecto se conocen como enzimas alostéricas (*allos* diferente, *stereos* estructura). Los efectos alostéricos pueden ocurrir entre los sitios de unión separados por el mismo ligando dando a la enzima "cooperatividad homotrópica".

Un modelo para explicar la cooperatividad es el modelo de simetría o modelo concertado mejor conocido como MWC (Monod y col., 1965) (Figura 12).

### *MODELO CONCERTADO DE MONOD-WYMAN-CHANGEUX (MWC)*

El modelo postula:

1. Las proteínas alostéricas son oligómeros de monómeros que están asociados de tal manera que ocupan posiciones equivalentes. Esto implica que la molécula posee al menos un eje de simetría.
2. Cada subunidad en la proteína es capaz de existir en dos estados conformacionales, que se llaman T (tenso y menos afín al sustrato) y R (relajado y más afín al sustrato), aún antes de que se adicione un compuesto capaz de unirse.
3. Todas las subunidades del oligómero de proteína están en la misma conformación, ya sea todas en T o todas en R. Los estados mixtos no se generan debido a que las subunidades en distintos estados (T o R) tienen interacciones poco favorables. Las dos formas conformacionales de la proteína están en equilibrio en ausencia de moléculas unidas, por lo que el equilibrio (tendiente a T) se rompe por la adición de estas moléculas (generalmente el equilibrio se desplaza hacia R).
4. Las constantes de asociación de una molécula ligable para las forma T y R son diferentes, porque son estructuralmente distintas.

5. Cuando una proteína alostérica va de un estado al otro, se conserva la simetría molecular. El modelo MWC, también propone la existencia de tres clases de comportamientos que pueden esperarse en los sistemas alostéricos.
- a) **Sistemas K:** la unión de un efector a la enzima cambia la constante de afinidad por el sustrato. Ya que tanto el activador como el sustrato tienen diferentes afinidades por las formas T o R, la presencia del efector modificará la afinidad aparente de la proteína por el sustrato, pero sin afectar la  $V_{max}$  de la reacción.
  - b) **Sistemas V:** el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados. De esta manera, la unión del efector no modifica la afinidad de unión aparente del sustrato, pero produce un cambio en la  $V_{max}$ . Si el efector tiene afinidad máxima por la forma activa (R) o por la inactiva (T), funcionará como un activador (sistemas V positivos) o como inhibidor (sistemas V negativos). El sustrato no funciona como activador en ninguna concentración.
  - c) **Sistemas mixto K-V:** Todos los sistemas que no son completamente V o K.

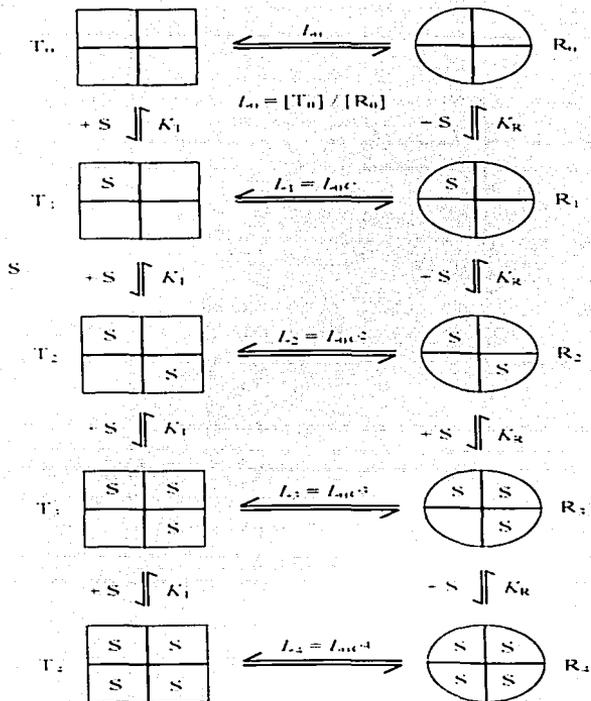


Figura 12 . Representación esquemática de los equilibrios que involucrados en el Modelo MWC.

Utilizando este modelo (Figura 12), se pueden hacer varias afirmaciones (Rudiño, 2001):

- ❖ En un sistema alostérico enzimático K, un efector debe mostrar interacciones cooperativas homotrópicas.
- ❖ En aquellos sistemas en que el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados, el sustrato no muestra interacciones cooperativas homotrópicas.
- ❖ El cambio conformacional es debido a la diferencial de energías de unión entre los dos estados.
- ❖ El modelo MWC hace predicciones simples basándose en sólo dos parámetros físicos: la constante de equilibrio o constante alostérica,  $L$ , que representa la relación de los estados T a R en ausencia de cualquier molécula ligable ( $L = [T_0] / [R_0]$ ) y el coeficiente de unión no exclusivo,  $c$ , que es la relación de las constantes de disociación de los estados R y T ( $c = K_T / K_R$ ).
- ❖ No puede explicar la cooperatividad negativa en el esquema.

La ecuación derivada para el modelo de MWC es la siguiente (Segel, 1974).

$$v_n = \frac{k_{cat} n [E_0] \{L c \alpha (1 + c \alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}\}}{L (1 + c \alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Donde  $\alpha = K_R / [S]$ ,  $L = [T_0] / [R_0]$  y  $c = K_R / K_T$

El modelo de MWC define también las propiedades de los sistemas alostéricos:

- 1) Las proteínas alostéricas son oligoméricas.
- 2) Las interacciones alostéricas están relacionadas con alteraciones en la estructura cuaternaria de las proteínas (como alteraciones en la unión entre las subunidades).
- 3) Mientras que los efectos heterotrópicos, pueden ser tanto positivos como negativos (activación o inhibición), los efectos homotrópicos parecen siempre positivos.
- 4) Muy pocos sistemas alostéricos presentan solamente efectos heterotrópicos. En otras palabras, los efectos cooperativos homotrópicos se observan invariablemente para al menos una de las moléculas ligables del sistema.
- 5) Las condiciones, los tratamientos o las mutaciones que alteran las interacciones heterotrópicas, también pueden alterar las homotrópicas.

#### *EL MODELO SECUENCIAL SIMPLE DE KOSHLAND-NEMETHY-FILMER (KNF).*

Otro modelo para explicar la cooperatividad es el modelo KNF. Una forma de entender el modelo MWC consiste en relajar la cooperatividad y la simetría absolutas, permitiendo que coexistan ambas conformaciones alostéricas (R y T) en el mismo oligómero. La posibilidad de que existan subunidades adyacentes con una conformación diferente se puede modelar añadiendo a la ecuación un término que modifique la energía de interacción. Incluso si el valor de la energía de interacción es casi infinito, se obliga a que la transición sea concentrada y se obtiene el modelo MWC. Este modelo más general puede tomar formas interesantes, así, si la energía de interacción es cero, no habría cooperatividad. Igual que en modelo MWC, la cooperatividad sigue siendo debida a la

interfase entre los monómeros. Este modelo secuencial también se conoce como modelo KNF, secuencial simple o de "induced fit" y su característica principal es que permite la existencia de oligómeros mixtos, o híbridos (T y R), los cuales tienen más de una conformación por oligómero. En este modelo:

- 1) Cada subunidad, dentro del oligómero funcional, puede unir a distintas moléculas y experimentar cambios conformacionales independientes de las subunidades vecinas.
- 2) Existen interacciones entre las subunidades que modifican la forma en que se unen los ligandos adicionales.
- 3) Debido al gran número de parámetros en este modelo, las predicciones del comportamiento enzimático no son claras como en el modelo MWC.
- 4) Puede explicar los fenómenos de cooperatividad negativa.

El tratamiento matemático de este modelo es muy complicado y algunas de sus variables no tienen sentido físico, por lo cual no se utiliza.

### *FLUORESCENCIA*

Diferentes sistemas químicos son fotoluminiscentes, los cuales pueden ser excitados por radiación electromagnética y como consecuencia emitir radiación de mayor longitud de onda. Dos de las emisiones más comunes son la fluorescencia y la fosforescencia. La fluorescencia es mucho más importante desde el punto de vista analítico ya que es una poderosa técnica para estudiar interacciones moleculares y aspectos de biología celular.

neurología y bioquímica entre otras ramas ya que tiene una gran sensibilidad que permite trabajar con concentraciones nanomolares.

La fluorescencia tiene tres grandes ventajas; seguridad, gran velocidad y alta sensibilidad. El punto de seguridad se refiere a que la muestra no es afectada ni destruida en el proceso y sobretodo que no se genera intermediarios. La gran sensibilidad es importante porque las concentraciones son proporcionales a la concentración de la sustancia que se está investigando y su gran velocidad se refiere a que los cambios de intensidad pueden ser detectados en un orden de picosegundos.

La sensibilidad de la fluorescencia depende tanto del instrumento como del fluoroforo, la capacidad de respuesta de éste dependerá de la absorptividad molar y el campo cuántico, factores que controlan el comportamiento del análisis.

Todas las moléculas poseen una serie de niveles de energía cercanos entre sí que pueden llegar a niveles de mayor energía después de ser excitadas. Durante este proceso un electrón es promovido a un nivel electrónico energéticamente superior. Las moléculas que pueden alcanzar estos niveles de energía excitados son aquellas en las que se presenta el fenómeno de luminiscencia. Los diferentes estados electrónicos moleculares presentan subniveles que reciben el nombre de estados vibracionales. El primero de estos estados del primer nivel energético en la molécula corresponde a lo que se conoce como el estado basal (Sauceda, 2003).

Los diferentes estados vibracionales presentan diferencias entre sí considerablemente menores a los estados electrónicos. Se puede acceder a los estados vibracionales mediante procesos menos energéticos que la excitación por fotones. Para la emisión de

fluorescencia, es necesario excitar a la molécula con una radiación de cierta longitud de onda para que el último electrón pase de su estado basal a un estado singulete. Una vez excitada la molécula, ésta regresa a su estado basal realizando una serie de pasos. La molécula puede llevar a cabo un movimiento vibracional, lo cuál implica una pérdida de energía. Dicho movimiento depende de las colisiones entre las moléculas de la especie excitada y el tipo de disolvente. También se puede perder energía emitiendo un fotón de una energía menor a aquella con la que se excitó la molécula.

Las moléculas que tienen un mayor comportamiento fluorescente son todas aquellas que tienen anillos aromáticos ya que presentan electrones resonantes. Se ha encontrado experimentalmente que la fluorescencia es afectada tanto por la rigidez de la estructura del compuesto como por el tipo de disolvente ya que esto puede restringir el movimiento vibracional (Guilbault, 1973).

#### *TIPOS DE FLUORESCENCIA*

La fluorescencia puede ser de tres tipos:

1. **Fluorescencia de Stokes:** ocurre cuando los fotones emitidos son menos energéticos que los utilizados para excitación, es decir, la radiación de emisión presenta una longitud de onda superior a la radiación de excitación. Este tipo de fluorescencia ocurre principalmente en soluciones líquidas.
2. **Fluorescencia anti-Stokes:** ocurre si la radiación emitida es más energética que la de excitación. Ocurre al añadir energía térmica al sistema y es frecuente en gases diluidos a altas temperaturas.

3. **Fluorescencia de resonancia:** consiste en la emisión de fotones de igual energía que los fotones de excitación. Nunca ocurre en solución debido a las interacciones con el disolvente, pero es común en cristales y en gases.

Asociada a la fluorescencia existen dos tipos de dispersión: la dispersión de Rayleigh y la dispersión de Raman. La primera ocurre cuando el fotón incidente excita al fluoróforo a un nivel vibracional superior al basal, para ser reemitido con la misma energía. El fenómeno de Rayleigh ocurre a cualquier longitud de onda de excitación, pero disminuye como la cuarta potencia de esta longitud. Para evitar interferencias con el análisis, se debe trabajar a la mayor longitud de onda de excitación posible. La dispersión Raman ocurre a diferencias fijas de la dispersión de Rayleigh y se da por energía sustraída o añadida a este fotón de excitación. Esta dispersión es significativamente menor que la Raman (Sauceda, 2003).

#### *Fluorómetro*

La longitud de onda de excitación se escoge con ayuda de un monocromador primario, o de excitación, que se encuentra entre la fuente de radiación (por lo general una lámpara de xenón, halógeno, vapor de mercurio o filamento de tungsteno) y la muestra. Después de la excitación se detectan las longitudes de onda de emisión y sus intensidades relativas, para lo cual se utiliza un monocromador secundario, o de emisión, y un detector que se encuentra a un ángulo de  $90^\circ$  con respecto a la luz incidente. A la salida del fotodetector se amplifica la corriente que es proporcional a la energía de fluorescencia (Sauceda 2003).

En espectrofotometría, la fuente y el detector están orientados a  $180^\circ$ , por lo que en todo momento existe una señal electrónicamente considerable. La radiación absorbida se mide indirectamente. En espectrofluorometría, la señal de luz se mide de una forma directa, es decir, no es necesario restar la radiación proveniente de la fuente a la radiación emitida por la muestra, porque el detector está orientado a  $90^\circ$  de la fuente y no la puede "ver". Es por eso que las mediciones de fluorescencia son mediciones absolutas. La señal de salida puede ser controlada ajustando la intensidad de la fuente, variando las rendijas del monocromador, o controlando la amplificación a la salida del detector.

#### *FUENTES DE INTERFERENCIA EN FLUORESCENCIA*

La intensidad de fluorescencia de la muestra es sensible a los siguientes factores:

- *Descomposición fotoquímica.* La luz ultravioleta incidente en la muestra puede causar cambios fotoquímicos o la destrucción del compuesto fluorescente, provocando un decaimiento gradual en la intensidad de fluorescencia. Para evitar esta situación es necesario utilizar la mayor longitud de onda posible en la excitación del compuesto y exponer lo menos posible la muestra a la radiación incidente y a la luz UV del ambiente.
- *Viscosidad.* La fluorescencia de un compuesto es mayor en medios más viscosos. En éstos, la energía de transferencia en una solución (procesos no fluorescentes) decrecen por una reducción en los procesos colisionales.
- *Apagamiento ("quenching").* Este es un proceso en el cual existe una competencia entre la emisión de radiación fluorescente y la formación de una especie no

**fluorescente a partir del fluoróforo y otra sustancia presente en el medio. Este fenómeno puede ser utilizado intencionalmente, para hacer evidente la interacción del fluoróforo con otra especie, o bien puede ser una interferencia no deseada en la medición. (Lakowicz, 1999)**

## **OBJETIVOS**

### **GENERALES**

- Estudiar la transición alostérica de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* mediante el uso de técnicas fisicoquímicas y moleculares en busca de señales cuaternarias puras.

### **PARTICULARES**

- Construir una mutante sitio específica en el residuo K234W.
- Llevar a cabo un estudio cinético de la mutante elaborada bajo diversas condiciones y posteriormente comparar con las características cinéticas de la enzima silvestre, para validarla como modelo.
- Estudiar los cambios conformacionales por espectroscopia de fluorescencia de emisión del Trp234.

## JUSTIFICACIÓN

La transición alostérica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa se ha descrito como un cambio estructural entre dos conformaciones estáticas. Sin embargo, tanto los mecanismos que la originan como ruta del cambio cuaternario no han sido comprendidos. La cristalografía de proteínas nos ofrece la visión de los estados inicial y final de este cambio estructural pero no nos indica la presencia de conformaciones intermedias entre los estados T y R. Por el contrario, la fisicoquímica nos puede dar indicios de la existencia de tales estados intermediarios mediante señales asociadas únicamente a los cambios cuaternarios. Las señales que se pueden utilizar para este fin son la fluorescencia, resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular. La experiencia con el dicroísmo circular dentro de nuestro grupo ha mostrado que el cambio cuaternario no puede ser seguido por esta técnica debido a la complejidad de la señal. La fluorescencia de la enzima silvestre es difícil de analizar debido a la presencia de varios residuos fluorescentes en diversas regiones de la proteína. La construcción de mutantes que conservan el comportamiento cinético de la enzima silvestre, pero que sólo poseen un grupo fluorescente en una región específica de la molécula, nos puede dar información sobre el cambio estructural cuaternario. El residuo Lys234 se encuentra en la interfase entre dos monómeros de la enzima, pero suficientemente alejado del sitio de unión de activador y no ha sido asociado a interacciones críticas para el funcionamiento de la enzima. Por esta razón se mutó la posición 234 cambiándola por un residuo de Trp. Esta mutación se realizó en un gen cuyos residuos naturales de Trp habían sido previamente cambiados por residuos de Tyr. La caracterización cinética de esta mutante, que

llamamos W234, nos permitirá validarla como un buen modelo para extrapolarlo a la enzima silvestre.

## **METODOLOGÍA Y MATERIAL**

### ***REACTIVOS***

La mayoría de las sustancias químicas fueron compradas en Sigma-Aldrich S.A de C.V., México. El activador alostérico, GlcNAc6P, fue preparado por acetilación de la GlcN6P con anhídrido acético y se purificó por cromatografía de intercambio iónico como lo describen Rogers y col. (1988).

El inhibidor competitivo 2-amino-2-desoxi-D-glucitol 6-fosfato, GlcN-ol-6P, fue sintetizado por reducción de GlcN6P con borhidruro de sodio y se purificó por cromatografía de intercambio iónico como ha sido descrito anteriormente (Rogers y col. 1988).

### ***PLÁSMIDOS Y MUTAGÉNESIS.***

Se utilizó el vector pTZ18R con un inserto de DNA conteniendo una copia del gen *nagB* con 2 mutaciones previas para cambiar los residuos de triptofano naturales (Trp15 y Trp224). A este plásmido le denominamos pTZ18R*nagBW-*. Con este plásmido se llevó a cabo una mutagénesis sitio-específica por PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos de acuerdo al método de Kunkel descrito por Sambrook y col. (1989). Los oligonucleótidos usados para cambiar el codón de Lys234 por uno correspondiente a Trp (AAA-TGG) fueron:

FK234W 5'-AACTGCATCCGTGGGCGATCA'TGG-3'  $\Delta G^{\circ}_{FH}$  -6.5 kcal/mol,  $T_m$  61 °C.

RK234W 5'-ATGATCGCCACGGATGCAGTTGC-3'  $\Delta G^{\circ}_{FH}$  -6.9 kcal/mol,  $T_m$  61 °C.

La mutagénesis se realizó utilizando la enzima *Pfu* polimerasa, la reacción contiene desoxinucleotidos trifosfato. Para la digestión del plásmido pTZ18RnagBW- se utiliza *DpnI*. El programa de termociclado usado se describe a continuación:

Paso	Temp(°C) / tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 / 3 min	1
Desnaturalización	95 / 1 min	25
Hibridación	55 / 1 min	
Polimerización	68 / 10 min	
Extensión final	68 / 15 min	1

Se utilizó el *kit* Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA, E.U.A). Se transformó el producto PCR en células competentes de *E. coli* epicurian XL- blue de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente los plásmidos resultantes se secuenciaron para verificar la mutación.

### TRANSFORMACIÓN

El vector que lleva el gen de la enzima mutante se utilizó para la transformación de una cepa de *E. coli* 1BPCS90, la cual es  $\Delta nag$  y  $\Delta lacI$ . Esta cepa no expresa la glucosamina-6-fosfato desaminasa silvestre, mientras que la mutante expresa de manera constitutiva al estar bajo el control del promotor *lac*. El plásmido pTZ18RnagBK234W se usó para

transformar células competentes de *E. coli* IBPC590 por electroporación utilizando el electroporador *gene pulser II* (BIORAD). Las células se sometieron a un solo pulso de 4 mseg a 2.5 KV, con una capacitancia de 25  $\mu\text{F}$  y una resistencia 200 W. Estas condiciones generan un campo eléctrico de 12.5 KVcm<sup>-1</sup>. Para permitir la expresión del gen de resistencia se incubó durante 1 hora a 37°C en medio SOC a 250 rpm y posteriormente se sembró en placas de agar LB (Luria Bertrani) adicionado de ampicilina a una concentración final de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### *EXPRESIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE EN E. coli*

Se inocularon tubos de 10 mL de caldo LB con ampicilina 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se incubó a 37°C en una agitadora orbital a 200 rpm durante 12 h. Posteriormente se utilizó este cultivo para inocular matraces Erlen-Meyer de 250 ml con 100 mL del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones durante 3 h. Este cultivo se utiliza para inocular matraces Erlen-Meyer de 2 L conteniendo 1 L del mismo medio y se cultiva a 30°C durante 6 h a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 1.

#### *PURIFICACIÓN DE LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA*

Las células se centrifugaron a 25,000g durante 10 min a 4°C y se lavan con 250 mL de KCl 0.15M frío y se centrifuga en las mismas condiciones. Las células lavadas se resuspendieron en un amortiguador de Tris 50 mM, pH 8, EDTA 10 mM a 4°C y se rompen por sonicación a 4°C. Se utiliza un sonicador marca Cole Parmer, llevando a cabo 20 pulsos de 20 s con una amplitud de 40 %. Este procedimiento se realiza dejando reposar las células durante 30 s entre cada pulso para evitar un aumento en la temperatura

y la generación de burbujas ya que esto implica desnaturalización de proteínas. Se centrifuga a 27.000 g para quitar restos celulares y al sobrenadante se le agrega sulfato de amonio hasta obtener una saturación del 40 %, nuevamente se centrifuga en las mismas condiciones y se satura el sobrenadante con sulfato de amonio al 55% para precipitar nuestra enzima y posteriormente purificarla.

Se lleva a cabo la purificación por cromatografía de afinidad, es decir se hace pasar el sobrenadante a través del material cromatográfico, que tiene moléculas de GlcN6P unidas a agarosa-ácido 6-amino-*n*-hexanoico por el grupo amino de manera que se asemejan al activador alostérico. La proteína deseada se une al ligando inmovilizado mientras que las demás son sustancias eliminadas de la columna. La proteína deseada puede recuperarse, en forma pura, variando las condiciones de elución de modo que se libere la proteína de la matriz cromatográfica.

La GlcN6P desaminasa fue eluida con GlcNAc6P a una concentración 10 mM. La fracción con actividad se precipitó con sulfato de amonio hasta obtener una saturación de 55%. Posteriormente se dializó con un buffer de Tris 50 mM (pH 7.5), durante 4 horas. Se verificó la pureza de la enzima por SDS-PAGE.

#### *CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA*

Para determinar la concentración de esta mutante se midió la absorbividad molar a 278 nm ( $\epsilon_{278}$ ) mediante la reacción de los residuos de cisteína con 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB). La enzima nativa en ausencia de ligandos presenta dos residuos de cisteína reactivos con DTNB. Esto permite calcular su concentración basándonos en el

cambio de absorbancia de la muestra a 412 nm por la liberación estequiométrica (1:1) de 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) cuyo  $\epsilon_{412}$  es de  $0.01414 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .

#### *DETERMINACIÓN DE VELOCIDAD ENZIMÁTICA*

La determinación de actividad de la enzima fue hecha en la dirección a la formación de Fru6P en una mezcla de reacción de 200  $\mu\text{l}$  que contiene Tris-HCl (pH 7.7) 100 mM, EDTA 25 mM; una concentración variable de GlcNAc6P y una concentración variable de sustrato, GlcN6P. La reacción fue iniciada por la adición de la enzima y la mezcla se incubó a 30 °C. La reacción se interrumpió a los 10 minutos mediante la adición de 2 ml de HCl 10 M. La concentración de fructosa fue determinada por el método de resorcinol de Roe (1934) como lo describe Davis y Gander (1967), pero la lectura espectrofotométrica se realiza a 512 nm. La reacción siempre se llevó a cabo cuidando que se convirtiera menos del 5% del sustrato inicial. Todos los ensayos se realizaron con una concentración de enzima de 1 nM.

La velocidad inicial se calculó bajo diversas condiciones de reacción: en ausencia de activador, y en presencia de diferentes concentraciones de activador; 0.1 mM, 0.5 mM y 1.0 mM. Posteriormente se determinó el efecto inhibitorio de la GlcN-ol-6P a distintas concentraciones de este ligando: 0.5, 2.0 y 4.0  $\mu\text{M}$ . El ensayo de inhibición competitiva se realizó a una concentración saturante de activador alostérico para hacer el análisis de la inhibición en términos del modelo de Michaelis-Menten. A partir de este análisis se calculó la constante de inhibición de este ligando.

## AJUSTE DE LA CINÉTICA

Fueron analizados por regresión no lineal utilizando el programa Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). Dependiendo del experimento se ajustaron los datos a Michaelis-Menten, Hill y/o Monod. El modelo de Michaelis-Menten nos permite saber la  $V_{max}$  y  $K_m$  de la forma R, la ecuación de Hill nos permitió calcular la  $V_{max}$  en condiciones de cooperatividad y con el modelo de Monod podemos obtener los valores de  $c$ ,  $L$ ,  $n$ ,  $V_{max}$  y  $K_m$  del estado R. Para reducir la parametrización de la ecuación de Monod, se sustituyen en ésta, los valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$  de R y  $n$ , que vienen de los ajustes a Michaelis-Menten y Hill. El número de subunidades,  $n$ , es 6.

## FLUORESCENCIA

La fluorescencia intrínseca se midió en un equipo ISS-PCI. Se excitaban los grupos indol de los triptofanos a la longitud de onda de 290 nm, recolectando datos de emisión entre 300 a 400 nm usando tres integraciones por lectura y una lectura por nm, con los controles necesarios. La enzima se usó a una concentración final de 25 mgmL<sup>-1</sup> (1  $\mu$ M) disuelta en un amortiguador de Tris 100 mM y EDTA 25 mM (pH 7.5). Se realizaron 4 cambios en la adición de ligandos: primero el ligando alostérico, GlcNAc6P, y posteriormente a concentración saturante de éste se adicionó el inhibidor competitivo GlcN-ol-6P a concentraciones subsaturantes y saturantes. Se realizó también una curva con GlcN-ol-6P a diferentes concentraciones en ausencia de activador y posteriormente una con inhibidor a concentración saturante adicionando diferentes concentraciones de activador alostérico.

Con los resultados obtenidos se calculó el valor de longitud de onda del centro de masa del espectro,  $\lambda_{p_{centro}}$ , con la siguiente ecuación:

$$\lambda_{p_{centro}} = \frac{\sum_{\lambda=i}^{\lambda=j} (\lambda_{IF} * IF)}{\sum_{\lambda=i}^{\lambda=j} IF}$$

Donde  $IF$  es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda  $\lambda_{IF}$ , para todos los valores de  $\lambda$  que van de  $i$  a  $j$ .

## RESULTADOS

### MUTAGÉNESIS

Se obtuvo un producto de PCR correspondiente al peso molecular del plásmido pTZ18RnagBW-. Este producto de PCR se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* Epicurian Coli XL2-Blue. De estas se seleccionaron 3 colonias y sus plásmidos fueron purificados y el gen *nagB* se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. Una vez que se comprobó que la mutación se encontraba presente en los tres plásmidos pTZ18RnagB234W, se utilizó uno de ellos para transformar células competentes de *E. coli* IBPC590. Esta última cepa es *Anag*, por lo cual no expresa bajo ninguna condición la GlcN6P desaminasa; también es *Alact*, por lo cual no requiere inducción para la sobreexpresión del gen *nagB234W*.

### EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA

El plásmido pTZ18RnagB234W se usó para transformar *E. coli* IBPC590 y posteriormente se llevó a cabo una selección en base a que las colonias bacterianas que contienen el plásmido tienen la propiedad conferida por el gen *amp<sup>r</sup>* de crecer en un medio con ampicilina (derivado de la penicilina), de esta manera sólo obtenemos el crecimiento de las células transformadas. Durante toda la expresión las células se cultivaron en medios con extracto de levadura y peptona, como fuentes de carbono y nitrógeno.

Para el aislamiento de la enzima se separaron las células por centrifugación y se rompieron por ultrasonido y posteriormente se centrifugaron para separar los restos celulares de la fracción de proteína soluble.

La pureza de la enzima se verificó por SDS-PAGE (figura 13) en las diferentes etapas de purificación, desde producción en placa, producción en líquido, después del sonicado, primer sobrenadante de sulfato de amonio, segundo sobrenadante de sulfato de amonio, precipitado del segundo sobrenadante de sulfato de amonio y después de pasar por la columna de afinidad, para monitorear que la enzima esté presente en todos los pasos de la purificación y en caso de no encontrarse saber en que paso se retuvo o perdió la actividad. Se utilizó la enzima silvestre como referencia. Los resultados de pureza se presentan en la figura 13. En el carril 3 comprobamos que efectivamente se sobre expresó la *GlcN6P* desaminasa. En el carril 5 observamos una pequeña cantidad de *GlcN6P* desaminasa y una gran cantidad de proteínas con otro peso molecular, lo que nos indica que en este paso no se perdió enzima y por lo tanto se puede eliminar el segundo sobrenadante de sulfato de amonio. En el carril 7 se observa sólo una banda con la misma movilidad electroforética que la referencia, indicándonos que se llevó a cabo una buena purificación. Para comprobar que la proteína obtenida es la *GlcN6P* desaminasa mutante se realizó una prueba rápida de actividad consiguiendo un resultado satisfactorio.



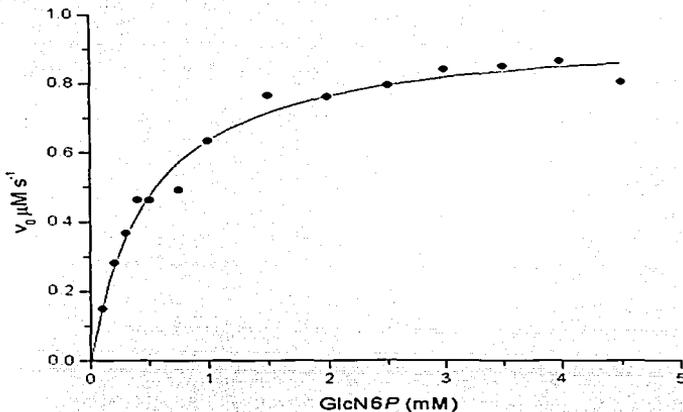
**Figura 13. SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación de la mutante 234W de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. 1) y 8), enzima silvestre; 2) producción en placa; 3) producción en líquido después del sonicated; 4) primer sobrenadante de sulfato de amonio; 5) segundo sobrenadante de sulfato de amonio; 6) precipitado de sulfato de amonio; 7) después de pasar por la columna de afinidad.**

El volumen de enzima total purificada fue de 25 ml. A ésta enzima se le calculó la absorptividad molar, el valor de  $\epsilon_{278}$  para esa mutante resultó ser de  $0.1338 \cdot 0.0067 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}$ , que es bastante menor que el  $0.2002 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ , que presenta la enzima silvestre debido a la eliminación de dos triptofanos y la adición de uno nuevo en otro sitio.

#### **CARACTERIZACIÓN CINÉTICA**

La caracterización cinética de la enzima mutante W234 nos proporciona información sobre el comportamiento catalítico de la enzima, lo que nos permite saber si es un buen modelo de la enzima silvestre. Inicialmente se realizó un estudio de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato, adicionando el activador alostérico a una concentración saturante para inducir la transición alostérica y que toda la enzima se encuentre en su conformero R. Al tener toda la enzima en su conformero estructural R, obtenemos un comportamiento cinético hiperbólico, que se puede analizar por medio de

la ecuación Henri-Michaelis-Menten, a partir de la cuál podemos calcular la  $K_m$  y la  $k_{cat}$  para el estado R (Figura 14 ).

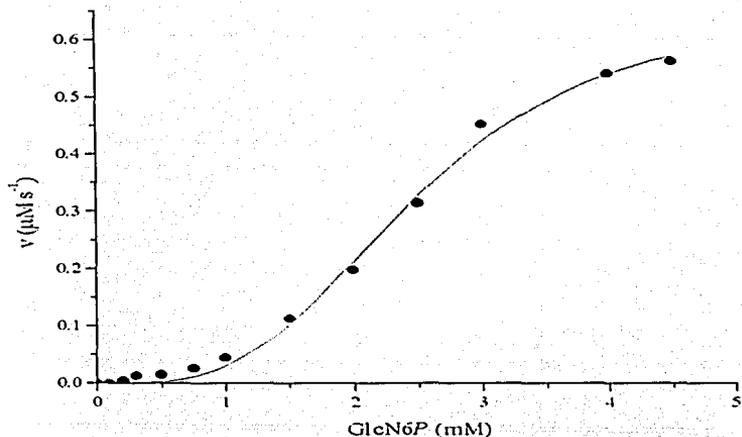


**Figura 14. Patrones de velocidad inicial vs concentración de sustrato para la mutante W234. En presencia de 1 mM de GlcNAc6P. Datos ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. pH 7.5, Temperatura 30 °C.**

La constante de disociación del complejo enzima-sustrato,  $K_m$ , para la mutante W234 es de 0.498 mM. La enzima silvestre presenta una  $K_m$  de 0.55 mM, valor que es prácticamente idéntico al de la enzima mutante. No se esperaba un cambio drástico en el valor de ésta constante debido a que las tres mutaciones se encuentran en lugares lejanos al sitio activo. La constante catalítica para la mutante es de 953  $\text{s}^{-1}$  por hexámero, que

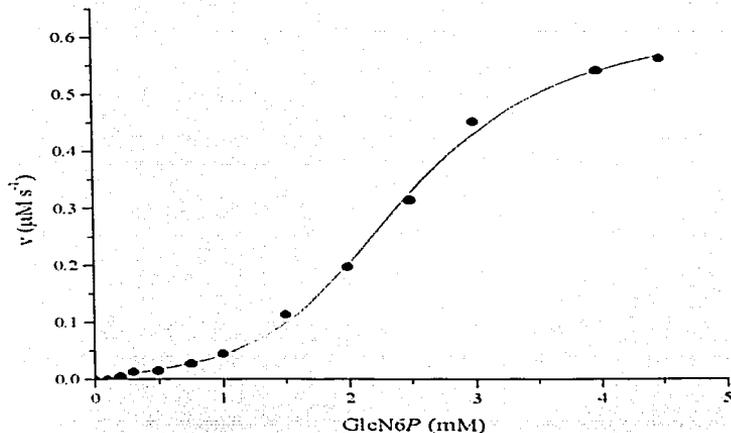
corresponde a  $159 \text{ s}^{-1}$  por sitio activo. Este valor concuerda con el valor obtenido para la enzima silvestre que es de  $158 \text{ s}^{-1}$ , lo que implica que, al menos para el estado R, la mutante es prácticamente igual a la enzima silvestre.

La enzima silvestre presenta cooperatividad homotrópica por el sustrato. Para estudiar la cooperatividad en la mutante W234, estudiamos la cinética en ausencia de activador alostérico obteniendo el patrón observado en la figura 15. Es notoria la cooperatividad homotrópica que presenta esta enzima. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill para calcular la  $V_{\max}$ ,  $S_{0.5}$  y el número de Hill ( $h$ ). Contrario a lo esperado obtuvimos una  $V_{\max}$ , y por lo tanto una  $k_{\text{cat}}$ , menor que en el caso de la enzima saturada con activador alostérico. Esto implica que la mutante W234 es un sistema alostérico mixto, en contraste con la enzima silvestre que es un sistema K puro. Esta diferencia entre las velocidades máximas en presencia y ausencia del activador alostérico nos hacen pensar que, de alguna manera desconocida, el conformero R formado sólo con sustrato, en ausencia de activador alostérico, es catalíticamente distinto del conformero R formado con el activador alostérico. La  $k_{\text{cat}}$  en este caso es de  $111 \text{ s}^{-1}$  por sitio, que es 30 % menor que para la enzima saturada de activador. La  $S_{0.5}$  es de 2.5 mM, mientras que  $h$  es de 3.26. La GlcN6P desaminasa silvestre presenta una cooperatividad vista a través del número de Hill de 2.9, en lo que consideramos que no hay diferencia significativa con la triple mutante. No ocurre lo mismo con la  $S_{0.5}$ , cuyo valor para la enzima silvestre es de 5.5 mM, aproximadamente el doble. La variación aparentemente indica que las fuerzas que mantienen la enzima en el estado T se debilitaron por las mutaciones efectuadas. Es claro que esto deberá reflejarse en los parámetros  $L$  y  $c$  de la ecuación de MWC.



**Figura 15. Patrón de velocidad inicial vs concentración de sustrato para la mutante W234, en ausencia de GlcNAc6P. Datos ajustados al modelo de Hill.**

Para obtener parámetros importantes como la constante alostérica,  $L$ , constante de fijación no exclusiva para el sustrato,  $c$ ,  $K_R$  y  $K_T$  se ajustan los datos obtenidos anteriormente a la ecuación general para el modelo Monod-Wyman-Changeux. El ajuste se muestra en la figura 16.



**Figura 16. Patrón de velocidad inicial  $v$  vs concentración de sustrato para la mutante W234, en ausencia de  $\text{GlcNAc6P}$ . Gráfica ajustada al modelo de Hill.**

La constante de equilibrio  $L$  para la interconversión entre los estados R y T de nuestra mutante en ausencia de ligando es de  $2.05 \times 10^4$  valor que nos indica que tenemos una curva menos sigmoide y por lo tanto un comportamiento de la enzima menos cooperativo que la enzima silvestre ya que el valor de  $L$  en ésta es de  $1 \times 10^6$ . La constante  $c$  obtenida para la mutante (0.026) es prácticamente igual a la silvestre (0.025) lo que significa que la afinidad del sustrato en el estado T con relación al estado R es igual en los dos casos. La  $K_R$  obtenida es la constante de disociación del sustrato en el estado R, la cual tampoco varía significativamente. La disminución del valor de la constante  $L$  sin

cambio en el valor de  $c$  implica que el cambio observado en la  $S_{0.5}$  debe obedecer a un desplazamiento del equilibrio T-R en dirección al estado R.

La enzima se caracterizó cinéticamente a distintas concentraciones de activador encontrando el perfil mostrado en la figura 17.

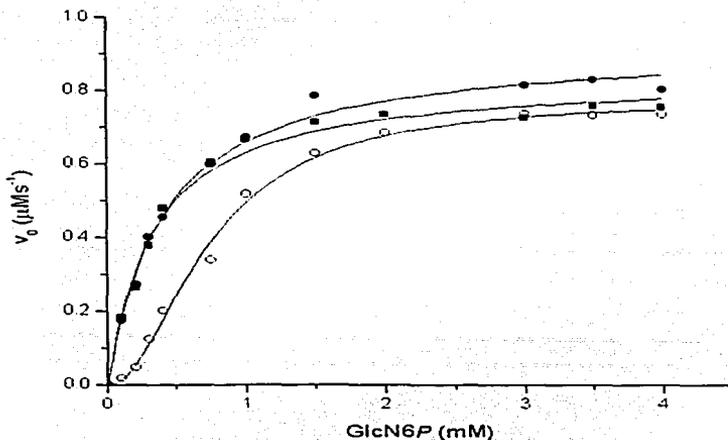


Figura 17. Patrón de velocidad inicial vs concentración de sustrato para la mutante W234 a las siguientes concentraciones de  $\text{GlcNac6P}$  (○) 0.1 mM, (●) 0.5 mM y (■) 1.0 mM.

Como es notorio a una concentración baja de activador obtenemos una curva sigmoideal pero con una  $V_{max}$  de  $0.77 \mu\text{Ms}^{-1}$  y un valor de Hill de 1.9, lo que nos indica que hay una pérdida en la cooperatividad homotrópica y una  $V_{max}$  mayor, en comparación con los datos obtenidos con ausencia de activador.

A una concentración sobre saturante de activador se observa una curva hiperbólica, con una caída al final, a lo que podemos atribuir que a altas concentraciones de activador alostérico, éste puede actuar como inhibidor competitivo.

Se realizó una cinética a diferentes concentraciones de GlcN-ol-6P (Figura 18), el cual se ha demostrado cristalográficamente que actúa como inhibidor competitivo ya que se une a la enzima en el sitio activo (Oliva y col., 1995).

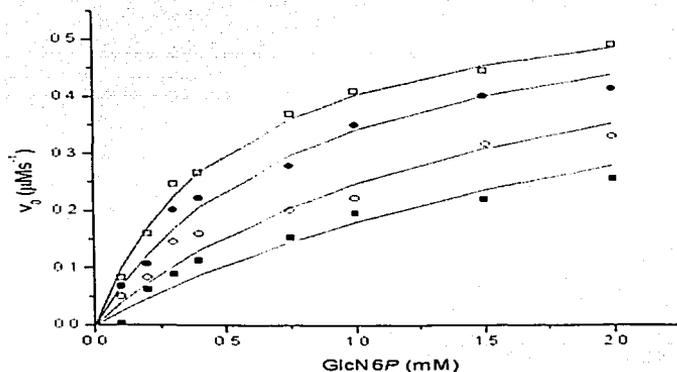


Figura 18. Patrón de velocidad inicial  $v_0$  concentración de sustrato para la mutante W234, en presencia de las siguientes concentraciones de inhibidor competitivo (□) 0.0  $\mu\text{M}$ , (●) 0.5  $\mu\text{M}$ , (○) 2.0  $\mu\text{M}$  (■) 4.0  $\mu\text{M}$ .

El inhibidor competitivo se une exclusivamente a la enzima libre, compitiendo por el GlcN6P, por tanto, el equilibrio de formación del complejo ES se verá desplazado hacia la izquierda, disminuyendo aparentemente la afinidad del sustrato por la enzima, es decir, aumentando el valor de  $K_m$ . Por esta razón observamos que la  $K_m$  aumenta ( $K_m^{app}$ ) conforme la concentración de inhibidor aumenta. La  $V_{max}$  no se altera, y es cuestión de poner mayor cantidad de sustrato para conseguirla. La linealidad en el gráfico de  $K_m^{app}$  contra concentración de inhibidor, nos indica que realmente se trata de un inhibidor competitivo. A partir de la pendiente de esta gráfica ( $K_m/K_i$ ) se puede calcular la  $K_i$  (Figura 19).

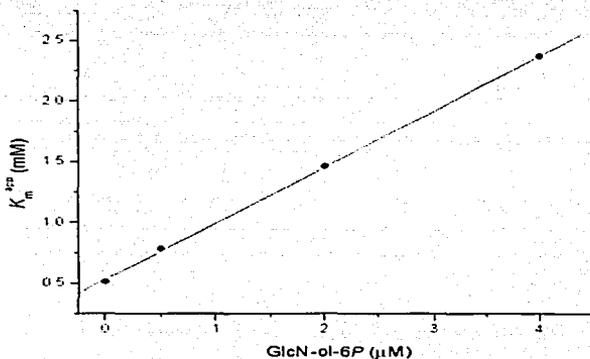


Figura 19.  $K_m^{app}$  vs diferentes concentraciones de inhibidor competitivo .

## RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

**TABLA 1.- Datos obtenidos de la gráfica ajustada a los modelos de Henri-Michaelis-Menten y Hill**

Enzima	SIN ACTIVADOR			CON ACTIVADOR		
	$S_{0.5}$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$h$	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_I$ (μM)
Silvestre	5.5 ± 0.2	158 ± 8	2.9 ± 0.1	0.55 ± 0.05	158 ± 8	2.2 ± 0.18
W234	2.49 ± 0.1	109 ± 6	3.3 ± 0.3	0.50 ± 0.05	159 ± 7	1.2 ± 0.11

**TABLA 2.- Datos obtenidos del ajuste al modelo MWC**

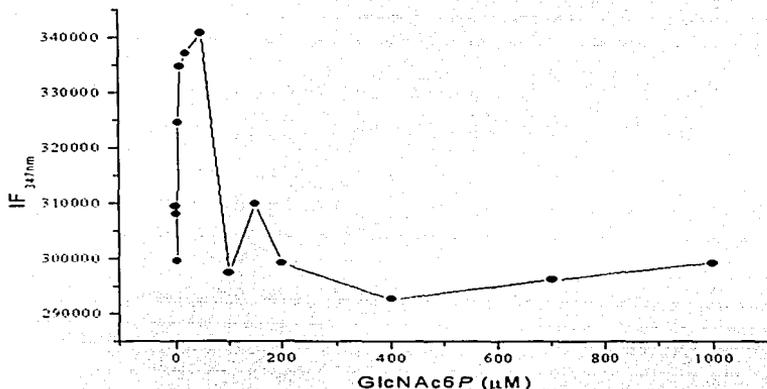
Enzima	$K_R$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$S_{0.5}$ (mM)	$L$ (x10 <sup>6</sup> )	$K_I$ (mM)	$c$
Silvestre	0.55 ± 0.05	158 ± 8	5.5 ± 0.2	1.0 ± 0.019	22.0 ± 2	0.025 ± 0.0002
W234	0.49 ± 0.06	109 ± 6	2.4 ± 0.11	0.2 ± 0.001	19.9 ± 3	0.026 ± 0.0002

Después del estudio cinético pudimos observar que la mutante W234 tiene un comportamiento muy parecido al de la enzima silvestre, comprobando que la mutación contenida altera su comportamiento comparando con la silvestre, por lo tanto se realizó el estudio de fluorescencia. Esto es asumiendo que los cambios de fluorescencia estarán asociados a la transición alostérica.

### FLUORESCENCIA

Las pruebas preliminares indicaron que se debería usar una excitación a una longitud de onda de 290 nm y que el espectro de emisión mostraba cambios significativos en la zona de 300 a 350 nm aunque originalmente se hizo de 300 a 400 nm.

El primer paso consistió en evaluar el efecto del activador alostérico, *N*-acetil glucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Se probaron distintas concentraciones crecientes en el rango en que se observan cambios cinéticos.



**Figura 20.** Intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de 347 nm en función de la concentración de GlcNAc6P en la mutante W234. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.

En la Figura 20 podemos observar dos tendencias claramente definidas. A concentraciones bajas de activador hay un aumento en la intensidad de fluorescencia (IF) mientras que al pasar la concentración de 50 μM, el comportamiento se invierte produciendo una caída de IF a medida que aumenta la concentración de GlcNAc6P, hasta volverse aparentemente asintótico. La fluorescencia puede analizarse directamente por su

cambio de intensidad a una longitud de onda o por la longitud de onda de emisión promedio ( $\lambda_{prom}$ ), los espectros de  $\lambda_{prom}$ , presentan un comportamiento bifásico similar al observado para la IF (figura 21).

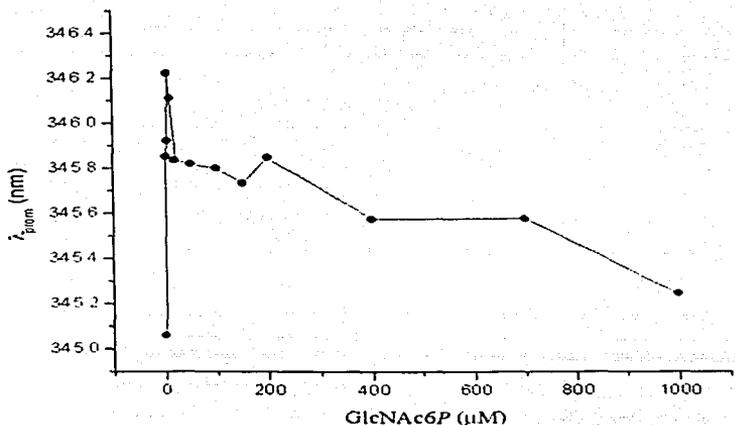


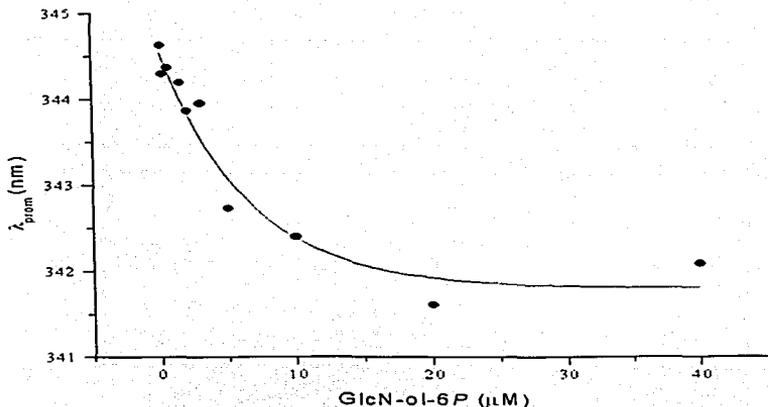
Figura 21. Efecto de la adición de GlcNAc6P sobre la longitud de onda promedio para la mutante W234. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.

De las gráficas anteriores suponemos que el primer cambio de IF como de  $\lambda_{prom}$  a bajas concentraciones de activador está asociado a un cambio cuaternario ya que debido a los estudios cristallográficos previos asumimos que la unión de una sola molécula provoca el cambio cuaternario. En consecuencia la unión de unas pocas moléculas deberían de llevar toda la población de hexámeros a la forma R. El cambio en la intensidad de fluorescencia

es muy probable que se relacione con la movilidad del residuo de triptofano, aunque éste no se encuentre en el sitio alostérico. La interfase donde se localiza el residuo W234 sufre movimientos ocasionados por la transición alostérica. Esto aparentemente se corrobora con la gráfica de  $\lambda_{\text{prom}}$  ya que se relaciona con el ambiente electrónico y en la gráfica se muestra cómo con poca cantidad (0-5  $\mu\text{M}$ ) de activador la  $\lambda_{\text{prom}}$  aumenta por lo que pensamos que el ambiente electrónico cambia por la transición cuaternaria.

En las dos gráficas anteriores se observa una caída tanto de IF como de  $\lambda_{\text{prom}}$  arriba de una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y asumimos que a esa concentración ya terminó la transición alostérica y que la enzima ya no sufre cambios cuaternarios, aunque podría ser que la unión del activador alostérico en los otros sitios alostéricos si produzca cambios en la proteína. Estos cambios no serían tan drásticos para provocar un gran movimiento del triptofano. Cuando la IF se mantiene constante asumimos que los sitios alostérico se han llenado y por lo tanto no hay ningún movimiento que ocasione el cambio de la IF.

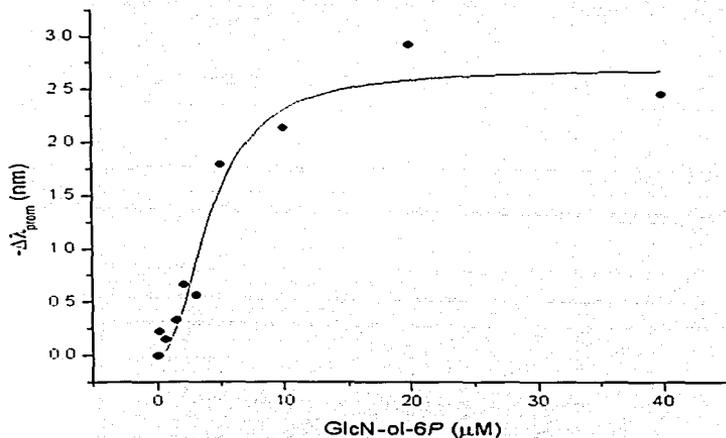
Para poder realizar una comparación se realizó una curva con concentraciones de inhibidor competitivo crecientes. La gráfica de IF no muestra cambios significativos lo cual podría deberse a que el llenado del sitio activo no afecta en el movimiento del triptofano debido a que éste se encuentra alejado del sitio. Sin embargo, sí hay un cambio en la  $\lambda_{\text{prom}}$  porque al ocurrir la transición alostérica el ambiente electrónico se debe de modificar cuando la subunidad vecina se acerca al llegar a la conformación R (Figura 22).



**Figura 22. Efecto de la adición de GlcN-ol-6P sobre la longitud de onda promedio para la mutante W234 . El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

La figura 22 nos muestra que hay un cambio hacia valores de longitud de onda menores lo que nos indica que hay un incremento en la energía de emisión. Este cambio se atribuye a que la transición alostérica esta ocurriendo más, con éste experimento no podemos determinar cuanto sitios activos se llenaron antes de que ocurriera el cambio conformacional. Tampoco se puede saber si la disminución de  $\lambda_{prom}$  es provocado por la unión de ligandos en el sitio activo después de la transición alostérica formando un ambiente más hidrofóbico para el residuo 234 o simplemente el triptofano se encuentra tan alejado del sitio activo que no puede captar los cambios terciarios que en él ocurren.

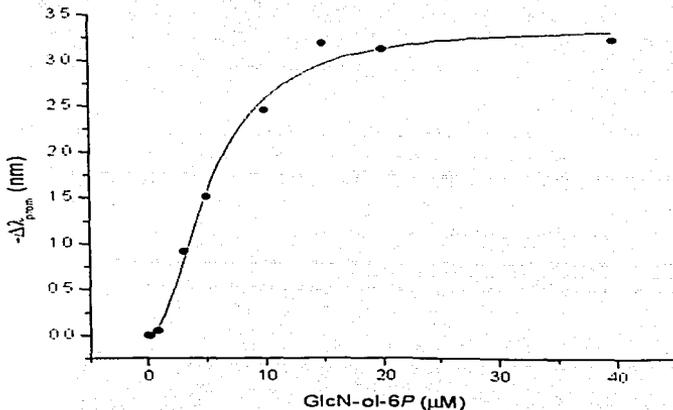
Al analizar la unión de GlcN-ol-6P a esta mutante, a través de  $-\Delta\lambda_{\text{prom}}$  (figura 23), encontramos que presenta un perfil de tipo sigmoide que al ajustarse a la ecuación de Hill tiene un valor de  $h$  de 2.0, indicándonos que existe cooperatividad. Esto implica que el fenómeno de unión del ligando al sitio activo de alguna manera facilita la unión de nuevos ligandos al hexámero, fenómeno que quedó demostrado con el estudio cinético que se presentó en la primera parte.



**Figura 23. Cambio negativo del centro de masa en función de la concentración de GlcN-ol-6P en la mutante W234. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.**

La cooperatividad podría deberse a que al inicio se unen unas cuantas moléculas de inhibidor pero no ocurre la transición alostérica. Al aumentar la concentración de GlcN-ol-6P se produce el cambio cuaternario y podemos observar una disminución de casi 3 nm en la  $\lambda_{\text{punto}}$  del espectro. Este cambio puede ser una señal interesante para seguir la transición cuaternaria en estudios de cinética rápida.

Al hacer el experimento a concentración saturante de GlcNAc6P y agregando distintas concentraciones de inhibidor competitivo se obtuvo el comportamiento observado en la figura 24.



**Figura 24.** Cambio negativo del centro de masa en función de la concentración de GlcN-ol-6P con una concentración saturante de GlcNAc6P en la mutante W234. El ensayo se realizó a 30 °C y pH 7.5.

El cambio observado en la gráfica anterior no se puede atribuir a la transición alostérica ya que desde el inicio se induce ésta por la presencia del activador alostérico. La caída de  $\lambda_{\text{prim}}^{\text{prim}}$  que se observa debe ser ocasionada por la unión del GlcN-ol-6P en el sitio activo. El sitio activo de esta enzima está conectado al sitio alostérico a través del motivo de la tapa del sitio activo, como se mencionó en la introducción. Es factible que la unión al sitio activo altere las interacciones de la enzima en la interfase debido a cambios terciarios inducidos en la región del sitio activo y transmitidos hacia el sitio alostérico. Suponemos que la disminución de la  $\lambda_{\text{prim}}^{\text{prim}}$  implica la generación de un ambiente hidrofóbico para el residuo Trp234. Un hecho interesante es la presencia de cooperatividad que se observa en la figura 24 ( $h= 1.9$ ). Esta cooperatividad no se puede explicar en términos de la transición alostérica, ya que como se había mencionado en un principio ya ocurrió por la presencia del activador alostérico. Es posible que la cooperatividad que se observa sea una señal generada por el ajuste inducido en el sitio activo, que refleja las interacciones que dispararían la transición alostérica desde el sitio activo. Es posible que este efecto no sea visible en cinética debido a que no produce cambios de  $K_m$  ni de  $k_{\text{cat}}$  apreciables.

Posteriormente se probó con una concentración saturante de inhibidor competitivo a fin de tener el sitio activo ocupado y producir la transición T-R con el sitio alostérico vacío. En estas condiciones la enzima se tituló con activador alostérico encontrando que no hay cambios significativos en la IF ni en la  $\lambda_{\text{prim}}^{\text{prim}}$ . Probablemente el cambio cuaternario producido desde el sitio activo haya reducido al mínimo los cambios a los que el residuo W234 es sensible.

La fluorescencia intrínseca de la enzima, pone de manifiesto que el estado R producido a través de unión del activador alostérico ( $R_A$ ) es distinto del estado conformacional con ambas moléculas unidas ( $R_{AS}$ ). También quedó claro que la adición de inhibidor competitivo a la enzima en estado  $R_A$  produce un cambio en su fluorescencia por lo que podemos afirmar que  $R_A$ ,  $R_{AS}$  y R con inhibidor competitivo unido ( $R_S$ ) son tres estados distintos, al menos vibracionalmente, es decir, pertenecen cada uno a un grupo específico de conformeros con muchas similitudes pero ligeramente distintos. Falta discutir la existencia de un cuarto estado que el modelo de Monod-Wayman-Changeux (1965) predice,  $R_0$ , es decir, el estado R sin ligando alguno que se encuentra en equilibrio con la forma  $T_0$ . No podemos asumir la inexistencia de tal estado aunque su abundancia sea mínima comparada con el estado  $T_0$  ( $L = [T_0]/[R_0] = 10^6$ ), aunque tampoco podemos hablar mucho de él ya que no tenemos manera alguna de estudiarlo.

## CONCLUSIONES

Se construyó una mutante con un triptofano en la posición 234 localizada en la interfase de la enzima. En el estudio cinético de esta mutante se muestra un comportamiento semejante al de la enzima silvestre, con lo que comprobamos que la enzima W234 es un buen modelo para estudiar la transición alostérica. Durante este estudio se observó que el conformero R formado con el activador alostérico es catalíticamente distinto al conformero formado por el sustrato en ausencia de activador alostérico.

El estudio de fluorescencia confirma la existencia de varios estados alostéricos R ( $R_S$ ,  $R_A$  y  $R_{AS}$ ), estructuralmente muy similares pero vibracional y catalíticamente distintos. También es segura la existencia del conformero alostérico  $R_0$ . Sin embargo, la existencia de esta especie es difícil de estudiar debido a su baja proporción con respecto al conformero  $T_0$ .

Las señales cuaternarias que se obtuvieron en el experimento de fluorescencia pueden ser utilizadas para buscar la existencia de intermediarios entre los conformeros T y R así como la velocidad a que estos aparecen.

En presencia del activador, las señales que emite el triptofano-234 al llenar el sitio activo obedecen a cambios terciarios que son transmitidos desde el sitio activo hacia el sitio alostérico. Esto corrobora la unión estructural y funcional entre ambos sitios.

Las proteínas poseen una naturaleza flexible y sus posibles estados conformacionales son muchos aún sin sufrir cambios que la hagan perder su identidad funcional (desnaturalización). La señales que medimos a través de nuestras técnicas fisicoquímicas son promedios que asignamos a un estado conformacional, que en realidad es una familia de conformaciones cuyas diferencias están fuera de la sensibilidad de nuestros métodos. En la GlcN6P desaminasa encontramos múltiples conformaciones que nos muestran la complejidad estructural de esta enzima.

## PERSPECTIVAS

Considerando que nuestras técnicas nos dan promedios de poblaciones y no podemos distinguir entre dos moléculas con tres sitios llenos y dos moléculas, una con seis sitios llenos y otra completamente vacía, se podría determinar la relación entre las señales observadas y la estequiometría por medio de curvas de pegue con inhibidor competitivo o activador alostérico marcados radiactivamente.

Las señales descritas en este trabajo pueden servir como modelo para estudiar la dinámica de la transición alostérica a través de cinética rápida, la existencia de intermediarios y la velocidad del o de los procesos de dicho cambio cuaternario.

También se podrían generar mutantes la cuales se modificaran con otro tipo de fluoróforos y de ese modo tener varias señales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 266-272.
- 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 glucosamina-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **220**, 409-13.
- Arreola, R. (1996). Estudios estructurales sobre la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* y otras especies. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bustos, I. (2001) Estudio de la flexibilidad en el motivo  $\alpha\text{sa}/\beta\text{B}'/\text{helice5}/\alpha\text{sa}/\beta\text{C}'$  (158-187) en la regulación de la glucosamina-6-fosfato de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.
- Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.
- Comb D.G. y Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* **232**, 807-827.
- Drickamer, K. (1991). Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* **67**, 1029-32.
- 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.
- Guilbault, G.G. Practical Fluorescence, Theory, Methods and Techniques, 1973, Marcel Dekker, N.Y., U.S.A.
- 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.
- Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, M. L., Garratt R. C. and Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamina-6-phosphate desaminasa: the structure of the state T at 2.3 Å resolution. *Structure*, **7**, 527-537.
- Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 1999, Plenum Press Pub. Co., U.S.A.

Lara-Lemus, R., Estudio cinetico y caracterizacion molecular de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de corteza renal de bovino. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.

Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C.A., Altamirano, M.M. y Calcagno, M.L. (1992). Purification and characterization of glucosamine-6-phosphate deaminase from dog kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 213-220.

Lara-González, S. (2001). Desencadenamiento y propagación de la transición alosterica en la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.

Lara-González, S., Dixon, H.B.F., 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 desaminasa from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**, 219-227.

Leloir L.F. y Cardini, C.E., (1956). Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 33-42.

Mengin-Leereux, 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.

Midelfort, C. y Rose I.A. (1977). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* **16**, 1590-1596.

Monod, J., Wyman J. y Changeux, J.P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **2**, 88-118.

Montero-Morán, G.M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L.I., Plumbridge, J.A. y Calcagno, M.L. (2001). On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamina-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **40**, 10187-10196.

Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. y 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**, 7844-7849

Natarajan, K., y Datta A. (1993). Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamina-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9206-9214.

Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. y Horjales, E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* **3**, 1323-1332.

Parrington, J. Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., Lai, F.A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* **379**, 364-368.

Plumbridge, J.A. (1989). Sequence of the *nagBACD* operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the *nag* regulon. *Mol. Microbiol.* **3**, 506-515.

Plumbridge J.A. (1992) A dominant mutation in the gene for the Nag repressor of *Escherichia coli* that renders the *nag* regulon uninducible. *J Gen Microbiol.* **138**, 1011-7

Plumbridge, J.A., Cochet, O., Souza, J.M., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L. y Badet, B. (1993). Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacterol.* **175**, 4951-4956.

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.

Robert A. Copeland, Enzymes, 2000, Wiley-VCH, U.S.A.

Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J. y 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.

Rose, I.A. (1975). Mechanism of the aldose-ketose isomerase reactions. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **43**, 491-517.

Rudiño Piñera Enrique. (2001). Estudios estructurales sobre el mecanismo de activación alostérica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Sauceda Peña Jimena. (2003). El ANS (1-anilino-8-sulfonato naftaleno) como sensor de ambientes hidrofóbicos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Wolny Y.M., Fissore R.A., Wu H., Reis M.M., Colombero L.T., Ergün B., Rosenwaks Z., Palermo G.D. (1999). Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca<sup>2+</sup> release in mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev.* **52**, 277-87