

00591



Universidad Nacional Autónoma  
de México

---

---

Instituto de Biotecnología 

Estudios estructurales de dos Glucosaminas 6-fosfato  
desaminasas humanas.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
(DENTRO DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS) PRESENTA:  
RODRIGO ARREOLA ALEMÓN

Cuernavaca, Morelos

Noviembre de 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**TESIS DE DOCTORADO ASESORADA POR :**

**Dr. EDUARDO HORJALES REBOREDO.**

**ESTE TRABAJO ESTA BASADO EN EXPERIMENTOS REALIZADOS EN LAS INSTALACIONES DEL *STANFORD SYNCHROTRON RADIATION LABORATORY (SSRL)*.**

**DOCTORADO REALIZADO CON EL APOYO FINANCIERO DE UNA BECA CONACYT.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco especialmente a Sonia Rojas por su asistencia técnica durante la cristalización de la proteína.**

**A Nabuki Miyajima y J. Plumbridge por facilitar el gen *GNPI*.**

**A Laura I. Álvarez Añorve y al Dr. M. Calcagno por el trabajo de purificación de la enzima.**

**Al Laboratorio Universitario de Estructura LUE por facilitar el uso de los equipos de difracción de rayos X para los ensayos de crió-protección y pruebas de difracción.**

**A los doctores Brenda Valderrama, Gloria Saab, Adela Rodríguez Romero Eduardo Horjales, Enrique Morett, Baltazar Becerril y Ernesto Pérez Rueda por la revisión y sus valiosos comentarios de este trabajo.**

**Agradezco especialmente al Dr. Eduardo Horjales por su paciente guía académica por los sinuosos senderos de la ciencia.**

**Agradezco *muy* especialmente a la Dra. Brenda Valderrama por su oportuna conducción académica.**

**A mi madre y mis hermanos: María Eugenia, Sara Eugenia, Dante, Alejandro, Roberto y Rogelio.**

**A Lorena Chiu ☛**

**A Eduardo Horjales y Stela Araújo.**

**A mis amigos: Humberto Barrios, Sonia Dávila , Brenda Valderrama, Juan Téllez, Ismael Hernández, Viviana Escobar, Ricardo Grande, Ernesto Pérez, Ramón Suárez, Josue Reyes, Enrique Balderas, Luis Ledezma, Olga Monroy, Enrique Rudiño y Paula Gonzalezrubio.**

**A todos ellos gracias por su amistad y cariño**

*"What is real never can be controlled, what can be controlled never is real"*

**Ilya Prigonine**

# Contenido

<b>Contenido</b>	1
Indice de figuras y tablas	3
Resumen	4
Summary	5
<b>Introducción</b>	6
Propiedades cinéticas y alostéricas de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i>	7
La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> vista desde sus estructuras cristalográficas	9
La estructura cristalográfica del conformero R de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i>	9
Propiedades alostéricas en la GlcN6P desaminasa de mamíferos	12
Genética de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i>	12
Fisiología de la vía de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> y variaciones en otras especies	14
Presencia de la GlcN6P desaminasa en otros organismos	15
Fisiología en mamíferos	16
Estructura y regulación de la GlcN6P desaminasa de mamíferos	17
<b>Justificación del trabajo</b>	19
<b>Objetivos</b>	19
<b>Materiales y métodos</b>	20
Purificación de la enzima GlcN6P desaminasa I	20
Cristalización	20
Colecta de datos	22
Integración de datos, reemplazo molecular y construcción del modelo	23
Análisis estructural	24
Modelado computacional de la GlcN6P desaminasa II	25
Búsqueda de secuencias homólogas de la GlcN6P desaminasa	26
Análisis de firmas de secuencia del extremo C-terminal	26
Análisis comparativo de la familia de la GlcN6P desaminasa	26
<b>Resultados. Primera parte: Estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa I</b>	28
Difracción, determinación y afinamiento	28
El hexámero de la GlcN6P desaminasa humana	29
Descripción del plegamiento de la GlcN6P desaminasa	30
El extremo C-terminal	33
Sitio alostérico de la GlcN6P humana	34
El sitio activo	36

El posible canal de entrada del amonio	38
La GlcN6P desaminasa humana tiene 6 monómeros con diferencias conformacionales en la tapa del sitio activo	40
Comparaciones estructurales entre la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> y Humano	42
Hexámeros	42
Monómeros	44
<b>Segunda Parte : La GlcN6P desaminasa II</b>	46
Los genomas de humano y de ratón tienen dos genes de Glucosamina 6-fosfato desaminasa cada uno	46
Modelo computacional de la GlcN6P desaminasa II	48
Análisis de firmas de secuencias del extremo C-terminal	49
<b>Discusión</b>	52
Las dos GlcN6P desaminasas que existen en mamíferos	52
Comparaciones del sitio activo de las subunidades de la GlcN6P desaminasa humana y la enzima de <i>E. coli</i>	55
Modelo estructural del cambio conformacional alostérico de la GlcN6P desaminasa humana	57
<b>Conclusiones de la Primera y Segunda Parte</b>	60
<b>Artículo Publicado con esta tesis</b>	61
<b>Resultados adicionales</b>	69
Relaciones de parentesco entre las GlcN6P desaminasas	70
GlcN6P desaminasas: hexaméricas (alostéricas) y no hexaméricas (no alostéricas)	73
El grupo de la Galactosamina 6-fosfato desaminasa	75
El grupo de la 6-fosfogluconolactonasa	75
Análisis de traza evolutiva: de la GlcN6P desaminasa	76
Análisis de traza evolutiva de la GlcN6P desaminasa y el grupo de la GalN6P desaminasa	80
<b>Discusión resultados adicionales</b>	82
Comparaciones estructurales del plegamiento entre la GlcN6P desaminasa humana, la de <i>E. coli</i> y su relación con el análisis de traza evolutiva	82
La evolución del plegamiento de GlcN6P desaminasa	83
<b>Conclusiones de resultados adicionales</b>	85
<b>Perspectivas</b>	86
<b>Apéndice 1</b> : Especies con una secuencia homóloga a la GlcN6P desaminasas de <i>E. coli</i>	87
<b>Apéndice 2</b> : Conceptos	90
<b>Bibliografía</b>	92

## Índice de Figuras

Figura 1	Estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa de <i>Escherichia coli</i>	8
Figura 2	Sitio activo de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i>	11
Figura 3	Esquema de los operones <i>nag</i> y <i>glm</i> en <i>E. coli</i>	13
Figura 4	Esquema de la vía metabólica de la glucosamina-6-fosfato en <i>E. Coli</i>	15
Figura 5	Pozos de cristalización	21
Figura 6	El hexámero de la GlcN6P desaminasa humana I	29
Figura 7	Topología de la GlcN6P desaminasa humana	31
Figura 8	Topología de un plegamiento tipo Rossmann	32
Figura 9	El extremo C-terminal de la GlcN6P desaminasa humana I	33
Figura 10	Densidad electrónica del activador alostérico	35
Figura 11	Sitio activo de la GlcN6P desaminasa I	37
Figura 12	El posible canal de entrada del amonio	39
Figura 13	Diferencias conformacionales entre las distintas tapas del sitio activo	41
Figura 14	A) Comparación entre hexámeros de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> y humano B) Sobreposición estructural entre monómeros de 1HOT y 1NE7	43 43
Figura 15	Alineamiento de los productos peptídicos de los genes <i>gnp1</i> y <i>gnp2</i>	47
Figura 16	Figura estereoscópica del modelo computacional de la GlcN6P desaminasa II	49
Figura 17	Modelo de transición alostérica propuesto para la GlcN6P desaminasa humana I	58
Figura 18	Posición de los 19 residuos 100% conservados en las GlcN6P desaminasas	71
Figura 19	Árbol filogenético por máxima parsimonia	74
Figura 20	Reacción catalítica realizada por la 6-fosfogluconolactonasa	76
Figura 21	Residuos 100% conservados y <i>clase específicos</i> localizados con el Análisis de Traza Evolutiva	78
Figura 22	Árbol filogenético construido por TraceSuitII con las secuencias de las GlcN6P desaminasas	79
Figura 23	Residuos obtenidos con el Análisis de traza evolutiva del alineamiento de secuencias entre GlcN6P desaminasas y GalN6P desaminasas	81

## Índice de tablas

Tabla 1	Condiciones de cristalización	22
Tabla 2	Estadística de los datos de difracción	23
Tabla 3	Procedimiento del afinamiento	25
Tabla 4	Estadística del afinamiento cristalográfico	28
Tabla 5	Sobreposición estructural entre hexámeros de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> y humana	42
Tabla 6	Sobreposición estructural entre los monómeros de la GlcN6P desaminasa I humana y de <i>E. coli</i>	44
Tabla 7	Identities entre GlcN6P desaminasas de mamíferos	47
Tabla 8	Marcas de secuencias de expresión (EST) de los genes <i>gnp1</i> y <i>gnp2</i>	48
Tabla 9	Sitio de fosforilación para la proteína Quinasa C en la GlcN6P desaminasa I y II	51
Tabla 10	Sitio de fosforilación para Quinasa de Caseína II (CK-2) en la GlcN6P desaminasa I y II	51
Tabla 11	Medidas de cinética enzimática	54
Tabla 12	Identities de la GlcN6P desaminasas I y II humanas con algunos organismos metazoarios, bacterias y hongos	72
Tabla 13	Comparación de la posiciones de aminoácidos que distinguen GlcN6P desaminasa I de la GlcN6P desaminasa II	73
Tabla 14	Residuos conservados según el Análisis de Traza Evolutiva	80



## Resumen

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (EC:3.5.99.6) cataliza la conversión reversible de glucosamina 6-fosfato a fructosa 6-fosfato y amonio. En este trabajo describimos la existencia de dos glucosamina-6-fosfato desaminasas en mamíferos (GlcN6P desaminasa I y II). Asimismo, presentamos la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa I en complejo con la molécula del inhibidor en el sitio activo (complejo cerrado) a 1.75 Å de resolución. Este cristal pertenece al grupo espacial  $P2_12_12_1$  y presenta un hexámero en la unidad asimétrica. La tapa del sitio activo (residuos del 162 al 182) presenta significativas diferencias conformacionales entre sus monómeros (*variabilidad conformacional*) causado por las interacciones de la Ser43. La comparación con la enzima homóloga de *E. coli*, la región con diferencias conformacionales se ubica cercana al sitio activo. Las diferencias estructurales pueden estar relacionadas con las peculiares propiedades alostéricas diferentes observadas en las enzimas correspondientes de mamíferos. La *variabilidad conformacional* podría deberse a la pérdida de la optimización en el ajuste inducido ("*induced fit*") como una estrategia funcional para lograr una mayor afinidad por el  $\text{NH}_4^+$ . También se propone un posible mecanismo alostérico de la GlcN6P desaminasa I explicando el comportamiento del sistema V.

Adicionalmente, se realizó un estudio comparativo de las secuencias peptídicas de la familia de la GlcN6P desaminasa., basado en un análisis de traza evolutiva (ATE). Los archivos de coordenadas PDB 1DEA (enzima de *E. coli*) y 1N7E (enzima humana) fueron usados para localizar la información del ATE de la familia de la GlcN6P desaminasa. Los resultados muestran que el plegamiento y ya relacionados con la catálisis y unión de los sustratos de la GlcN6P desaminasa son compartidos con las enzimas Galactosmina 6-fosfato desaminasa (GalN6P) y la 6-fosfogluconolactonasa (6PGL). Ambos tipos de enzimas conservan los núcleos de los dominios estructurales y funcionales observados en el plegamiento de la GlcN6P desaminasa. Nosotros proponemos que los plegamientos de las GalN6P y GlcN6P desaminasas surgieron de un plegamiento del tipo de la 6PGL. Los resultados muestran que las proteínas GlcN6P desaminasas de *Eukaryotes* y *Proteobacterias* comparten el tipo de GlcN6P desaminasa de la mitocondria ancestral. Las significativas similitudes entre ambos grupos sugieren que el gen de la GlcN6P desaminasa *Eukaryota* fue transferido al núcleo del hospedero por la mitocondria ancestral endosimbionte. Sobre la GlcN6P desaminasa de *G. intestinalis*, ésta podrían ser del tipo de la enzima ancestral *Eukaryote* debido a la baja identidad con las enzimas actuales de *Eukaryotes* y *Proteobacterias*. Alternativamente el gen de la GlcN6P desaminasa de *Giardia* pudo haber sido transferido horizontalmente desde un grupo de organismos no representados en el ATE.

## SUMMARY

Glucosamine-6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6) is an allosteric enzyme that catalyses the reversible conversion of D-glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) into D-fructose-6-phosphate and ammonium. Here we describe the existence of two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase enzymes (GlcN6P-deaminase I y II). We present the crystallographic structure of one of them, the human GlcN6P-deaminase I in complex with the inhibitor molecule in the active site cavity (closed complex), at 1.75 Å resolution. Crystals belong to space group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> and presented a whole hexamer in the asymmetric unit. The active-site lid (residues 162 to 182) presents significant structural differences among monomers probably caused by interactions of Ser43. Interestingly, the region with the largest differences, when compared with the *E. coli* homologue, was found to be close to the active site. These structural differences can be related to the kinetic and allosteric properties of both mammalian enzymes. The conformational differences in the GlcN6P-deaminase I closed complex was named *conformational variability* which is interpreted as a loss of the optimisation of the *induced fit*. We propose a possible alosteric mechanism for GlcN6P deaminase I which explains the behavior of this V-type allosteric system.

Additionally we performed a comparative study of the sequences of the GlcN6P deaminase protein family, based on an evolutionary trace analysis. The PDB coordinates of the files 1DEA (*E. coli* enzyme) and 1N7E (human enzyme) were used to map the evolutionary trace information of the GlcN6P-deaminase protein family. Our results indicate that the GlcN6P deaminase-fold and aminoacid residues which mediate the catalysis and the binding of the phosphate substrate are shared with Galactosamine 6-phosphate deaminases (GalN6P) and with 6-phosphogluconolactonase (6PGL) enzymes. Both types of enzymes conserve their structural and functional core domains as observed in GlcN6P deaminase-fold. We propose that GalN6P and GlcN6P deaminase-folds might have arisen from an ancestral 6PGL type enzyme. The results indicate that *Eukaryotes* and *Proteobacteria* GlcN6P-deaminases proteins share an GlcN6P-deaminase type protein from ancestral mitochondria. The significant similarities between both groups suggest that *Eukaryote* GlcN6P deaminase gene might have been transferred to host nucleus by the ancestral mitochondrial endosymbiont. Another interesting observation is the *G. intestinalis* GlcN6P deaminases might have been the ancestral *Eukaryotic* GlcN6P deaminase type, this enzyme have low identity with *Eukaryotes* and *Proteobacteria* enzymes. Alternatively *Giardia* might have been acquired the GlcN6P deaminase gene by lateral transfer from an organism not represented in the analysis.

## Introducción

Muchas de las proteínas en eucariotas son modificadas covalentemente (por ej. factores de transcripción y proteínas nucleares) con monosacáridos de N-acetil glucosamina (GlcNAc) en aminoácidos como la serina y la treonina. Los estudios sobre la síntesis y degradación de aminoazúcares tienen sus orígenes en la segunda mitad del siglo XX [1]. En principio, el interés de conocer estas vías metabólicas está fundamentado en el hecho de que un gran número de proteínas son glicoproteínas, que están ampliamente distribuidas y no sólo se encuentran en regiones extracelulares, como son las proteínas sanguíneas o de la pared celular en bacterias, sino que también se encuentran en regiones intracelulares y en las membranas lipídicas de organelos como la mitocondria y el núcleo. Las enzimas implicadas en el metabolismo de GlcNAc son claves para mantener los niveles celulares de N-acetil glucosamina 6-fosfato y dado que este compuesto aparece regularmente en glicoproteínas, se ha propuesto que el estado de *O*-glicosilación en algunas proteínas regula su degradación por el proteosoma en mamíferos [2].

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) es una de las enzimas de la vía metabólica de aminoazúcares, y una de las pocas capaces de verter o emplear nitrógeno directamente del medio celular en forma de  $\text{NH}_4^+$ . Aunque la GlcN6P desaminasa es preferencialmente catabólica en bacterias (reacción de desaminación), en otras especies ésta enzima es biosintética (síntesis de glucosamina 6-fosfato), como en *Giardia intestinalis* y *Musca domestica* [3,4,5]. La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es una enzima alostérica que cataliza la reacción reversible de desaminación de la glucosamina 6-fosfato a fructosa 6-fosfato y amonio. La enzima está clasificada formalmente como EC:3.5.99.6 haciendo referencia a la actividad de una hidrolasa actuando sobre un enlace entre un carbono y un nitrógeno de un grupo amina. La GlcN6 desaminasa estaba clasificada antiguamente como EC:5.3.1.10 en donde se hacía referencia a una actividad de isomerasa, mediante un mecanismo de oxidoreducción intramolecular, que da lugar a la interconversión de una aldosa a una cetosa. Ésta descripción no es correcta, ya que la reacción no es la isomerización de Glucosamina 6-fosfato sino la hidrólisis de un grupo amino. La GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* [6] es una enzima bien caracterizada cinéticamente, también se han realizado estudios cinéticos de las enzimas homólogas de *Canis familiaris* [7], *Bos taurus* [8], *Plasmodium falciparum* [9] y *Candida albicans* [10].

En los últimos años, y debido a los proyectos de secuenciación genómica, se han identificado al menos 40 genes que codifican para probables GlcN6P desaminasas, las cuales abarcan un amplio rango de distribución biológica, desde bacterias hasta mamíferos. Sin embargo, no se han logrado identificar

en arqueas ni en algunas especies de hongos cuyo genoma está totalmente secuenciado, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Por otro lado, se han identificado secuencias parálogas de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* como la Galactosamina-6-fosfato isomerasa [11], que cataliza la conversión de la galactosamina-6-fosfato en tagatosa-6-fosfato y amonio.

**Propiedades cinéticas y alostéricas de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.** El concepto de transición alostérica y el modelo de transición alostérica concertada de Monod (ver apéndice 2 para definición) [12] pueden explicar el mecanismo de regulación de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. El modelo describe el equilibrio termodinámico entre los estados T y R asumiendo que la enzima sigue un equilibrio rápido (figura 1). La cooperatividad homotrópica y la activación de la GlcN6P desaminasa pueden ser explicadas en términos del modelo Monod-Wyman-Changeux, MWC (ver apéndice 2 para definición) [6], donde la  $V_{max}$  es independiente de la concentración del activador alostérico, y éste último se enlaza exclusivamente al estado R. Por lo tanto, se puede describir como una enzima alostérica del tipo *K*, la cual puede ser activada de dos formas: primero homotrópicamente por adición de los substratos, glucosamina-6-fosfato o fructosa-6-fosfato, y la segunda heterotrópicamente por adición del activador alostérico N-acetil glucosamina 6-fosfato [13,14,15,16]. Cinéticamente, se han observado el estado T (el menos activo) y el estado R (el activado). Ambos estados cinéticos comprenden conformaciones diferentes y promueven distintos arreglos en la estructura cuaternaria del hexámero. Por cristalografía de rayos X se han observado las dos conformaciones: la conformación R y la conformación T [17,18] (figura 1). La enzima está formada por un homohexámero de 266 residuos por subunidad y 29.7 kDa de masa molecular para cada una de ellas (figura 1). El estado T se caracteriza por tener nula o baja afinidad por los substratos y por el activador alostérico, mientras que el estado R presenta un incremento de su afinidad aparente por éstos (cooperatividad de los substratos). El estado R de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* une el substrato con una  $K_m$  de 2.0 mM [14]. Posteriormente los valores para la  $K_m$  fueron evaluados nuevamente por el mismo grupo de investigación en  $0.75 \pm 0.05$  mM con activador alostérico a saturación [15]. El estado R no presenta diferencias en su  $k_{cat}$  en presencia o ausencia del activador alostérico:  $158 \text{ s}^{-1}$  y  $155 \text{ s}^{-1}$ , ya que las diferencias están dentro del intervalo del error experimental [16]. La enzima también puede realizar la reacción inversa de la desaminación, produciendo glucosamina-6-fosfato a partir de fructosa-6 fosfato y  $\text{NH}_4^+$ . Los valores de la  $K_m$  para ambos substratos en esta dirección de la reacción han sido estimados en 0.9 mM para la fructosa-6 fosfato y 18 mM para  $\text{NH}_4^+$  con una  $k_{cat}$  de  $15 \text{ s}^{-1}$ .

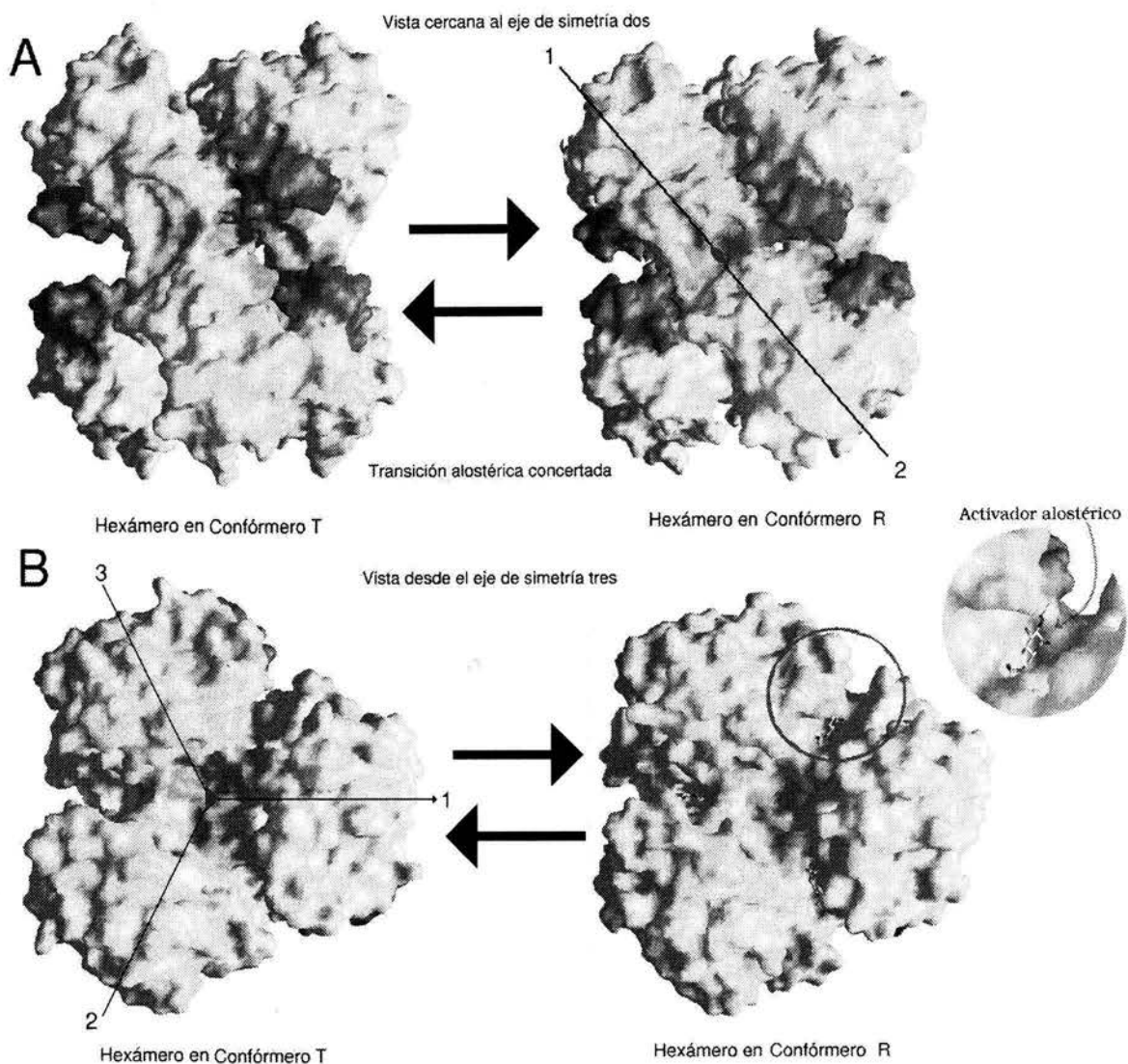


Figura 1.-Estructura cristalográfica del hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* en los conformeros T y R. Los colores representan las regiones funcionales relevantes para la transición alostérica, en azul la zona interna, en amarillo la zona externa y en magenta la tapa del sitio activo (ver texto para detalles). A) La Unidad biológica es un hexámero cuya estructura cuaternaria presenta 3 ejes de simetría de orden dos, donde se organizan 2 monómeros en un dímero por eje de orden dos (representados por números). Aquí se representa la transición concertada de los conformeros T a R. B) El hexámero tiene 3 dímeros organizados perpendicularmente en un eje de simetría tres que produce la formación de 2 trímeros unidos de forma opuesta. Cada trímero tiene representadas sus subunidades por números. Se señala la cavidad (con un círculo rojo) donde se une el activador alostérico entre la interfaz de las subunidades de los trímeros (tomado de la referencia 18).

**La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* vista desde sus estructuras cristalográficas.** Tanto los cambios en la estructura que ocurren con la transición alostérica [17], como la naturaleza estructural del cambio concertado del conformero T al R [18], en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, han sido descritos experimentalmente (figura 1). El hexámero se puede dividir en tres regiones estructurales relacionadas con la transición alostérica: la primera, es la llamada zona externa, que incluye las regiones de la proteína que sufren cambios estructurales importantes en la transición del conformero T al conformero R; la segunda, es la zona interna que comprende las regiones donde se realizan los contactos intermonoméricos del hexámero y está formada por el motivo estructural de trimerización, el asa de dimerización junto con una parte de la hélice 8 y el primer giro  $\beta$  del asa catalítica, donde se ubica la His143; finalmente, la tercera región comprende el motivo estructural de la tapa del sitio activo. La zona interna no sufre cambios conformacionales apreciables durante la transición alostérica del conformero T al conformero R. Durante la transición, la zona externa junto con la tapa de sitio activo sufre un movimiento de cuerpo rígido alrededor de la zona interna, el cual se realiza alrededor de un eje paralelo al eje de orden tres del hexámero. El movimiento de cuerpo rígido de todos los monómeros ensamblados en el hexámero requiere ser coordinado y simultáneo, ya que el modelo de la cinética se ajusta a un cambio de T a R de forma concertada.

El conformero T a 1.9 Å de resolución (código PDB: 1FSF) muestra un alto grado de movilidad o vibración atómica, preferencialmente en torno a un eje paralelo al eje de orden tres y en dirección de la transición alostérica. Esta estructura dio elementos para sugerir la existencia de un estado oscilante del conformero T en dirección de la transición alostérica, hacia el conformero R, cambiando el punto de vista del movimiento de cuerpo rígido de la transición alostérica a un movimiento elástico en oscilación. Según este modelo, el estado T del hexámero oscila coordinadamente con un movimiento elástico en dirección del cambio conformacional donde, eventualmente, el estado R es alcanzado simultáneamente en todos los monómeros del hexámero (de forma concertada también). La tapa del sitio activo es un motivo estructural que rota junto con la región externa pero además presenta una movilidad propia.

**La estructura cristalográfica del conformero R de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.** La GlcN6P desaminasa de *E. coli* era la única enzima de esta familia de proteínas de la cual se disponía de la estructura tridimensional al comienzo de este trabajo de investigación. La estructura se determinó por cristalografía de rayos X a 1.65 Å de resolución [19]. Hasta este momento, se han reportado alrededor de 10 estructuras de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* en los conformeros T y R [17,18] y con base en ellos se han determinado algunas relaciones entre la estructura y la función. El plegamiento

de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* está clasificado en el SCOP [20] como una proteína de la Clase  $\alpha/\beta$ , formada con unidades de estructura secundaria  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  y principalmente con hebras  $\beta$  paralelas. Se subclasifica en el plegamiento de Isomerasa de fosfoazúcares (*Phosphosugar isomerase*) con una estructura de tres capas  $\alpha/\beta/\alpha$  y una capa  $\beta$  de 6 hebras paralelas en orden 321456. Sin embargo, la descripción anterior no es completa y la realizada por los autores de la estructura es más precisa [21]. El plegamiento está formado por una capa  $\beta$  central de 7 hebras paralelas rodeada por 8 hélices  $\alpha$  y una segunda capa  $\beta$  antiparalela de 3 hebras. La topología del plegamiento ha sido descrita también como similar a los dominios de unión a NAD con la inserción de tres regiones [21]. La descripción permite dividir a la enzima en regiones relacionadas con sus funciones las cuales se representan con colores particulares (figura 2). Las regiones adicionadas están en el extremo N-terminal (del residuo 1 al 35), en el extremo C-terminal (del residuo 235 a 266) y una inserción de 47 residuos (aminoácidos 141 a 188) en la región C-terminal de la primer hebra del segundo motivo de unión a mononucleótido. Un motivo estructural especialmente interesante se forma entre los residuos 161 al 184, denominado como la tapa del sitio activo, y es de gran importancia ya que contiene tanto residuos relacionados con la ligadura al sustrato y la catálisis, como con residuos vinculados a la transición alostérica. Los residuos catalíticos están emplazados en dos zonas funcionalmente distintas dentro de la cavidad catalítica (figura 2). Por un lado la His143, el Asp141 y el Glu148 catalizan la apertura del anillo de piranosa de la glucosamina-6-fosfato (la etapa de catálisis uno). Estos residuos forman parte de un sistema intercambiador de protones [21, 17] donde el anillo de imidazol de la His143 está posicionado y polarizado por los carboxilos del Asp141 y Glu148. El N $\epsilon$ 1 del imidazol ataca el C1 del anillo de piranosa extrayendo un protón y transfiriéndolo al O5, desestabilizando así el enlace entre el C1 y el O5. Estos residuos están localizados en una asa conformada por 3 giros (136 a 151) y una asa del sitio alostérico (152 a 158). Por otro lado, el Asp72 que se ubica en la hebra  $\beta$  A' de la capa  $\beta$  antiparalela promueve la desaminación del sustrato por extracción de un protón del C2 (la etapa de catálisis dos).

En el conformero R la tapa del sitio activo es una estructura flexible que, en ausencia de ligantes, presenta al menos 3 diferentes conformaciones (figura 2). Las dos conformaciones más alejadas del sitio activo (o conformaciones "abiertas") presentan distancias de hasta más de 3 y 7 Å entre sus átomos de C $\alpha$ . Ambas conformaciones representan diferentes estados del movimiento de cuerpo rígido que experimenta la tapa y que inicia en la Thr161 y termina en la Tyr184 [18]. La tercera conformación es geoméricamente muy similar a la conformación catalítica, la cual es observada en otras estructuras de la misma enzima en complejo con sus sustratos e inhibidores en el sitio activo

(fosfato inorgánico, inhibidor competitivo o fructosa 6-fosfato). Entonces, la tapa adopta una conformación única sobre el sitio activo (conformación catalítica o "cerrada"). Este movimiento está propuesto como una forma de regular la  $K_m$  de la enzima.

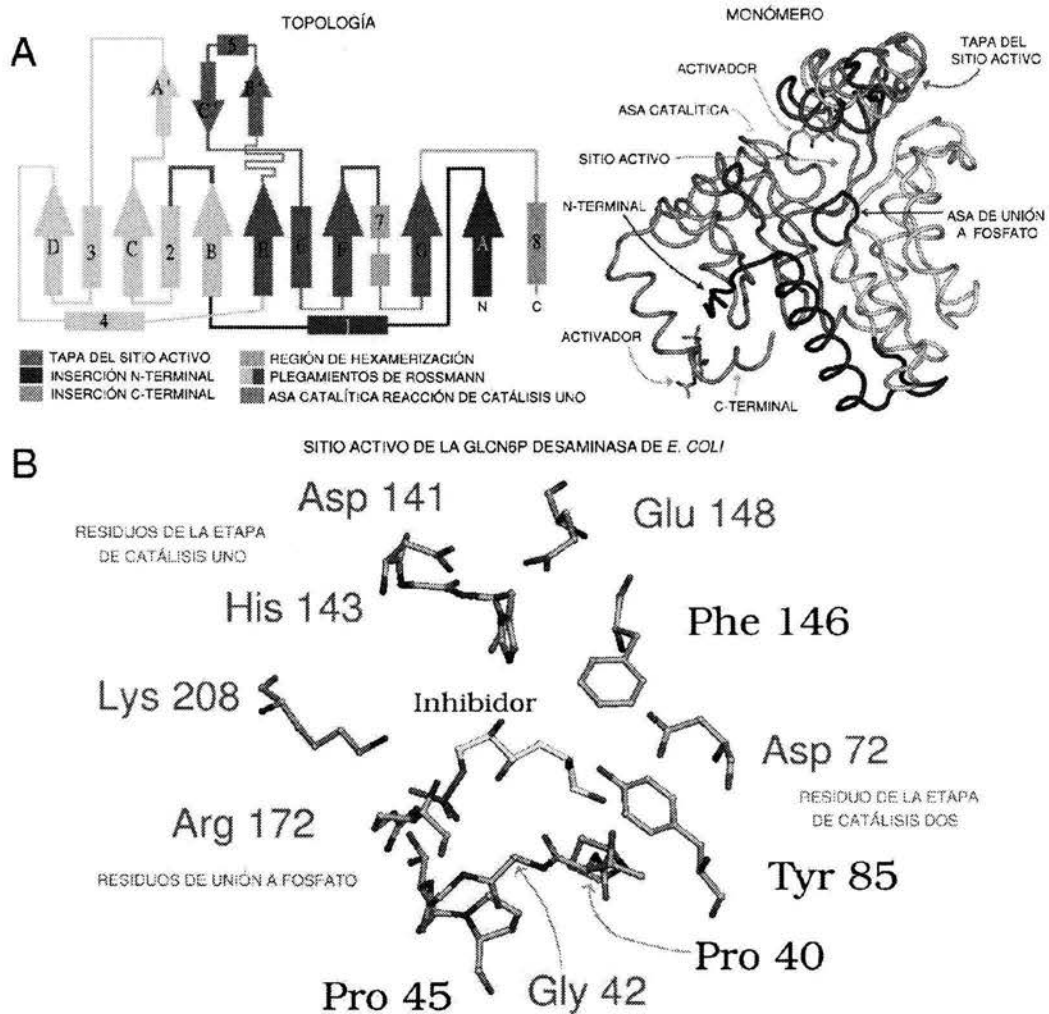


Figura 2.- A) Descripción del monómero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. La topología muestra las estructuras secundarias y las regiones en que se divide el plegamiento. El monómero en el conformero R, en un modelo de tubos, está coloreado en la misma forma que la topología. Se señalan algunas partes de la enzima, entre ellas las tres conformaciones que adopta la tapa del sitio activo cuando éste está vacío. B) Sitio Activo. En letras color azul los residuos catalíticos. La His143 realiza la reacción de apertura del anillo del GlcN6P (etapa de catálisis uno) y el Asp72 realiza la reacción de desaminación (etapa de catálisis dos) cuando el sustrato está abierto de forma similar al inhibidor (molécula en amarillo claro). En letras color rojo los residuos más relevantes encargados de la unir el fosfato del sustrato (basado en las referencias 18 y 21).



**Propiedades alostéricas en la GlcN6P desaminasa de mamíferos.** Las propiedades alostéricas han sido estudiadas cinéticamente en la GlcN6P desaminasa de perro [7], bovino [8], y recientemente, de humanos [22]. Al igual que la bacteriana, las enzimas de mamíferos son alostéricas y la unidad biológica está conformada por seis subunidades iguales (un homohexámero). El activador alostérico de las enzimas de mamíferos es el mismo que el de la enzima bacteriana, la N-acetil-*D*-glucosamina 6-fosfato. Sin embargo, se observan dos comportamientos diferentes para sus propiedades alostéricas [7,8]. Por un lado, la enzima aislada de riñón de perro tiene propiedades de un sistema *K*, similar a la enzima de *E. coli*. Por otro lado, las enzimas aisladas de riñón de bovino y la recombinante humana presentan propiedades de un sistema *V*. En éste sistema, la  $k_{cat}$  se incrementa con el aumento de la concentración de activador alostérico y cuando el activador está ausente la  $k_{cat}$  se aproxima a cero. Los estudios realizados en las enzimas de riñón bovino y en la enzima recombinante humana muestran que éstas son incapaces de realizar la catálisis en ausencia del activador alostérico N-acetil-*D*-glucosamina 6-fosfato.

Las enzimas de mamíferos difieren en sus masas moleculares relativas reportadas. La enzima de perro presenta una masa molecular de 30 kDa, la cual es similar a la reportada para la de *E. coli*, y la de bovino está reportada en 32.5 kDa. Una diferencia importante de la enzima de bovino, es que durante la reacción reversa tiene una afinidad inusual por el  $\text{HN}_4^+$  respecto a la enzima bacteriana, con una  $K_m$  de 3.7 mM (18 mM en *E. coli*), y además pierde sensiblemente afinidad por la fructosa-6-fosfato con una  $K_m$  de 5.9 mM (0.9 en *E. coli*).

**Genética de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.** La genética de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* ha sido estudiada con detalle [23,24]. La enzima es importante para regular la vía de degradación de aminoazúcares y está codificada por el gen *nagB* que forma parte del operón *nag*, el cual contiene al menos 5 genes (*nagA*, *nagB*, *nagC*, *nagD* y *nagE*). De las proteínas codificadas por el operón *nag*, NagC es una proteína que actúa como represor transcripcional (junto con el regulador transcripcional CRP-cAMP. Figura 3) sobre los promotores divergentes de *nagBACD* y *nagE* en ausencia de N-acetil glucosamina 6-fosfato y glucosamina 6-fosfato [25]. El gen *nagA* codifica para una N-acetil glucosamina 6-fosfato desacetilasa y el gen *nagE* para un sistema de fosfotransferencia de membrana (un sistema PTS) para N-acetil glucosamina y glucosamina. Hasta ahora, no se le ha podido asignar función alguna al producto peptídico del gen *nagD*, sin embargo, se sabe que también se expresa [26]. Adicionalmente, existen los genes del operón *glm* de la vía biosintética de UDP-N-acetil glucosamina y están relacionados con el operón *nag* por medio de la proteína reguladora NagC (sin CRP-cAMP).

Este operón consta de los genes *glmS*, *glmM* y *glmU*. El gen *glmS* codifica para la enzima Glucosamina-6-fosfato sintasa (GlcN6P sintasa EC:2.6.1.16), responsable de sintetizar glucosamina-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato y L-glutamina. El gen *glmM* codifica para la enzima fosfoglucomutasa, capaz de convertir la glucosamina-6-fosfato en glucosamina-1-fosfato. Finalmente, el gen *glmU* codifica para una enzima bifuncional con las actividades de glucosamina-1-fosfato N-acetil transferasa (capaz de acetilar la glucosamina 1-fosfato a partir de Acetil Co-A) y de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (la cual convierte la N-acetil glucosamina 1-fosfato en UDP-N-acetil glucosamina a partir de UTP). El producto final de esta vía biosintética, UDP-N-acetil glucosamina, se emplea en la glicolisación de proteínas y en la síntesis de lipopolisacáridos. Los genes *glmUS* son transcritos por dos promotores (P1 y P2). En ausencia de aminoazúcares ambos promotores están activados. Sin embargo, en presencia de N-acetil glucosamina el promotor P1, próximal al gen *glmU*, es inactivado mientras el promotor P2, localizado más arriba de P1 (100 pares de bases aproximadamente), está sujeto a una débil inducción. Dos sitios de unión para NagC han sido identificados en la región de los promotores P1 y P2 (BoxG1 y BoxG2) siendo necesaria su presencia en ambos sitios para la expresión del promotor P1. En esta situación la proteína NagC actúa como activador transcripcional. El sitio P1 es reprimido bajo las condiciones de expresión del operón *nag* donde NagC actúa como represor transcripcional [23].

### Operones regulados por la proteína NagC

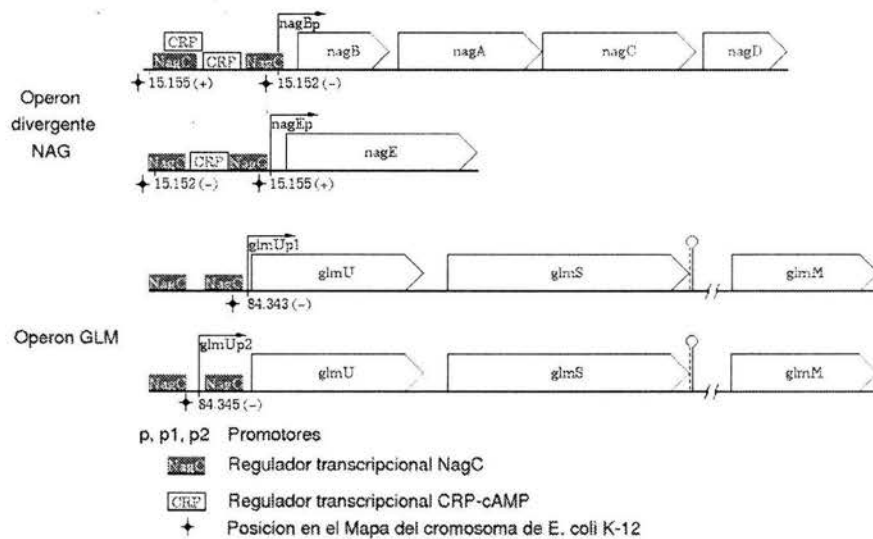


Figura 3. Esquema de los operones *nag* y *glm* en *E. coli*.

**Fisiología de la vía de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y variaciones en otras especies.** La vía de síntesis de UDP-N-acetil glucosamina es iniciada por la GlcN6P sintasa (figura 4) y es igual en todos los tipos de células (procariotas y eucariotas) a excepción de dos pasos posteriores a la formación de GlcN6P. En bacterias la GlcN6P es primero isomerizada a GlcN1P y posteriormente acetilada para obtener GlcNAc1P. En eucariotas primero se realiza la obtención de GlcNAc6P y luego esta última es isomerizada a GlcNAc1P [27]. El UDP-N-acetil glucosamina sirve como una forma activada de N-acetil glucosamina para diversos organismos ya que de este modo es incorporada a lipopolisacáridos, péptidoglucanos, quitina, glucoproteínas, glucosaminoglucanos y mucopolisacáridos. También es responsable de la formación de compuestos como los derivados N-acilados del ácido neuramínico llamados genéricamente ácido siálico. La vía es primordial para la formación de los componentes de la pared celular en hongos y bacterias y la remoción del gen de la GlcN6P sintasa resulta letal, aunque está reportado para *E. coli* que la enzima catabólica de la GlcN6P, la GlcN6P desaminasa, puede complementar a la GlcN6P sintasa [27]. La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es activada alostéricamente por N-acetilglucosamina 6-fosfato sensando de este modo los excedentes de GlcNAc6P producidos a partir de GlcN6P y controlando las concentraciones de los otros productos de la vía hasta UDP-GlcNAc. En *E. coli* la GlcN6P desaminasa es la única enzima de la vía regulada alostéricamente. La UDP-GlcNAc es sintetizada por la enzima N-acetil glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa la cual es regulada negativamente por inhibición por sustrato [27]. Tanto la GlcN6P sintasa como la GlcN6P desaminasa son enzimas importantes en la regulación de las necesidades celulares para obtener UDP-N-acetil glucosamina en todos los organismos ya que son puntos de control metabólico. Es interesante destacar que en eucariotas ambas enzimas están reguladas alostéricamente. De la GlcN6P sintasa existen varios estudios sobre su regulación. Esta enzima es regulada alostéricamente por UDP-N-acetil glucosamina desactivándose en su presencia (la enzima bacteriana no es regulada por este compuesto) donde es evidente que el producto final de la vía se encarga de auto regular su producción [27]. En mamíferos existen dos genes que codifican cada uno para una GlcN6P sintasa distinta (76% de identidad) y existen evidencias de que ambas están sujetas a un estricto control metabólico y transcripcional de manera tejido-específica.

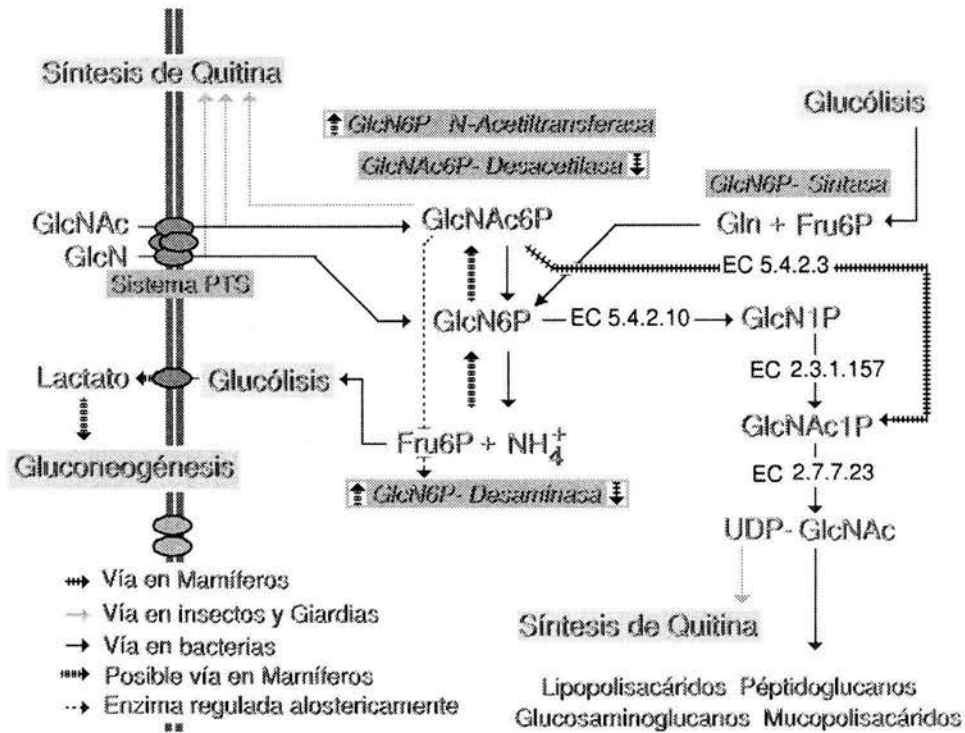


Figura 4. Esquema de la vía metabólica de la glucosamina-6-fosfato en *E. coli* y otros organismos. La vía en *E. coli* esta marcada con líneas azules. La línea verde representa la diferencia en la vía que existe entre mamíferos y bacterias. La línea punteada indica la regulación alostérica de la GlcN6P desaminasa. La línea roja es la posible vía en mamíferos.

**Presencia de la GlcN6P desaminasa en otros organismos.** En *E. coli*, la GlcN6P desaminasa es catabólica; sin embargo, estudios de transcripción realizados en *Giardia lamblia* sugieren que este protozoo emplea una GlcN6P desaminasa biosintética para iniciar la síntesis de los aminoazúcares, los cuales son precursores de la pared del quiste, el cual está hecho de quitina, un polímero de *N*-acetilglucosamina. Mientras que en *E. coli* la enzima que inicia la vía de síntesis de aminoazúcares es la GlcN6P sintasa, no se encuentra actividad detectable de esta enzima en *G. lamblia*, la cual sin embargo, presenta dos genes muy similares que pueden codificar para dos GlcN6P desaminasas [3]. De estos dos genes sólo *gpi1* es expresado después de la inducción de la formación de pared del quiste sugiriendo que es la enzima biosintética [3].

En un estudio sobre el alosterismo de la GlcN6P desaminasa de *Musca domestica*, se sugiere que la enzima puede estar orientada diferencialmente hacia la biosíntesis o hacia la degradación de glucosamina-6-fosfato por medio de uno o más reguladores alostéricos, ya sea durante el periodo de

alimentación activa o para la producción de quitina del díptero [4]. La glucosa-6-fosfato es un activador de la enzima en dirección de la formación de glucosamina-6-fosfato, sin embargo, la N-acetil glucosamina-6-fosfato es también capaz de activar la enzima en ambas direcciones [4].

Aunque no se han encontrado las secuencias genómicas ni detectado la actividad de la GlcN6P desaminasa en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la enzima está presente en cepas patógenas de *C. albicans*, y ha sido relacionada de manera preliminar como parte del mecanismo de adhesión celular al hospedero [28]. En *C. albicans* la GlcN6P desaminasa presenta propiedades cinéticas coherentes con el modelo de Michaelis-Menten [29] lo cual es concordante al tener una unidad biológica de un dímero y no ser sensible a la activación alostérica por la N-acetil glucosamina-6-fosfato [30].

**Fisiología en mamíferos.** Si bien el estudio de la vía metabólica a la cual pertenece la GlcN6P desaminasa en mamíferos tiene casi 50 años [1], el papel fisiológico de la enzima no está totalmente esclarecido así como tampoco está claro como se regula la vía metabólica. Debido a que, probablemente, la vía metabólica está regulada de forma distinta en los diferentes tejidos se han generado datos aislados [5,31] y con poco o nulo seguimiento posterior.

A mediados de la década de los años 60's se tenían ya identificadas algunas de las enzimas implicadas en la vía metabólica de la glucosamina, así como su distribución aproximada en las fracciones celulares en el hígado de la rata [32]. Para 1971 ya se había reconocido la importancia de la Fosfoglucosamina isomerasa (actualmente la Glucosamina-6-fosfato desaminasa) como una enzima reguladora de la conversión de glucosamina en CO<sub>2</sub>, lactato y glucógeno en células tumorales (sarcoma de Yoshida) por la vía de la glucólisis [33]. Aunque la glucosamina es rápidamente consumida como fuente de carbono, su destino en el metabolismo varía dependiendo de la concentración administrada y tipo de tejido. En células de hígado de rata la glucosamina exógena es metabolizada por vía biosintética (observándose una acumulación de UDP-N-acetil hexosaminas y reducción de nucleótidos), mientras que en ascitis tumorales se transforma en lactato y glucógeno [33]. Esta diferencia se debe a que la actividad es mucho menor en el hígado que en tumores, y que en estos últimos, el flujo de glucosamina hacia glucólisis estaría determinado por la glucosamina-6-fosfato desaminasa.

Por otro lado, es conocido que la N-acetil glucosamina exógena es procesada de forma distinta tanto en riñón como en hígado de rata [33]. En el riñón, la vía metabólica de la N-acetil glucosamina es estimulada por la fructosa 1,6-bisfosfato. Bajo estas condiciones la N-acetil glucosamina es recuperada como un intermediario glicolítico [33]. En contraste, en el hígado la vía es estimulada por

fosfoenolpiruvato (y no por fructosa 1,6-bisfosfato), mientras que la N-acetil glucosamina es recuperada como ácido siálico [34].

En estudios más recientes, la actividad de la GlcN6P desaminasa ha sido encontrada en diversos tejidos celulares de mamíferos: riñón [7,8], eritrocitos [35], espermatozoides [36,37,38,39], células de transporte del intestino delgado, neuronas y terminaciones nerviosas de células cerebrales [40]. En líneas celulares cultivadas *in vitro*, bajo altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ , la GlcN6P desaminasa tiene un importante papel en la recuperación del mismo. En este caso la reacción se realiza preferentemente hacia la formación de glucosamina-6-fosfato, observándose además una inducción de la actividad específica de GlcN6P desaminasa, en presencia de  $\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo [31]. Las reservas de UDP-N-acetil glucosamina y UDP-N-acetil galactosamina celular se elevan en respuesta a una aplicación exógena de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en diferentes líneas celulares de mamíferos (hibridoma CHO, BHK-21 y Ltk929), donde la rápida formación de UDP-N-acetil glucosamina es dependiente de glucosa y amonio. También se confirma en este caso, que la falta de glucosa en el medio de cultivo evita la síntesis de UDP-N-acetil glucosamina aún con altas concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [31].

Respecto a la dirección metabólica que puede tomar la GlcN6P desaminasa, se ha determinado que en presencia de la Glucosamina-6-fosfato N-transacetilasa y de Acetil-CoA (cofactor de la glucosamina-6-fosfato N-transacetilasa), la dirección de la reacción procede hacia la síntesis de glucosamina-6-fosfato [41]. También se sabe que la alta concentración de UDP-N-acetil glucosamina dentro de la célula promueve desórdenes en el estado de la antenaridad (ver apéndice de conceptos) de la glicosilación sobre las proteínas procesadas en el aparato de Golgi [5, 42]. Por otro lado, es relevante mencionar que algunos tipos de diabetes están asociados a la alteración de la regulación de la vía completa de las hexosaminas a través de la GlcN6P sintasa, la cual se considera el punto de control principal de la vía [27].

**Estructura y regulación de la GlcN6P desaminasa de mamíferos.** A la fecha se conocen las secuencias peptídicas completas (a partir de la secuencia de sus genes) de la GlcN6P desaminasa de al menos 3 mamíferos (humano, ratón y hámster ) [36,37,38,39]. Éstas tres enzimas tienen una longitud de 289 residuos, esto es 23 residuos extra hacia el extremo C-terminal respecto a la enzima de *E. coli* la cual es de 266 residuos. Se conoce la secuencia peptídica de los primeros veinte residuos del N-terminal de la GlcN6P desaminasa de bovino la cual se prevé que presente 289 residuos por el análisis de composición de aminoácidos [8]. En el humano, el gen que codifica para la GlcN6P desaminasa está localizado en el cromosoma 5 y su producto peptídico presenta 58.9% de identidad con el de *E.*

*coli* [43].

También fue reportada la secuencia peptídica del extremo N-terminal de dos diferentes GlcN6P desaminasas que se expresan en la línea celular BHK-21 de hámster [5]. Asimismo, han sido reportadas dos secuencias completas de cDNA de ratón [44]. La primera secuencia corresponde a la GlcN6P desaminasa de ratón de 289 aminoácidos. La segunda secuencia de cDNA de ratón codifica para otra GlcN6P desaminasa de 276 residuos. Finalmente, también fueron reportadas las secuencias homólogas, aunque parciales, de cDNA que codifican para proteínas de 276 y 289 residuos en rata y perro [45].

**Justificación del trabajo:** Se han secuenciado dos cDNA que codifican para dos GlcN6P desaminasas diferentes de ratón. Asimismo, se han observado dos mecanismos alostéricos en la GlcN6P desaminasa de mamíferos (bovino, humano y perro) vinculados a dos diferentes masas moleculares. La GlcN6P desaminasa humana es conocida en su secuencia peptídica y mecanismo cinético y alostérico. Las interrogantes planteadas a resolver en este proyecto fueron vincular los dos diferentes mecanismos cinéticos y alostéricos observados en las GlcN6P desaminasa de mamíferos con sus correspondientes secuencias peptídicas mediante un estudio estructural. Adicionalmente, nos dimos a la tarea de realizar un análisis de agrupamiento de secuencias de la familia de la GlcN6P desaminasa y otras secuencias homólogas que pudieran compartir el plegamiento. La finalidad de este estudio es determinar qué regiones del plegamiento son importantes para obtener modificaciones en la función (cinética y alostérica) y especificidad de los sustratos en las enzimas que comparten el plegamiento de la GlcN6P desaminasa.

## Objetivos

### Objetivos generales

- ▶ Investigar estructuralmente el plegamiento en la familia de la proteína GlcN6P desaminasa centrandolo estudio en las enzimas humanas y de *E. coli*.
- ▶ Investigar la relación evolutiva de la familia de proteínas de GlcN6P desaminasa.

### Objetivos Particulares

- ▶ Determinación de la estructura cristalográfica de la proteína GlcN6P desaminasa I humana (de 289 aminoácidos) recombinante en *E. coli*.
- ▶ Realizar una comparación entre las estructuras tridimensionales de las GlcN6P desaminasa I humana y de *E. coli*.
- ▶ Encontrar la secuencia peptídica de la GlcN6P desaminasa II (de 276 aminoácidos) en el genoma humano y construir un modelo computacional para proponer una hipótesis estructural de las diferencias observadas en las propiedades del mecanismo alostérico y cinéticas de ambas enzimas.
- ▶ Proponer un modelo estructural del mecanismo alostérico de la GlcN6P desaminasa I con base en los datos cinéticos y alostéricos.
- ▶ Identificar las regiones sujetas a variación en el plegamiento de la GlcN6P desaminasa que están relacionadas con los cambios de función y especificidad de sustrato.



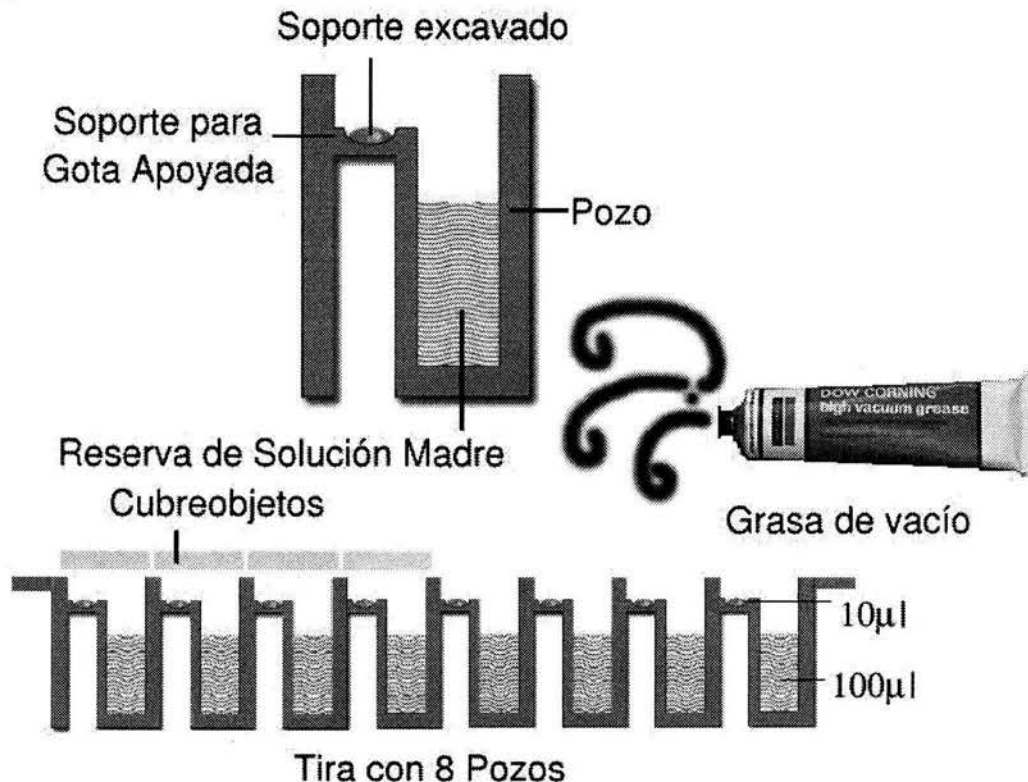
## Materiales y métodos

**Purificación de la enzima GlcN6P desaminasa I** (*preparada en el laboratorio del Dr. Mario Calcagno por Laura Álvarez-Añorve. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de UNAM*). La cepa de *E. coli* 590PTZ HA PPB5 fue usada como hospedero del plásmido pTZ19R, el cual fue empleado para sobre-expresar el producto proteico del gen *gnp1* humano que codifica para la GlcN6P desaminasa. Se cultivaron 10 ml de células de *E. coli* con ampicilina en medio LB durante 8 h a 30° C. Posteriormente 10 µl de cultivo se platearon en medio LB sólido con ampicilina para obtener colonias individuales. Las colonias individuales fueron sembradas en 200 ml de medio LB-ampicilina y crecidas por 4 h a 30° C. Posteriormente seis matraces de 1 litro fueron inoculados con 50 ml de cultivo y crecidos por 8 h a 30° C. Las células fueron centrifugadas por 15 minutos a 5000 r.p.m., y la pastilla de células o "pellet" fue guardada en frío toda la noche. El pellet se lavó y centrifugó en tres ocasiones con KCl a 0.15 M. Las bacterias se resuspendieron en 200 ml de solución para lisar células (EDTA 20 mM pH 7.7, KCl 0.15 M y Tris 100 mM pH 7.7) y se sometieron a sonicación. La sonicación se realizó por 20 segundos, a intervalos de 2 minutos, 7 veces y se centrifugaron por 15 minutos a 15000 r.p.m. La purificación de la enzima se realizó por precipitación con sulfato de amonio en 2 pasos a 40% y 55%. Posteriormente se dializó y filtró. Finalmente se purificó por cromatografía de afinidad de sitio alostérico en N-6-aminohexanoil glucosamina 6-fosfato agarosa [8]. El gel de cromatografía de afinidad fue preparado como se describe en el artículo de la referencia 6. La proteína fue eluída con N-acetil glucosamina 6-fosfato, el activador alostérico y se llevo hasta un volumen de 4 ml. La proteína finalmente se concentró usando filtros Amicon de Millipore de 2ml para 30 kDa centrifugando a 3000 r.p.m. por 30 minutos a 6 °C. La proteína concentrada en los filtros se resuspendió en 200 µl a una concentración de 10 mg/ml.

**Cristalización.** Los cristales fueron obtenidos por el método de difusión de vapor en gota asentada a 18 °C. Las gotas fueron preparadas en placas con tiras de 8 pozos de la marca Hampton Research (Crystalclear strips, HR3-128, figura 5). Las tiras fueron cubiertas con cubreobjetos y sellados con grasa de vacío. El precipitante empleado fue sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.8 M como solución inicial. Al precipitante se le adicionó activador alostérico (N-acetil glucosamina 6-fosfato) a una concentración inicial de 200 mM e inhibidor competitivo 2-deoxi-2-amino D-glucitol 6-fosfato a

una concentración inicial de 10 mM. Se realizaron diluciones entre 58% y 72% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y diluciones del 5% de activador y 1% de inhibidor, en buffer HEPES 100 mM pH 7, 7.25 y 7.5. Las gotas se prepararon con 4  $\mu\text{l}$  de proteína más 4  $\mu\text{l}$  de solución precipitante. La solución madre del pozo contenía la misma concentración de los precipitantes con un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . Además, se probaron dos diferentes concentraciones de proteína, 10 y 5 mg/ml, con diluciones de 58% al 63% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y los pH de 7 y 7.25 (tabla 1, 1<sup>er</sup> caja). Para ampliar las condiciones del medio de cristalización, se probó utilizar PEG 400 al 20%, solución precipitante de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con diluciones entre 60% y 72%, y diluciones de 5% de activador y 1% de inhibidor, en buffer HEPES 100 mM pH 7, 7.25 y 7.5. En estas condiciones se mantuvo fija la concentración de proteína a 10 mg/ml (tabla 1, 2<sup>a</sup> caja). Los cristales crecieron durante tres meses alcanzando tallas superiores a 1.5 mm por 0.15 mm.

Las condiciones finales de la gota de donde se extrajo el cristal de proteína para la colecta de datos fueron (1<sup>er</sup> caja posición D1): la concentración final de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la solución de la gota fue de 1.68 M, 10 mM de activador alostérico y 0.1 mM de inhibidor competitivo a pH 7, sin PEG 400 a 10 mg/ml de proteína.



*Figura.-5 Pozos de cristalización para reservas de solución madre de 100  $\mu\text{l}$  de la marca Hampton Research. La solución con la proteína se coloca en el soporte excavado de 10  $\mu\text{l}$ .*

Tabla 1.- Condiciones de Cristalización

<i>Primera caja de Cristalización</i>						
	Proteína 10mg/ml		Proteína 5mg/ml			P. 10mg/ml
	pH 7.0	pH 7.25	pH 7.0	pH 7.25	pH 7.25	pH 7.0
	1	2	3	4	5	6
A	58	58	58	*	58	58
B	59	59	59	*	59	59
D	60 £	60	60	*	60	60
E	61	61	61	*	61	61
G	62	62	62	62	*	62
H	63	63	63	63	*	63

<i>Segunda caja de Cristalización</i>						
	Con PEG			SIN PEG		
	Proteína 10mg/ml					
	pH 7.0	pH 7.25	pH 7.50	pH 7.0	pH 7.25	pH 7.50
	1	2	3	4	5	6
A	60	60	60	60	60	60
B	63	63	63	63	63	63
D	66	66	66	66	*	66
E	69	69	69	69	*	69
G	70	70	70	70	*	70
H	72	72	72	72	*	72

*En la casilla se presenta el porcentaje de  $(NH_4)_2SO_4$  al 2.8 M empleado. Se utilizaron 10ml de PEG400 al 20% por pozo. \* Condiciones no realizadas.*

*£ Los cristales de proteína empleados para la colecta de datos fueron extraídos de esta posición.*

**Colecta de datos** (*realizada en la línea BL9.1 del Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL) a  $-180$  °C y una longitud de onda de  $0.78$  Å*). Durante la colecta de datos se emplearon tres cristales de la misma gota que difractaron a temperatura de flujo de nitrógeno. Los primeros dos cristales fueron congelados con su solución madre del pozo más 35% de trehalosa como crioprotector. Estos cristales fueron tratados con las técnica de remojado rápido y de recocido en la solución crioprotectora [46]. Ambos cristales difractaron con alta mosaicidad (ésta última es una medida de la distorsión de la difracción dada en grados). El tercer cristal permaneció en la solución crioprotectora por 24 h.

Ésta consistió en adicionar trehalosa al 35% a la gota donde crecieron los cristales y previo a la colecta se le aplicó al cristal la técnica de recocido<sup>1</sup>. El cristal difractó a una resolución de 1.75 Å. Se empleó el programa Strategy de Mosfilm [47] para determinar la estrategia de la colecta la cual consistió de 90 exposiciones de 1° de rotación y 10 minutos de exposición para obtener 94% de integridad de los datos (completeness).

**Integración de datos, reemplazo molecular y construcción del modelo.** La integración de los datos se llevó acabo con el programa de DENZO-XDISP [48] [49] y el escalamiento de los datos se realizó con el programa SCALA del paquete de CCP4 (tabla 2) [50]. La estructura fue resuelta con el método de reemplazo molecular usando como templete de polialaninas la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* con 266 residuos. A la molécula templete se le retiraron las regiones de menor conservación estructural, las cuales corresponden a las asas del modelo que no presentan ninguna función catalítica ni alostérica. El mejor resultado se obtuvo empleando la unidad biológica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* que es un hexámero.

Tabla 2.- Estadística de los datos de difracción

Parámetros de la celda Å	109.87 90°	110.89 90°	180.88 90°
El Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>		
Resolución	1.75 Å		
Reflexiones únicas	209143		
Integridad de los datos	94.6(96.8)*		
Multiplicidad	3.8(3.6)*		
R <sub>sym</sub>	0.052(0.224)*		
Rango de resolución	1.74 -29.48 Å		
Unidad asimétrica y unidad biológica	Un hexámero		
I/sigma	9.9(3.4)*		

\*El valor representa el último rango de resolución.

<sup>1</sup> La técnica de recocido consiste en someter al cristal de proteína a cambios rápidos de temperatura, en este caso el cristal que es congelado muy rápidamente (-180 °C), a continuación es retirado del flujo de nitrógeno permitiendo que alcance la temperatura del cuarto y el cristal puede ser regresado a su solución madre con crioprotector (éste paso no es obligatorio). El cristal es congelado rápidamente por segunda ocasión con el flujo de nitrógeno. Este procedimiento permite mejorar la calidad de la difracción, siempre y cuando no se experimente formación de cristales en la fase líquida que contiene al cristal de proteína (la cual debe permanecer vitrificada y transparente).

El reemplazo molecular y el afinamiento de la estructura fue realizado con el programa CNS [51] y la construcción del modelo se realizó con programa gráfico "O" [52] calculando mapas de diferencia<sup>2</sup> de la densidad electrónica  $2Fo-Fc$  y  $Fo-Fc$  de toda la unidad asimétrica (tabla 3). En los últimos pasos del afinamiento se usaron mapas promedio de densidad electrónica (programas AVE [53] e IMP [54] del paquete de programas RAVE)  $2Fo-Fc$  y  $Fo-Fc$ , así como también mapas de omisión de fases del modelo (*annealing omit maps*) en esferas de 10 a 15 Å. Este tipo de mapas son  $2Fo-Fc$  donde se hace omisión de las fases en una esfera centrada en una región específica. Las regiones omitidas tuvieron como centro la cavidad central del sitio activo para poder construir el mejor modelo de la molécula del análogo del estado de transición (inhibidor competitivo).

**Análisis estructural.** El análisis estructural y las sobreposiciones de átomos C $\alpha$  se realizaron con el programa "O" (empleando los comandos LSQ) [52] y algunos de los programas acoplados. Las sobreposiciones de cuerpo rígido realizadas entre los monómeros de la GlcN6P desaminasa humana y la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (códigos PDB 1DEA, 1HOR, 1HOT y 1FS5) fueron realizadas con el programa LSQMAN [55] del paquete DEJAVU. Así como todos los valores de RMSD de las sobreposiciones fueron calculados empleando únicamente los carbonos  $\alpha$  a menos de 3.8 Å (valor de integración) inicialmente y recalculando los valores entre 0.8 y 0.3 Å de distancia. Se eligieron estos valores para encontrar las regiones de conservación estructural que nos permitieran determinar si las diferencias son reales. Esto es debido al error calculado para las coordenadas de la estructura que es de 0.19 Å. Las sobreposiciones entre las subunidades biológicas (hexámeros) de la GlcN6P desaminasa humana y la de *E. coli* incluyeron todos los carbonos  $\alpha$  a menos de 3.8 Å de distancia únicamente.

---

2 Los mapas de diferencias son calculados a partir de las fases del modelo construido, donde  $Fo$  son los datos experimentales u observados (factores de estructura) y  $Fc$  son datos calculados a partir del modelo. Los mapas calculados permiten localizar visualmente las diferencias del modelo respecto a los datos experimentales y corregirlos. Los mapas  $2Fo-Fc$  agregan un peso extra durante el cálculo a las datos experimentales dando menos peso a los datos calculados a partir del modelo. Un mapa  $Fo-Fc$  nos permite observar diferencias totales entre los datos calculados y los observados.

Tabla 3.- Procedimiento del afinamiento.

<i>No. de Etapa</i>	<i>Procedimiento</i>	<i>No. Pasos</i>	<i>Res.(Å)</i>	<i>R Inicial</i>	<i>R free Inicial</i>	<i>R Final</i>	<i>R free Final</i>
1	Reemplazo Molecular :						
	Función <i>Cross rotation</i>	-	15 - 4.0				
	Correlación de Patterson	10	10 - 3.0				
	Búsqueda de Traslación	-	10 - 3.0				
	Afinamiento de cuerpo rígido	20	10 - 3.0	Mejor	Solución	Monitor	0.65
2	Minimización Rígida	30	50-2.40	0.38	0.38	0.37	0.37
3	Minimización Rígida (con ligantes)	30	50-2.40	0.36	0.37	0.36	0.37
4	Recocido (T= 1200 C)	--	50-1.80	0.34	0.34	0.30	0.32
5	Afinamiento de B	40	50-1.80	0.30	0.32	0.29	0.31
6	Minimización	60	50-1.79	0.29	0.31	0.29	0.31
7	Mapa 2fo-fc, Ajuste manual de todos los residuos.						
8	Minimización	100	6-1.75	0.28	0.30	0.27	0.29
9	Afinamiento de B	40	6-1.75	0.27	0.29	0.27	0.29
10	Minimización(con"bulk solvent correction")	35	50-1.75	0.26	0.27	0.26	0.27
11	Afinamiento de Q para ligandos: SO4, activador alostérico y trehalosa.						
12	Búsqueda de moléculas de agua en mapas de diferencias fo-fc	--	50-1.75	0.26	0.28	0.21	0.24
13	Mapas 2fo-fc & fo-fc Ajuste manual de todos los residuos y aguas.						
14	Minimización	200	50-1.75	0.217	0.233	0.210	0.234
15	Afinamiento de B	40	6-1.75	0.211	0.234	0.207	0.230
16	Adición de conformaciones alternas						
17	Minimización	50	50-1.75	0.208	0.227	0.208	0.227
18	Afinamiento de B	40	50-1.75	0.208	0.227	0.206	0.226
	<b>Adición del ligante en el sitio activo: inhibidor competitivo.</b>						
	Mapas promedio de densidad electrónica 2fo-fc y fo-fc.						
19	Mapas de omisión (annealed omit map) con regiones esféricas omitidas de la cavidad catalítica.						
20	Minimizaron	25	30-1.75	0.204	0.226	0.200	0.223
21	Afinamiento de B	30	30-1.75	0.200	0.223	0.1937	0.2179
22	Minimizaron	25	20-1.75	0.1937	0.2179	0.1929	0.2169

**Modelado computacional de la GlcN6P desaminasa II.** El modelo estructural de la GlcN6P desaminasa humana II (*Gnp2*) fue construido usando como templatado el modelo cristalográfico de la GlcN6P desaminasa humana I (*Gnp1*). La identidad entre ambas secuencias peptídicas es de 86.9 %. Los cálculos de minimización de energía y de dinámica molecular se hicieron empleando el programa Insight II y tres de sus módulos: Homology, Biopolimer y Discover [56]. La simulación se hizo con la molécula del inhibidor competitivo (el análogo del estado de transición) en la cavidad catalítica con 19 moléculas de agua cristalográficas y adicionalmente se incorporo una capa de 5 Å de espesor con moléculas de agua en torno al modelo inicial. Se calcularon 12,000 iteraciones de minimización y

20,000 iteraciones de dinámica de 1 fs a 300 °K. El análisis estructural del modelo se hizo con el programa gráfico "O" [52].

**Búsqueda de secuencias homólogas a la GlcN6P desaminasa.** La búsqueda de secuencias se realizó con los programas BLAST [57] en las bases de datos del Gene Bank del NIH [58], los bancos de secuencia de EST (expressed sequence tags) del NIH [59], del genoma humano [60] (sitio de red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) y los bancos de secuencia de cDNA de RIKEN Mouse Gene Encyclopaedia Project [44] (<http://genome.gsc.riken.go.jp/>). También fueron realizadas búsquedas en las bases de datos del "Institute for Genomic Research" (<http://www.tigr.org>). El programa empleado fue tBLASTn el cual compara la secuencia de la proteína de interés contra el banco de datos de secuencias de DNA traducida en los 6 marcos de lectura posibles. La búsqueda inicial se realizó con la secuencia de aminoácidos de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Se realizó otra búsqueda con la secuencia peptídica elegida de la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa humana I, la cual coincide con la deducida a partir de su secuencia nucleotídica [43].

**Análisis de firmas de secuencia del extremo C-terminal.** La secuencia de aminoácidos del fragmento 271 al 289 de la GlcN6P desaminasa humana I y del 271 al 276 de la GlcN6P desaminasa humana II fueron analizados con el programa PROSCAN [61]. Este programa está disponible a través de la red en el servidor de biología molecular ExpASy (Expert Protein Analysis System) del Swiss Institute of Bioinformatics (<http://us.expasy.org/>). Se usó el banco de datos de familias de proteínas y dominios PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite/>). El fragmento de aminoácidos de la secuencia de GlcN6P desaminasa humana de 289 residuos usado para el análisis de secuencia fue: SIKEKETEKSSKPYSD . Para la secuencia de 276 residuos se empleó el fragmento equivalente : SMKDGN.

**Análisis comparativo de la familia de la GlcN6P desaminasa.** Para realizar el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de la familia de la GlcN6P desaminasa se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustalw versión 1.82 [62]. Posteriormente el alineamiento fue corregido y optimizado manualmente con el programa SEQLAB de Wisconsin package [63]. A partir del alineamiento optimizado se realizó otro donde fueron recortados los extremos N y C-terminales de las secuencias, para obtener mejores resultados en el estudio comparativo (entre los residuos 36 y 240). El estudio se realizó con el paquete de programas Phylip versión 3.5c [64]. El acortamiento de los

extremos es debido a que éstos presentan variabilidad y sólo se emplearon las regiones más conservadas que se localizan en la región de aminoácidos de 36 al 240, entre la hebra  $\beta$  B y la hebra  $\beta$  G. Se empleó el método de máxima parsimonia para establecer la posible relación de parentesco entre las secuencias de aminoácidos.

Adicionalmente, se realizó un análisis de traza evolutiva con el programa TraceSuitII donde se empleó el alineamiento sin recortar los extremos C y N terminal [65,66]. Utilizando este programa se realizaron dos análisis, con diferente número de secuencias incluidas: el primero incluyó las secuencias peptídicas del grupo de la enzima Glucosamina 6-fosfato desaminasa y el segundo las secuencias peptídicas tanto del grupo de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa como el grupo de la Galactosamina 6-fosfato desaminasa. Esta clase de estudio se basa en la extracción de los residuos funcionales del patrón de conservación de un alineamiento de secuencias homólogas. Posteriormente, estos residuos seleccionados son identificados sobre la estructura del representante tridimensional del grupo estudiado: en este caso se empleó la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (código PDB 1DEA). El programa clasifica según un árbol filogenético, construido por el método de Fitch-Margoliash, un número de particiones seleccionadas para las que se van a extraer los residuos del análisis. En éste análisis se emplearon 5 particiones.



## Resultados

### Primera parte: Estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa I.

**Difracción, determinación y afinamiento.** La GlcN6P desaminasa I humana recombinante (producto del gen *gnp1*) fue cristalizada en presencia de sulfato de amonio, el activador alostérico (N-acetil glucosamina 6-fosfato), y el análogo del estado de transición (inhibidor competitivo: 2-deoxy 2-aminoglucitol 6-fosfato). La congelación del cristal de la proteína a  $-180^{\circ}$  centígrados previo a la irradiación con rayos X y el empleo de técnicas de crioprotección, con trehalosa al 35%, permitió obtener datos de difracción a  $1.75 \text{ \AA}$  de resolución, a una longitud de onda de  $0.78 \text{ \AA}$ . Con la integración de los datos se obtuvo el grupo espacial  $P2_12_12_1$  con los siguientes parámetros de celda:  $a=109.87 \text{ \AA}$ ,  $b=110.89 \text{ \AA}$ ,  $c=180.88 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ . El conjunto de datos presentó 94% de integridad (tabla 4). La estructura fue resuelta por reemplazo molecular, usando como templete la cadena de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* [21].

Tabla 4.- Estadística del afinamiento cristalográfico.

R Final	0.193(0.223)*
R <sub>free</sub>	0.217(0.245)* (10% de las Reflexiones únicas)
Desviación RMS de los valores ideales	
Longitud de enlaces	0.005 $\text{ \AA}$
Ángulos de enlaces	1.4 grados
Ángulos Dihedrales	23.1 grados
Ángulos impropios	0.85 grados
Error estimado de las coordenadas	
ESD de la gráfica de Luzzati	0.19 $\text{ \AA}$
ESD de SIGMA A	0.13 $\text{ \AA}$
Moléculas de Agua	2194

\* Entre paréntesis se indica el valor en el último rango de alta resolución ( $1.75\text{-}1.86 \text{ \AA}$ ).

La cantidad de reflexiones únicas es estadísticamente satisfactoria para poder procesar la unidad asimétrica completa y afinar los factores de temperatura de cada uno de los átomos de forma independiente. La unidad asimétrica contiene un homohexámero con subunidades de 289 residuos. Cada una de las subunidades monoméricas contiene un análogo del estado de transición y un sulfato inorgánico en el sitio activo con ocupación parcial de 0.70 y 0.30 respectivamente. En la cavidad alostérica se encontró la molécula del activador, y en una posición cercana, una molécula de trehalosa por monómero unida a la Phe27 y la Lys33 con ocupación parcial de 0.71. También, durante el

afinamiento, se encontró un sulfato adicional en una región de contactos entre los hexámeros vecinos de la red cristalina. El modelo final se logró afinar hasta obtener un  $R=0.19$  y un  $R_{free}=0.21$  (ver apéndice 2).

**El hexámero de la GlcN6P desaminasa I humana.** La unidad asimétrica (u.a.) del cristal de la GlcN6P desaminasa humana corresponde a la unidad biológica funcional (figura 6), un hexámero de 6 subunidades idénticas en número y tipo de aminoácidos (con 289 cada subunidad).

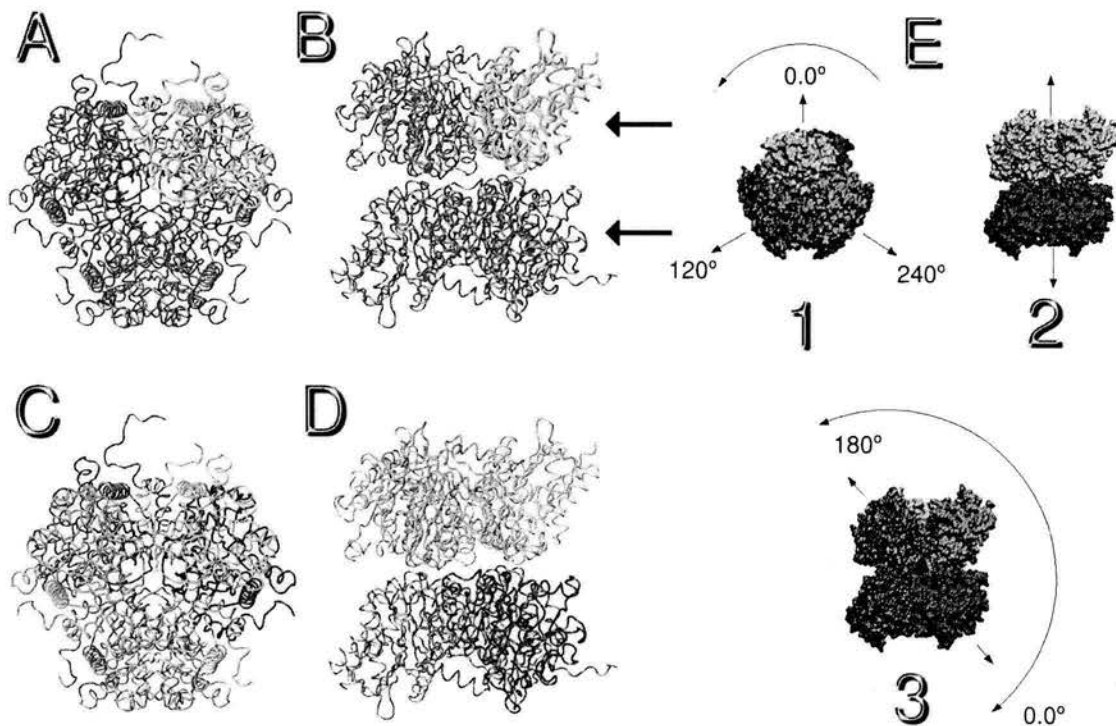


Figura 6.-El Hexámero de la GlcN6p humana I. En "A" se observa el hexámero desde el eje de simetría de orden tres. Sobre este eje se unen dos trímeros. En primer plano se ve un trímero y debajo de este se localiza otro. En amarillo se ve un monómero del trímero en primer plano. En "B" se observa al hexámero desde una vista cercana al eje de simetría dos, cada flecha indica la posición de un trímero. El trímero superior presenta un monómero en amarillo. En "C" y "D" se observa al hexámero en las mismas vistas que en "A" y "B" pero cada monómero presenta un color diferente. En "E" se explica por donde pasan los ejes de simetría de la molécula. En 1 vista desde el eje de simetría de orden tres y la disposición de cada monómero a  $120^\circ$ . En 2 el eje de simetría tres desde una vista cercana al eje de simetría dos. Un trímero en amarillo y otro en azul. En 3 se observa la disposición de los monómeros del dímero entorno al eje de simetría de orden dos.

El hexámero está formado, como en la enzima de *E. coli*, con las subunidades organizadas en ejes de simetría de orden tres y de orden dos. El primero y más notorio, es un eje de simetría de orden tres, en el cual la molécula se organiza en dos grupos de tres subunidades o trímeros. El otro eje de simetría es de orden dos, y está formado por dos subunidades a 180 grados una de la otra formando un dímero. Cada una de las subunidades del dímero pertenece además a trímeros diferentes. El hexámero presenta 3 ejes de simetría de orden dos y cada eje de simetría está a 120 grados uno del otro, perpendiculares al eje de simetría de orden tres. Esto se conoce como simetría 3-2.

**Descripción del plegamiento de la GlcN6P desaminasa.** El plegamiento está formado por una capa  $\beta$  central de 7 hebras paralelas rodeada por 9 hélices  $\alpha$  y una hélice  $3_{10}$ , así como una capa  $\beta$  secundaria antiparalela de 3 hebras (figura 7). Es importante mencionar que tres de las hélices  $\alpha$  presentan terminaciones en hélices  $3_{10}$  (las hélices 3, 5 y 9) y la hélice  $\alpha$  7 presenta una pequeña hélice  $3_{10}$  al inicio de la misma. También se presenta una vuelta de hélice  $3_{10}$  en medio de la asa ubicada entre la hebra  $\beta$  G y la hélice  $\alpha$  8. La topología de la GlcN6P desaminasa humana, igual que su homóloga de *E. coli*, es similar a los dominios de unión a  $\text{NAD}^+$  (figura 8). El dominio de unión a  $\text{NAD}^+$  esta conformado por dos motivos de tipo Rossmann (o motivos de unión a mononucleótido) formando una sola capa  $\beta$  de hebras paralelas rodeada por hélices  $\alpha$ .

El dominio de unión a  $\text{NAD}^+$  se caracteriza por unir dinucleótidos, principalmente los cofactores NADP y NAD, mediante una asa ubicada entre la primer hebra  $\beta$  y la primer hélice del motivo estructural [21]. La mencionada asa puede establecer puentes de hidrógeno entre la proteína y el dinucleótido mediante uno de los fosfatos que unen ambos nucleótidos. El asa, además, presenta una firma distintiva, a la cual se adiciona un residuo ácido en el extremo C-terminal de la segunda hebra  $\beta$ , que lleva a cabo la función de establecer un puente de hidrógeno con uno de los azúcares del cofactor. La GlcN6P desaminasa presenta un asa de ligadura para el fosfato del sustrato análoga al asa observada en los plegamientos de Rossmann, que también se localiza entre una hebra  $\beta$  (hebra  $\beta$  B) y una hélice  $\alpha$  (hélice  $\alpha$  2). Asimismo tiene un residuo ácido en el extremo C-terminal de la hebra siguiente (entre las hebras  $\beta$  C y A') y que en este caso su función es la de llevar a cabo la reacción catalítica en lugar de participar en un puente de hidrógeno con el hidroxilo.

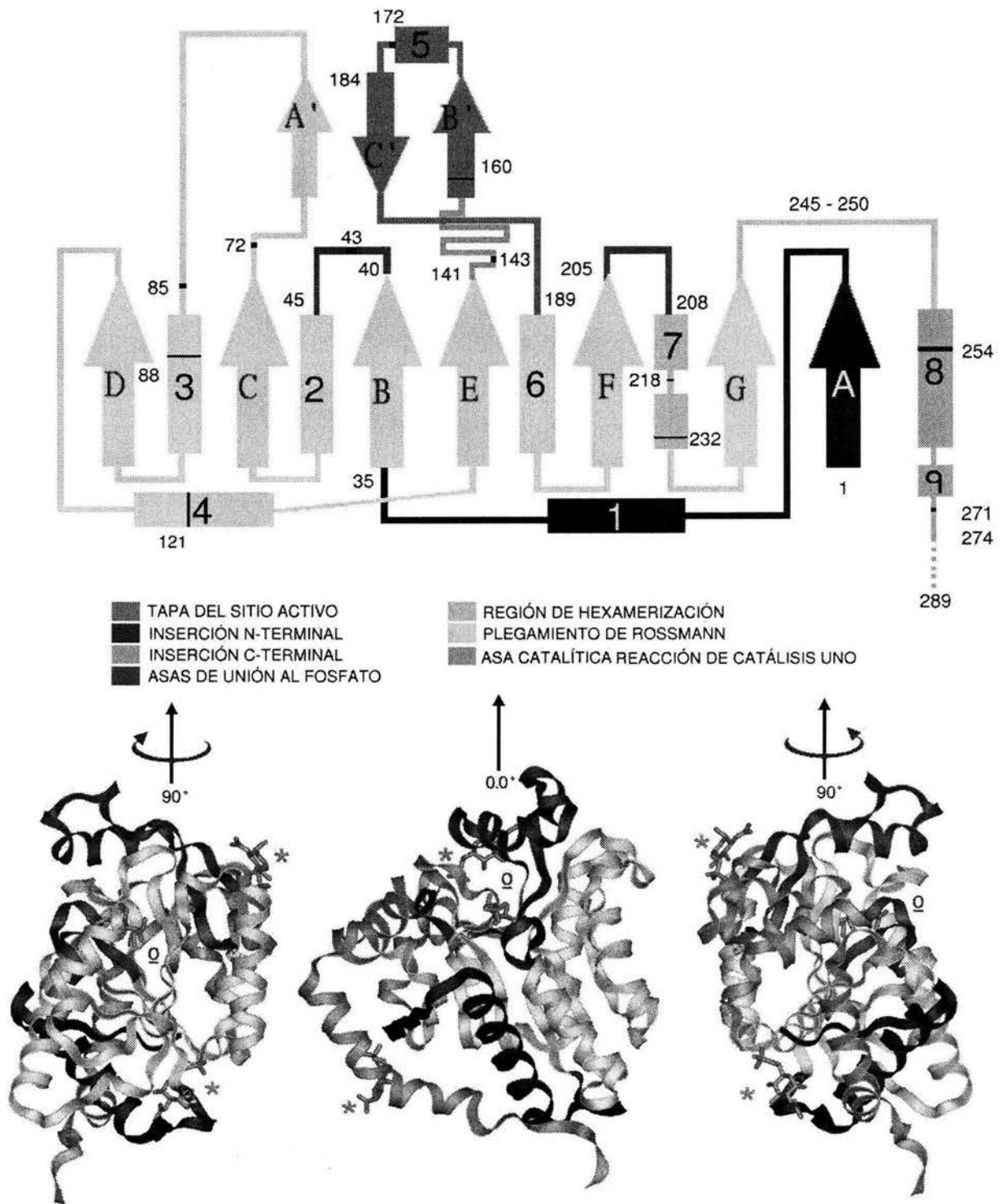
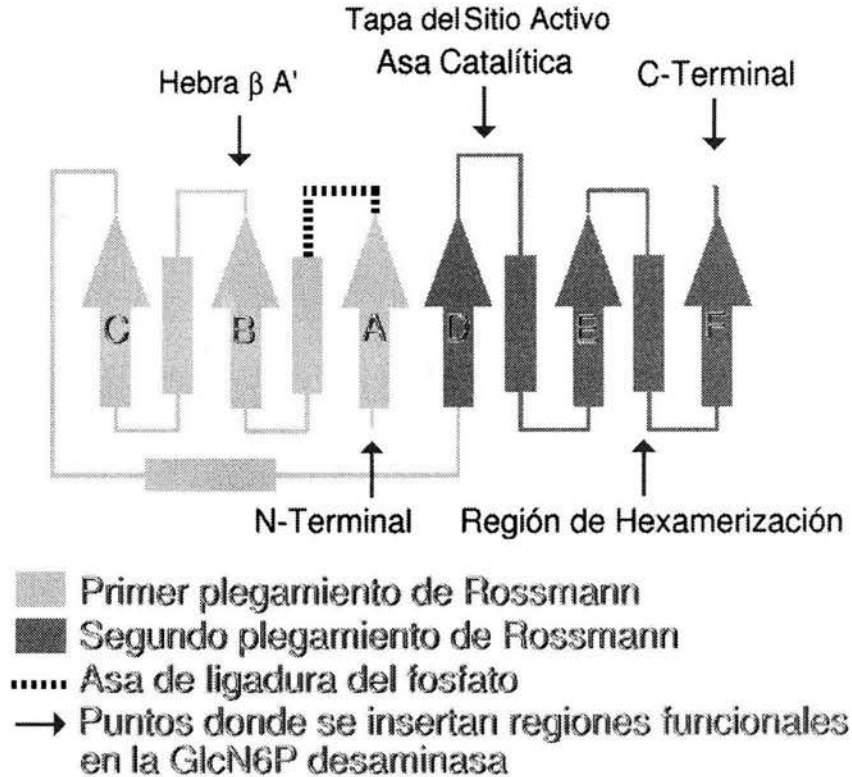


Figura 7.- Topología de la GlcN6P desaminasa humana I, la diferencia respecto a *E. coli* es el extremo C-terminal. Tres diferentes vistas de la unidad monomérica con el análogo del estado de transición en el sitio activo del monómero A (con el símbolo ° en color azul) y dos activadores alostéricos (con asteriscos en color verde).



*Figura 8.- Topología de un plegamiento de unión a dinucleótidos con dos motivos de tipo Rossmann (gris claro y oscuro). En flechas se señalan donde se insertan las regiones funcionales de la GlcN6P desaminasa.*

En una comparación entre topologías de la GlcN6P desaminasa I humana y la familia del plegamiento de unión a mononucleótido, estas muestran un arreglo topológico similar de la capa  $\beta$  central [22]. Sin embargo, en la GlcN6P desaminasa se observan inserciones en los extremos N- y C-terminales así como en otros puntos del plegamiento Rossmann que coinciden con regiones funcionales. Las inserciones comprenden la región correspondiente al asa catalítica, la tapa del sitio activo (regiones continuas del 137 al 187), la modificación sobre la hebra del ácido catalítico donde la hebra se extiende y divide en dos (hebras C y A') dejando al Asp72 entre ambas y finalmente una inserción delante de la hélice  $\alpha$  7 de una hélice  $3_{10}$  relacionada con la oligomerización del hexámero (motivo estructural de trimerización del 208 al 232).

**El extremo C-terminal.** El modelo final de la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa humana revela el mismo plegamiento y el mismo arreglo cuaternario que se ha observado en la enzima homóloga de *E. coli*. Sin embargo, en una sobreposición estructural de la GlcN6P desaminasa I humana con la de *E. coli*, se observan diferencias significativas hacia el extremo C-terminal, a partir del aminoácido Leu258 (figura 9). En ésta zona la cadena principal de la enzima humana se desvía tomándose otra dirección. Mientras que la enzima de *E. coli* forma una corta hélice y una pequeña asa o rulo en el extremo C-terminal que se desplaza separándose de la enzima, la GlcN6P desaminasa I humana forma una hélice en otra dirección y más larga (hélice 9 de los aminoácidos 258 a 266) que mantiene contactos hidrofóbicos con residuos de la hebra  $\beta$  A y la hélice  $\alpha$  1.

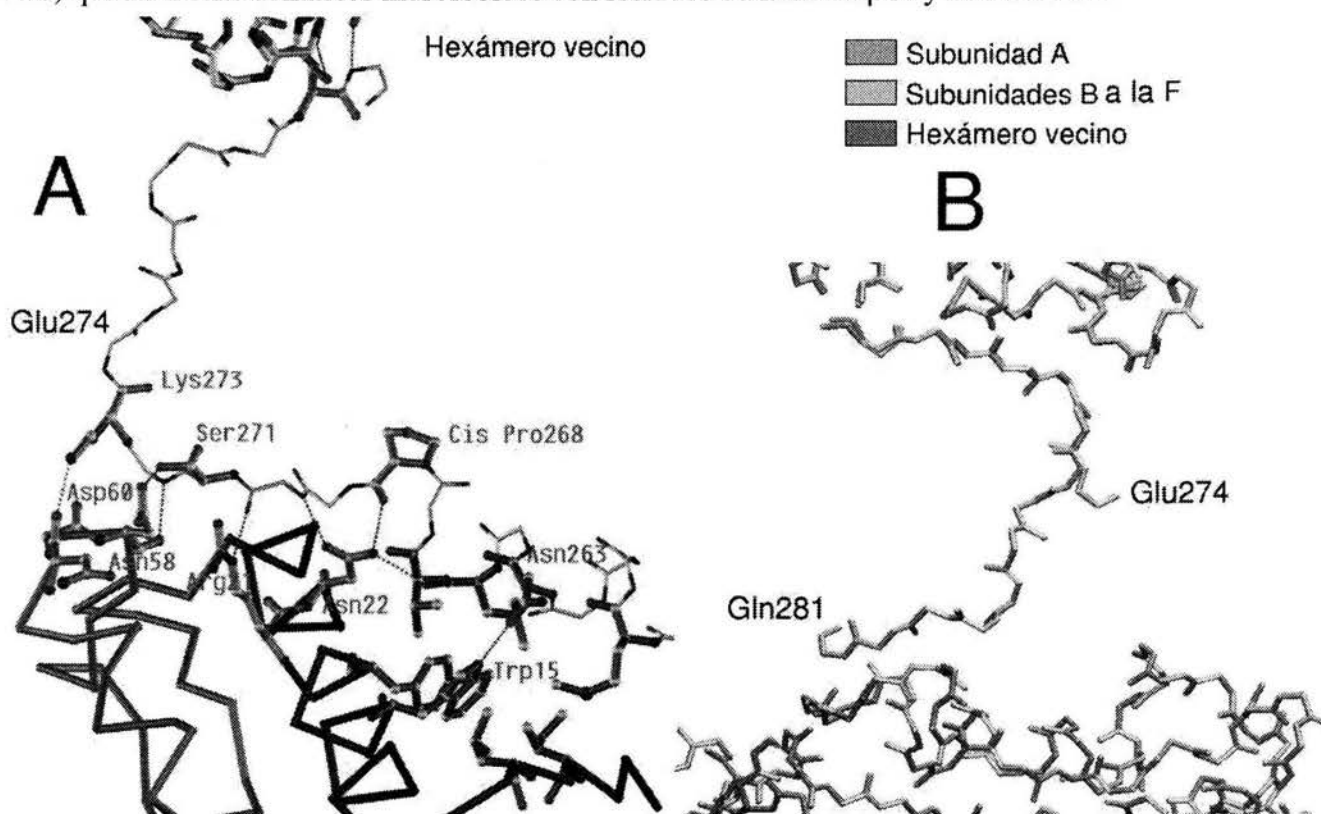


Figura 9.- El extremo C-terminal de la GlcN6P desaminasa humana I presenta 289 residuos pero sólo son visibles hasta el 274 en 5 de los monómeros. La subunidad A presenta 281 residuos con densidad electrónica visibles debido a un contacto cristalográfico (figura A). En la figura A se observan los contactos hidrofóbicos de la hélice nueva con residuos color magenta. Los contactos polares están representados por líneas punteadas. La Ser271 es un sitio hipotético de fosforilación por cinasa C. Este residuo presenta un puente de hidrógeno con el Asp60. El Asp60 podría promover un cambio conformacional de la proteína dirigido al sitio activo cuando la Ser271 estuviese fosforilada. En la figura B se observa la diferencia entre el monómero A y el B.

La nueva hélice  $\alpha$  9 finaliza en su extremo C-terminal en una vuelta de hélice  $3_{10}$  (aminoácidos 263 a 266). A continuación de la hélice 9 se aprecia la densidad electrónica de una asa o rulo (aminoácidos 267-274) que se extiende manteniendo contactos con la hélice  $\alpha$  1 en dirección al asa localizada en el extremo C-terminal de la hélice  $\alpha$  2. Con esta asa el C-terminal de la enzima presenta los últimos contactos con el plegamiento hasta el aminoácido Lys273. La GlcN6P desaminasa humana tiene 289 aminoácidos por monómero; sin embargo, en 5 de los monómeros (de la subunidad "B" a la "E") la densidad electrónica es continua hasta el aminoácido 274, mientras que los residuos del 275 al 289 están desordenados. Excepcionalmente en el monómero "A" se observa la densidad electrónica hasta el aminoácido 281 debido a que existe un contacto cristalográfico entre hexámeros vecinos de la red cristalina. Los aa del 282 al 289 están totalmente desordenados. Es interesante notar que en la posición 268 de cada monómero se observa un aminoácido poco común: una *cis*-prolina.

**Sitio alostérico de la GlcN6P humana.** La GlcN6P desaminasa humana presenta 6 sitios de ligadura, uno por monómero, para el activador alostérico N-Acetil Glucosamina 6-fosfato. Como en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, los sitios alostéricos se forman en una cavidad o hendidura ubicada en la interfaz de dos monómeros que pertenecen al mismo trímero. Así se localizan tres sitios alostéricos por trímero.

Del activador se observa una densidad electrónica continua y bien definida en cada uno de los sitios alostéricos, el cual se une a la proteína por medio de una numerosa red de puentes de hidrógeno (figura 10). La principal red de puentes de hidrógeno se forma entre los átomos de la proteína (cadena principal y algunas cadenas laterales) que forman la cavidad y los átomos del activador alostérico. Estas interacciones están formadas mayoritariamente por el extremo C-terminal del asa catalítica (del residuo 135 al 157) y la hebra  $\beta$  B' (del residuo 158 al 161). Ambas estructuras secundarias forman una de las superficies de la cavidad alostérica que contactan al activador. Esta superficie pertenece a una de las dos subunidades que forman la cavidad y se localiza justo por detrás del sitio activo. La hebra  $\beta$  B' además forma parte de la capa  $\beta$  antiparalela y es una de las hebras que soportan la tapa del sitio activo (del residuo 158 al 187).

La otra subunidad proporciona sólo dos interacciones y una de ellas es directamente con el N-terminal que se encarga de unir el fosfato del activador (figura 10). El otro residuo es la His262 que contacta con el O1 del activador por medio del NE2 de la cadena lateral. Este residuo no está presente en la enzima de *E. coli* y es un nuevo ligante del activador alostérico para ésta enzima y que no se había observado antes. Sin embargo, en la enzima de *E. coli* se observa a una molécula de agua

contactando al O1 del activador y que además presenta también un puente de hidrógeno con el Glu259. Estas interacciones diferentes, pero con la misma finalidad de enlazar al activador alostérico, muestran que las moléculas de agua también pueden formar parte de la región de unión a ligandos.

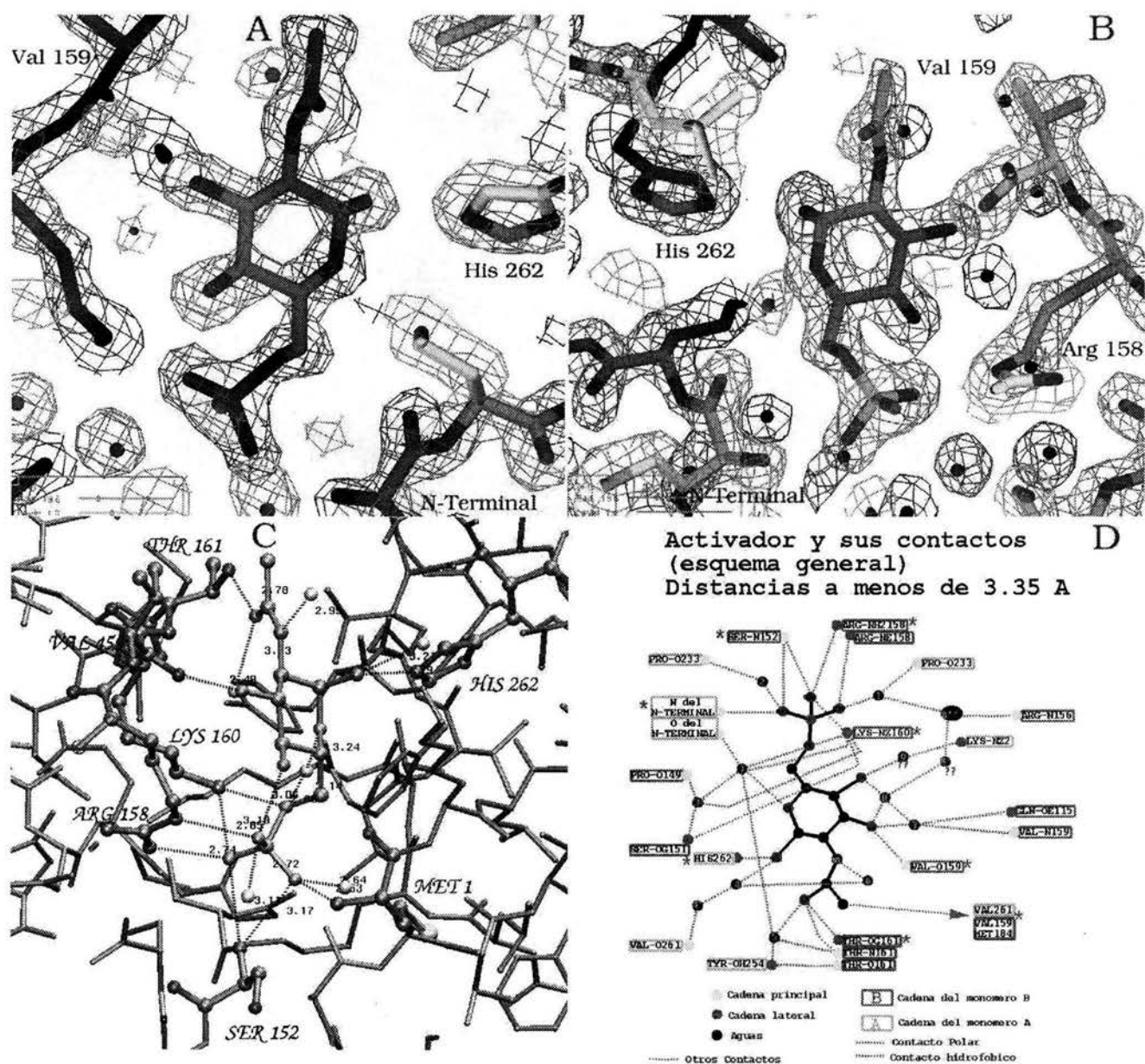


Figura 10.- A) y B) Densidades electrónicas de los activadores alostéricos en la subunidades A y B. C) Contactos del activador alostérico en la subunidad A. D) Esquema de los contactos del activador alostérico en las subunidades A y B a menos de 3.35 Å de distancia.



El activador alostérico presenta numerosas interacciones adicionales con la proteína mediante moléculas de agua. De estas, al menos ocho son importantes para unir el activador con la proteína formando una red de puentes de hidrógeno. Un análisis comparativo entre las estructuras de más alta resolución de la enzima bacteriana (código PDB 1FS5, 1FRZ y una estructura no depositada a 1.73 Å de resolución) y la enzima humana muestra que existen al menos 20 moléculas de agua conservadas entre ambas estructuras en torno al activador y la vecindad de la cavidad alostérica. La Tyr254 en la GlcN6P desaminasa de *E. coli* se propone como un "switch" de la transición alostérica [14] y se encuentra conservado en la enzima humana. El mecanismo de interruptor funciona cuando la Tyr254 establece un puente de hidrógeno con el oxígeno de cadena principal de la Thr161 del otro monómero y una molécula de agua que contacta con el activador alostérico. Esta interacción se establece cuando la enzima realiza la transición alostérica y se forma el conformero R, funcionando como un interruptor en la estabilización de este último. Es interesante mencionar que las interacciones de la Tyr254 con la Thr161 como con la molécula de agua se conservan respecto a la enzima bacteriana.

**El sitio activo.** La GlcN6P desaminasa humana presenta todos los residuos catalíticos del sitio activo conservados respecto a la enzima de *E. coli* (figura 11). Los residuos Asp141, His143 y Glu148 que pertenecen al asa catalítica (del residuo 135 al 157) están conservados, y forman parte del mecanismo catalítico que rompe el anillo de piranosa de la glucosamina-6 fosfato produciendo la forma abierta. El residuo Asp 72 que realiza la desaminación sobre el sustrato abierto está conservado también. Estos aminoácidos se encuentran en conformaciones similares a las observadas en la enzima de *E. coli*, sin embargo, el Asp141, la His143 y el Glu148 tienen diferencias en sus conformaciones que podrían ser significativas para el mecanismo de reacción.

La His143 de la GlcN6P desaminasa I humana presenta una desviación del anillo de imidazol de aproximadamente 45° respecto a la enzima de *E. coli*, sin embargo, las posiciones de los Nε1 de la His son muy similares. El 88% de los aminoácidos que forman la primera capa de la superficie de la cavidad catalítica están conservados. Únicamente los residuos Val135, Ile138 y Pro140 son diferentes respecto a la enzima bacteriana pero sus cadenas laterales están a 180° de la cavidad catalítica, es decir la cadena principal es la encargada de contribuir a la superficie del sitio activo. Otro residuo cambiado es la Ser43 que en la enzima de *E. coli* es Gly. La Ser43 está ubicada en el asa de ligadura del fosfato y presenta en algunos de los monómeros dobles conformaciones de la cadena lateral. Las interacciones de la Ser43 son importantes ya que se observa que mantiene puentes de hidrógeno con la cadena lateral de la Arg172 (perteneciente a la tapa del sitio activo) y con el fosfato del inhibidor.

La Ser43 es la única posición que podría afectar el mecanismo catalítico de la GlcN6P desaminasa humana respecto a la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Es probable que la Ser43 promueva el desplazamiento del asa de ligadura del fosfato y de la tapa del sitio activo respecto a las posiciones observadas en la enzima de *E. coli*, debido a las interacciones con la Arg172 y con el fosfato del inhibidor. Este desplazamiento daría como resultado que la cavidad catalítica sea grande que la observada en la enzima bacteriana.

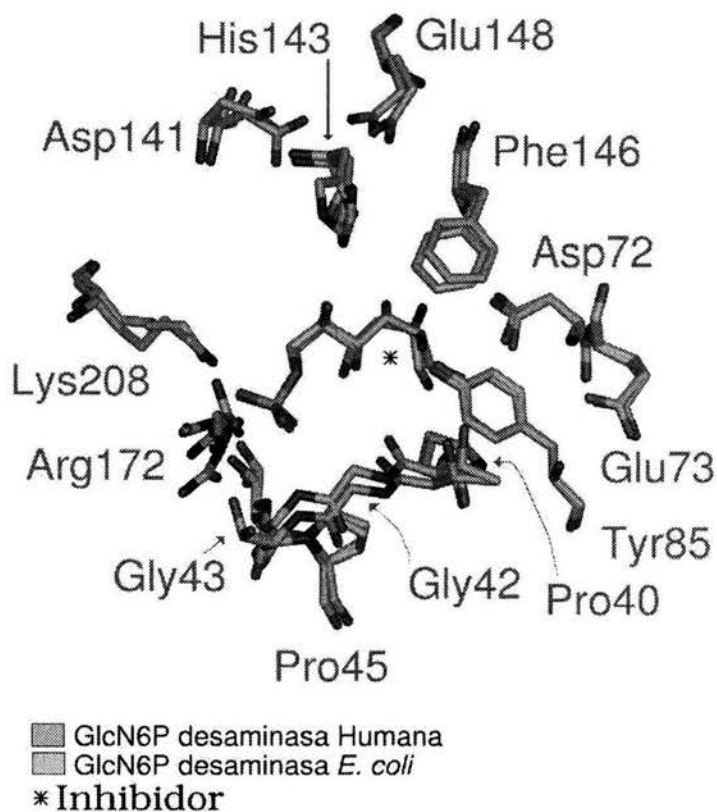


Figura 11.-Sitio activo de la GlcN6P desaminasa humana comparado con el de la enzima de *E. coli*.

La GlcN6P desaminasa humana presenta el sitio activo ocupado con dos moléculas, un  $\text{SO}_4^-$  y el inhibidor competitivo (2-deoxi 2-aminoglusitol 6-fosfato). Ambos están presentes en la cavidad con ocupación parcial. El  $\text{SO}_4^-$  y el  $\text{PO}_4^-$  del inhibidor ocupan la misma posición junto al asa de ligadura del fosfato y con una densidad electrónica bien definida. Sin embargo, la densidad electrónica de la molécula del inhibidor es pobre y en la mayor parte de los monómeros se observa falta de densidad electrónica para esta molécula. La molécula presenta una ruptura de la densidad electrónica en la mayoría de los casos entre la posición del  $\text{PO}_4^-$  y el C5. Finalmente los átomos C1, C2, C3, O1 y N2

presentan un alto grado de desorden (densidad electrónica débil) y en algunos casos desorden total (falta de densidad electrónica). Sabemos que la molécula del inhibidor se encuentra presente ya que su adición al afinamiento cristalográfico permitió un descenso en los valores de monitores, R y Rfree, (ver las etapas 18 a la 22 en tabla 3). Adicionalmente, el Asp72 presenta dos picos de alta intensidad a distancias de puentes de hidrógeno de los átomos OD1 y OD2 correspondientes a dos moléculas de agua.

**El posible canal de entrada del amonio.** La red de puentes de hidrógeno, formada por las moléculas de agua dentro del sitio activo, nos permitió localizar el canal de entrada y salida del  $\text{NH}_4^+$ , una entrada adicional al sitio activo que también ha sido observada en la enzima de *E. coli*. El canal está formado por residuos de la tapa del sitio activo (del Asn170 a la Phe174), del asa de ligadura del fosfato (de la Thr41 a la Ser43), residuos procedentes de las hebra  $\beta$  A' (la Tyr74) y residuos de la hélice  $\alpha$  3 (de la Phe83 al Glu88). Esta región presenta 5 anillos aromáticos (la Tyr74, la Tyr85, la Phe88, la Phe173 y la Phe174) en un agrupamiento semi-circular que forma el centro del canal de amonio. Estos cinco residuos están bien conservados en las secuencias de GlcN6P desaminasas hipotéticas con algunas variaciones de Phe a Tyr. El resto de los residuos que forman el canal y que rodean este semi-anillo de residuos aromáticos resultan ser de características hidrofílicas (figura 12). La mayor parte de los residuos hidrofílicos (incluyendo la Tyr74 y la Tyr85) presentan contactos de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que se encuentran localizadas dentro de este canal. En la GlcN6P desaminasa humana las moléculas de agua dentro del canal del amonio presentan una red de puentes de hidrógeno similar para la mayoría de los canales de cada monómero. Se pueden localizar al menos de 4 a 5 moléculas de agua por monómero al centro de los canales. Estas moléculas de agua son estructurales y probablemente funcionales ya que se localizan en una zona de probable tránsito de uno de los sustratos (el amonio).

Recordemos que la proteína GlcN6P desaminasa humana fue cristalizada en un ambiente con alta concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (concentración final en la gota D1 de 1.68 M). Las densidades electrónicas de una molécula de agua y una molécula de amonio no se pueden diferenciar, dado que presentan el mismo número de electrones. Por lo que no hay modo de saber si son moléculas de agua y/o iones de amonio, aunque las observaciones realizadas en la enzima homóloga de *E. coli*, donde la proteína fue cristalizada en conformación R en un medio sin amonio, también aparecen moléculas de agua en el canal. Si bien están organizadas en una red de puentes de hidrógeno similar, no es idéntica respecto a la enzima humana, ya que nunca aparecen 5 moléculas de agua simultáneamente.

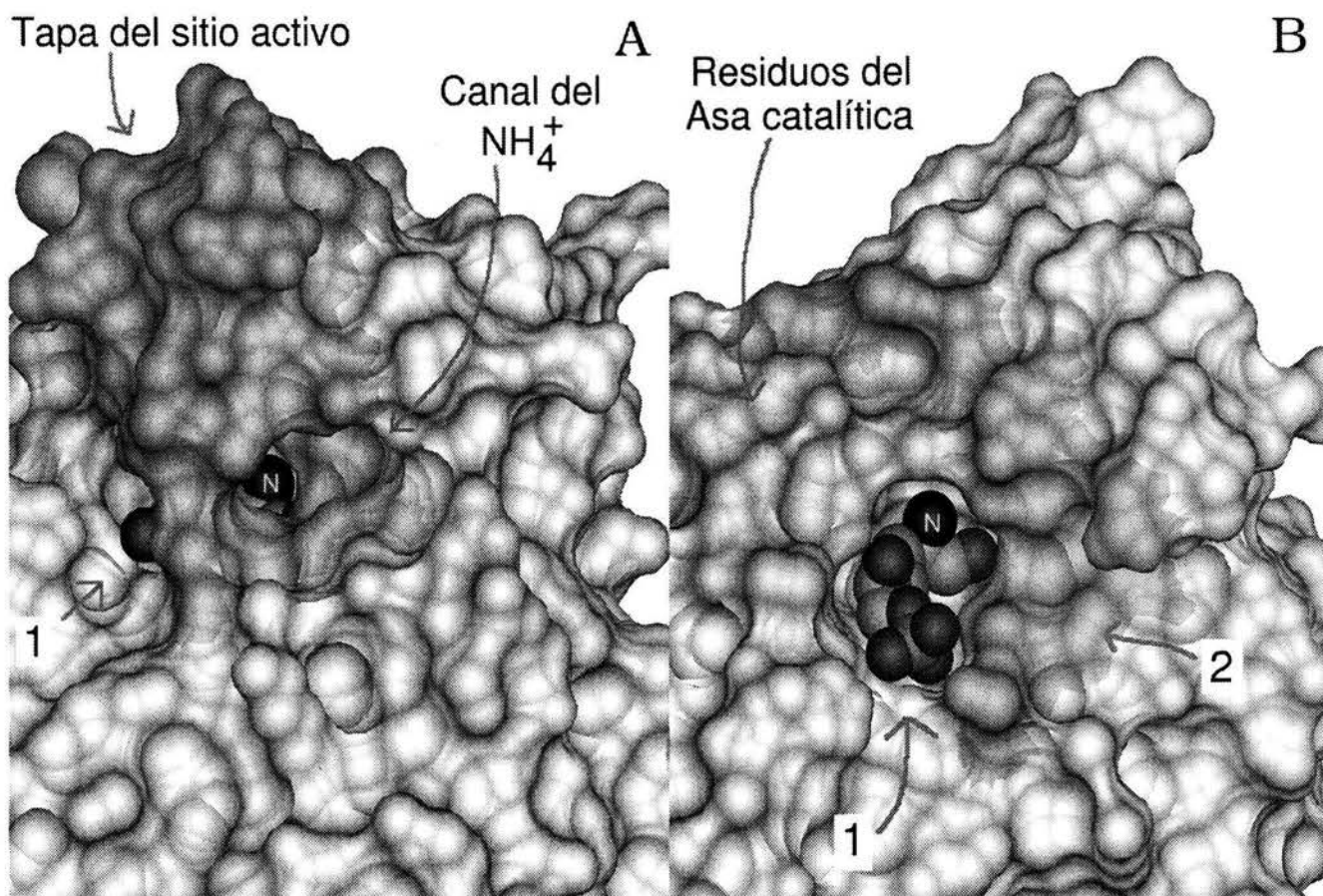


Figura 12.- Posible canal de entrada del amonio. A) Se observan en color verde los residuos hidrofílicos que forman el posible canal de entrada del amonio. En otros colores y con sus nombres respectivos los residuos aromáticos del canal. La molécula del inhibidor está en esferas de color azul claro, en rojo los oxígenos y en azul oscuro el nitrógeno de la amina (marcado con una N), el cual se observa al fondo del canal. B) Se observa la cavidad catalítica sin la tapa del sitio activo (en violeta). El número 1 marca la entrada a la cavidad catalítica de la fructosa-6-fosfato. El número 2 la entrada del amonio. En naranja claro el asa catalítica que contiene al residuo His143. En blanco está el resto de la proteína.

Sin embargo, la estructura de más alta resolución de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* es un complejo con metil amonio en conformación R (trabajo realizado por Enrique Rudiño-Piñera en nuestro laboratorio) donde se puede apreciar que este compuesto se encuentra unido en tres sitios: dos en la cavidad catalítica y otro fuera justo a la entrada del canal del amonio unido al residuo Glu83. En este caso aparece una red de puentes de hidrógeno muy similar a la observada en el monómero C de la enzima humana y con un anillo doble de moléculas de agua en el que uno de los oxígenos de la cadena lateral del Glu83 forma parte de uno de los anillos. Las moléculas de amonio dentro de la cavidad

catalítica están localizadas a 3 Å una de la otra y están unidas a cadenas laterales diferentes. El primer amonio está unido por un puente de hidrógeno a un oxígeno de la cadena lateral del residuo catalítico Asp72 a 2.8 Å y el otro está unido por un puente de hidrógeno a 2.77 Å del oxígeno de la cadena lateral de la Tyr85. La enzima humana presenta una molécula de agua en una posición cercana al primer amonio con un puente de hidrógeno entre 2.55 y 2.8 Å de los OD1 y OD2 del Asp72. El segundo amonio no tiene un equivalente cercano pero la enzima humana presenta otra molécula de agua que contacta el oxígeno de la Tyr85 a 2.8 Å desde otro ángulo.

**La GlcN6P desaminasa humana tiene 6 monómeros con diferencias conformacionales en la tapa del sitio activo.** Dado que el afinamiento cristalográfico se realizó con las seis subunidades (todo el hexámero) es posible comparar cada una de ellas por separado. Además, si las seis subunidades pertenecen a la unidad asimétrica es probable que haya diferencias entre las conformaciones de los residuos y/o asas de las subunidades. La sobreposición estructural de la traza de C $\alpha$  entre los seis monómeros de la GlcN6P desaminasa humana generó 15 combinaciones diferentes y fue realizada para determinar si existían diferencias conformacionales entre los monómeros. Se encontró que el RMSD de los monómeros no es igual y que varía entre 0.19 y 0.29 Å para subunidades del mismo tipo. Las sobreposiciones se realizaron con un integrador a 3.0 Å y todas las sobreposiciones tuvieron 274 átomos de C $\alpha$  incluidos (figura 13). Los valores de RMSD al ser distintos revelan la existencia de diferencias conformacionales entre los monómeros.

Un integrador mas bajo (0.6 Å) confirma que existen diferencias conformacionales entre los monómeros al excluir en la sobreposición a los átomos de C $\alpha$  correspondientes a las asas que rodean a la cavidad catalítica, incluyendo la tapa del sitio activo (del residuo 158 al 187). El valor de RMSD para las sobreposiciones varía entre 0.14 Å y 0.189 Å demostrando que las regiones incluidas dentro de la sobreposición son conformaciones indistinguibles una de otra debido que están por debajo del error experimental de las coordenadas (valor de la gráfica de Luzzati: 0.19 Å).

A diferencia de la enzima de *E. coli*, donde la tapa del sitio activo presenta una sola conformación, en la GlcN6P desaminasa humana se presentan diferencias conformacionales aún en presencia de los ligandos en el sitio activo (SO $_4^-$  e inhibidor). Entre los dos monómeros de la enzima humana cuyas tapas presentan mayores diferencias conformacionales se pueden observar distancias de hasta 1.7 Å entre sus átomos de C $\alpha$ . La región de la tapa en la cual se puede apreciar que hay mayores diferencias conformacionales entre las 6 tapas es entre los residuos 171 y 180. Dadas estas comparaciones podemos decir que la GlcN6P desaminasa presenta variaciones en la conformación

catalítica o en la conformación cerrada del motivo estructural del sitio activo.

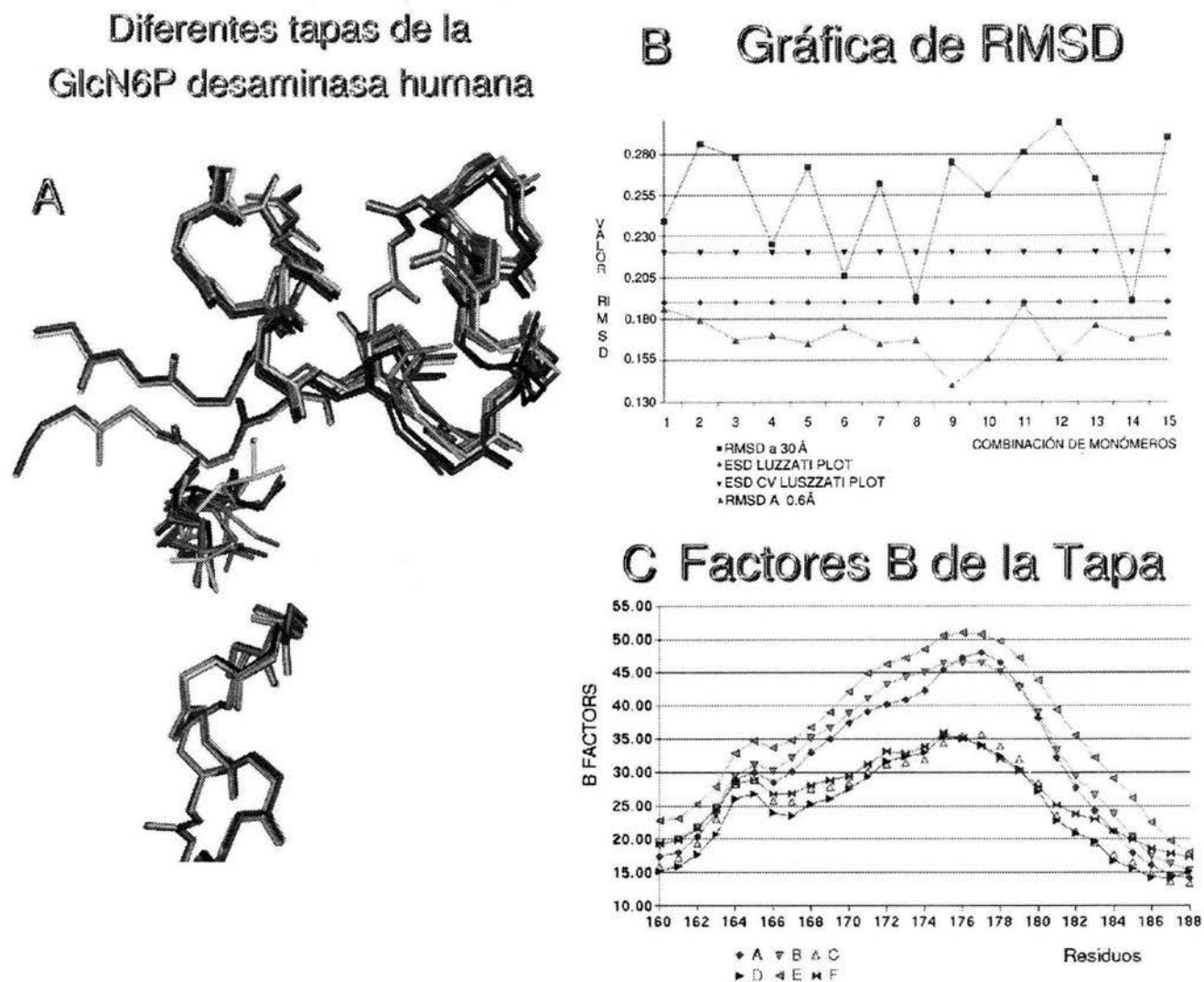


Figura 13.- Diferencias conformacionales entre las distintas tapas del sitio activo observadas entre monómeros diferentes de la GlcN6P desaminasa humana. En A se muestran las comparaciones de las diferentes tapas del sitio activo y el asa de ligadura del fosfato. Adicionalmente se observa también el análogo del estado de transición unido a la cavidad catalítica. En B se muestran los valores de RMSD de los alineamientos estructurales entre los diferentes monómeros. En C se muestran los valores B de las distintas tapas del sitio activo asociados a diferentes conformaciones.

### Comparaciones estructurales entre las GlcN6P desaminasa I humana y *E. coli*.

**Hexámeros.** De las comparaciones realizadas entre las estructuras de GlcN6P desaminasa I humana y la de *E. coli* se observan un RMSD de 1.15 Å usando un integrador de 3.8 Å (tabla 5). Cada monómero queda incluido en el alineamiento con 260 átomos de C $\alpha$  sumando un total de 1560 átomos para todo el hexámero. Las regiones de trimerización y dimerización se observan sobrepuestas entre hexámeros (figura 14). Sin embargo, se observa una desviación general de los hexámeros de la GlcN6P desaminasa humana respecto a la enzima bacteriana sobre los ejes de simetría tres y dos de aproximadamente 1.5°. Las diferencias son más evidentes sobre las regiones más alejadas del centro del hexámero. Las diferencias en el ensamble de ambos hexámeros parecen estar promovidas por una desviación general de la región de hexamerización. Esto provoca que la región de hexamerización esté orientada de forma diferente en los monómeros de ambas especies. La diferencia es difícil de medir en el alineamiento estructural de los hexámeros, sin embargo, se puede cuantificar con facilidad haciendo un alineamiento entre monómeros. Las diferencias entre ambos monómeros quedan fuera de la sobreposición.

Tabla 5.- Sobreposición estructural entre hexámeros de la GlcN6P desaminasa I humana y de *E. coli*.

<i>Moléculas comparadas</i>	<i>RMSD</i>	<i>No. de residuos considerados</i>	<i>Complejo cristalizado en la enzima de E. coli</i>	
			Sitio Activo	Sitio Alostérico
DEA vs D9T	1.153	1560	PO <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>
HOR vs D9T	1.155	1560	Inhibidor	PO <sub>4</sub>
HOT vs D9T	1.139	1560	PO <sub>4</sub>	Activador

*Para las sobreposiciones se uso un integrador a 3.8 Å de distancia entre átomos de C $\alpha$ .*

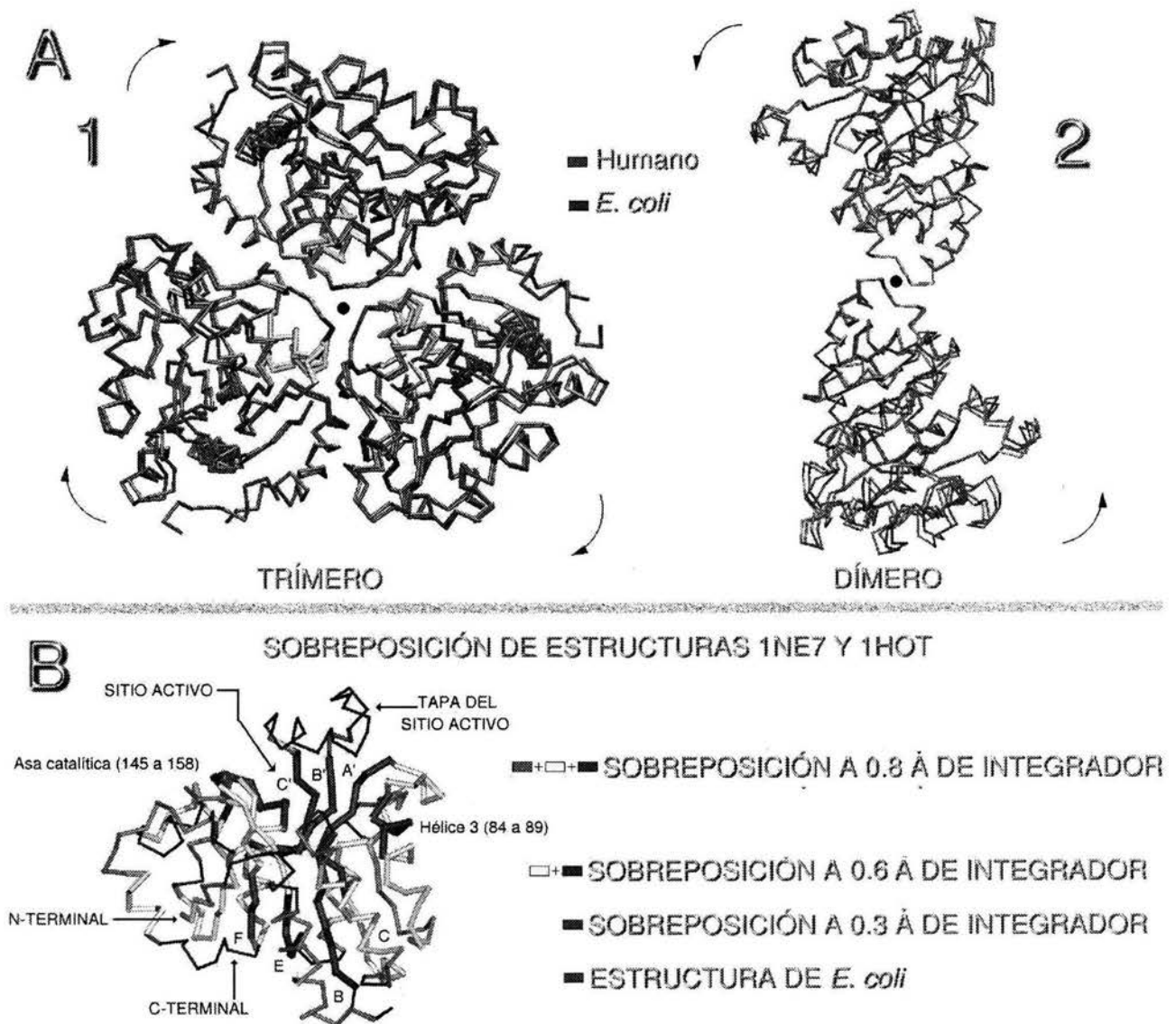


Figura 14.-A) Comparación entre hexámeros y monómeros de la GlcN6P desaminasa I humana y *E. coli*. En 1) se aprecia la sobreposición estructural desde el eje de simetría tres. En azul claro y en amarillo las hélices  $\alpha 7$  y  $3_{10}$  del motivo estructural de trimerización. Este motivo estructural promueve una desviación de los monómeros en dirección de la flechas marcadas tanto en 1) como en 2). En 2) se aprecia la sobreposición estructural desde el eje de simetría dos. B) Sobreposición estructural entre monómeros de 1HOT y 1NE7 a tres integradores diferentes. Los tres colores juntos (verde, blanco y rojo) representan la sobreposición a 0.8 Å. Los colores blanco y rojo representan la sobreposición a 0.6 Å. El color rojo representa la sobreposición a 0.3 Å. Las regiones sobrepuestas a este último integrador son las hebras A', B', C', B, E, F, parcialmente la hebra C y las regiones 84 a 89 y 145 a 158.



**Monómeros.** Los valores para el RMSD entre la subunidad de *E. coli* (código pdb 1HOT) y las seis subunidades de la GlcN6P desaminasa I humana están entre 0.57 y 0.68 Å, usando un integrador de 3.8 Å que incluye átomos 260 C $\alpha$  de un total de 266. Las observaciones gráficas de las sobreposiciones ubican las diferencias principalmente alrededor del sitio activo, la tapa, asa de ligadura del fosfato, asa cercanas, la hélice  $\alpha$  7 de la región de trimerización y el extremo C-terminal.

Para cuantificar las diferencias entre los plegamientos y para localizar las regiones de máxima conservación estructural, se analizaron 2 alineamientos con diferentes integradores (0.6 y 0.3 Å. Figura 14). Las sobreposiciones fueron realizados entre el monómero A de la GlcN6P desaminasa I y las subunidades B de la enzima bacteriana de las estructuras reportadas con código PDB 1DEA, 1HOR, 1HOT y 1FS5 (tabla 6). Los alineamientos con integrador de 0.6 Å, arrojaron un RMSD de 0.333, 0.318, 0.338 y 0.350 Å con 153, 149, 162 y 124 C $\alpha$  considerados respectivamente en el orden de los códigos PDB mencionados.

Tabla 6.- Sobreposición estructural entre los monómeros de la GlcN6P desaminasa I humana y de *E. coli*.

<i>Moléculas comparadas</i>	<i>RMSD</i>	<i>Integrador en Å</i>	<i>No. átomos de Carbonos <math>\alpha</math> considerados</i>	<i>Porcentaje del plegamiento</i>	<i>Complejo cristalizado en la enzima de E. coli</i>	
					<i>Sitio Activo</i>	<i>Sitio Alostérico</i>
DEA vs 1NE7	0.333	0.60	153	58.84	PO <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>
HOR vs 1NE7	0.318	0.60	149	57.30	Inhibidor	PO <sub>4</sub>
HOT vs 1NE7	0.338	0.60	162	62.30	PO <sub>4</sub>	Activador
DEA vs 1NE7	0.198	0.30	61	23.46	PO <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>
HOR vs 1NE7	0.180	0.30	47	18.07	Inhibidor	PO <sub>4</sub>
HOT vs 1NE7	0.186	0.30	53	20.38	PO <sub>4</sub>	Activador

De las 4 estructuras de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* sobrepuestas con la GlcN6P desaminasa I humana las regiones que no se sobreponen son 4: la primera es la hélice  $\alpha$  1 así como el asa que la precede y el asa que continua a la hélice (residuos 5 al 33); la segunda es la tapa del sitio activo entre el residuo 164 y 183; la tercera corresponde a la región de hexamerización, en las hélices  $\alpha$  7 y 3<sub>10</sub> del eje de simetría 3 y al asa 241 a 250 del eje de simetría dos. La cuarta y última región corresponde al extremo C-terminal a partir del residuo 258. Las diferencias observadas de la región de hexamerización se relacionan con la desviación de 1.5 grados observada en la sobreposición de hexámeros. Existe una orientación distinta del motivo estructural del cual forman parte las hélices  $\alpha$  7 y 3<sub>10</sub>, así como en el asa de dimerización de la GlcN6P desaminasa humana respecto a la enzima de *E. coli*.

Las sobreposiciones realizadas con un integrador de 0.3 Å recalcularon los valores para RMSD a 0.198, 0.180, 0.186, 0.169 Å y con 61, 47, 53 y 44 átomos de C $\alpha$  incluidos. En estas se sobreponen las regiones estructurales más conservadas las cuales son una parte de la cavidad catalítica y una parte de la región de control alostérico de la enzima localizada en el asa catalítica (figura 14). De la cavidad catalítica se conservan la capa  $\beta$  antiparalela (las hebras  $\beta$  A', C', y B'), las hebras  $\beta$  B, C, E, y F de la capa  $\beta$  central (la unión entre plegamientos de Rossmann) y el fragmento 84 a 89 de la hélice  $\alpha$  3. La hélice  $\alpha$  3 contiene a la Tyr85, la cual se propone podría intervenir en la unión del grupo NH $_3^+$  que es liberado como NH $_4^+$  (uno de los productos) una vez realizada la reacción. La hebra  $\beta$  A' de la capa  $\beta$  antiparalela contiene el Asp72, el residuo catalítico, y a la Tyr74, la cual se localiza en la base de la tapa del sitio activo y con la que presenta contactos hidrofóbicos a través de la Phe174. La Phe174 es un residuo importante para la función de la tapa, como demuestra la mutante en la Phe174-Ala realizada en la enzima de *E. coli*, ya que carece de actividad en ausencia del activador alostérico pero recupera la actividad en su presencia [67]. En la estructura 1HOT, obtenida en complejo con el activador alostérico, se sobrepone con la enzima humana un fragmento adicional de la asa catalítica (residuos 145 a 152 y 155 a 158) relacionado con la zona de unión con el activador. El fragmento se sobrepone debido a que la unión del activador promueve un cambio conformacional de ésta región.

Las estructuras 1DEA y 1HOR presentan únicamente PO $_4^-$  en el sitio alostérico, motivo por el cual los dos fragmentos del asa catalítica (145 a 152 y 155 a 158) no se sobreponen con la enzima GlcN6P desaminasa I humana la cual fue resuelta en complejo con el activador alostérico. En la estructura de *E. coli* 1FS5 se observan algunas diferencias en la capa  $\beta$  antiparalela donde sólo se sobrepone la hebra  $\beta$  B' completa. Las hebras de la capa  $\beta$  central B, C, E, F y G se mantienen sobrepuestas y se pierde el fragmento 84 a 89 de la hélice  $\alpha$  3. Las diferencias son causadas por la falta de moléculas unidas al sitio activo en esta estructura y observamos a la enzima con la tapa del sitio activo en la conformación abierta.

Entre las diferencias observadas en las secuencias de aminoácidos entre GlcN6P desaminasa de *E. coli* y humana está la posición 121. En *E. coli* es una Tyr y en humana es una Phe. Las mutantes (Tyr121-Thr y Tyr121-Trp) en esta posición en la enzima de *E. coli* promueven cambios notables en las propiedades de unión del activador alostérico respecto a la enzima normal [13]. Las mutantes presentan durante la primera fase de activación un sistema alostérico mixto de tipo K/V. El residuo 121 está localizado en la hélice  $\alpha$  4, atrás de la hebra del Asp72 que realiza la etapa de catálisis dos (hidrólisis del NH $_4^+$ ). En *E. coli* el residuo Tyr121 forma un puente de hidrógeno con la cadena

principal del Asn70. En la enzima humana la Phe121 sólo participa en interacciones hidrofóbicas con la Phe69, la Leu107, la Ile125 y la Val188. Los cambios observados podrían deberse a una diferente estabilidad de la hélice  $\alpha 4$  que contacta con el sitio alostérico y la cavidad catalítica. Las comparaciones de factores B entre las estructuras de *E. coli* y la estructura humana no muestran diferencias en los patrones de las vibraciones y desplazamientos de los átomos en esta región. La inestabilidad podría entonces manifestarse durante el cambio de la transición alostérica antes de la unión del activador alostérico.

## **Segunda Parte: La GlcN6P desaminasa II**

**Los genomas de humano y de ratón poseen dos genes para la Glucosamina 6-fosfato desaminasa.** El reporte de dos diferentes extremos N-terminal para la proteína GlcN6P desaminasa de hámster y el de dos diferentes secuencias de cDNA de ratón, que codifican para dos GlcN6P desaminasas distintas, motivó la búsqueda de un posible segundo gen en el genoma humano para esta enzima. La búsqueda realizada con la secuencia peptídica de la GlcN6P desaminasa humana en los bancos de secuencia del genoma humano nos permitió encontrar dos genes diferentes para la GlcN6P desaminasa (figura 15). Por un lado, la secuencia del péptido deducida a partir de una secuencia del cromosoma 5, correspondiente a la publicada para de la GlcN6P desaminasa I humana de 289 aminoácidos codificada por el gen *gnp1*. Por otro lado, se encontró un segundo marco de lectura abierto con 6 exones y 5 intrones en el cromosoma 4. De la secuencia de nucleótidos codificante (exones) se puede deducir una proteína de 276 aminoácidos que proponemos codifica para la GlcN6P desaminasa II codificada por el gen *gnp2*. Este gen comparte con *gnp1* la misma talla en la mayoría los exones, a excepción del último, y presenta alta identidad (86.9%) hasta el aminoácido 276 (tabla 7). Los intrones se localizan en las mismas posiciones pero varían en longitud.

Las dos secuencias peptídicas fueron comparadas con los bancos de secuencia de cDNA de EST (Expressed Sequence Tags) o Marcas de secuencia expresadas de diversos tejidos humanos [59]. De este modo confirmamos que *gnp2* se expresa y por lo tanto, no se trata de un pseudogene. Más aún, encontramos que ambos mensajeros se coexpresan, lo cual sugiere que ambas enzimas coexisten en algunos tejidos como son hipotálamo, testículo, riñón y páncreas [60].

Las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes *gnp1* y *gnp2* humanos tienen alta identidad con las secuencias reportadas de ratón respectivamente (tabla 7) lo cual sugiere que se trata de los genes homólogos de cada especie con un gene ortólogo y un gene parálogo en ambos casos.

También hemos encontrado fragmentos de cDNA de GlcN6P desaminasa I y II (tabla 8) para la especie de laboratorio *Rattus norvegicus* [45] y recientemente se localizaron las secuencias de cDNA que codifican para los extremos C-terminal de ambas secuencias en *Canis familiaris* [68].

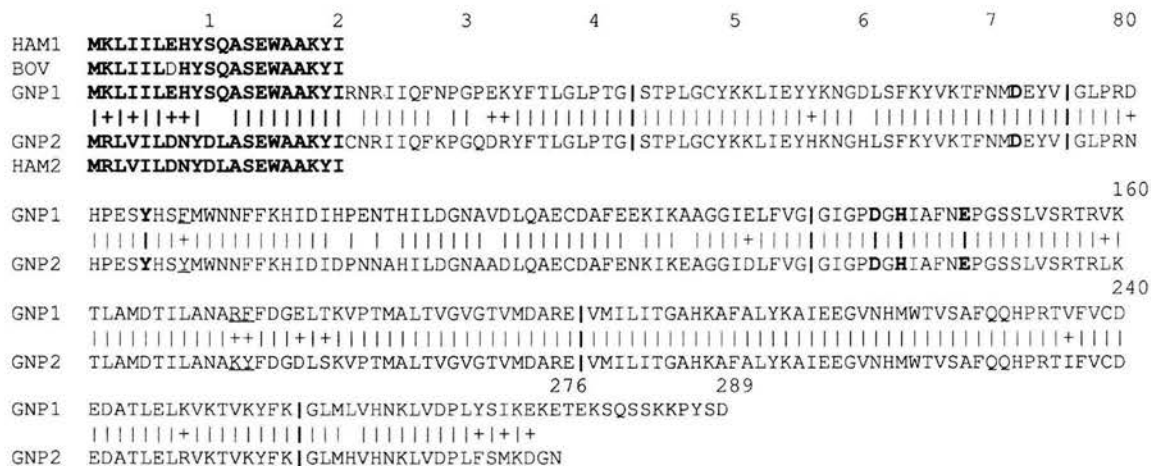


Figura 15.-Alineamiento de los productos peptídicos de los genes *gnp1* y *gnp2* de humano. Las líneas verticales "I" representan las posiciones de los intrones entre los exones. En los primeros 20 aminoácidos marcados en negritas están las secuencias reportadas del N-terminal para las proteínas GlcN6P desaminasa I y II en la línea germinal BHK-21 de hámster (que son 100% idénticas a las de humano). También está la secuencia de la GlcN6P desaminasa I de bovino que presenta una única mutación en la posición 7 de un Glu por un Asp. Residuos en negritas son catalíticos (72, 85, 141, 143 y 148). Los residuos subrayados son los residuos que podrían ser responsables del cambio de actividad de la enzima *Gnp1* a la *Gnp2* (88, 172 y 173).

Tabla 7.- Identities entre GlcN6P desaminasas de mamíferos cuya secuencia de aminoácidos son conocidas totalmente. En negritas las identities mas altas entre especies diferentes.

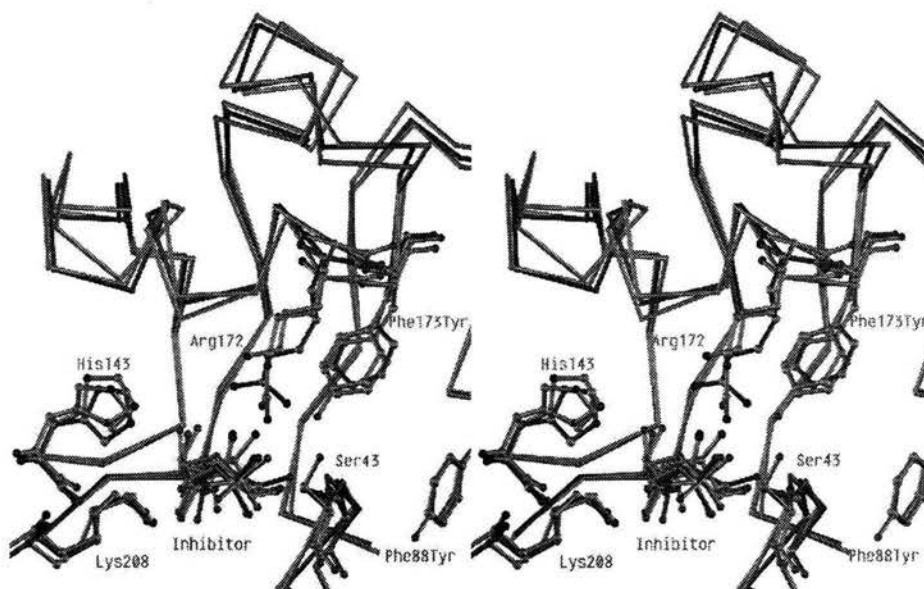
No. Residuos	Especies	<i>E. coli</i>	Hámster 1	Ratón 2	Ratón 1	Humano 2	Humano 1
289	Humano 1	58.20%	<b>95.10%</b>	86.90%	<b>95.10%</b>	86.90%	100.00%
276	Humano 2	57.80%	86.90%	<b>96.80%</b>	86.90%	100.00%	
289	Ratón 1	57.80%	<b>97.90%</b>	86.50%	100.00%		
276	Ratón 2	57.80%	86.50%	100.00%			
289	Hámster 1	58.20%	100.00%				
266	<i>E. coli</i>	100.00%					

Tabla 8.- Marcas de Secuencia Expresadas (EST) de los genes *gnp1* y *gnp2*

ORGANISMO	ENZIMA	LONGITUD	ENTRADA	TEJIDO	NUMERO ID
Humano	1	1-289	Cromosomal	--	gil13643897
Humano	1	1-197	EST	Hipotálamo	gil15494294
Humano	1	1-213	EST	Testículo	gil15253870
Humano	1	1-224	EST	Riñón	gil13337909
Humano	1	1-199	EST	Páncreas	gil18046891
Humano	2	1-276	Cromosomal	--	gil13628777
Humano	2	1-205	EST	Hipotálamo	gil15490182
Humano	2	1-140	EST	Testículo	gil13999823
Humano	2	1-103	EST	Riñón	gil5887273
Humano	2	154-276	EST	Riñón	gil13335729
Humano	2	1-150	EST	Páncreas	gil15688350
Humano	2	1-168	EST	Linea celular de leiomiocoma	gil10346591
Humano	2	1-166	EST	Linea celular de Adenocarcinoma	gil12613723
Ratón	1	1-289	cDNA	Testículo	gil5353760
	1	1-289	cDNA	Testículo	gil6754029
Ratón	2	1-276	cDNA	Testículo	gil12853906
Ratón	2	1-276	cDNA	Embrión de 8 Días	gil12856903
Hámster	1	1-289	cDNA	Testículo	gil1177524
Bovino	1	1- 42	Péptido secuenciado	Extracción Renal	Lara-Lemus et al 1998
Bovino	1	1-167	EST	Tejido Mamario	gil9607266
Bovino	1	1-155	EST	Tejido Mamario	gil9602899
Bovino	1	1-163	EST	Tejido Mamario	gil9596706
Bovino	1	57-174	EST	Tejido Mamario	gil6860672
Perro	1	158-289	cDNA	Testículo	gil18818168
Perro	2	208-276	cDNA	Corazón	gil23702059
Rata	1	1-130	cDNA	Papila dérmica	gil8549670
Rata	2	1-126	cDNA	Raíz de ganglio dorsal	gil13893393

**Modelo computacional de la GlcN6P desaminasa II.** Con la finalidad de proponer una hipótesis estructural de las diferencias observadas en las propiedades del mecanismo alostérico y cinéticas de las GlcN6P desaminasas I y II en mamíferos, se construyó un modelo computacional de la GlcN6P desaminasa II. Este modelo es estable en la minimización y nos permitió encontrar las diferencias que hay entre ambas enzimas y su posible vínculo con las diferencias en los mecanismos alostéricos observados experimentalmente. La dinámica molecular generó algunas distorsiones debido a la falta de los monómeros del hexámero completo al realizar los cálculos. Estas distorsiones fueron controladas fijando la cadena principal de las regiones de contactos intermonoméricos. Lo más notable de las simulación fue que se observó el acercamiento de la Tyr173 (localizada en la tapa del sitio activo) hacia la cadena lateral de la Ser43 (localizada en el asa de ligadura del fosfato del substrato), así como la movilización de la Lys172 en dirección del fosfato del substrato. Otro movimiento

importante fue el del asa de ligadura del fosfato del sustrato (del residuo 40 al 45). Esta asa se desplazó en dirección del asa conocida para la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, promoviendo de este modo la formación de una cavidad catalítica más chica para la GlcN6P desaminasa II humana. El desplazamiento del asa de ligadura de fosfato se debe a otra variación observada entre las dos desaminasas humanas de Phe a Tyr en la posición 88. El grupo OH de la Tyr88 de la GlcN6P desaminasa II establece puentes de hidrógeno con la cadena principal del asa de ligadura del fosfato, empujando la estructura hacia el sitio activo (figura 16).



*Figura 16.- Figura estereoscópica del modelo computacional de la GlcN6P desaminasa II (en color naranja) comparado con las GlcN6P desaminasas I humana (en color morado) y de E. coli (en color verde). Estas dos últimas obtenidas por cristalografía.*

**Análisis de firmas de secuencia del extremo C-terminal.** La GlcN6P desaminasa I tiene cuatro posibles sitios de fosforilación en el extremo C-terminal para una cinasa C (tabla 9) y sólo un posible sitio de fosforilación para una cinasa CK-2 (tabla 10). Algunos de estos sitios se localizan en el fragmento de la proteína que carece de densidad electrónica (a partir del residuo 274) en la posición número cinco del fragmento analizado. La posición número uno, la Ser271, aparece como un sitio consenso de fosforilación para cinasa C y para la CK-2. El análisis en la estructura muestra que la cadena lateral de la Ser271 mantiene un puente de hidrógeno con la cadena lateral del Asp60 a 2.59 Å.

El Asp60 se ubica en la base de la hélice dos la cual presenta hacia su extremo N-terminal el asa de ligadura del fosfato (del residuo 40 al 45). Si la Ser271 fuera fosforilada, la proteína podría sufrir un cambio conformacional transmitido por el Asp60, cuya consecuencia sería mayor actividad por ajustar la posición del asa de ligadura del fosfato a una posición similar a la observada en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. La secuencia de aminoácidos de la GlcN6P desaminasa II presenta un posible sitio de fosforilación también en la Ser271 pero no conserva ni el Asp60 ni la Arg21. La Arg21 presenta un puente salino con el Asp60 en la GlcN6P desaminasa I, mientras que en la GlcN6P desaminasas II no existe debido a que la posición 21 es una Cys y la posición 60 una His. Las modificaciones que puedan ocasionar estos cambios en la GlcN6P desaminasa II no se conocen pero sugieren cambios en la dirección de la cadena principal del extremo C-terminal y de algunas de las interacciones de las cadenas laterales.

Como se puede observar, la Ser271 es un posible sitio consenso de fosforilación para la cinasa C y la CK-2, en cuyo caso las implicaciones funcionales serían las mismas, independientemente de que enzimas realicen la fosforilación. La diferencia entre ambas enzimas sería el mecanismo por el cual llevan a cabo su función reguladora. Proponemos que la enzima que es regulada por fosforilación es la GlcN6P desaminasa I debido a que la enzima II presenta variaciones que sugieren que este sitio no es funcional o aunque se fosforile, no provoca cambios conformaciones relacionados con la actividad catalítica. La Arg21 de la GlcN6P desaminasa I tiene además, un puente de hidrógeno con la cadena principal del residuo 270 (y no solo con la cadena lateral un puente salino). El reemplazo a una Cys en la GlcN6P desaminasa II podría cambiar las interacciones y modificar la dirección de la cadena principal y su conformación funcional. La posible fosforilación de la GlcN6P desaminasas I de humano como un mecanismo de activación/regulación podría estar relacionado con en el hecho de que las enzimas humana y de bovino tiene diferencias en la  $k_{cat}$  ( $10.1 \text{ s}^{-1}$  para la humana y  $61 \text{ s}^{-1}$  para la de bovino). La enzima humana es recombinante (la de bovino fue aislada de riñón) y tiene una  $k_{cat}$  más baja lo cual repercute en una eficiencia catalítica ( $k_{cat}/k_m$ ) más baja que la observada en la enzima de bovino ( $67.33 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para la humana y  $381.25$  para la de bovino). La enzima de bovino al ser aislada de la fuente es probable que presente una modificación en el plegamiento que promueva cambios en la actividad catalítica.

Tabla 9.- Probables sitios de fosforilación para la cinasa C en las GlcN6P desaminasas I y II.

Número de acceso de PROSITE : PS00005

Número de acceso a documentación de PROSITE: PDOC00005

Patrón de reconocimiento: [ST]-x-[RK]. Sitios de fosforilación T o S

*Probables sitios de fosforilación en la GlcN6P desaminasa I (del residuo 271 al 289).*

Sitio	Secuencia	Identidad/Similitud*
271-289 1 a 3	<b>SI</b> KEKETEK <b>S</b> QSSKKPYSD	100% identidad
271-289 7 a 9	SIKEKET <b>TE</b> K <b>S</b> QSSKKPYSD	100% identidad
271-289 12 a 14	SIKEKETEK <b>S</b> Q <b>S</b> KKPYSD	100% identidad
271-289 13 a 15	SIKEKETEK <b>S</b> Q <b>S</b> KKPYSD	100% identidad

*Probable sitio de fosforilación en la GlcN6P desaminasa II (del residuo 271 al 276).*

271-276 1 a 3	<b>SM</b> KDGN	100% identidad
---------------	----------------	----------------

\* La identidad/similitud es calculada respecto al patrón de reconocimiento.

*In vivo, la cinasa C tiene preferencia para fosforilar a los residuos de Ser o de Thr localizados cerca de residuos básicos en el extremo C-terminal. La presencia de residuos básicos en los extremos N y C-terminales del sitio de fosforilación incrementan la eficiencia de la reacción [69,70]. Se muestra el posible sitio de fosforilación para la GlcN6P desaminasa II.*

Tabla 10.- Probables Sitios de fosforilación para cinasa de Caseína 2 (CK-2) en las GlcN6P desaminasas I y II

Número de acceso de PROSITE: PS00006

Número de acceso a documentación de PROSITE: PDOC00006

Patrón de reconocimiento: [ST]-x(2)-[DE]. Sitio de fosforilación: S o T

*Probable sitio de fosforilación en la GlcN6P desaminasa I (del residuo 271 al 289).*

Sitio	Secuencia	Identidad *
271-289 1 to 4	<b>SI</b> KEKETEK <b>S</b> QSSKKPYSD	100% Identidad

*Probable sitio de fosforilación en la GlcN6P desaminasa II (del residuo 271 al 276).*

271-276 1 a 3	<b>SM</b> KDGN	100% identidad*
---------------	----------------	-----------------

\* La identidad/similitud es calculada respecto al patrón de reconocimiento.

*La especificidad hacia el sustrato por parte de la CK-2 puede ser resumida como sigue: 1) Bajo condiciones similares los aminoácidos Ser y la Thr son igualmente susceptibles a ser fosforilados. 2) Un residuo ácido (Asp o Glu) debe estar presente a 3 residuos del extremo C-terminal del sitio aceptor de fosfato. 3) Residuos ácidos en posiciones +1, +2, +4, y +5 incrementan la tasa de fosforilación. Muchos sustratos fisiológicos tienen al menos un residuo ácido en estas posiciones. 4) El Asp es preferido sobre el Glu como residuo determinante. 5) Un residuo básico en el N-terminal del sitio aceptor disminuye la tasa de fosforilación mientras uno ácido puede incrementarla [71].*



## Discusión

### **Las dos GlcN6P desaminasas que existen en mamíferos.**

En la literatura se reportan dos diferentes mecanismos alostéricos para la GlcN6P desaminasa de mamíferos (un sistema *K* en perro y un sistema *V* en bovino y humano. Tabla 11) asociado a enzimas de dos diferentes pesos moleculares (29.7 kDa para perro y 32.5 kDa para bovino y humano) [7,8,22]. Este dato por si solo podría indicar una modificación sobre la misma proteína, como proteólisis o una edición diferencial de un único RNA mensajero (el llamado *splicing* alternativo en ingles), que produciría dos péptidos de diferentes tallas. Sin embargo, el reporte de dos secuencias de cDNA distintas que codifican para dos GlcN6P desaminasas (de 276 y 289 aminoácidos y 86% de identidad) en ratón [44,45], nos dio la pauta para suponer la existencia de dos genes que codificaran para dos GlcN6P desaminasas en el genoma humano y con mecanismos alostéricos diferentes.

En la base de datos del genoma humano se localizaron dos genes con diferente número de bases codificantes y en diferentes cromosomas. El primero de dichos genes codifica para una proteína de 289 aminoácidos, previamente reportado como el gen que codifica para la GlcN6P desaminasa humana, alojado en el cromosoma 5 [43]. El segundo gen codifica para una proteína de 276 aminoácidos que se encuentra alojado en el cromosoma 4, y el cual no ha sido reportado en la literatura como una GlcN6P desaminasa. Ambos genes se expresan ya que existen los reportes de sus EST (Secuencias de marca de expresión) en diferentes tejidos y en ocasiones se reportan ambos EST en los mismos tejidos. Los genes humanos fueron nombrados *gnp1* (para la secuencia de 289 aa) y *gnp2* (para la secuencia de 276 aa) y las proteínas GlcN6P desaminasa I y II.

Los pesos moleculares teóricos de las secuencias peptídicas codificadas por los genes de ratón y humano son de 32.5 kDa para el péptido de 289 residuos y 31 kDa para el péptido de 276 residuos. Dichos pesos son aproximados con los pesos reportados para las proteínas de bovino, humano y perro. Del gene *gnp1* se puede deducir la secuencia peptídica de la GlcN6P desaminasa I humana, la cual es coincidente con la que se puede deducir de los datos cristalográficos y 95% idéntica a la codificada por el gen de ratón de la misma longitud (*gnp1* de ratón). De la secuencia de aminoácidos de la proteína de bovino sólo se conocen 20 aa del N-terminal, de los cuales 19 son idénticos a los de la GlcN6P desaminasa I. Información adicional de la línea celular BHK-21 de hámster reporta los primeros 20 aminoácidos del N-terminal dos secuencias diferentes para la GlcN6P desaminasa [5]. Uno de estos fragmentos de aminoácidos es idéntico a la secuencia de la GlcN6P desaminasa I y el otro es idéntico a la secuencia de la GlcN6P desaminasa II. *De estos datos deducimos la existencia de dos genes (gnp1 y*

*gnp2*) que codifican para dos GlcN6P desaminasas diferentes en sus secuencias de aminoácidos y longitudes peptídicas. Ambos genes se expresan en tejidos humanos, de ratón y de hámster. Se deduce también que la enzima purificada de perro, es la GlcN6P desaminasa II homóloga a las secuencias peptídicas de 276 aminoácidos codificadas por los genes *gnp2* de humano, ratón y hámster.

En las bases de datos de marcas de expresión (EST) correspondientes a otros mamíferos se localizaron fragmentos de las secuencias de perro y rata. Es probable que algunos mamíferos tengan ambos genes activos de GlcN6P desaminasa.

El hecho de tener dos sistemas alostéricos diferentes reportados en el mismo tipo de tejido (riñón de bovino y perro) para mamíferos, asociados a dos diferentes masas moleculares nos permite especular que se trate de dos enzimas independientes, cada una formando un homohexámero diferente con sus propiedades catalíticas y alostéricas propias. Aunque definitivamente la existencia de un posible heterohexámero no puede ser desechada totalmente aún, realizamos estudio de modelado computacional que es útil para establecer una hipótesis.

Para soportar tal hipótesis localizamos los cambios de aminoácidos entre ambas secuencias y comparamos el modelo de la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa I humana recombinante, que fue el resultado de este trabajo, con un modelo computacional hecho por homología de la GlcN6P desaminasa II humana. La comparación entre ambos modelos arrojó evidencia estructural de los posibles residuos que promueven los cambios de un sistema *V* a un sistema *K*. El modelo computacional de la GlcN6P desaminasa humana II muestra que es probable que los diferentes residuos observados en torno al sitio activo (posiciones 88, 172, 173. Ver figura 16) modifiquen su actividad a un sistema tipo *K* similar a la enzima de *E. coli*. El asa de ligadura del fosfato (del residuo 40 al 45) podría cambiar su posición a una similar a la observada en la estructura de GlcN6P desaminasa de *E. coli* por tener nuevas interacciones con las cadenas laterales diferentes. Por otro lado, es probable que las diferentes cadenas laterales también modifiquen la variación conformacional observada en la tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa I. Las alteraciones que se puedan promover en la actividad debido a las diferencias en la talla del C-terminal no se pueden prever, sin embargo, la posición de la Cys21 en la GlcN6P desaminasa II (Arg en la GlcN6P desaminasa I) podría ser importante ya que se localiza en la vecindad del C-terminal y podría ser un residuo relevante en la estabilidad del plegamiento. Un dato interesante es la existencia de un posible sitio de fosforilación en ambas enzimas en la Ser271 y que es cercana a la posición 21. La funcionalidad de este sitio en las dos enzimas no está comprobada, pero podría estar relacionada con las diferencias en las posiciones 21 y 60 ya que es muy probable que cambien las interacciones en esta región debido a los cambios. *En base*

a estos datos nosotros proponemos la existencia de dos enzimas con diferentes propiedades alostéricas, un homohexámero con cadenas de 276 residuos y otro homohexámero con cadenas de 289 residuos.

Tabla 11.- Constantes catalíticas para las GlcN6P desaminasas I humana y bovina; la probable GlcN6P desaminasa II de perro y la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

	<i>GlcN6PD1</i> <i>Humana</i>	<i>GlcN6PD1</i> <i>Bovino</i>	<i>GlcN6PD2</i> <i>Perro</i>	<i>GlcN6P desaminasa</i> <i>E. coli</i>
$k_{cat}$ S <sup>-1</sup>	10.1 *(0.42**)	61 *(0.37**)	42	158 (155**)
$K_m$	0.57 mM	0.65 mM	0.25 mM	5.5 mM
$K_m$ (10μM de activador)	0.15 mM	0.16 mM	-	0.78 mM (2 mM de activador)
$k_{cat}/K_m$ mM <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup>	67.33*(0.73**)	381.25*(2.31**)	168	202
$K_{dis}$ activador	14.62μM	17.5μM	14.0μM	33 μM
$K_m$ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	3.7 mM	-	18 mM
$K_m$ Fructosa 6 fosfato	-	5.9 mM	-	0.9 mM
$K_i$ inhibidor	-	4.1μM	-	2 μM
Residuos	289	289	276***	266
Sistema Alostérico	Tipo V	Tipo V	K	K

\*: Con Activador alostérico a saturación

\*\* : Sin activador alostérico

\*\*\*: El número de residuos esta basado en los productos peptídicos de los genes de la *GlcN6P desaminasa II* de ratón, y humano.

Datos extraídos de las referencias: [7,8,22,6,13,14,15,16].

Trabajos de fisiología en diferentes tejidos de mamíferos (sarcoma de Yoshida e hígado de rata) [32,34] vinculan a la GlcN6P desaminasa como la enzima responsable de redirigir el flujo de la Glucosamina-6-fosfato y la N-Acetil glucosamina-6-fosfato, según las concentraciones administradas y dependiendo del tipo de tejido, hacia lactato, CO<sub>2</sub> y glucógeno (vía glucólisis) o hacia la vía de síntesis de UDP-N-acetil glucosamina [33]. En líneas celulares resistentes a altas concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [5] este compuesto es secuestrado y acumulado en UDP-N-acetil glucosamina, que es un inhibidor alostérico de las dos GlcN6P sintasas que existen en mamíferos. Por lo que la única enzima capaz de proveer la reacción de biosíntesis de glucosamina-6-fosfato es la GlcN6P desaminasa. También se ha observado que la GlcN6P sintasa está sometida a estricto control tanto metabólico como genético [27] y las dos GlcN6P desaminasas podrían estar sometidas a semejante control. Los datos de fisiología, bioquímica y estructurales de las GlcN6P desaminasas I y II sugieren que su intervención en el

*control de los flujos de azúcares aminados en mamíferos podría llevarse a cabo mediante un estricto control metabólico, que incluye regulación alostérica diferencial de ambas enzimas, y genético [5] dependiendo del tipo de tejido y su metabolismo.*

**Comparaciones del sitio activo de las subunidades de la GlcN6P desaminasa humana y la enzima de *E. coli*.** Cada uno de los monómeros de la GlcN6P desaminasa humana I tiene diferentes conformaciones (variación conformacional) en la tapa del sitio activo, aún con el análogo del estado de transición en la cavidad catalítica (conformaciones cerradas). En *E. coli* se observa una única conformación de la tapa cuando está cerrada y con los ligandos. También se observa que las tapas cerradas de la enzima humana están menos unidas o cerradas sobre la cavidad catalítica.

La variación conformacional observada podría ser provocada por la única diferencia relacionada con el sitio activo de las enzimas de *E. coli* y humano: la Ser43 (Gly en *E. coli*). Esta Ser como se ha mostrado anteriormente (ver resultados del sitio activo) tiene interacciones con la tapa (Arg172) y el fosfato del inhibidor, que en la enzima de *E. coli* no se observan. Estas nuevas interacciones podrían ser las responsables de que el asa de ligadura del fosfato y la tapa tengan diferentes conformaciones, provocando que la tapa no cierre totalmente sobre la cavidad catalítica y formando una cavidad catalítica más grande que la observada en la enzima de *E. coli*. *El reajuste conformacional observado de la geometría que une al estado de transición afecta la formación del Complejo ES, pudiera ser resultado de estas nuevas interacciones.*

La variación conformacional de las tapas de los sitios activos de la enzima humana indican que éstas no se logran unir bien sobre la cavidad catalítica en el complejo ES. Una situación de esta naturaleza podría sugerir que la enzima no reconoce al análogo del estado de transición tan bien como lo hace la enzima de *E. coli*. Asimismo el desorden observado en el análogo del estado de transición sugiere que es probable que se esté uniendo a la enzima deficientemente y afectando a la  $k_{cat}$  (ver tabla 11) de la enzima humana respecto a la de la enzima de bovino. *El reajuste conformacional de la geometría podría provocar la pérdida de la conformación óptima de unión de la enzima al análogo del estado de transición (y probablemente al estado mismo de transición), lo cual se observa como las diferentes conformaciones asumidas por las asas sobre el sitio activo y desorden en la molécula del análogo del estado de transición.*

La variación conformacional de las tapas del sitio activo dentro del cristal puede estar influida por cambios locales en el entorno de cada una de las tapas, como lo es la influencia de la carga eléctrica y el arreglo de las moléculas de agua de un hexámero vecino que, sin presentar contactos,

podría promover cambios conformacionales. Esto podría deberse a que *las tapas del sitio activo carecen de una conformación óptima (o única) de unión al sitio activo* provocando que las asas se deslicen o vibren sobre su posición en un rango de conformaciones similares.

*Dicho de otro modo, la enzima presenta una disminución de la optimización del "induced fit" o ajuste inducido (ver apéndice de conceptos) al formar el complejo Enzima-Substrato.* La GlcN6P desaminasa I bovina presenta una mayor afinidad al  $\text{NH}_4^+$  que la enzima bacteriana, propiedad que probablemente comparte con la enzima humana. La aparente disminución de la tasa de formación del complejo ES podría estar relacionada con la habilidad de esta enzima para ser biosintética [5,33,34,41,72,73]. Recordemos que la enzima tiene dos canales de entrada al sitio activo y uno de ellos es probablemente para amonio, sería posible entonces que la cavidad empleada para su tránsito hasta el sitio de reacción se vea favorecida conformacionalmente para unir  $\text{NH}_4^+$ .

La habilidad de la GlcN6P desaminasa I humana para llevar a cabo la reacción biosintética es conocida (reacción reversa); y aunque tradicionalmente se le conoce como una enzima catabólica, en bacterias puede llegar a sustituir a la GlcN6P sintasa [27]. En *E. coli*, la organización de los operones y los mecanismos de regulación muestran que su función es la de degradación de glucosamina-6-fosfato y no su síntesis. Sin embargo, se observó en la GlcN6P desaminasa de *M. domestica* que la actividad catalítica estaba orientada hacia la biosíntesis y probablemente acoplada a la vía de síntesis de quitina. También se ha observado en mamíferos que cuando la GlcN6P desaminasa está acoplada con la glucosamina-6-fosfato N-transacetilasa en presencia de Acetil-CoA, la dirección de la reacción procede hacia la síntesis de glucosamina-6-fosfato [41,72,73], aunque ninguno de estos estudios analizó la existencia de dos GlcN6P desaminasas por lo que no sabemos en que sentido de la reacción cada una de las enzimas es funcional.

Las diferencias en las propiedades catalíticas observadas (tabla 11) entre la GlcN6P desaminasa I humana y la bovina podrían deberse a una modificación post-traducciona. Mientras la enzima de bovino fue purificada de la fuente original (riñón), la enzima humana fue obtenida recombinante en *E. coli*. En la secuencia de la GlcN6P desaminasa humana I existe un posible sitio de fosforilación en la Ser271 hacia el C-terminal que podría promover una mayor activación catalítica. La funcionalidad de este sitio no está probada y también existe la posibilidad de que el extremo C-terminal, que no se ve en la difracción, presente alguna modificación.

**Modelo estructural del cambio conformacional alostérico de la GlcN6P desaminasa humana.** Los cambios estructurales de la transición alostérica de la conformación T al R en la GlcN6P desaminasa I no han sido descritos estructuralmente por cristalografía de rayos X. Las pruebas de cristalización para obtener cristales de la proteína en su conformación T no arrojaron resultados positivos; sin embargo, nosotros postulamos un modelo con base en la información de sus constantes catalíticas y el modelo propuesto para la enzima homóloga de *E. coli* [18]. Este modelo permite suponer que la conformación R es alcanzada por todas las subunidades del hexámero simultáneamente (de forma concertada) de acuerdo con el modelo cinético MWC.

La GlcN6P desaminasa humana podría ser una enzima alostérica con movimiento de oscilación similar al postulado para la enzima homóloga de *E. coli*, donde el hexámero en conformación T oscila en dirección al conformación R. Desafortunadamente, se desconoce si la enzima humana es oscilante o no, propiedad conformacional que tendrá que ser confirmada en experimentos futuros. Lo cierto es que el mecanismo de la enzima humana es compatible con un modelo de transición alostérica concertada del hexámero en conformación T a un hexámero en conformación R. En la enzima de *E. coli*, el hexámero en conformación R es el único que une tanto los sustratos como el activador alostérico.

En contraste, la transición alostérica de la enzima humana que puede ser considerada como concertada en cuanto al cambio conformacional de T a R, la conformación R formada une y cataliza el sustrato con muy baja eficiencia en ausencia de su activador (en realidad casi no hay reacción (Figura 17). Sin embargo, esta conformación es capaz de unir el activador alostérico con alta afinidad. Esto es definido como una enzima sin cooperatividad homotrópica [7,8,22] debido a que los sustratos no logran estabilizar el cambio conformacional y activar la enzima. Sin embargo, una vez unido el activador a la enzima, la conformación R es estabilizada elevando la eficiencia catalítica e incrementando la afinidad del sustrato hasta casi 4 veces a 10  $\mu\text{M}$  de activador.

La GlcN6P desaminasa I en conformación R vacío (sin activador y sin sustratos) no puede unir el sustrato cooperativamente debido a que la tapa del sitio activo está desordenada al igual que la cavidad catalítica impidiendo la catálisis hasta que el activador es unido. El desorden de la tapa del sitio activo podría ser causado por la Phe121, como se observa en las mutantes realizadas en *E. coli*, provocando un mecanismo alostérico tipo V. La tapa es estabilizada cuando el activador alostérico ocupa su sitio de unión, a través de la formación del enlace de la cadena lateral de la Tyr254 con la cadena principal de la Thr161.

Las curvas de la cinética de la GlcN6P desaminasa I humana (figura 17) muestran un

incremento de la  $k_{cat}$  dependiente de la concentración de activador alostérico. Proponemos que las curvas sean interpretadas como la activación de los monómeros a los que se les ha unido un activador, incrementando la  $k_{cat}$  conforme se van ocupando los sitios alostéricos y se van estabilizando los sitios activos. Esto es, *que cada monómero en conformero R, para ser catalítico, requiere de su activador alostérico correspondiente*. Esta ocupación de sitios uno a uno podría facilitar la unión del activador en los sitios alostéricos de monómeros vecinos a altas concentraciones de activador.

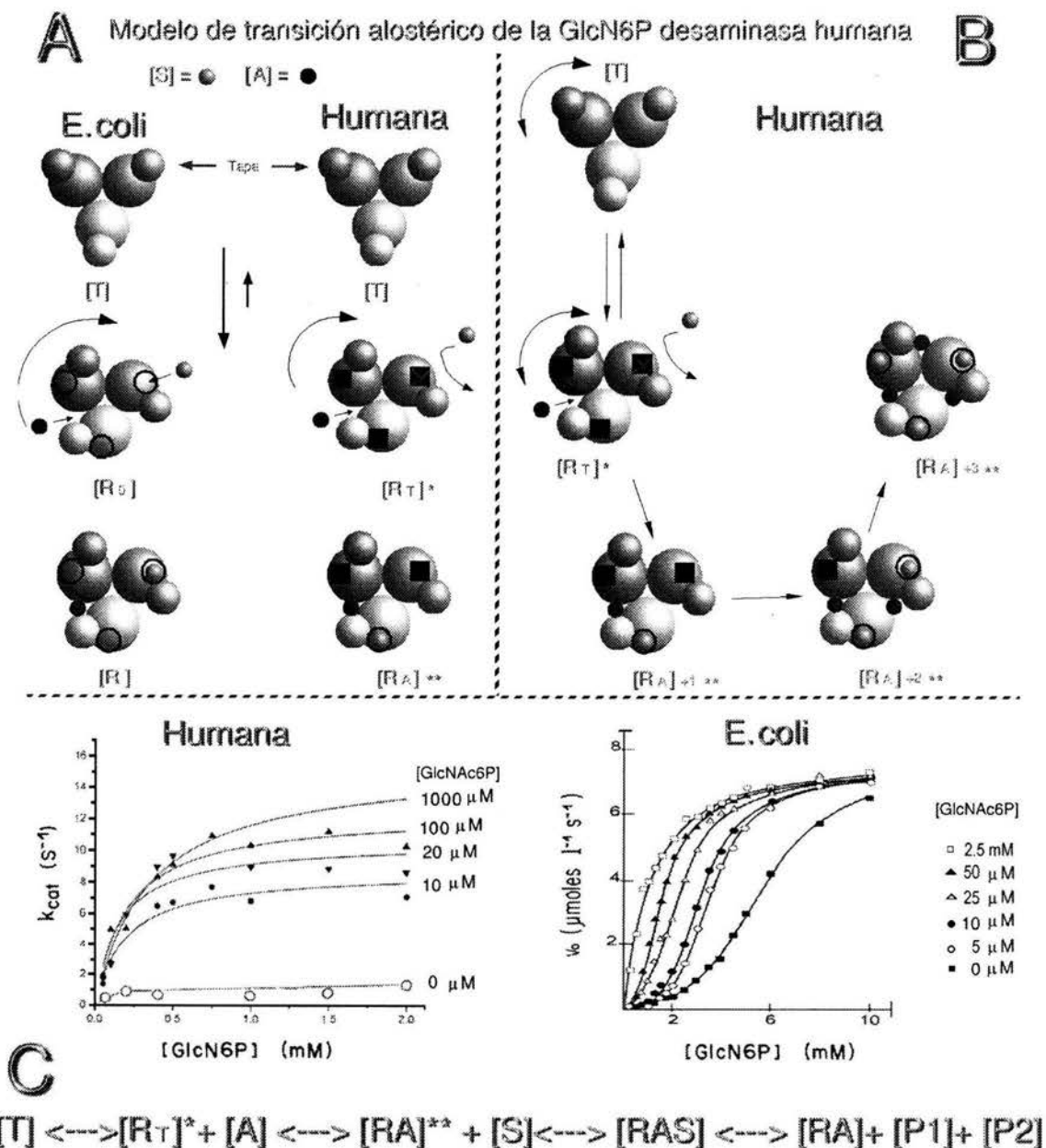


Figura 17.- Modelo de transición alostérica propuesto para la GlcN6P desaminasa I humana. En A se compara la transición alostérica con la GlcN6P desaminasa de E. coli.

*En ella se observa que la enzima bacteriana puede realizar una transición alostérica concertada del conformero T al R donde se produce un hexámero funcional en sus seis sitios activos, tanto heterotrópicamente como homotrópicamente. En cambio la enzima humana alcanza la formación de un hexámero en conformación R inactivo incapaz de realizar la reacción catalítica. El activador alostérico activa únicamente el monómero al que se ha unido permitiendo la catálisis en dicho sitio activo. En B se explica el mecanismo en más detalle para la GlcN6P desaminasa I humana. La unión de los activadores podría ser progresiva en función de la concentración de activador. También la unión del primer activador podría facilitar la unión de los siguientes activadores estabilizando el trímero al que se ha unido. En C se observan las gráficas de las cinéticas de activación de la GlcN6P desaminasa I humana y de E. coli (gráficas tomadas de las referencias 8 y 67). Adicionalmente se observa la fórmula del modelo cinético, el "\*" es donde hay cooperatividad heterotrópica únicamente (forma R capaz de unir solo el activador ) y el "\*\*\*" donde hay una conformación R catalítica).*



## Conclusiones de las Primera y Segunda Partes

1.-Existen dos genes homólogos de la GlcN6P desaminasa en el genoma de humano y de ratón, que se expresan en diversos tejidos y en algunos inclusive de manera simultánea.

2.-Existen dos enzimas GlcN6P desaminasas homólogas en mamíferos con diferentes propiedades alostéricas. Una con 289 residuos por subunidad (33 kDa) y con una cinética alostérica tipo V; y otra de 276 residuos por subunidad (30 kDa) y con una cinética alostérica tipo K.

3.-La estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa humana I presenta variabilidad conformacional en el sitio activo provocado por la Ser43 que disminuye la optimización en el *induced fit* probablemente como una estrategia funcional para lograr una elevación en la afinidad por el  $\text{NH}_4^+$ .

4.- Las diferencias en la  $k_{\text{cat}}$  entre la GlcN6P desaminasa I humana y bovina pueden deberse a alguna modificación enzimática como la fosforilación. La enzima de bovino fue purificada de tejido directamente y podría estar activada por una modificación postraducciona. La enzima humana es recombinante y expresada en la bacteria *E. coli* donde la modificación necesaria no se realiza espontáneamente. El probable sitio de fosforilación de la GlcN6P desaminasa humana I esta localizado hacia el extremo C-terminal en la Ser271.

5.-La GlcN6P desaminasa humana I presenta un cambio concertado en la transición alostérica del conformero T hacia R, pero es incapaz de ser retenida en el conformero R por el sustrato, debido al desorden conformacional de la tapa con el sitio activo vacío. El desorden de la tapa tal vez sea debido a la Phe121 como se observa en mutantes de *E. coli* en la Tyr121, presentando un estado conformacional R no activo por sustrato pero si sensible a la activación por activador alostérico.

## **Artículo publicado con este trabajo**

# Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study

Rodrigo Arreola<sup>a,\*</sup>, Brenda Valderrama<sup>b</sup>, Maria L. Morante<sup>a</sup>, Eduardo Horjales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Received 10 March 2003; revised 9 May 2003; accepted 20 June 2003

First published online 20 August 2003

Edited by Richard Cogdell

**Abstract** Glucosamine-6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6) is an allosteric enzyme that catalyzes the reversible conversion of D-glucosamine-6-phosphate into D-fructose-6-phosphate and ammonium. Here we describe the existence of two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase enzymes. We present the crystallographic structure of one of them, the long human glucosamine-6-phosphate deaminase, at 1.75 Å resolution. Crystals belong to the space group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> and present a whole hexamer in the asymmetric unit. The active-site lid (residues 162–182) presented significant structural differences among monomers. Interestingly the region with the largest differences, when compared with the *Escherichia coli* homologue, was found to be close to the active site. These structural differences can be related to the kinetic and allosteric properties of both mammalian enzymes.

© 2003 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

**Key words:** K-type allosteric system; EST; Isoenzyme; GNPI; GlcN6P-deaminase; Ammonia capture and detoxification

## 1. Introduction

Glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6P-deaminase, EC 3.5.99.6), formerly known as glucosamine-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.10), catalyzes the reversible conversion of GlcN6P into D-fructose-6-phosphate (Fru6P) and ammonium. Although the enzyme was initially described in pig kidney [1], it has been currently characterized in a variety of organisms such as *Escherichia coli* [2], *Candida albicans* [3], *Musca domestica* [4], *Plasmodium falciparum* [5], *Canis familiaris* [6], *Bos taurus* [7] and *Homo sapiens* [8,9].

The best-studied GlcN6P-deaminase is that from *E. coli* and has been characterized from the structural, catalytic and mechanistic points of view [10–14]. The functional unit of this particular enzyme is a hexamer of identical 29 kDa subunits [2]. The *E. coli* GlcN6P-deaminase is a K-type allosteric enzyme, which is activated by substrate cooperativity and by the allosteric activator N-acetyl-glucosamine-6-phosphate (GlcNAc6P) [15]. Crystallographic structures of the ‘T’ and

the ‘R’ conformers allowed us to describe the allosteric transition of the *E. coli* GlcN6P-deaminase [13,14] and to propose a catalytic mechanism [10].

The mammalian GlcN6P-deaminases from *C. familiaris* [6], *B. taurus* [7] and *H. sapiens* [9] have been purified and their catalytic parameters determined. Whereas all of them catalyze the same reaction using GlcN6P and present allosteric activation by GlcNAc6P, their catalytic and allosteric properties show significant differences, which might constitute a paradox if only one GlcN6P-deaminase exists for each species. The kinetics obtained for the enzyme from *C. familiaris* (isolated from kidney) is a K-type allosteric system such as its *E. coli* homologue [6]. In contrast, the kinetics found for the enzymes from *B. taurus* (isolated from kidney) and the recombinant *H. sapiens* enzyme expressed in *E. coli* are both V-type-like allosteric systems [7,9]. Whereas the enzymes from human and bovine sources show a molecular mass of 32.5 kDa [9], the canine enzyme presents a molecular mass of 30.4 kDa [6].

The physiological function of the GlcN6P-deaminase in mammals is poorly understood. When cells of the baby-hamster kidney line BHK-21 are exposed to high ammonium concentrations, GlcN6P-deaminase activity is induced [16]. Under these conditions, the GlcN6P synthesizing activity from Fru6P and ammonium is the sole responsible for ammonium assimilation with the concomitant accumulation of UDP-N-acetylglucosamine [17]. Interestingly, the GlcN6P-deaminase preparation obtained from cells of this line was composed of two different proteins of 29.9 and 32.4 kDa [16]. The amino acid sequence of the amino terminus of each one of these proteins was determined, yielding fragments with 70% identity [16] and suggesting the existence of at least two isoenzymes.

The genes encoding GlcN6P-deaminase from mouse [18], hamster [19] and human [20] sources have been cloned and sequenced. All of them encode a protein product of 289 residues with a predicted molecular mass of 33 kDa, similar in size to that isolated from *B. taurus* kidney and to one of the enzymes isolated from BHK-21 cells. In this paper we present the identification of a putative second GlcN6P-deaminase gene encoding a product of 276 residues in the mouse and human genomes. To offer further insight into the structural basis of the different regulatory and catalytic properties of these two isoenzymes, we report the crystallographic structure of the 289-residue-long human enzyme at 1.75 Å resolution (PDB ID 1NE7) and a computer model of the novel 276-residue-long human enzyme.

\*Corresponding authors. Fax: (52)-777-317 23 88.  
E-mail addresses: arreola@ibt.unam.mx (R. Arreola),  
horjales@ibt.unam.mx (E. Horjales).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Purification of the human recombinant GlcN6P-deaminase

Recombinant expression of the human GlcN6P-deaminase encoded by the constitutive GNPI gene cloned in pTZ19R was achieved using the *E. coli* IBPC590R strain [21]. Pre-cultures were prepared by inoculating a single colony of the recombinant strain in 200 ml of LB medium plus ampicillin and incubated for 4 h at 30°C. Six flasks with 1 l of LB medium plus ampicillin were inoculated with 50 ml of the pre-culture and incubated for 8 h at 30°C. The cells were concentrated by centrifugation at 5000 rpm. The pellet was washed three times with 150 mM, KCl and the extract was prepared by sonication in 20 mM EDTA, 150 mM KCl and 100 mM Tris–HCl pH 7.7 and cleared by centrifugation. The supernatant was precipitated with ammonium sulfate and the 40–55% fraction, containing the GlcN6P-deaminase activity, was collected and stored for further analysis. When necessary, the precipitate was dialyzed overnight against 50 mM Tris–HCl pH 8.2. The enzyme was purified as described elsewhere [7] and concentrated to 10 mg ml<sup>-1</sup>.

### 2.2. Enzyme crystallization

Many crystals were obtained using vapor diffusion in sitting drops at 18°C. The crystal selected for diffraction was grown in a drop containing 10 mg ml<sup>-1</sup> protein with a well solution of 1.68 M ammonium sulfate, 10 mM *N*-acetyl-glucosamine-6-phosphate and 0.1 mM 2-deoxy-2-amino-*D*-glucitol-6-phosphate at pH 7. Crystals grew as long rods in 3 months, reaching dimensions of up to 0.15 × 1.5 mm.

### 2.3. Data collection

A solution with the same components and concentrations of the reservoir plus 35% w/v of trehalose was used as cryoprotectant. After soaking during 24 h, crystals were flash-cooled using annealing techniques [22] and thus a 94.6% complete diffraction data set (Table 1) up to 1.75 Å resolution was obtained at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, in the Station BL 9-1 with a wavelength of 0.78 Å.

### 2.4. Data integration, molecular replacement and structure refinement

Diffraction data were integrated using the DENZO program [23] and scaled using the SCALA program from the CCP4 package [24]. The structure was solved using the molecular replacement method with the whole hexamer of the *E. coli* GlcN6P-deaminase (PDB entry 1DEA) as poly-alanine template with 266 residues used as the starting model. The refinement procedure was carried out using the CNS program [25] and the program O was used for model building [26]. In the model building steps we used 2fo–fc and fo–fc electron-density maps of the whole asymmetric unit to construct the hexameric particle. Trials to refine the structure using non-crystallographic symmetries did not yield results better than 24% in *R*-value, thus we proceeded to determine the hexamer as six individual monomers (Table

1). In the final steps, 2fo–fc and fo–fc electron-density average maps were used as well as annealed omit maps with a spherical omitted region. The omitted region was on the active-site cavity to better build the transition-state analogue (competitive inhibitor).

### 2.5. Structural analyses

The structural analysis of the final model was performed using the program O and coupled programs (see command LSQ\_IMPROVE in program O) [27]. The electron-density average maps were calculated using the AVE and IMP programs from the RAVE package [27].

### 2.6. Genomic searches for GlcN6P-deaminase coding genes

Searches were performed upon the National Centre for Biotechnology Information databases GenBank [28] and ESTs (Expressed Sequence Tags database) [29]. Additional searches were performed upon the mouse full-length cDNAs public database from the RIKEN Mouse Gene Encyclopaedia Project [30]. We used the tBLASTn program, which compares a protein query sequence against a nucleotide sequence database dynamically translated in all possible reading frames [31]. The initial search, using the GenBank database, was performed using the human GlcN6P-deaminase amino acid sequence deduced from the cDNA reported by Nomura and collaborators in the HUGE Protein Database (KIAA0060 number) [20]. The results of this search showed significant alignments with the previously reported 289-residue-long GlcN6P-deaminases from mouse, hamster and human. Moreover, a different mouse sequence, only 276 residues long, was found from two sources, adult male testis and 8-day-old embryo. This novel sequence was also found in the RIKEN Mouse Gene Encyclopaedia Project [30]. A search performed upon the human genome using the short mouse GlcN6P-deaminase sequence as query allowed the identification of two different deduced peptide sequences: (1) one located in chromosome 5 which corresponded to the previously reported long human GlcN6P-deaminase and (2) a second short sequence in chromosome 4. The complete sequence for the short copy was obtained through inspection of the DNA sequence in that chromosome fragment (gi|13628777). Exon–intron boundaries were identified using the GENSCAN program [32]. All alignments were performed manually using the SEQLAB program of the GCG [33].

### 2.7. Modelling of the short human GlcN6P-deaminase

The structural model of the short human GlcN6P-deaminase was built using the long human GlcN6P-deaminase crystallographic structure as template. The calculations for energy minimization and molecular dynamics were performed using the Insight II program from Molecular Simulations Inc [34] and its modules (Homology, Biopolymer and Discover). The simulation was made with the transition-state analogue molecule in the active-site cavity and 19 crystallographic water molecules plus a water coat of 5 Å. We calculated 12000 minimization iterations and 20000 dynamic iterations of 1 fs at 300 K. The structural analysis was made using the O program [26].

Table 1  
Refinement statistics and diffraction data statistics

Refinement statistics		Diffraction data statistics	
Final <i>R</i>	0.193(0.223) <sup>a</sup>	Cell parameters	109.87 Å (90°), 110.89 Å (90°), 180.88 Å (90°)
<i>R</i> <sub>free</sub>	0.217(0.245) <sup>a</sup> (10% of unique reflections)	Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
RMS deviation from ideal values		Resolution	1.75 Å
Bond lengths	0.005 Å	Unique reflections	209 143
Bond angles	1.4°	Completeness	94.3(96.8) <sup>a</sup>
Dihedral angles	23.1°	Multiplicity	3.8(3.6) <sup>a</sup>
Improper angles	0.85°	<i>R</i> <sub>sym</sub> <sup>b</sup>	0.052(0.224) <sup>a</sup>
Estimated coordinate error		Range resolution	1.74–29.48 Å
ESD from Luzzati plot	0.19 Å	Asymmetric unit and biological unit	one hexamer
ESD from SIGMAA	0.13 Å	//sigma	9.9(3.4) <sup>a</sup>
Water molecules	2 194		

<sup>a</sup>Values in parentheses correspond to the highest resolution bin: 1.75–1.86. The *R*<sub>free</sub> value was obtained using cross-validation throughout the method and the test set selection was random.

<sup>b</sup> $R_{\text{sym}} = \sum |I_n - \langle I_n \rangle| / \sum I_n$ .

	10	20	30	40	50	60
mouse2	MRLVILDNYDLASEWAAKYICNR	IQFKPKGQDRYFSLGLPTG	STPLGCKYKLIIEYHKSGN			
human2	<b>MRLVILDNYDLASEWAAKYICNR</b>	<b>IQFKPKGQDRYFSLGLPTG</b>	<b>STPLGCKYKLIIEYHKNGH</b>			
	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
human1	<b>MKLIILEHYSQASEWAAKYIRNR</b>	<b>IQFNPGPEKYFTLGLPTG</b>	<b>STPLGCKYKLIIEYKNGD</b>			
mouse1	MKLIILEHYSQASEWAAKYIRNR	IQFNPGPKDYFTLGLPTG	STPLGCKYKLIIEYKNGD			
hamster1	MKLIILEHYSQASEWAAKYIRNR	IQFNPGPKDYFTMGLPTG	STPLGCKYKLIIEYKNGD			
bovine1	MKLIILDHYSQASEWAAKYIRNR	IQFNPGPKDYFTLGLPTG	STPLGCKYKLIIEYKNGD			
consensus	M-L-IL--Y--ASEWAAKYI-NR	I-F-PG-D-YF--GLPTG	STPLGCKY-KLIEY-K-G-			
						120
mouse2	LSFKYVKTFFNMDEYV	GLPRNHPEYHSMWNNFFKH	HIDIDPNNAHILDGNAADLQAE	CA		
human2	LSFKYVKTFFNMDEYV	GLPRNHPEYHSMWNNFFKH	HIDIDPNNAHILDGNAADLQAE	CA		
	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
human1	LSFKYVKTFFNMDEYV	GLPRDHPEYHSMWNNFFKH	HIDIHPTHILDGNAVDLQAE	CA		
mouse1	LSFQYVKTFFNMDEYV	GLPRDHPEYHSMWNNFFKH	HIDIHPTHILDGNAADLQAE	CA		
hamster1	LSFKYVKTFFNMDEYV	GLPREHPEYHSMWNNFFKH	HIDIHPTHILDGNAADLQAE	CA		
bovine1	LSFKYVKTFFNMDEYV	GLPRDHPEYHSMWNNFFKH	HIDIHPTHILDGNAADLQAE	CA		
consensus	LSF-YVKTFFNMDEYV	GLPR-HPESYHS-MWNNFFKH	IDI-P-N-HILDGNA-DLQAE	CA		
						180
mouse2	FEEDIKEAGGIDLFGV	GIGPDGHIAFNEPGSSLSVSR	TRLKTLMADTILANAKYFDG	DL		
human2	FENKIKEAGGIDLFGV	GIGPDGHIAFNEPGSSLSVSR	TRLKTLMADTILANAKYFDG	DL		
	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
human1	FEEDIKAAGGIELFVG	GIGPDGHIAFNEPGSSLSVSR	TRVKTLMADTILANARFFD	GEL		
mouse1	FEEDIKAAGGIELFVG	GIGPDGHIAFNEPGSSLSVSR	TRVKTLMADTILANARFFD	GEL		
hamster1	FEEDIKAAGGIELFVG	GIGPDGHIAFNEPGSSLSVSR	TRVKTLMADTILANARFFD	GEL		
bovine1	FEEDIKAAGGIELFVG	GIGPDGHIAFNEPGSSLSVSR	TRVKTLMADTILANARFF			
consensus	FE-KIK-AGGI-LFVG	GIGPDGH-AFNEPGSSLSVSR	TR-KTLMADTILANA--FDG-L-K			
						240
mouse2	VPTMALTGVGVTVM	DARE VMILITGAHKAFALYKAMEE	GVNHHMWTVSFAFQQHPRTIF	VCD		
human2	VPTMALTGVGVTVM	DARE VMILITGAHKAFALYKAI	EEGVNHHMWTVSFAFQQHPRTIF	VCD		
	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
human1	VPTMALTGVGVTVM	DARE VMILITGAHKAFALYKAI	EEGVNHHMWTVSFAFQQHPRTIF	VCD		
mouse1	VPTMALTGVGVTVM	DAKE VMILITGAHKAFALYKAI	EEGVNHHMWTVSFAFQQHPRTIF	VCD		
hamster1	VPTMALTGVGVTVM	DARE VMILITGAHKAFALYKAI	EEGVNHHMWTVSFAFQQHPRTIF	VCD		
consensus	VPTMALTGVGVTVM	DA-E VMILITGAHKAFALYKA-EE	GVNHHMWTVSFAFQQHPRT-FVCD			
mouse2	EDATLELRVKTVKYFK	GLMHVHNKLVDP	LYSMKEGN			
human2	EDATLELRVKTVKYFK	GLMHVHNKLVDP	PLFSMKDGN			
	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
human1	EDATLELRVKTVKYFK	GLMLVHNKLVDP	LYSIKEKETEKSQSSKPYSD			
mouse1	EDATLELRVKTVKYFK	GLMLVHNKLVDP	LYSIKEKEIQKSQSAKPYSD			
hamster1	EDATLELRVKTVKYFK	GLMLVHNKLVDP	LYSIKEKEIQKSQAAPKPYSD			
consensus	EDATLEL-VKTVKYFK	GLM-VHNKLVDP	L-S-K---			

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of mammalian GlcN6P-deaminases isoenzymes. The complete sequence of the orthologous *GNP1* gene products from human, mouse and hamster sources are shown, together with an incomplete product from bovine, with an overall identity ranging between 95.1 and 97.5%. Newly identified paralogous copies of *GNP1*, named *GNP2*, were found on the human and mouse genomes, with an identity of 96.8% between them. The first 20 residues of the amino terminus correspond to the sequence directly obtained from the two isoenzymes purified from the BHK-21 line cell [16]. The pipelines indicate the conserved exon–intron boundaries in human *GNP1* and *GNP2* transcripts. Conserved catalytic residues are highlighted in bold whereas allosteric-site residues are underlined.

### 3. Results

#### 3.1. Sequence search and analyses

Two different sequences encoding putative GlcN6P-deaminases were detected in the human genome as described in Section 2 (Fig. 1). One of these sequences, which we named *GNP1*, is located in chromosome 5 (5q31) [35] and encodes a product of 289 residues with a predicted molecular mass of 32.6 kDa. This gene is actively transcribed in different tissues (Table 2). The deduced product of *GNP1* corresponds in size and sequence to the recombinant human GlcN6P-deaminase described elsewhere [7,9]. The second sequence, *GNP2*, is located in chromosome 4 (4p13) and encodes a product of 276 residues with a predicted molecular mass of 31.08 kDa. The functionality of *GNP2* was assessed by the identification of specific expression sequence tags from normal tissues and transformed cells (Table 2).

The products of *GNP1* and *GNP2* share 87% identity and 94.5% similarity throughout their sequences. Both genes are interrupted by five introns located at identical positions. It is

important to notice that the amino terminus of each one of these products matched with one of those obtained by direct sequencing of the enzymes purified from hamster cultured cells (Fig. 1) [16].

#### 3.2. Crystallographic structure determination and refinement of the human *GNP1*

Crystals of the recombinant human *GNP1* were obtained in complex with the allosteric activator GlcNAc6P, the competitive inhibitor 2-deoxy-2-amino-D-glucitol-6-phosphate, ammonia and inorganic sulfate (Table 1). The amount of unique reflections resulted enough to process the complete asymmetric unit and to refine individual atomic isotropic B factors. The three-dimensional structure was determined by molecular replacement using the structure of the hexamer of the *E. coli* GlcN6P-deaminase (PDB entry 1DEA) as initial model and was refined at 1.75 Å resolution. The final model has an  $R=0.20$  and an  $R_{\text{free}}=0.22$ . The asymmetric unit contains six monomers ( $5 \times 274$  a.a. +  $1 \times 281$  a.a.) with one allosteric activator, one trehalose molecule and one sulfate ion in alter-

nate conformation with a competitive inhibitor in each monomer. One additional sulfate ion appeared in the inter-hexameric crystal contacts. The C-terminal end presented an electron density visible only up to residue Glu274 in five of the six monomers in the asymmetric unit. Residues Lys275 to Gln289 were totally disordered in almost all the monomers, with the exception of monomer 'A' where a longer chain was visible up to residue 281 (Fig. 2). In this case, residues 278 to 281 showed crystalline contacts with a neighboring hexamer. No density was detected for residues 282 to 289 in monomer 'A'.

### 3.3. High structural similarity of GNP1 with the *E. coli* enzyme, with the largest differences at the active-site region and in the C-terminus

The asymmetric unit of GNP1 contained the biologically active particle, a hexamer with non-crystallographic 32 symmetry. A structural alignment by rigid-body superposition between the *E. coli* and the GNP1 hexamers showed an RMSD of 1.15 Å with 1560 α carbon atoms included in the superposition (260 α carbon atoms per monomer). The monomer fold was the same as in the *E. coli* enzyme [10].

### 3.4. The C-terminus

Although GNP1 and the *E. coli* enzymes share the same fold, GNP1 is longer in sequence and a rigid-body superposition between the two monomeric structures showed large differences in the main chain at the C-terminus starting at residue Leu258. In GNP1 a new structure was present with a short helix (residues 259 to 266) and an extended loop (residues 267 to 274) (Fig. 2). This extended loop builds an anchor of the helical structure (249–266), which supports the loop 240–249, responsible for the inter-monomeric interactions close to the two-fold axis of the hexameric particle. This inter-monomeric surface is rather flexible in the *E. coli*

enzyme and is part of the core supporting the 13° rotation associated with the allosteric transition. The anchor in the C-terminus of the *E. coli* enzyme is much more flexible than the one found in GNP1 and this can be one of the structural properties generating the differences in allosteric behavior.

### 3.5. The active site

Many of the differences between GNP1 and the *E. coli* deaminases were located in the substrate-binding loops of the active site, in particular in the active-site lid (residues 162 to 182) and the phosphate-binding loop (residues 41 to 44). The α carbon atoms of these residues were more than 0.8 Å apart when both structures were superimposed (RMSD=0.43 Å for 213 α carbons closer than 0.8 Å) (Fig. 3A).

A detailed analysis of the six active-site cavities in the different monomers of GNP1 showed a sulfate ion and a molecule of 2-deoxy-2-amino-D-glucitol-6-phosphate (the competitive inhibitor) in each active site, both molecules in alternate conformations. This molecules presented partial occupancy and shared similar coordinates in the phosphate-binding site. The rotamers of the catalytic residues were the same in the six monomers in the asymmetric unit.

The residues in the active site of the GNP1 and *E. coli* enzymes are fully conserved, with the remarkable exception of Ser43 (Gly in *E. coli*). This side chain is placed in good geometry to build a hydrogen bond with the phosphate moiety of the inhibitor (or the sulfate ion) in the human enzyme. Moreover, Ser43 is located in the phosphate-binding loop (residues 41–44), which is one of the few regions where significant differences appeared between geometries (Fig. 3). Residue Ser43 also appears in good geometry to bind Arg172, which is a substrate ligand, and therefore potentially able to compete with the substrate for this residue, leading to a conformational change of the active-site lid (residues 162–185).

Table 2  
Expressed sequence tags for several GNP1 and GNP2 genes

Organism	Enzyme	Length (aa)	Entry type	Tissue	ID number
Human	1	1–289	Chromosomal	–	gi 13643897
Human	1	1–197	EST	Hypothalamus	gi 15494294
Human	1	1–213	EST	Testis	gi 15253870
Human	1	1–224	EST	Kidney	gi 13337909
Human	1	1–199	EST	Pancreatic islets	gi 180468
Human	2	1–276	Chromosomal	–	gi 13628777
Human	2	1–205	EST	Hypothalamus	gi 15490182
Human	2	1–140	EST	Testis	gi 13999823
Human	2	1–103	EST	Kidney	gi 5887273
Human	2	154–276	EST	Kidney	gi 13335729
Human	2	1–150	EST	Pancreatic islets	gi 15688350
Human	2	1–168	EST	Lciomyosarcoma line cells	gi 10346591
Human	2	1–166	EST	Adenocarcinoma line cells	gi 12613723
Mouse	1	1–289	cDNA	Testis	gi 5353760
Mouse	1	1–289	cDNA	Testis	gi 6754029
Mouse	2	1–276	cDNA	Testis	gi 12853906
Mouse	2	1–276	cDNA	8-day-old embryo	gi 12856903
Hamster	1	1–289	cDNA	Testis	gi 1177524
Bovine	1	1–42	Peptide	Kidney extraction	Lara-Lemus et al. [7]
Bovine	1	1–167	EST	Mammary tissues	gi 9607266
Bovine	1	1–155	EST	Mammary tissues	gi 9602899
Bovine	1	1–163	EST	Mammary tissues	gi 9596706
Bovine	1	57–174	EST	Mammary tissues	gi 6860672
Dog	1	158–289	cDNA	Testis	gi 18818168
Dog	2	208–276	cDNA	Heart	gi 23702059

The GNP1 and GNP2 genes encode three GlcN6P-deaminases enzymes in *H. sapiens*, *M. musculus* and *C. familiaris*. Both genes are actively expressed in several tissues and in four cases they are co-expressed (hypothalamus, testis, kidney and pancreatic islets).

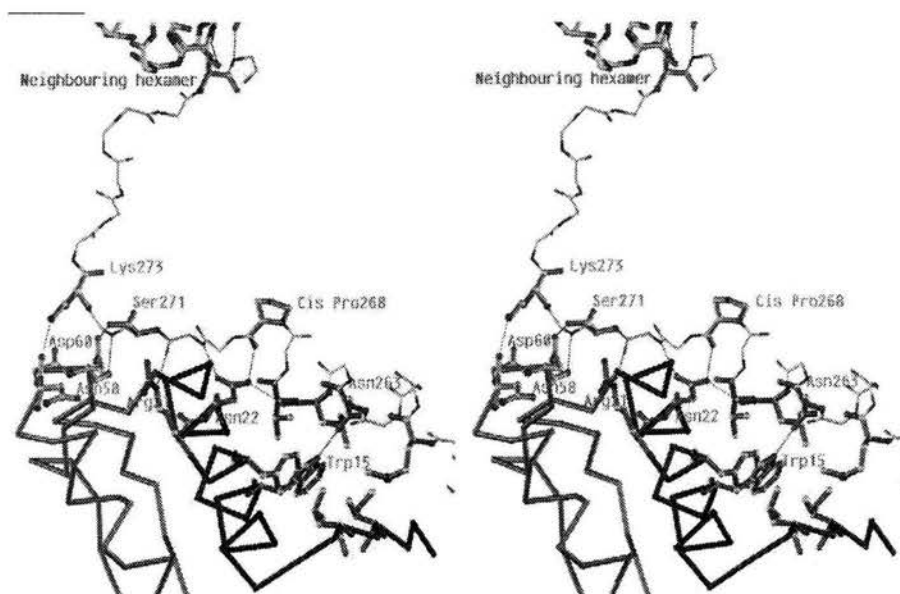


Fig. 2. Stereoscopic image of the human GNP1 C-terminus. The long C-terminus of the human GNP1 monomer A (from residue 259 onwards) interacts with the rest of the protein by hydrophobic interactions (residues Ile4, Leu6, Trp15, Tyr19, Met259, Leu265 and Val266 in purple) as well as a series of hydrogen bonds involving main chain and side chain residues (indicated by dashed red lines).

The lid presented conformational differences among the different monomers in the inhibitor-bound human enzyme (Fig. 3A), all different from the catalytic conformation of the lid found in the *E. coli* enzyme. We interpreted these differences as conformational disorder in the active site, which is a characteristic of GNP1. In the bacterial enzyme, a unique conformation of the active-site lid is observed when the inhibitor occupies this cavity, even when phosphate ions were used as precipitants at 2–4 M concentration [10]. All the mentioned conformational differences enlarged the GNP1 active-site cavity (as compared to the *E. coli* cavity) and changed the general coordination of the phosphate moiety in the substrate.

It is a very uncommon feature for the largest structural differences between orthologous enzymes to be located in the active site, in particular in the substrate-binding amino acids (Fig. 3A,B).

### 3.6. The allosteric site

The allosteric site in GNP1 is placed in a cleft between two monomers as in the *E. coli* enzyme [10]. Additionally, a new hydrogen bond between the activator O1 atom and the second monomer His262 NE2 atom was observed. This interaction, which is not present in the *E. coli* enzyme, might be related to the higher affinity observed in GNP1 for the allosteric activator [9,11]. His262 is part of the longer C-terminus GNP1 and is not present in the *E. coli* enzyme.

### 3.7. Computer model of the short human GlcN6P-deaminase

The products of *GNP1* and *GNP2* share an identity of 87% distributed evenly throughout the length of the alignment without gaps (Fig. 1). As expected, many of the differences were located at the surface of the protein. Nevertheless, some of these mutations appeared in positions close to the active site. These are Phe88Tyr, Phe173Tyr, and Arg172Lys (first the amino acid in GNP1 and afterwards the one in GNP2). The Phe to Tyr substitutions added hydroxyl groups to the side chains, generating close contacts (2.3 Å distance) with the

phosphate-binding loop (residues 41–44). Additionally, new hydrogen bonds were built along the main chain of the loop without changing the hydrophobic interactions at side chains 88 and 173 present in the crystallographic structure of the long enzyme. Furthermore, both minimization and molecular dynamics procedures (see Section 2) relocate the phosphate-binding loop. The relocation approached the loop to the active-site cavity without changing the hydrophobic interactions around the aromatic rings of residues 88 and 173 (Fig. 4). This rearrangement might be sufficient for the stabilization of the active-site lid and the optimal binding conformation of the inhibitor.

## 4. Discussion

Here we present the identification of two GlcN6P-deaminase genes (*GNP1* and *GNP2*) in the completely sequenced genomes of human and mouse (Fig. 1). Kinetic and structural studies show that both enzymes share the same fold, both are hexameric particles in solution, present the same catalytic activity with the same substrates, and share the same allosteric activator [6,7,9]. Moreover, these genes are often expressed in the same tissues. However, their lengths are different (276 and 289) as well as some amino acids in the proximity of the active-site cavity. We found that 15 residues in the C-terminal region of GNP1 are completely disordered in the crystallographic structure. The amino acid sequence of this C-terminal segment is very uncommon, as more than 50% of the residues are charged. Our search for footprints within this sequence did not produce any positive result. We cannot assign any specific function for this segment.

The three-dimensional structure of GNP1 shows different conformations for the active-site lid in all the six independent monomers in the crystal. Interestingly, none of them corresponded to the conformation observed in the *E. coli* enzyme. Moreover, in all monomers, the phosphate-binding loop is displaced 1.0 Å from the position known to generate the cat-

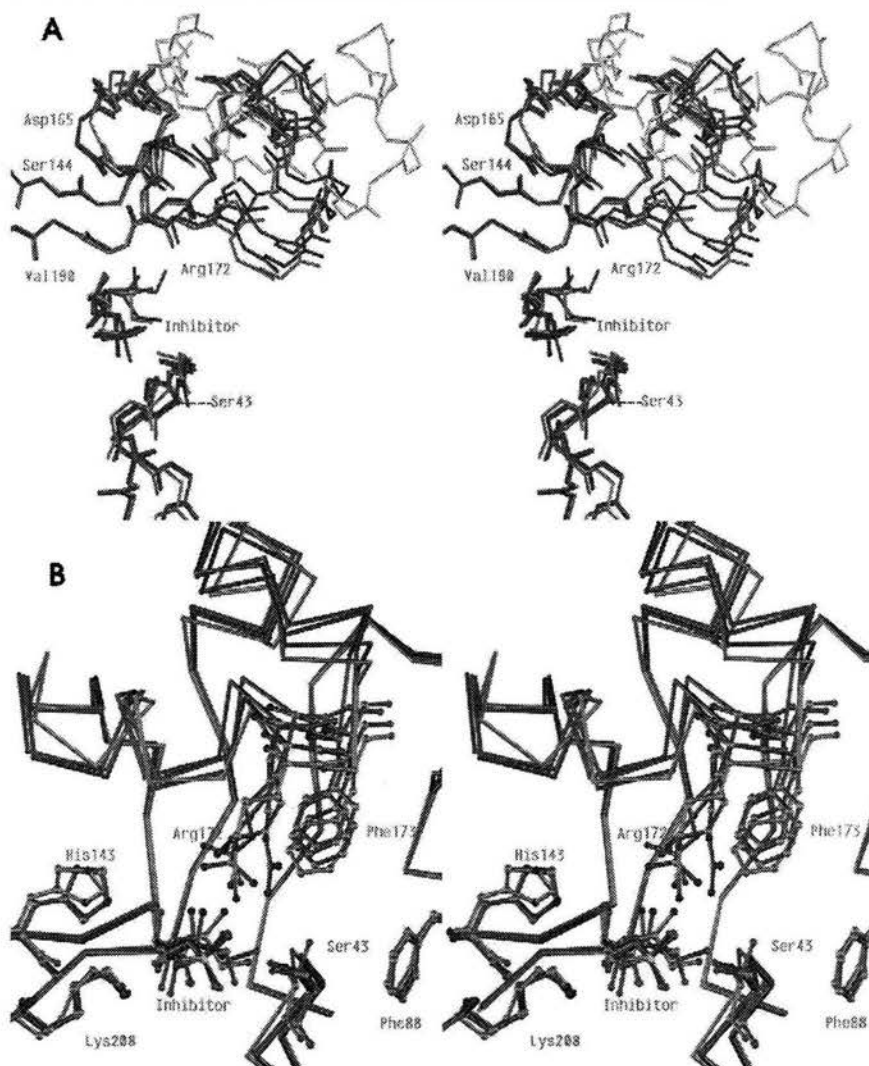


Fig. 3. Rigid-body superposition of the six monomers of human GNP1. The superposition leads to root mean-square deviations between 0.303 and 0.196 Å. The monomers B and F (chains in red and purple) presented the largest differences in the main chain of the active-site lid (residues 162–182). A: Conformations of the active-site loops in human and *E. coli* enzymes. The main chains of monomers A, C, D and E are not shown for simplicity. The active-site lid of monomer F presents an additional hydrogen bond between the Glu177 side chain and the main chain oxygen of Arg79 of a neighboring hexamer. The structure of the *E. coli* GlcN6P-deaminase in complex with the competitive inhibitor molecule is shown in green whereas the structure of the same enzyme free of active-site ligands is shown in yellow. Another significant difference between the human GNP1 and the *E. coli* enzyme is at the phosphate-binding loop at residue Ser43 where there is a distance of around 1 Å between corresponding C $\alpha$  carbons. B: Conformational disorder at the active-site lid found in the human GlcN6P-deaminase-inhibitor complex. GlcN6P-deaminase chains shown are: A (chain in brown), B (chain in red) and F (chain in purple). The *E. coli* enzyme is represented in green. The side chains of Arg172 and Phe173 show conformational disorder in the active-site lid of the human enzyme. The monomer A has alternate conformations in Ser43 and Arg172. The alternative conformations of Ser43 show different interactions, one bound to the phosphate of the inhibitor (or sulfate ion) as well as to Arg 172 and the other bound only to Arg 172. This geometry is not observed in the *E. coli* enzyme.

alytic conformation in the *E. coli* enzyme. The phosphate moiety of the substrate is thus in a different position and the C1, O1, C2 and N2 atoms, which participate in the isomerization reaction, did not present electron density in most of the monomers. The catalytic reaction region is usually the most conserved portion of all enzymes. In contrast, the computer model of the human GNP2 presented the phosphate-binding loop in a conformation similar to that of the *E. coli* enzyme.

Two different allosteric systems (*V*- and *K*-type systems) have been reported in the literature for GlcN6P-deaminases isolated from bovine and canine kidneys. GNP1 can be iden-

tified with a *V*-type allosteric system, which is found in bovine and recombinant human enzymes [7,9]. We suggest that the product of the human and mouse *GNP2* genes might be identified with the *K*-type allosteric system isolated from canine kidney [6] given their similarity of molecular weights and differences observed in its kinetic behavior with that of the GNP1 product [7,9]. GNP2 seems to be significantly similar to the *E. coli* GlcN6P-deaminase in its kinetic behavior and in the active-site structure, and therefore we suggest that it can be a catabolic enzyme, optimized for reaction rate acceleration. In contrast, GNP1 is related to an unusually high affinity for ammonia (the *B. taurus* enzyme presents a  $K_m$  for ammo-



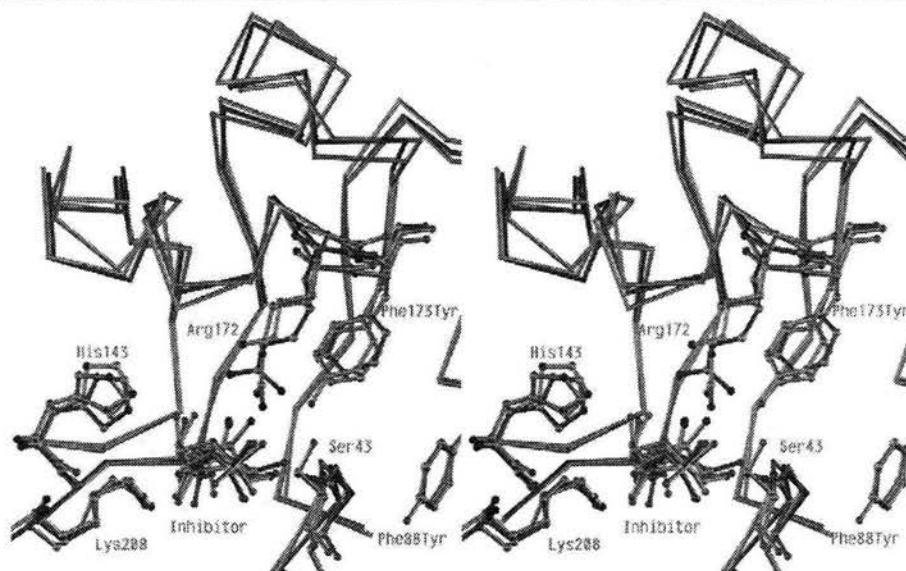


Fig. 4. Computer model of human GlcN6P-deaminase (GNP2). The crystallographic structure of GlcN6P-deaminase from *E. coli* is shown in green, aligned with the crystallographic structure of human GlcN6P-deaminase (monomer F, in purple). The F monomer presents the active-site lid in a conformation that builds the smallest active-site cavity. The orange chain is the minimization of the computer model of the GNP2 gene product. This enzyme has two mutations in the active-site lid (residues 162–182): Arg172 is changed to Lys and Phe173 changed to Tyr. A third mutation neighboring the phosphate-binding loop (residues 40–45), is Phe88, which is also changed to Tyr. The changes in residues 88 and 173 add two OH groups, generating close contacts with the phosphate-binding loop. In these conditions, the energy minimization displaced this loop to a position similar to that observed in *E. coli* GlcN6P-deaminase.

nia of 3.7 mM [7] in contrast to the *E. coli* enzyme with a  $K_m$  of 18 mM. [11]. Moreover, the structural differences observed around the active site of GNP1 when compared to the *E. coli* enzyme might be the result of a structural optimization towards a slightly different function as, for example, ammonia binding, since the transition-state analogue of the reaction binds in a disordered fashion.

**Acknowledgements:** We would like to thank Laura I. Álvarez-Añorve and Mario L. Calcagno for enzyme purification and Sonia Rojas for her technical assistance during enzyme crystallization. R.A. was recipient of a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. We are indebted to Nabuki Miyajima and J. Plumbridge for the GNP1 gene. This work is based upon research conducted at Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL) which is funded by Department of Energy (BES, BER) and the National Institute of Health (NCRR, NIGMS). We also want to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for support (project 37120N).

## References

- [1] Leloir, L.F. and Cardini, C.E. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 20, 33–42.
- [2] Calcagno, M., Campos, P.J., Mulliert, G. and Suastegui, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 787, 165–173.
- [3] Das, M. and Datta, A. (1982) *Biochem. Int.* 5, 735–741.
- [4] Benson, R.L. and Friedman, S. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2219–2228.
- [5] Weidans, J.A., Campbell, P., Moore, D., DeLucas, L.J., Rodén, L. and Veza, A.C. (1995) *Br. J. Haematol.* 91, 578–586.
- [6] Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C.A., Altamirano, M.M. and Calcagno, M.L. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 213–220.
- [7] Lara-Lemus, R. and Calcagno, M.L. (1998) *Biophys. Acta* 1388, 1–9.
- [8] Weidanz, J.A., Campbell, P., DeLucas, L.J., Jin, J., Moore, D., Rodén, L., Yu, H., Heilmann, E. and Veza, A.C. (1995) *Br. J. Haematol.* 91, 72–79.
- [9] Lara-Lemus, R. (1999) Ph.D. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Ciudad de México.
- [10] Oliva, G., Fontes, M.R., Garratt, R.C., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L. and Horjales, E. (1995) *Structure* 3, 1323–1332.
- [11] Montero-Moran, G.M., Lara-Gonzalez, S., Alvarez-Anorve, L.I., Plumbridge, J.A. and Calcagno, M.L. (2001) *Biochemistry* 40, 10187–10196.
- [12] Bustos-Jaimes, I. and Calcagno, M.L. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 156–160.
- [13] Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P. and Horjales, E. (2002) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58, 10–20.
- [14] Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L., Garratt, R.C. and Oliva, G. (1999) *Structure* 7, 527–537.
- [15] Comb, D.G. and Roseman, S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 807–827. See also Comb, D.G. and Roseman, S. (1962) *Methods Enzymol.* 5, 422–427.
- [16] Çaylı, A., Hirschmann, F., Wirth, M., Hauser, H. and Wagner, R. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 65, 192–200.
- [17] Valley, U., Nimitz, M., Conradt, H.S. and Wagner, R. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 64, 401–417.
- [18] Amireault, P. and Dube, F. (2000) *Mol. Reprod. Dev.* 56, 424–435. See also Montag, M., van der Ven, K., Dorbecker, C. and van der Ven, H. (1999) *FEBS Lett.* 458, 141–144.
- [19] Wolosker, H., Kline, D., Bian, Y., Blackshaw, S., Cameron, A.M., Fralich, T.J., Schnaar, R.L. and Snyder, S.H. (1998) *FASEB J.* 12, 91–99. See also Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K. and Lai, F.A. (1996) *Nature* 379, 364–368.
- [20] Nomura, N., Nagase, T., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Sato, S., Seki, N., Kawarabayashi, Y., Ishikawa, K. and Tabata, S. (1994) *DNA Res.* 1, 223–229. See also Suyama, M., Nagase, T. and Ohara, O. (1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 338–339.
- [21] Plumbridge, J.A., Cochet, O., Souza, J.M., Altamirano, M., Calcagno, M.L. and Badet, B. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 4951–4956.
- [22] Bunick, G., Harp, J., Timm, D. and Hanson, L. (1998) *Rigaku J.* 15, 6–12.
- [23] Otwinowski, Z. (1993) in: *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing* (Sawyer, L., Issacs, N. and Baily, S., Eds.), pp. 56–62, SERC Daresbury Laboratory, Warrington. See also Otwinowski, Z. and Minor, W. (1996) in: *Pro-*

- cessing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode (Carter, C. and Sweet, R.M., Eds.), pp. 307–325. Academic Press, Boston MA.
- [24] Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- [25] Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
- [26] Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr. A* 47, 110–119.
- [27] Kleywegt, G.J. and Jones, T.A. (2001) RAVE Package Version 010122/3.0, Uppsala University, Biomedical Centre, Uppsala.
- [28] Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. and Wheeler, D.L. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 15–18.
- [29] Boguski, M.S. (1993) *Nat. Genet.* 4, 332–333.
- [30] The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium (2001) *Nature* 409, 685–690.
- [31] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- [32] Burge, C. and Karlin, S. (1997) *J. Mol. Biol.* 268, 78–94.
- [33] Wisconsin Package Version 10.2. (2001) Genetics Computer Group (GCG), Oxford Molecular Group, Inc., Madison, WI.
- [34] Insight II, Version 98.0. (1998) Molecular Simulations Inc.
- [35] Shevchenko, V., Hogben, M., Ekong, R., Parrington, J. and Lai, F.A. (1998) *Gene* 216, 31–38.

## Resultados adicionales.

Durante el desarrollo de este proyecto y conforme a los objetivos originales, se realizó un estudio comparativo de las secuencias peptídicas de la familia de las GlcN6P desaminasas. De los resultados previos se desprende que la secuencia de las regiones relacionadas con el reconocimiento de sustrato y la regulación alostérica, entre las GlcN6P desaminasas I y II de mamíferos y la proteína de *E. coli*, son variables. Estas variaciones se localizan en la tapa del sitio activo, en el asa de ligadura de fosfato del sustrato y en el extremo C-terminal. Un análisis del alineamiento de secuencias de proteínas hipotéticas similares a las GlcN6P desaminasas humanas y de *E. coli* muestra heterogeneidad en las regiones antes mencionadas. Las modificaciones en dichas regiones comprenden cambios en la secuencia de aminoácidos así como en algunos casos inserciones y/o recortes en la misma, observándose proteínas de diversas tallas (de 212 hasta 311 aminoácidos). La secuencia más corta encontrada corresponde a la probable GlcN6P desaminasa de *Mycoplasma capricolum*, de la cual se ha realizado un estudio teórico estructural que predice la conservación del plegamiento [74] con la consecuente pérdida de la zona de regulación alostérica y de oligomerización conocidas para la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Dichas regiones son posteriores a la posición del residuo Lys208, último residuo 100% conservado, y que une el fosfato del sustrato. Los métodos empleados fueron la predicción de estructuras secundarias (se predicen el 88% de las hélices y hebras  $\beta$ ) y modelado computacional por homología de secuencias con la estructura cristalográfica conocida de *E. coli* [21]. La identidad entre la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y *M. capricolum* es de 33% y una similitud de 65% considerando 205 aminoácidos. Los residuos 100% conservados suman 68 aminoácidos entre los cuales están los residuos catalíticos (Asp72, His143 y Glu148), de unión al sustrato (Thr41, Gly42 y Lys208) y residuos comprometidos estructuralmente (Gly38, Pro45, Tyr49, Glu73, Gly142 Phe174 y Gly205) entre otros. Con el análisis de este modelo surge la inquietud de conocer cuales son las regiones estructurales y funcionales más conservadas así como las sujetas a variación en el plegamiento de la GlcN6P desaminasa así como la necesidad de cuantificar cual sería el número mínimo de aminoácidos del plegamiento que podría mantener la función catalítica, el cual podría estar alrededor de los 210 aminoácidos.

**Relaciones de parentesco entre las GlcN6P desaminasas.** La búsqueda de secuencias realizada con las secuencias peptídicas de la GlcN6P desaminasa I humana y de *E. coli* produjo 68 secuencias similares en diversos organismos (apéndice 1). Las secuencias encontradas fueron seleccionadas manualmente por los siguientes criterios: **a)** por la identidad que mostraron con la secuencia semilla y por la longitud de la región alineada, **b)** por la presencia de los aminoácidos catalíticos, de unión al sustrato y aminoácidos conservados con importancia estructural, **c)** finalmente se consideró el valor "e" expectativa mínimo de  $5e-09$ , generado por el programa Psi-Blast [75] en la primera iteración usando la secuencia de *E. coli* como semilla, para validar que las secuencias seleccionadas fueran homólogas. Durante la selección se consideró que las secuencias tuvieran un mínimo en el alineamiento entre los residuos 36 y 232 de la numeración de *E. coli*. En este intervalo se localizan la mayoría de los residuos 100% conservados. El alineamiento final fue curado manualmente e incluyó algunas secuencias que no fueron localizadas con el Psi-Blast del National Institutes of Health (que fueron localizadas en los bancos de datos de las siguientes instituciones: the Institute for Genomic Research, The Sanger Institute, Advanced Center for Genome Technology y KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y que fueron seleccionadas por los mismos criterios.

De las secuencias localizadas 58 son probables GlcN6P desaminasas las cuales pertenecen a diversos grupos taxonómicos. Se encontraron 22 secuencias de *Firmicutes*, 16 de *Eukaryota* (cordados, hongos, giardias, insectos, nemátodos), 9 de *Proteobacteria*, 3 de *Mollicutes* (micoplasmas), 5 de *Actinobacteria*, 2 de *Spirochaetales*, 1 de *Bacteroidetes* y 1 de *Fusobacteria*. Otras 10 secuencias son de proteínas similares a la GlcN6P desaminasa con diferente especificidad de sustrato, entre las que se encuentra la Galactosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*. Se encontraron adicionalmente 11 secuencias parciales de probables GlcN6P desaminasas en otros grupos como *Chlorophyta* (algas verdes), *Viridiplantae* (plantas verdes), *Kinetoplastida* (tripanosomas), *Apicomplexa* (plasmodios), y *Entamoebidae* (amibas). Estas últimas secuencias fueron descartadas para el análisis por estar incompletas. De esta colección de secuencias sólo a 3 se les ha comprobado la actividad catalítica de GlcN6P desaminasa y son: *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, y *Candida albicans* [30]. Por otro lado a la Galactosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*, (producto peptídico del gen Agal) se le ha comprobado la actividad de desaminación pero actuando sobre un compuesto muy similar (galactosamina-6-fosfato) [11].

La secuencia de probables GlcN6P desaminasas puede ser encontrada en todos los niveles de complejidad biológica, sin embargo, no es universal. Las secuencias de DNA que probablemente codifican para esta enzima no se han encontrado en algunas especies de bacterias como en

*Helicobacter pylori* y *Mycoplasma genitalum*, en algunos eucariotas como *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, ni en arqueobacterias. Adicionalmente, en *Saccharomyces cerevisiae* tampoco se ha encontrado la actividad de dicha enzima al igual que en algunas cepas que no son patógenas de *C. albicans* [28]. Por otro lado, aunque se ha localizado la secuencia de la probable GlcN6P desaminasa de la planta *Oriza sativa* (arroz), no se ha encontrado en *Arabidopsis thaliana* ni en otras plantas como el maíz y la papa.

El análisis de las probables GlcN6P desaminasas con valores de expectativa entre e-158 y 2e-26, encontró 19 aminoácidos 100% conservados, los cuales fueron localizados sobre el plegamiento conocido de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (figura 18): Gly38, Thr41, Gly42, Tyr49, Asp72, Glu73, Gly139, His143, Asn147, Glu148, Thr157, Leu162, Thr166, Phe174, Pro182, Gly189, Lys208, His232 y Asp240.

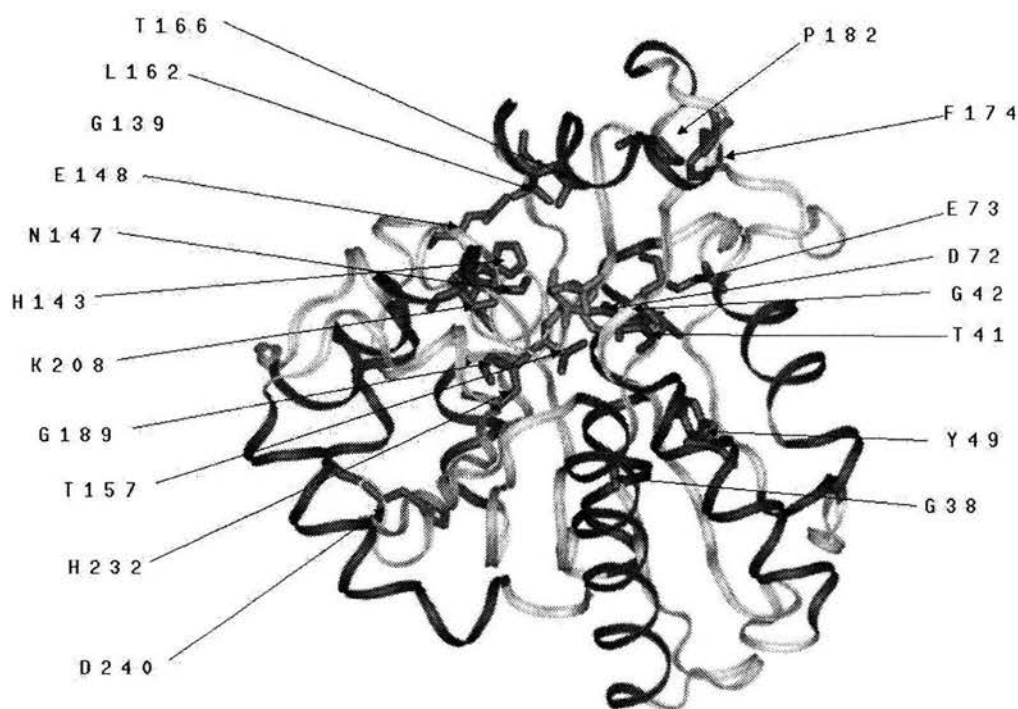


Figura 18.- Posición de los 19 residuos 100% conservados en las GlcN6P desaminasas. Los residuos están en color verde, en modelos de tubos y esferas. La traza de la cadena está dibujada en listones con tres colores: morado para hélices, en blanco asas y amarillo las hebras  $\beta$ .

Entre éstos están los residuos catalíticos (72 ,143 y 148), de unión al fosfato del sustrato (41, 42 y 208) y residuos comprometidos estructuralmente (como residuos que unen la tapa del sitio activo o presentan restricciones funcionales un torno a los residuos catalíticos). Las secuencias pertenecientes al grupo de la Galactosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli* sólo presentan 8 residuos 100% conservados los cuales son: Gly42, Asp72, Glu73, Gly139, His143, Asn147, Gly189 y Lys208. Estos están restringidos a residuos catalíticos (72 y 143), de unión al fosfato del sustrato (42 y 208) y a algunos residuos comprometidos estructuralmente. Dichas secuencias presentan valores de expectativa entre 6e-20 y 5e-09.

Respecto a las GlcN6P desaminasas humanas, se aprecian en la tabla 12 las identidades entre éstas y las de otros metazoarios. Se muestra que no es posible definir por el porcentaje de identidad si la GlcN6P desaminasa I o la GlcN6P desaminasa II corresponden a la enzima única para otros metazoarios ya que estos valores son similares. Sin embargo, se pueden identificar las posiciones de aminoácidos (tabla 13) que distinguen la GlcN6P desaminasa I de la II.

Tabla 12.- Identidades de la GlcN6P desaminasas 1 y 2 humanas con algunos organismos Metazoarios, bacterias y hongos.

<i>Especie</i>	<i>GlcN6PD1 Identidad global</i>	<i>GlcN6PD2 Identidad global</i>
<i>Ciona intestinalis</i>	74%	76%
<i>Takifugu rubripes</i>	76%	77%
<i>Drosophila melanogaster</i>	67%	71%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	64%	64%
<i>Candida albicans</i>	40%	42%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	55%	57%
<i>Giardia intestinalis 1</i>	33%	34%
<i>Giardia intestinalis 2</i>	32%	33%
<i>Oriza sativa</i>	28%	28%
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	33%	30%
<i>Mycoplasma capricolum</i>	23%	24%
Tnab-bglb <i>E. coli</i> 1103281	23%	23%
GalN6P desaminasa de <i>E. coli</i>	17%	18%

*Identidades calculadas globalmente.*

El análisis comparativo para un grupo seleccionado de 19 secuencias representativas (figura 19) permite definir 2 grupos principales: **a) Proteobacteria / Spirochaetales / Bacteroidetes / Fusobacteria / Eukaryota**, **b) Firmicutes / Mollicutes**. Las secuencias de las posibles GlcN6P

desaminasas de *Giardia intestinalis* (*Diplomonadida*) y de *Streptomyces coelicolor* (*Actinobacteria*) aparecen cerca del origen y se parecen poco entre si y a las de *Eukaryota* y *Proteobacterias*. El grupo de *Diplomonadida* son eucariotas unicelulares considerados primitivos, ya que carecen de mitocondrias, que aparecen entre el origen y la raíz del grupo **a** y **b**.

Tabla 13.- Comparación de la posiciones de aminoácidos que distinguen GlcN6PD1 de la GlcN6PD2.

No.	Posición	Residuo	GlcN6PD1	GlcN6PD2	Propiedades alteradas
1	Cercano al C-terminal	21	Arg	Cys	Posiblemente estabilidad
2	Sitio Activo	88	Phe	Tyr	Unión de sustratos
3	Sitio Activo	172	Arg	Lys	Unión de sustratos
4	Sitio Activo	173	Phe	Tyr	Unión de sustratos
5	C-terminal	275	Lys	Gly	Posiblemente estabilidad
6	C-terminal	276	Glu	Asn	Posiblemente estabilidad

*Sólo unos pocos residuos permiten diferenciar entre las GlcN6PD1 y la GlcN6PD2 de mamíferos. Los pocos cambios de importancia están relacionados con el sitio activo y el extremo C-terminal.*

**GlcN6P desaminasas: hexaméricas (alostéricas) y no hexaméricas (no alostéricas).** Es interesante notar que los grupos de *Eukaryota* y *Proteobacteria* aparecen cercanos entre sí y alejados de *Firmicutes* (figura 19). Una característica que une a las secuencias de ambos grupos es que todas son probables proteínas hexaméricas con geometría 32 (excepto *C. albicans*), característica asociada al alosterismo. Las proteínas hexaméricas conservan las asas con residuos importantes que hacen posible la oligomerización. Residuos relacionados con la transición alostérica y la unión del activador están conservados entre ambos grupos (N-terminal, Arg158, Lys160, Thr161, Tyr254). Esta característica también es compartida por las secuencias de *Spirochaetales*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria* (aunque este último grupo presenta la mayor divergencia entre las hexaméricas y sale en la base del árbol). Es importante relatar que los grupos con enzimas hexaméricas, dadas su similitudes estructurales y funcionales parecen compartir un ancestro común más reciente para la enzima GlcN6P desaminasa que con *Firmicutes* (excepto tal vez *Actinobacterias*). Sin bien se considera que el origen de la mitocondria está en algún grupo ancestral de bacterias relacionado con *Proteobacteria*, bien podría tratarse de un gen transferido desde la mitocondria durante el proceso de endosimbiosis que le dio origen.

Las secuencias de aminoácidos de las probables GlcN6P desaminasas de *Firmicutes* revela que no son enzimas hexaméricas ya que carecen de las estructuras que forman el eje de simetría dos y de

los residuos relacionados con el alosterismo, si bien la secuencia de *B. anthracis* (está secuencia no se incluyó en el análisis de la figura 19) alcanza la talla suficiente, pero no presenta los residuos de la firma para la dimerización, ni tampoco conserva los residuos del alosterismo 158, 160, 161 y 254. Recordemos que la Tyr254 es un residuo clave en la estabilización de la transición alostérica de los conformeros T a R [11]. Además, el N-terminal que es importante para unir al fosfato del activador alostérico presenta al menos 8 residuos extras. Tener residuos extras en el extremo N-terminal podría resultar en la destrucción de la cavidad alostérica como se conoce en las enzimas de la GlcN6P desaminasa humana I y de *E. coli* o en la posibilidad de tener otro tipo de oligomerización. El grupo de *Diplomonadida* (giardias) presenta una sola especie y dos secuencias de las cuales una podría ser un probable hexámero por la talla de la misma aunque, como el caso de *B. anthracis*, presenta un N-terminal largo. Otro dato interesante en las giardias es que no ha sido detectada actividad de GlcN6P sintasa [3] lo cual sugiere que una de las dos GlcN6P desaminasas sea una enzima fisiológicamente orientada a la biosíntesis, recordemos que la falta de una GlcN6P sintasa es letal.

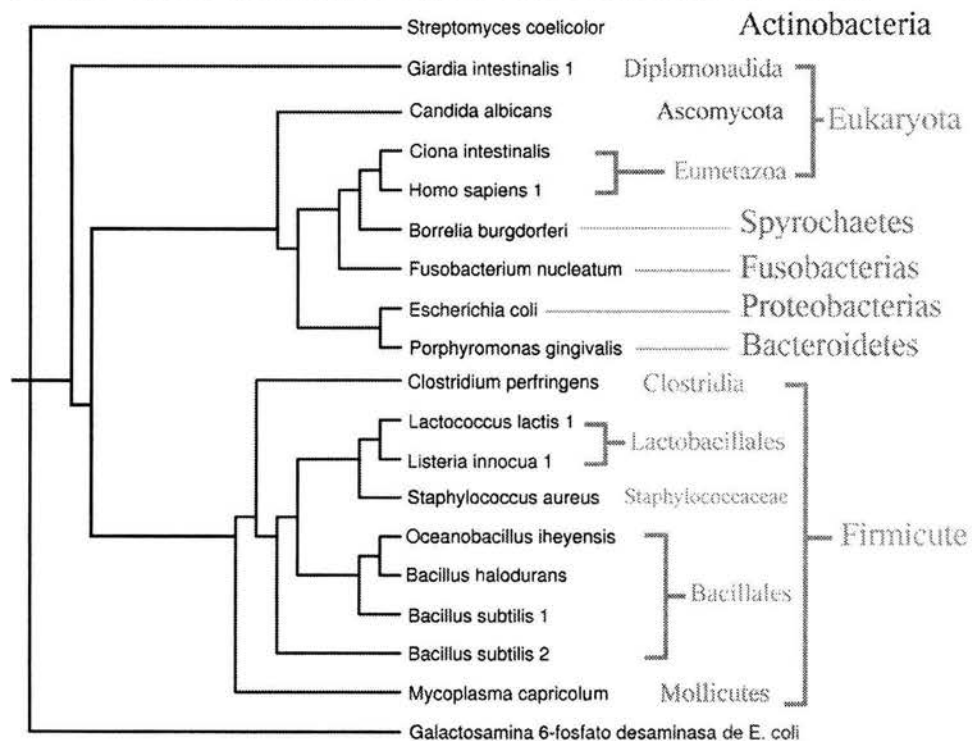


Figura 19.-Árbol construido por máxima parsimonia con 19 secuencias representativas. En el árbol se puede apreciar que las secuencias están divididas en dos grupos principales: a) Proteobacteria /Spirochaetales/ Bacteroidetes/ Fusobacteria /Eukaryota, b) Firmicutes/Mollicute. Diplomonadidad y Actinobacteria quedan en la base del árbol. La GalN6P desaminasa de *E. coli* fue elegida como el grupo externo.



La proteína de *C. albicans* no es una enzima hexamérica y presenta un dímero en equilibrio con una fracción monomérica [30]. La secuencia que se presenta en torno a la región del eje de simetría tres es poco conservada respecto a las enzimas hexaméricas (35% de identidad y 51% de similitud). Sin embargo, la conservación de esta región sugiere que la enzima de *C. albicans* pudo ser una enzima hexamérica como la de otros *Eukaryota*. La región del eje de simetría dos está casi perdida por la talla de la secuencia aunque son mantenidos la Leu247, la Lys248 y la Lys250.

**El grupo de la Galactosamina 6-fosfato desaminasa.** La Galactosamina 6-fosfato desaminasa es una enzima de *E. coli* codificada por un gen parálogo (*agal*) al de la GlcN6P desaminasa (*nagB*) y realiza una reacción similar [11]. Las secuencias localizadas de este grupo de enzimas son muy pocas pero tienen representantes tanto en *Firmicutes* como en *Proteobacteria*. Estas secuencias se localizan con los valores de expectativa más bajos, entre  $6e-20$  y  $5e-09$  por debajo de los valores para probables GlcN6P desaminasas ( $2e-26$ ) tomando como secuencia semilla la de *E. coli* (expectativa  $e-158$ ). En *Eukaryota* no se han localizado secuencias pertenecientes a este grupo. Los representantes de *Proteobacteria* son únicamente *E. coli* y *S. flexneri*. *E. coli* además presenta otro gen parálogo de *nagB* además de *agal*. El gen *tnab-bglb2* que codifica para una proteína hipotética cuya función no está definida, pero en función de los residuos conservados, probablemente realice una reacción similar a la GlcN6P desaminasa y a la GalN6P desaminasa. Este grupo de enzimas comparte con la GlcN6P desaminasa 8 residuos 100% conservados los cuales son: Gly42, Asp72, Glu73, Gly139, His143, Asn147, Gly189 y Lys208. Estos están restringidos a residuos catalíticos (72 y 143), de unión al fosfato del sustrato (42 y 208) y a algunos residuos comprometidos estructuralmente. Sin embargo, no comparten la firma para la hexamerización y alosterismo lo cual sugiere que no son enzimas hexaméricas. Este grupo de secuencias comparte con las GlcN6P desaminasas otros residuos que no siempre son 100% conservados como Asn/Asp141, Glu/Met/Leu148, Gly/Ser43, Thr/Ser44, Thr/Gly/Ala41, Pro/Val45, Tyr/Phe74 y Tyr/Cys/Val/Thr85. El grupo de las GalN6P desaminasas presenta modificaciones en las secuencias y tamaño de las hipotéticas tapas del sitio activo respecto a las GlcN6P desaminasas y entre ellas mismas, lo que sugiere que existen diferencias en la especificidad hacia los sustratos.

**El grupo de la 6-fosfogluconolactonasa.** Adicionalmente, también se pudo detectar a otro grupo de enzimas con secuencias relacionadas a las GlcN6P y la GalN6P desaminasas que fueron identificadas como la secuencia de la 6-fosfogluconolactonasa, una enzima de la vía de las pentosas.

Los valores de expectativa para esta enzimas son menores a 5e-09.

Esta enzima convierte la 6-fosfoglucono- $\delta$ -lactona en 6-fosfogluconato al incluir una molécula de agua en el C1 (figura 20). Estas enzimas también conservan los aminoácidos de apertura y reacción catalítica del sustrato (Asp72, Asn/Asp141, His143) y aquellos que unen al sustrato fosfatado (Gly42, Gly/Ser43, Thr/Ser44, y Lys208) y algunos estructuralmente importantes (Glu73, Gly137, Gly142 y Gly205). También presentan grandes cambios hacia los extremos N y C-terminales y en las asas que forman la cavidad del sitio activo. En estas secuencias se presentan cambios de residuos de forma permanente generando firmas distintas como el residuo de la posición 74 donde de una Tyr en las GlcN6P desaminasas cambia a Arg de forma constante en 6-fosfogluconolactonasas. Otro ejemplo es la posición 146 donde se observa una Ser en lugar de una Phe. La Ser146 y Arg74 podrían formar parte de los residuos de catálisis al estar muy cerca de la posición donde se ubicaría el C1 con la función  $\delta$ -lactona. A estas secuencias no se les realizó un análisis de traza evolutiva.

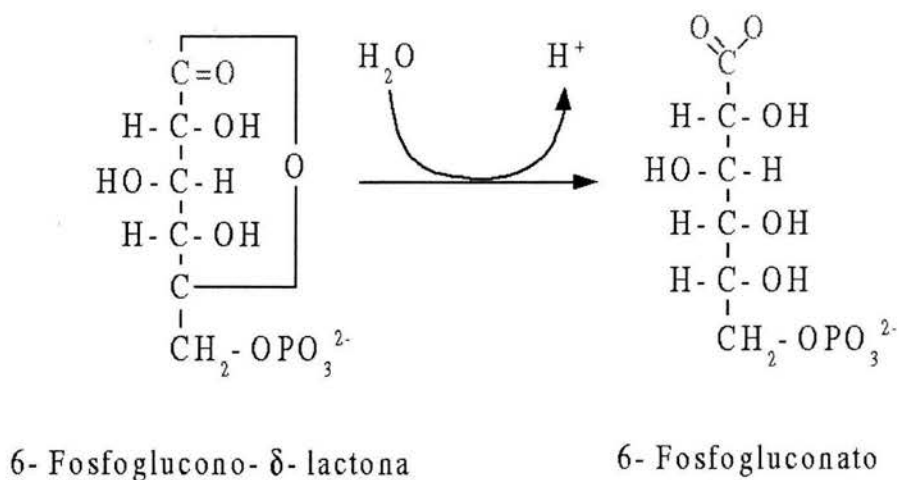


Figura 20.- Reacción catalítica realizada por la 6-fosfogluconolactonasa.

**Análisis de traza evolutiva: de la GlcN6P desaminasa.** El análisis de traza evolutiva identifica 19 residuos 100% conservados en 50 secuencias consideradas de probables GlcN6P desaminasas incluidas las secuencias de *E. coli*, humano y *C. albicans*. Se identifican 18 residuos internos conservados y 1 residuo externo conservado. Adicionalmente identifica 8 residuos internos clase-específicos. Todos estos residuos (27 en total) fueron localizados sobre el plegamiento de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (figura 21).

El programa TracesuitII organiza automáticamente las secuencias en 7 grupos principales: 1) *Eukaryota / Proteobacteria / Spirochaetes / Bacteroidetes / Fusobacteria*, 2) *Actinobacteria*, 3) *Diplomonadida*(giardias), 4) *Firmicutes: Clostridiaceae / Thermoanaerobacteriales / Bacillaceae*, 5)

*Firmicutes: Lactobacillales/Listeraceae* 6) *Firmicutes: Staphylococcaceae*, y 7) *Mollicutes* (micoplasmas). En los dos primeros grupos se presentan enzimas probablemente hexaméricas y alostéricas, mientras que los 5 grupos restantes probablemente no lo sean (figura 22).

Los residuos *internos* y *externos conservados* (IC y EC: 19 residuos) así como los *residuos clase específicos* (ICS: 8 residuos) se ubican en torno a la cavidad catalítica formando las paredes del sitio activo, excepto en la parte superior que corresponde a la tapa del sitio activo. Estos residuos envuelven y contactan al análogo del estado de transición parcialmente (figura 21). Los residuos IC, EC e ICS se asocian en una red de puentes de hidrógeno con la cadena principal y algunas cadenas laterales. Esta red de puentes de hidrógeno se divide en tres secciones funcionales (figura 21). Por un lado, los residuos del asa catalítica que presenta los aminoácidos que realizan la apertura del anillo de glucosa, (la etapa de la catálisis uno, residuos 139, 143, 146, 147, 148, 189, 240) junto con uno de los residuos que unen el fosfato del sustrato en el inicio de la hélice 7 (208). Por otro lado, los residuos cercanos al residuo catalítico Asp72 y que su mayoría intervienen en la etapa de la catálisis dos (71, 73, 74, 85, 157). La última sección son los residuos relacionados con las asas de ligadura del fosfato del sustrato (38, 40, 41, 42, 49) y residuos de la hebra E (134, 136 y 137). El único residuo que no está formando parte de esta red es la His232 que presenta un puente de hidrógeno con la cadena principal aparentemente importante para mantener dos asas unidas.

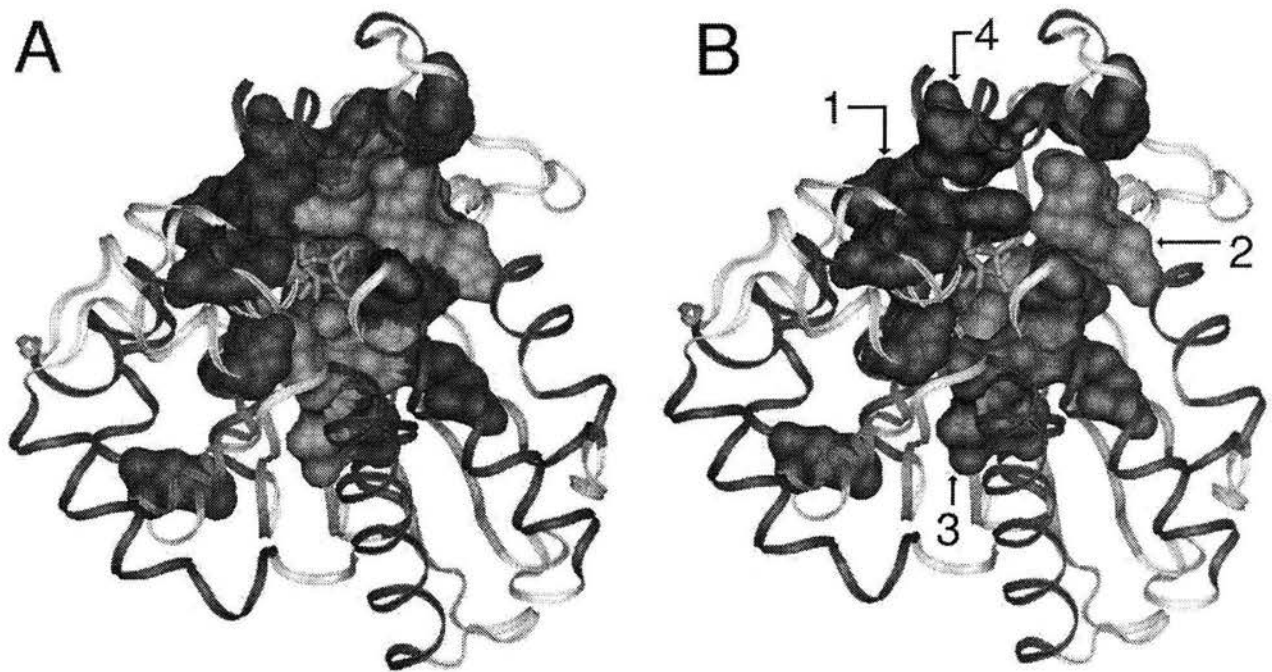


Figura 21.- A) Residuos 100% conservados y clase específicos localizados con el Análisis de Trazas Evolutivas. En la superficie se muestran los residuos conservados internos (en verde oscuro), externos (en azul) y Clase específicos (en violeta). Para A y B en azul claro la molécula del inhibidor. Se observa que la mayoría de los residuos conservados y clase específicos se organizan en torno a la cavidad del sitio activo. La traza de la cadena está dibujada en listones con tres colores: morado para hélices, en blanco asas y amarillo hebras  $\beta$ . B) Los residuos 100% conservados y clase específicos se dividen en tres regiones funcionales: 1) Los residuos de la etapa de catálisis uno (color magenta), 2) los residuos circundantes al Asp72 de la etapa de catálisis dos (color azul claro) y 3) los residuos relacionados con la asa de ligadura del fosfato del sustrato (color rojo). El número 4 (color azul oscuro) corresponde a residuos 100% conservados de la tapa y que contactan las regiones catalíticas (1 y 2).

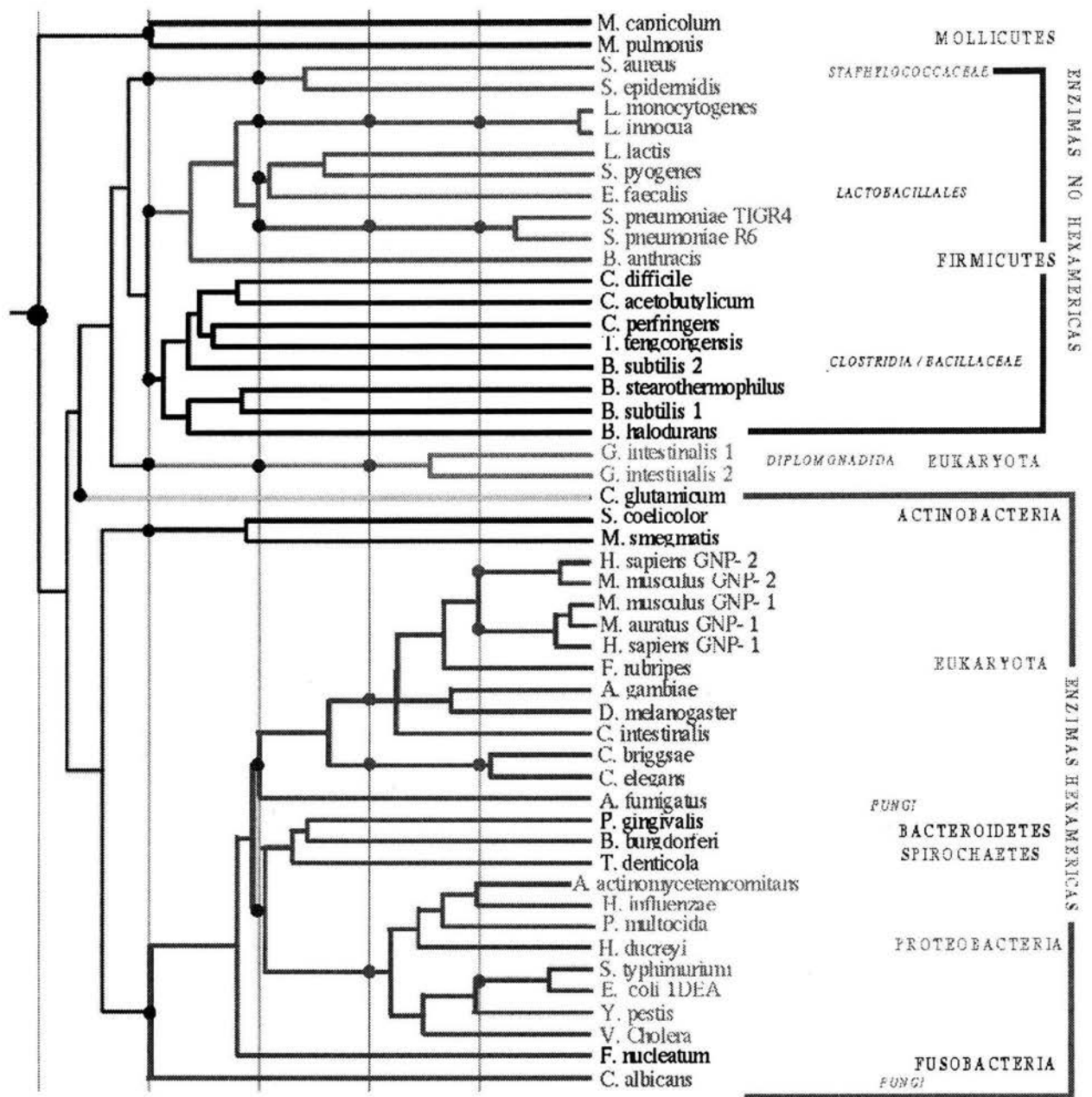


Figura 22.- Árbol filogenético construido por TraceSuitII con las secuencias de las GlcN6P desaminasas. Las líneas rojas verticales indican las particiones del árbol y los puntos sobre las líneas son las ramas consideradas por las particiones. En éste árbol se puede apreciar que las secuencias están divididas en 7 grupos principales en la segunda partición: 1) Eukaryota / Proteobacteria / Spirochaetes / Bacteroidetes / Fusobacteria, 2) Actinobacteria, 3) Diplomonadida(giardias), 4) Firmicutes: Clostridiaceae / Thermoanaerobacteriales / Bacillaceae, 5) Firmicutes: Lactobacillales/Listeraceae 6) Staphylococcaceae, y 7) Mollicutes (micoplasmas). El grupo 1 y 2 son probables enzimas hexaméricas y lo otros no.

### Análisis de traza evolutiva de la GlcN6P desaminasa y el grupo de la GalN6P desaminasa

El análisis consideró las 50 secuencias de probables GlcN6P desaminasas y 10 secuencias del grupo de la GalN6P desaminasa e identifica a 8 residuos 100% conservados (tabla 14) de los cuales 7 son *conservados internos* (Asp72, Glu73, Gly139, His143, Asn147, Gly189 y Lys208) y 1 *conservado externo* (Gly42). Adicionalmente, se identifican 4 residuos *internos clase-específicos* que junto con los residuos anteriores (12 residuos en total) fueron localizados sobre la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (figura 23). El análisis divide en 6 grupos las secuencias y excluye la GalN6P desaminasa de *E. coli* y la posible GlcN6P desaminasa de *C. glutamicum*: 1) Grupo *Listeria-4*; 2) Grupo *Listeria-3*; 3) *Mollicutes* (enzimas no hexaméricas); 4) *Actinobacterial Eukaryotal Bacteroidetes/ Spirochaetes/ Fusobacterial Proteobacteria* (enzimas hexaméricas) 5) *Firmicutes/Diplomonadida* (enzimas no hexaméricas); y 6) Grupo *Listeria-2*. De estos grupos formados destaca el que contiene las enzimas hexaméricas, el de enzimas no hexaméricas, y los grupos de *Listeria-2*, *Listeria-3* y *Listeria-4*. Los grupos de *Listeria* representan a proteínas emparentadas con probables diferentes funciones biológicas y/o especificidad de sustratos, debido a que presentan diferencias en sus secuencias en sitios ya reconocidos como importantes para la especificidad y la actividad catalítica de este plegamiento, como son la tapa del sitio activo, el asa de ligadura del fosfato del sustrato y el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha$  3.

Tabla 14.- Residuos conservados según el Análisis de Traza Evolutiva

<i>GlcN6PD</i>	
IC	38, 41, 49, 72, 73, 139, 143, 147, 148, 157, 162, 166, 174, 182, 189, 208, 232, 240
EC	42
ICS	40, 71, 74, 85, 134, 136, 137, 146
<i>GlcN6PD+GalN6PD</i>	
IC	72, 73, 139, 143, 147, 189, 208
EC	42
ICS	41, 49, 85, 137

*IC=Residuos internos conservados; EC=Residuos externos conservados; ICS=Residuos clase-específicos. Los ICS hacen referencia a residuos que cambian en algunos grupos particulares y son por lo general mutaciones correlacionadas.*

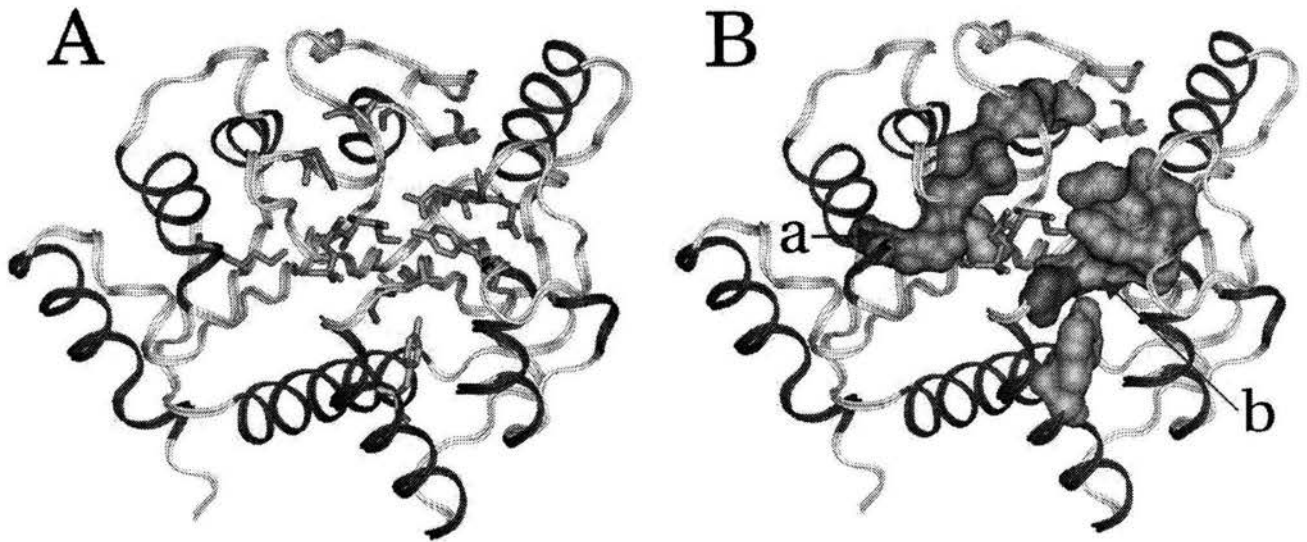


Figura 23.-Residuos obtenidos con el Análisis de Traza Evolutiva del alineamiento de secuencias entre GlcN6P desaminasas y GalN6P desaminasas. Residuos internos y externos conservados en azul claro y verde oscuro (residuo 42 únicamente) y residuos clase específicos en verde claro. La traza de la cadena está dibujada en listones con tres colores: morado para hélices, en blanco asas y amarillo hebras  $\beta$ . La tapa del sitio activo fue retirada para dejar una mejor observación. En otro tono de azul y dentro del sitio activo la molécula del inhibidor en modelo de tubos y esferas. Los residuos rodean el sitio activo en un anillo a nivel de los residuos catalíticos Asp72 e His143. En A) se observa una representación con un modelo de tubos y esferas de los residuos conservados y clase específicos; en B) se observan los mismo residuos en superficie y señalados por flechas rojas se observan dos grupos de residuos los cuales pertenecen a los residuos de las etapas de catálisis uno y dos.

## Discusión resultados adicionales

**Comparaciones estructurales del plegamiento entre la GlcN6P desaminasa I humana, la de *E. coli* y su relación con el análisis de traza evolutiva.** Las sobreposiciones de estructura a diferentes integradores muestran que las estructuras se sobreponen mejor en la región central del plegamiento justo sobre la base de la cavidad catalítica. Estructuralmente la geometría de la cadena principal es muy conservada en torno a la cavidad catalítica, a excepción de las asas móviles que presentan diferentes conformaciones. Se puede observar en la sobreposición realizada con el integrador a 0.3 Å que las regiones más conservadas son la capa  $\beta$  central, principalmente las 4 hebras centrales C, B, E, y F; así como la capa  $\beta$  antiparalela con las hebras A' (la hebra del residuo catalítico el Asp 72) B' y C'; el fragmento de los residuos 84 a 89 y la región de control alostérico. Estas regiones representan al parecer las zonas más vitales del plegamiento asociadas a la transmisión del enlace alostérico y a la etapa de catálisis dos. El análisis de traza evolutiva muestra los residuos 100% conservados (residuos *internos conservados* y *externos conservados*), para GlcN6P desaminasas, que están localizados en las hebras  $\beta$  centrales, la capa  $\beta$  antiparalela y las regiones funcionales que presentan movilidad como son las asas catalíticas y de unión a fosfato. Los residuos considerados como *clase específicos* no son 100% conservados y que están asociados a mutaciones correlacionadas, se localizan en las  $\beta$  centrales, en la capa  $\beta$  antiparalela y en el asa que interviene en la etapa de catálisis uno (reacción de apertura del anillo de glucosa). En total los residuos *internos conservados*, *externos conservados* y *clase específicos* son 27 y forman la cavidad catalítica y están asociados a las regiones estructurales conservadas las cuales tienen funciones definidas.

Lo más interesante de la disposición de los residuos más conservados en el plegamiento de la GlcN6P desaminasa es que se organizan en 3 regiones en torno al sitio activo. Una región se define por la cercanía e interacciones (puentes de hidrógeno entre cadena principal) que hay entre sus componentes. Cada región está vinculada a funciones distintas. Las regiones son el asa catalítica de la etapa de catálisis uno, el asa de ligadura del fosfato y la región en torno al residuo catalítico Asp72 que realiza la etapa de catálisis dos. Estas regiones se hayan en contacto y algunas son regiones móviles o están sujetas a cambios conformacionales durante la unión de los sustratos. Una observación interesante es que la tapa del sitio activo no presenta una región de aminoácidos agrupados con puentes de hidrógeno, sin embargo, los 4 residuos 100% conservados de la tapa del sitio activo se reparten entre las regiones de catálisis uno y dos. Estas 3 regiones podrían ser módulos funcionales del plegamiento de las GlcN6P desaminasas relacionadas directamente con la catálisis uno y dos (regiones



A y B), con la capacidad de unión del sustrato (región C)

**La evolución del plegamiento de GlcN6P desaminasa.** El análisis evolutivo de la secuencias de aminoácidos de la familia de la proteína GlcN6P desaminasa muestra claramente la existencia de tres ramas pertenecientes a grupos taxonómicos diferentes. La primera rama pertenece a las bacterias *Firmicutes* las cuales probablemente carecen de las estructuras secundarias necesarias para lograr una hexamerización como la observada en las GlcN6P desaminasas de *E. coli* y humanos y por lo tanto no ser alostéricas. La segunda rama pertenece a las enzimas hexaméricas que se subdivide en dos, los pertenecientes a *Proteobacteria* y a *Eukaryota*. *Proteobacteria* está relacionado con el grupo ancestral de bacterias que dio origen a las mitocondrias y dado el parecido que existe entre *Proteobacteria* y el grupo de *Eukaryota* es probable que la enzima de *Eukaryota* tenga sus orígenes en una transferencia de genes mitocondriales durante o posterior a la endosimbiosis. También es probable que los *Eukaryota* hayan perdido la enzima original en una etapa temprana previa a las simbiosis con la mitocondria. Del grupo *Eukaryota* destaca *G. intestinalis* un grupo de organismos que no se agrupa preferencialmente con ningún otro, aunque aparece entre *Actinobacteria* y *Firmicutes* cercano al origen del árbol. Recordemos que *Diplomonadida* se considera un grupo primitivo de *Eukaryota* al carecer de mitocondrias. Aunque recientemente, se ha descubierto que las *Diplomonadas* si tuvieron mitocondria, pero la misma fue reducida en tamaño y funciones a los organelos llamados mitosomas [76]. Los mitosomas se consideran reminiscencias mitocondriales como los hidrogenosomas y criptosomas amibianos. Es probable que el grupo de *Diplomonadida* haya mantenido la enzima ancestral *Eukaryota* o la haya adquirido por transferencia horizontal desde algún grupo no representado en el análisis. Finalmente, la tercera rama agrupa a los escasos representantes de la enzima GalN6P desaminasa y el producto peptídico del gen *t nab-bglb2*. Esta rama también se divide aparentemente en los dos grupos nombrados "Listeria-2" y "Listeria-4", y que probablemente tengan sustratos diferentes aunque relacionados por un esqueleto de carbono similar al de la glucosa y la galactosa con un fosfato en posición 6. Este conjunto de enzimas conservan los residuos más importantes relacionados con las reacciones catalíticas y la unión del sustrato. Adicionalmente, se encontró un cuarto grupo de proteínas que no fue incluida en el análisis de similitud, se trata de la 6-fosfogluconolactonasa. Esta familia comparte el plegamiento de la GlcN6P desaminasa conservando el perfil hidrofóbico de la capa  $\beta$  central y residuos similares de la capa  $\beta$  antiparalela, así como los residuos catalíticos de las etapas de catálisis uno y dos (His143 y Asp 72). Las estructuras secundarias de ligadura de fosfato se encuentran conservadas (del residuo 40 al 45 y la Lys208) mientras que la tapa del sitio activo está notablemente recortada. Esta enzima es universal y pertenece a una vía de metabolismo básico, lo cual

sugiere que el plegamiento de la 6-fosfogluconolactonasa es más antiguo que el de la GlcN6P desaminasa, siendo probable que pudiera haber dado origen al grupo de proteínas GalN6P/GlcN6P desaminasas.

## Conclusiones de resultados adicionales

1.-Del análisis de traza evolutiva y de la localización estructural de los residuos más conservados se puede concluir que la desaminasa presenta tres módulos estructurales con funciones diferentes (dos de catálisis y uno de unión al sustrato) localizados alrededor de la cavidad catalítica y sobre las regiones más conservadas en la estructura. Estas regiones comprenden residuos 100% conservados y *clase específicos*.

2.-Los análisis comparativos realizados a las secuencias localizadas de diversas GlcN6P desaminasa y de secuencias homólogas muestran que el plegamiento de la GlcN6P desaminasa es compartido con las familias de la GalN6P desaminasa y la 6-fosfogluconolactonasa. Es probable que estas enzimas compartan parte del mecanismo catalítico dada la conservación de los residuos funcionales His143 y Asp72.

3.- La similitud de las GlcN6P desaminasas de *Proteobacteria* y *Eukaryota* sugiere que la enzima de los organismos con núcleo tenga origen en el grupo de bacterias que dio origen a la mitocondria y haya sido transferido al núcleo durante el proceso de simbiosis. Los *Eukaryota* probablemente hayan perdido la GlcN6P desaminasa previamente a la simbiosis, ya que no es una enzima necesaria para la supervivencia.

4.-Las dos GlcN6P desaminasas de *G. intestinalis* se agrupan separadas cerca del origen del árbol filogenético. Es probable que estas enzimas representen a la GlcN6P desaminasa ancestral de *Eukaryota*, y aunque hayan tenido mitocondria a la par que otros organismos con núcleo, no representa la enzima mitocondrial. Sin embargo, también es probable que la haya adquirido por transferencia horizontal de genes de otro grupo de organismos no representado en el análisis.

5.- De todos los grupos rastreados para encontrar una posible secuencia homóloga a la GlcN6P desaminasa, sólo Arqueobacterias carecen de un gen que tuviera una secuencia peptídica que pudiera ser una GlcN6P desaminasa. Aparentemente en el curso de su evolución este grupo perdió el gen que codifica para una GlcN6P desaminasa.

6.-Sin bien las Arqueobacterias carecen del gen para la GlcN6P desaminasa presentan la 6-fosfogluconolactonasa y al ser una enzima de metabolismo básico es probable que esta enzima haya dado origen al plegamiento de la GlcN6P y GalN6P desaminasas o bien compartan un origen común a partir de un plegamiento ancestral.

## Perspectivas

Determinar la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa I sin análogo del estado de transición y sin sulfato en la cavidad catalítica.

Buscar nuevas condiciones de cristalización para la GlcN6P desaminasa.

Determinar la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa II en complejo con activador alostérico e inhibidor, así como buscar las condiciones de cristalización que permitan evitar la entrada de sulfato de amonio al sitio activo.

Comprobar el mecanismo alostérico de la GlcN6P desaminasa II humana (o de ratón) recombinante o de alguna fuente natural (líneas celulares en cultivo).

Buscar la existencia de posibles sitios de fosforilación con función regulatoria en la GlcN6P desaminasa I y II.

Realizar mutantes de las GlcN6P desaminasas I y II en las posiciones 43, 88, 121, 172, 173 y 174 para comprobar sus efectos en el mecanismo alostérico.

Terminar el análisis evolutivo y preparar la publicación correspondiente.

## Apéndice 1 :

Tabla de las especies con secuencias homólogas a la GlcN6P desaminasa *E. coli*.

No.	Especie	Valor "e"	Longitud del Alineamiento	Rango del Alineamiento	ID	GI	Longitud Total	ID calculada
1	<i>L. lactis 2</i>	<b>5e-09</b>	213	37-248	24	15673883	237	18
2	<i>Gen tnab-bglb de E. coli</i>	3e-11	244	1-241	26	33347786	240	23
3	<i>L. innocua1</i>	5e-11	227	32-249	26	16801929	239	21
4	<i>S. flexneri_2</i>	4e-14	239	5-236	28	24114429	240	23
5	<i>L. monocytogenes1</i>	1e-12	226	32-249	26	16804758	239	22
6	<i>GalN6PD de E. coli</i>	6e-15	215	28-241	29	26249725	251	23
7	<i>L. innocua 4</i>	2e-18	243	1-243	25	16801514	243	21
8	<i>L. monocytogenes 4</i>	2e-19	243	1-243	25	16804396	243	22
9	<i>L. monocytogenes 2</i>	3e-19	218	1-217	27	16802918	242	22
10	<i>L. innocua 2</i>	<b>6e-20</b>	218	1-217	27	16799949	242	22
11	<i>L. lactis1</i>	<b>2e -26</b>	216	28 -243	32	15673555	235	27
12	<i>M. capricolum</i>	*	206	1 - 208	*	516200	212	23
13	<i>S. agalactiae</i>	9e-31	247	1 - 247	32	22536963	233	28
14	<i>S. pneumoniae TIGR4</i>	2e-27	240	1 - 240	32	15901269	233	27
15	<i>S. pneumonia R6</i>	2e-27	240	1 - 240	32	31076811	240	28
16	<i>S. pyogenes</i>	1e-29	211	37 - 247	35	21910601	234	28
17	<i>S. aureus</i>	3e-30	206	37 - 241	35	15923559	252	28
18	<i>S. epidermidis</i>	3e-29	217	27 - 241	34	27467258	243	27
19	<i>B. anthracis</i>	2e-33	241	1 - 241	34	21402108	284	34
20	<i>E. faecalis</i>	1e-31	247	1 - 247	34	29375097	233	30
21	<i>M. pulmonis</i>	1e-36	248	10 - 253	35	15828833	256	31
22	<i>M.penetrans</i>	1e-35	240	1-237	34	31076815	242	29
23	<i>B. stearothermophilus</i>	*	234	1-240	*	UOKNOR_14 22	251	33
24	<i>B. subtilis 2</i>	2e-43	249	1 -248	37	16077305	249	34
25	<i>C. acetabutylicum</i>	7e-43	247	1 - 247	37	15893480	241	33
26	<i>C. glutamicum</i>	3e-39	212	37 - 247	40	19553842	253	34
27	<i>C. difficile</i>	*	234	1-240	*	Sanger_1496	249	35
28	<i>C. perfringens</i>	1e-43	248	1 - 248	37	18311416	242	34
29	<i>L. innocua3</i>	1e-29	204	37-240	38	16800025	234	31
30	<i>L. monocytogenes3</i>	4e-30	204	37-240	39	16802997	234	31
31	<i>B. halodurans</i>	4e-47	251	1 - 251	38	15612983	246	35

No.	Especie	Valor "e"	Longitud del Alineamiento	Rango del Alineamiento	ID	GI	Longitud Total	ID calculada
32	<i>O. sativa</i>	*	205	37-240	*	19972167	311	28
33	<i>S. mutans</i>	2e-32	207	37-243	38	24379109	232	30
34	<i>C. efficiens</i>	2e-36	248	1-248	35	25029074	285	29
35	<i>B. longum</i>	2e-44	256	3 - 250	37	23335426	270	33
36	<i>T. tengcongnesis</i>	1e-50	206	36-241	44	31076827	253	36
37	<i>G. intestinalis1</i>	3e-44	198	36 - 233	42	6831555	266	32
38	<i>G. intestinalis2</i>	1e-43	212	36 -247	41	6831556	263	32
39	<i>O. iheyensis</i>	1e-50	257	1 -257	40	23098066	250	37
40	<i>B. subtilis1</i>	4e-47	240	1-240	39	16080555	242	34
41	<i>S. coelicolor</i>	4e-49	222	28 -249	45	21223604	261	39
42	<i>M. smegmatis</i>	*	236	1-240	*	gnl TIGR_1772	250	40
43	<i>C. albicans</i>	2e-59	245	1-243	48	13702164	248	44
44	<i>F. nucleatum</i>	7e-87	262	1-262	56	19704478	274	53
45	<i>C. elegans</i>	9e-79	258	1-258	55	17554876	267	53
46	<i>B. burgdorferi</i>	4e-89	262	1-262	60	38014747	268	59
47	<i>C. briggsae</i>	*	266	1-266	*	22417586	267	56
48	<i>T. rubripes</i>	*	266	1-266	*	22418229	267	57
49	<i>C. intestinalis</i>	*	266	1-266	*	TC10583 gi 23587112	278	56
50	<i>D. melanogaster</i>	5e-95	255	1-255	60	19920764	259	57
51	<i>H. sapiens1</i>	7e-91	258	1-258	59	37926898	289	53
52	<i>H. sapiens2</i>	7e-91	258	1-258	59	16550419	276	55
53	<i>M. auratus</i>	5e-92	258	1-258	60	1177525	289	53
54	<i>M. musculus1</i>	2e-91	258	1-258	59	15928662	289	53
55	<i>M. musculus2</i>	3e-91	258	1-258	59	12856904	276	56
56	<i>T. denticola</i>	*	264	1-264	*	gnl TIGR_158	264	60
57	<i>A. fumigatus</i>	*	258	1-258	*	gnl TIGR_5085	270	58
58	<i>A. gambiae</i>	2e-97	255	1-255	62	31239371	256	60
59	<i>P. gingivalis</i>	5e-96	263	1-263	62	34540585	263	62
60	<i>H. ducreyi</i>	e-115	263	1-263	71	33152849	263	70
61	<i>H. influenzae</i>	e-117	260	1-260	74	16272108	270	71
62	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	*	263	1-263	*	gnl OUACGT_71 4	263	74
63	<i>P. multocida</i>	e-123	266	1-266	76	15602740	267	76
64	<i>V. cholerae</i>	e-127	266	1-266	79	15601778	266	79

No.	Especie	Valor "e"	Longitud del Alineamiento	Rango del Alineamiento	ID	GI	Longitud Total	ID calculada
65	<i>Y. pestis</i>	e-135	266	1-266	85	16122840	266	85
66	<i>S. typhimurium</i>	e-151	266	1-266	95	16764054	266	95
67	<i>S. flexneri 1</i>	e-158	266	1-266	98	24112036	266	99
68	<i>E. coli</i>	e-158	266	1-266	100	1310837	266	100

§ Valor "e" de corte estimado por Psi-Blast:  $5e^{-09}$

El valor "e" de  $2e^{-26}$  marca el posible limite entre las GlcN6P desaminasas y el grupo de la GalN6P desaminasas/isomerasas.

\* Secuencias validadas manualmente y que no aparecen con el Psi-Blast

## Apéndices 2 : Conceptos.

**Desorden conformacional:** se denomina desorden conformacional a las conformaciones diferentes que se observan sobre una misma estructura pero en diferentes subunidades.

**Induced-fit:** La teoría del "induced-fit" (I. D. E. Koshland, Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 98 (1958).) enuncia que la conformación de un enzima cambia al interactuar con el sustrato y de manera que se forme el complejo enzima-sustrato (ES), los grupos funcionales catalíticos del sitio activo de la enzima se rearreglan a una posición más apropiada para la reacción química. Es decir, la enzima cambia de conformación para que los residuos del sitio activo alcancen la geometría más apropiada de catálisis. La estructura óptima del sustrato para reaccionar en presencia de la enzima es el denominado estado de transición.

**Interpretación estructural del "induced fit":** El "*induced fit*" es una inducción al cambio conformacional de la enzima durante la formación del complejo Enzima-Sustrato (ES). El induced-fit ocurre cuando se da la unión del estado de transición a la enzima. Aunque no siempre se observa como un cambio conformacional debido a que existen enzimas con un alto grado de optimización de la geometría de sitio activo que une al estado de transición, es decir los grupos funcionales catalíticos del sitio activo de la enzima ya están arreglados con sus más apropiadas posiciones para la reacción química:  $[E] + [S] \rightleftharpoons [ES]$

**Modelo MWC.** Este modelo cinético fue propuesto por Monod Wyman y Changeux (MWC) para explicar el funcionamiento de las enzimas alostéricas. Las enzimas alostéricas están reguladas por una molécula diferente a la del sustrato, que interactúa con la proteína en un sitio diferente al del sitio activo. Las interacciones alostéricas ocurren cuando la unión del sustrato al sitio activo es afectada por la unión de la molécula reguladora a un sitio distinto. El modelo MWC está basado en conceptos estructurales de una proteína oligomérica que une moléculas de forma cooperativa. Cada una de las subunidades de la proteína alostérica debe estar dispuesta de forma simétrica y puede presentar dos estados conformacionales denominados T (el menos afin al sustrato) y R (el más afin al sustrato), aún en ausencia de los sustratos y activadores alostéricos. El modelo precisa que se considere que todas las subunidades del mismo oligómero estén en la misma conformación, ya sea T o R. Esto se debe a que los estados mixtos no interactúan favorablemente. Los estados conformacionales T y R están en equilibrio, pero el equilibrio puede romperse (ya sea hacia R o T) por la presencia de las moléculas catalíticas y alostéricas, las cuales tienen diferentes constantes de afinidad por ambas conformaciones. El modelo MWC propone tres tipos de comportamientos alostéricos: Por un lado los sistemas *V* donde el sustrato tiene la misma afinidad por ambos estados de modo que la molécula alostérica no afecta la unión aparente, pero sí promueve cambios en la  $V_{max}$  de la reacción. La afinidad diferencial de la molécula alostérica hacia una conformación T o R determinará si ésta es activador o inhibidor alostérico. Por otro lado, los sistemas *K* en donde la unión de una molécula alostérica cambia la constante de afinidad por el sustrato. La molécula alostérica y el sustrato tienen diferentes afinidades por las formas T o R. La unión de la molécula alostérica no cambia la  $V_{max}$  pero sí afecta la unión aparente del sustrato. El tercer sistema son los sistemas mixtos *K/V* ya que los sistemas biológicos nunca son sistemas *K* o *V* puros. Las proteínas alostéricas cuando cambian de conformación lo hacen conservando su simetría y de forma simultánea a lo que se le denomina cambio concertado, siguiendo el modelo MWC.



**Oscilaciones (vibraciones).** Las Oscilaciones son movimientos con periodicidad respecto a una posición de equilibrio (un mínimo de energía potencial). De todos los movimientos oscilatorios, el más importante debido a la sencillez con que se describe matemáticamente es el movimiento armónico simple. Además es una de las mejores aproximaciones de muchas oscilaciones observadas en la naturaleza. Matemáticamente las oscilaciones son funciones que varían de un valor a otro alternativamente de tipo sinusoidal (matemáticamente modelado por ecuaciones de senos y cosenos). Dicho de otro modo, son movimientos que tienen un ciclo que se cumple periódicamente y con una frecuencia dada (número de ciclos por unidad de tiempo) y una amplitud constante (de forma ideal). Comparativamente los movimientos inarmónicos presentan periodicidad pero varían en amplitud y tiempo como una función no sinusoidal respecto a una posición de equilibrio. Los Cambios conformacionales (conformaciones alternas) son movimientos con dos o más mínimos energéticos cercanos (con una barrera energética entre ambos). Un resorte ideal (sin rozamiento y sin efecto gravitacional) tendrá un movimiento armónico porque siempre se estirará y comprimirá igual entre dos puntos B y B' (un máximo y un mínimo), misma amplitud. La distancia entre dos máximos y dos mínimos es siempre la misma (conocida como  $\lambda$ ). Desde este punto de vista el modelo de Monod es un sistema armónico de dos conformaciones (dos mínimos energéticos) con una barrera energética para pasar de una a otra.

**Antenaridad:** Disposición en la complejidad de los N-glicanos sobre la superficie de la glicoproteínas. La complejidad cambia con la elevación de la concentración de UDP-N-acetil glucosamina en el aparato de Golgi por elevación del pH. El cambio del pH promueve cambios en el patrón de la glicosilación (principalmente sialilación) por la alteración de la actividad en la sialiltransferasa de Golgi (30, 41).

**Valores R y Rfree:** La cristalografía de proteínas es una área de estudio que maneja una enorme cantidad de datos experimentales y requiere de la adecuada manipulación de los mismo, ya que de esta dependerá la exactitud de los resultados finales y por ende de su correcta o acertada interpretación. Los modelos atómicos (MA) pueden contener errores en sus posiciones e inclusive omisiones de átomos tales como moléculas de agua y conformaciones alternas. La ambigüedad de los MA construidos solo puede ser verificada usando los datos experimentales de difracción (DED) y valorando la precisión del ajuste entre ambos (MA vs DED). La calidad del ajuste entre el MA y los DED se pueden observar en el valor R, el cual mide las discrepancias entre las amplitudes de los factores de estructura observados ( $F_o$ ) y las amplitudes de los factores de estructura calculados ( $F_c$ ):  $R = \frac{\sum | |F_o| - |F_c| |}{\sum |F_o|}$

Sin embargo, el valor R puede ser arbitrariamente bajo por el incremento del número de parámetros ajustables usados para describir el modelo, por lo que un valor R bajo no es garantía de un buen monitoreo de la exactitud del MA. Para llevar una adecuada vigilancia del ajuste del modelo a través del valor R es necesario considerar e implementar otro método estadístico. El método estadístico *cross-validation* fue introducido a la cristalografía en 1992 (Brunger A.T. 1992 Nature 335.472-275). En este método los datos de difracción son divididos en dos grupos iniciales: el primero contiene un 90% de los DED (*working set*) y es segundo el 10% de los DED escogidos al azar (*test set*). El primero se emplea para realizar el trabajo de afinamiento cristalográfico, mientras que el segundo para calcular un valor R llamado Rfree. El Rfree evalúa la capacidad que tienen el MA de predecir los DED a partir del *test set* y puede detectar cambios en el MA que no mejoran el ajuste entre el MA y los DED. MA con Rfree altos respecto al valor R son candidatos a tener errores en su construcción. Por lo general la separación del R y Rfree no debe ser mayor a 0.05 unidades.

## Bibliografía

- [1] Leloir, L. F., Cardini, C. E. (1953). Enzymes acting on glucosamine fosfato. *Biochimica et Biophysica Acta*. **20**:33-42.
- [2] Chang, Q., Su, K., Baker, J. R., Yang, X., Paterson, A. J., Kudlow, J. E. (2000). Phosphorylation of Human Glutamine:Fructose-6-phosphate Amidotransferase by cAMP-dependent Protein Kinase at Serine 205 Blocks the Enzyme Activity. *Journal of Biological Chemistry*. **275**:21981-21987.
- [3] Van Keulen H., Steimle P. A., Bulik D. A., Borowiak R. K., Jarroll L. E. (1998). Cloning of two putative *Giardia lamblia* glucosamine 6-phosphate isomerase genes only one of which is transcriptionally activated during encystment. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **45**(6):637-642.
- [4] Benson, R. L., Friedman, S. (1970). Allosteric control of glucosamine phosphate isomerase from adult housefly and its role in the synthesis of glucosamine 6-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*. **245**(9): 2219-2228.
- [5] Çayli, A., Hirschmann, F., Wirth, M., Hauser, H., Wagner, R. (1999). Cell Lines with Reduced UDP-N-Acetylhexosamine pool in the presence of ammonium. *Biotechnology and Bioengineering*. **65**:192-200.
- [6] Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G., Suástegui, J. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine 6-phosphate (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **787**:165-173.
- [7] Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C. A., Altamirano, M. M., Calcagno, M. (1992). Purification and Characterization of Glucosamine 6-phosphate deaminase from dog kidney Cortex. *Archives of Biochemistry Biophysics*. **297**:213-220.
- [8] Lara-Lemus R., Calcagno, M. (1998). Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1388**:1-9.
- [9] Weidanz, J. A., Campbell, P., DeLucas, L. J., Jin, J., Moore, D., Roden, L., Yu, H., Heilmann, E., Vezza, A. C. (1995a). Glucosamine 6-phosphate deaminase in normal human erythrocytes. *British Journal of Haematology*. **91**:578-586.
- [10] Malaya, D., Datta, A. (1982). Purification and some properties of inducible Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. **5**:235-741.
- [11] Brinkkötter, A., Klöß, H., Alpert, C.-A., Lengeler, J. W. (2000). Pathways for the utilization of N-acetyl-galactosamine and galactosamine in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. **37**:125-130.
- [12] Monod, J., Wyman, J., Changeux, J. P., (1965). On the nature of the allosteric transition : A plausible model. *Journal Of Molecular Biology*. **12**:18-118.
- [13] (Mutante Tyr121): Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E., Calcagno, M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* Glucosamine-6-phosphate deaminase production by replacements of Tyr121. *Biochemistry*. **34**:6074-6082.
- [14] (Mutante Tyr254): Montero-Morán, G. M., Horjales, E., Calcagno, M. L., Altamirano, M. M. (1998). Tyr254 Hydroxyl Group Acts as a Two-Way Switch Mechanism in the Coupling of Heterotropic and Homotropic Effects in *Escherichia coli* Glucosamine-6-phosphate Deaminase. *Biochemistry*. **37**:7844: 7849.
- [15] Lara-González, S., Henry, B. F. D., Mendoza-Hernández, G., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. (2000). On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6-phosphate Deaminase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. **301**:219-227.
- [16] Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J. A., Calcagno, M. L. (2001). On the

- Multiple Functional Roles of the Active Site Histidine in Catalysis and Allosteric Regulation of *Escherichia coli* Glucosamine 6-Phosphate Deaminase. *Biochemistry*. **40**:10187-10196.
- [17] Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt, R. C., Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase : the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure*. **7**: 527-536.
- [18] Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo S. P., Horjales E. (2002). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *E. coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Crystallographica Section D*. **58**:10-20.
- [19] Rudiño-Pinera, E. y Horjales, E. **Datos sin publicar** sobre *E. coli*.
- [20] Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*. **247**:536-540.
- [21] Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Horjales. E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine -6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure*. **3**:1323-1332.
- [22] Lara-Lemus, R. Estudio cinético y caracterización molecular de la enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa de corteza Renal de Bovino. Ph. D. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México. 1999. México)
- [23] Plumbridge, J. A., Cochet, O., Souza, J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Badet B. (1993). Coordinated regulation of amino sugar synthesizing and degrading enzymes in *Escherichia coli* K12. *Journal of Bacteriology*. **175**:4951-4956.
- [24] Plumbridge, J. A. (1995). Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of *glmUS* operon and require two separated NagC binding sites. *EMBO Journal*. **14**:3958-3965.
- [25] Vogler, A. P. and Lengeler, J., W. (1989). Analysis of the nag regulon from *Escherichia coli* K12 and *Klebsiella pneumoniae* and of its regulation. *Molecular and General Genetics*. **219**:197-105
- [26] Plumbridge, J. (1996). How to achieve constitutive expression of a gene within an inducible operon: the example of the *nagC* gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **178**:2629-2636.
- [27] Milewski, S. (2002). Glucosamine-6-phosphate synthase-the multi-fasets enzyme. *Biochimica Biophysica Acta*. **1597**:173-192.
- [28] Sing, B., Data, A. (1979c). *Biochimica et Biophysica Acta*. **557**:248-258.
- [29] Natarajan, K., Datta, A. (1993). Molecular cloning and analysis of the *NAG1* cDNA coding for glucosamine -6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**: 9206-9214.
- [30] Rudiño-Piñera, E. **Datos sin publicar** sobre *C. albicans*.
- [31] Ryll, T., Valley, U., Wagner, R. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*. **44**:184-193.
- [32] Izumi, K. (1965). Intracellular Distribution of Enzymes Involved in Glucosamine Metabolism in Rat liver. *The Journal of Biochemistry*. **57**:539-546.
- [33] Sukeno, T., Kikuchi, H., Saeki, H., Tsuiki S. (1971). Transformation of glucosamine to glycogen and lactate by ascites tumors cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **244**:19-29.
- [34] Kikuchi, K., Tsuiki, S. (1979). Metabolism of exogenous N-acetylglucosamine in extracts of rat kidney Liver and hepatoma. *Biochimica et Biophysica Acta*. **584**:246-253.

- [35] Weidans, J.A., Campbell, P., Moore, D., DeLucas L. J., Rodén L., Vezza, A. C. (1995b). Glucosamine 6-phosphate deaminase in *Plasmodium falciparum*. *British Journal of Haematology*. **91**:578-586.
- [36] Parrinton, 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**:368-364.
- [37] Swann, K., Lai, F.A. (1997). A novel signalling mechanism for generating Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mammals. *BioEssays*. **19**:371-378.
- [38] Mortag, M., Parrington, J., Swann, K., Lai, F. A., van der Ven. (1999). Presence and localization of oscillin in human spermatozoa in relation to the integrity of the sperm membrane. *FEBS*. **423**:357-361.
- [39] Amireault, P., Dubé, F.. (2000). Cloning, sequencing, and expression analysis of mouse glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA/oscillin). *Molecular Reproduction and Development*. **56**:424-435.
- [40] Wolosker, H., Kline, D., Bian, Y., Blackshaw, S., Cameron, A. M., Fralich, T. J., Schnaar, R. L., Snyder, S.H. (1998). Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB Journal*. **12**:91-99.
- [41] Davidson, E. A., Blumental, H. J., Roseman, S. (1957). Glucosamine Metabolism. IV. *The Journal of Biological Chemistry*. **226**:125-128.
- [42] Valley, U., Nimitz, M., Conradt, H. S., Wagner, R. (1999). Incorporation of Ammonium into intracellular UDP-activated N-Acetylhexosamines and into carbohydrates structures in glycoproteins. *Biotechnology and Bioengineering*. **64**:401-417.
- [43] Shevchenko, V., Hogben, M., Ekong, R., Parrington, J., Lai, F.A. (1998.) The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene*. **216**:31-38.
- [44] The RIKEN Genome Exploration Research Group and FANTOM Consortium. (2001). *Nature*. **409**:685-690.
- [45] Xiao, H.S., Huang, Q.H., Zhang, F.X., Bao, L., Lu, Y.J., Guo, C., Yang, L., Huang, W.J., Fu, G., Xu, S.H., Cheng, X.P., Yan, Q., Zhu, Z.D., Zhang, X., Chen, Z., Han, Z.G., Zhang, X. (2002). Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:8360-8366. Expressed sequence tags of cDNA clones from rat dermal papilla cells. Sleeman, M. A., Murison, J. G., Strachan, L., Kumble, K. D., Glenn, M. P., McGrath, A., Grierson, A., Havukkala, I., Tan, P. L. J., Watson, J. D. 2000. Unpublished
- [46] Bunick, G., Harp, J., Timm, D., Hanson, L. (1998), Macromolecular crystal annealing: techniques and case studies. *The Rigaku Journal*. **15**:6-12.
- [47] Leslie, A.G.W., (1992), Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26.
- [48] Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In *Proceedings of CCP4 Study weekend: Data Collection and Processing*. (Sawyer L., Issacs, N. & Baily, S., Eds.) pp. 56-62, SERC Daresbury Laboratory, Warrington.
- [49] Otwinowski, Z., Minor, W. (1996). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in oscillation mode. (Carter, C. & Sweet, R.M., Eds), pp. 307-325, Academic Press, Boston MA.
- [50] Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: program for protein crystallography *Acta Crystallographica. D* **50**:760-763.
- [51] Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998) Crystallography

- and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica. D.* **54**:905-921.
- [52] Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica. A.* **47**:110-119.
- [53] Kleywegt, G. J., Jones, T.A. (2001). AVE program from RAVE package Version 010122/5.0 Uppsala: Uppsala University, Biomedical Centre.
- [54] Kleywegt, G.J., Jones, T.A. (2001). IMP program from RAVE package Version 010122/3.0 Uppsala: Uppsala University, Biomedical Centre.
- [55] Kleywegt, G.J., Jones, T.A. (2001). LSQ\_MAN program from DEJAVU package Version 010418/8.1 Uppsala: Uppsala University, Biomedical Centre.
- [56] InsightII, Version 98.0. (1998). Molecular Simulations Inc.
- [57] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology.* **215**:403-410.
- [58] Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. (2003). GenBank. *Nucleic Acids Research.* **31**:23-27.
- [59] Boguski, M.S., Lowe, T.M., Tolstoshev, C.M. (1993). dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nature Genetics.* **4**:332-333.
- [60] International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). *Nature.* **409**:860-921.
- [61] Bairoch, A., Bucher, P., Hofmann, K. (1997). The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Research.* **25**:217-221.
- [62] Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* **22**:4673-4680.
- [63] Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. Oxford Molecular Group, Inc.
- [64] Felsenstein, J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics.* **5**:164-166.
- [65] Innis C.A., Shi J., Blundell T.L. (2000). Evolutionary trace analysis of TGF- $\beta$  and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis *Protein Engineering.* **13**:839-847.
- [66] Lichtarge, O., Bourne, H. R., Cohen, F. E. (1996). An Evolutionary Trace Method Defines Binding Surfaces Common to Protein Families. *Journal of Molecular Biology.* **257**:342-358.
- [67] (Mutante Phe 174) Bustos-Jaimes, I., Sosa-Peinado, A., Rudiño-Piñera, E., Horjales, E., Calcagno, M. L. (2002). On the Role of the Conformational Flexibility of the Active-site Lid on the Allosteric Kinetics of Glucosamine-6-phosphate Deaminase. *Journal of Molecular Biology.* **319**:183-189.
- [68] O'Shaughnessy, A.L., McCombie, W.R., Baker, J.P., Balija, V., Cunnius, D., Dedhia, N.N., de la Bastide, M., Katzenberger, F., King, L., Kirchoff, K. A., Miller, B., Muller, S., Nascimento, L. U., Palmer, L., Santos, L., Shah, R. S., Spiegel, L. A., Zutavern, T., Preston, R., Hannon, G. J. (2002). Expressed sequence tags from *Canis familiaris* (dog). Unpublished.
- [69] Woodget J. R., Gould K. L., Hunter T. (1986). *European Journal of Biochemistry.* **161**:177-184. Referencia del programa PROSCAN.

- [70] Kishimoto A., Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y., Nishizuka Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. **260**:12492-12499.
- [71] Pinna, L. A. (1990). *Biochimica et Biophysica Acta*. **1054**:267-284. Referencia del programa PROSCAN.
- [72] Arreola Alemón Rodrigo. Estudios estructurales de . Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996. México.
- [73] Tatusova, T. A., Madden T. L. (1999). Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotides sequences. *FEMS. Microbiol. Letters*. **174**:247-250.
- [74] Comb, D. G., Roseman, S. (1958). Glucosamine Metabolism. IV. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. **232**:807-827.
- [75] Ghosh, S., Blumenthal, H. J., Davidson, E., Roseman, S. (1959). Glucosamine Metabolism. V. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. **235**:1265-1273.
- [76] Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Muller, M. Lucocq, J. M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. **426**:172-176.