



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TRANSICION ALOSTERICA DE LA GLUCOSAMINA
-6-FOSFATO DESAMINASA: ESTUDIO DE LA
COMUNICACION ENTRE TRIMEROS POR FLUORESCENCIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
LORENA DE ANDA AGUILAR



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m343582



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

PRESIDENTE	PROF. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ
VOCAL	PROF. ISMAEL BUSTOS JAIMES
SECRETARIO	PROF. FRANCISCO RUÍZ TERÁN
1ER. SUPLENTE	PROF. LUIS TONATIHUT SANCHEZ LINARES
2DO. SUPLENTE	PROFA. MARÍA EUGENIA DE LA TORRE H.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
**LABORATORIO DE FISCOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**



DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

ASESOR



LORENA DE ANDA AGUILAR

SUSTENTANTE

Este trabajo contó con el apoyo de los proyectos CONACyT 41328-Q
y PAPIIT IN228703.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Lorena De Anda
Agilar

FECHA: 25 abril 2005

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes por la confianza que tuvo en mí para realizar este proyecto, por todo lo que de él aprendí, por su enorme paciencia y disposición para resolver mis dudas y por todo el apoyo que me brindó a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Mario L. Calcagno por compartirme su enorme conocimiento y experiencia, por mostrarme que el deseo por aprender cosas nuevas nada tiene que ver con la edad y por hacerme sentir parte de la comuna desde el primer día que llegué al laboratorio.

A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas. A Martín, Armando, Laura, Luis B. y Luis T., por las pláticas y buenos momentos compartidos, por nunca decirme no cuando necesité de su ayuda.

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas por haberme dado la oportunidad de comenzar mi camino en la investigación; a Daniel y Lilia por el tiempo que compartimos y por haberlos conocido. Al Dr. Felipe Cruz y a mis maestros de laboratorio de Bioquímica I y II por alimentar mi inquietud hacia esta área.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por la formación que de ellas recibí y por el orgullo de ser universitaria.

CON TODO CARIÑO:

A mis padres por su cariño y amor inagotables, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por nunca dejar de pensar en mí, por su esfuerzo incansable para darme siempre lo mejor, por enseñarme que no hay obstáculo alguno para salir adelante, por siempre apoyarme hasta en los proyectos más locos y sobre todo, por ser los míos.

A Lety, Oscar y Alberto por siempre cuidar de mí, por nunca dejarme sola, por ser mis cómplices, por todo lo que juntos hemos pasado y ser parte importante de lo que soy, porque sin ustedes mi vida estaría incompleta.

A To por las largas, reflexivas, sustanciosas y divertidas pláticas que siempre me brindas, por ser mi confidente, por siempre encontrar la forma de hacerme ver las cosas en perspectiva y reír de los malos ratos, por ser mi "Pepe Grillo" y por tu fe en mí.

A mi tía Margarita por todo el amor, cariño, apoyo y cuidados que me has dado a lo largo de mi vida, por permanecer a nuestro lado sobre todas las cosas.

A Susanne por ser mi "hermanita" del alma y confidente, por siempre estar a mi lado aun cuando el Atlántico nos separa y todo tu cariño, por las porras que me echas y consejos que me das, por preocuparte por mí, por todos los buenos y malos momentos que vivimos (y los que nos quedan por vivir).

A Daniela por compartir juntas esta etapa de nuestras vidas y las que nos faltan, por pensar en mí, por ser mi amiga. A Claus porque no hacen falta años para encontrar una amiga.

A Eri por estar ahí cuando te he necesitado, por las risas, lágrimas, desvelos y angustias compartidas, por ser siempre franca, por no dejarme mirar hacia atrás y animarme a seguir adelante, por todo lo que me has enseñado y apoyado. ¿Te acuerdas de Pituka y Petaka ?.

A Chío y Sandra porque los años pasan y nuestra amistad sigue creciendo, por todos los buenos momentos que desde la prepa hemos construido y los que juntas seguimos construyendo. Las quiero mucho.

A Jorge y Gisela por aguantarme en clases y laboratorios, y la "Alquimia" que en éstos llegamos a hacer, por su amistad. A George por los ratos en que divagamos y reímos, a veces de nosotros mismos.

A Juanito por estar siempre al pie del cañón y no olvidarte de mí.

A Raúl, Laura, Gustavo, Felipe y Humberto por iniciar mi etapa universitaria a su lado y hacerme más ligero el camino. A Resnick por siempre encontrar un rato para platicar, compartir experiencias e inquietudes y darme ánimos.

A Sadakko por dejarme ser parte de tu historia...

A Pablo por ser el punto de inflexión en mi vida y ser lo que ERES.

A todos aquellos con los que conviví a lo largo de la carrera y de una u otra manera forman parte de mi vida.

ÍNDICE

Resumen

Introducción

- Enzimas alostéricas 1
- Modelo concertado Monod-Wyman-Changeux 4
- Aminoazúcares 8
- Glucosamina-6-fosfato desaminasa 11
- Transición alostérica 16
- Sitio alostérico 17
- Sitio activo 19
- Mecanismo 21
- Fluorescencia 23

Objetivos 28

Metodología y material 29

- Reactivos 29
- Plásmidos y mutagénesis 29
- Transformación 31
- Expresión de las enzimas mutantes en *E. coli* 31
- Purificación de las mutantes de glucosamina-6-fosfato desaminasa 32
- Cuantificación de la enzima 33
- Determinación de la actividad enzimática 33
- Ajuste de la cinética 34
- Fluorescencia 34

Resultados 36

- Mutagénesis 36
- Caracterización cinética 38
- Fluorescencia 47

Conclusiones 53

Perspectivas 54

Bibliografía 55

RESUMEN

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa; EC 3.5.99.6) de *Escherichia coli*, es una enzima activada alostéricamente por *N*-acetil-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). Esta enzima cataliza la conversión de glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en fructosa-6-fosfato (Fru6P) y amonio. Esta enzima regula la concentración intracelular de GlcN6P y juega un papel crucial en el metabolismo de aminoazúcares en *E. coli*. La GlcN6P desaminasa es un homohexámero que ha sido caracterizado cristalográficamente en sus formas de alta (R) y baja (T) afinidad. La comparación de las estructuras cristalográficas de los estados R y T de esta enzima muestran un evidente cambio cuaternario. Sin embargo, la región correspondiente al eje de simetría de orden 2, que corresponde a la interfase de contacto entre trímeros, parece no cambiar su estructura entre ambos estados conformacionales, lo que sugiere que la propagación de la transición cuaternaria entre trímeros es mínima o no existe. En este trabajo se estudió la propagación de la transición alostérica a través del eje de simetría de orden 2 de la GlcN6P desaminasa mediante un residuo de Trp que, al ser colocado en la región de interés (Val249), actuó como sonda fluorescente de cambios estructurales. El espectro de emisión del triptofano se modifica al alterar el ambiente electrónico que lo rodea y estos cambios fueron correlacionados con las modificaciones estructurales ocurridas en la enzima. La mutación realizada, Val249Trp, no modificó de manera importante el comportamiento cinético de la enzima, por lo que fue posible emplearla como modelo de la enzima silvestre. Los resultados ponen en evidencia la participación activa de la interfase entre trímeros de la enzima en la propagación de la transición alostérica, así

como la existencia de distintos conformeros estructurales correspondientes a los distintos estados de ocupación de los sitios activo y alostérico de la enzima.

ENZIMAS ALOSTÉRICAS

La actividad metabólica de un organismo requiere de un conjunto de mecanismos reguladores que eviten la formación de ciclos fútiles y permitan el uso eficiente de los metabolitos. Estos mecanismos reguladores se presentan a distintos niveles en función de las necesidades metabólicas de la célula: regulando la expresión de la información genética del ADN y modificando la actividad enzimática a nivel de las proteínas. La regulación de la actividad enzimática ocurre a través de dos mecanismos: 1) modificaciones covalentes (interconversión enzimática) por fosforilación, acetilación o metilación, y 2) por la unión de ligandos (también llamados *efectores*) que pueden ser sustratos, productos o coenzimas que participan en la misma vía metabólica pero que no se producen o consumen a nivel de la enzima regulada. Estas modificaciones químicas o uniones de ligandos pueden reducir o aumentar la actividad enzimática. En el caso en que la regulación ocurre por la unión de un ligando regulador en un sitio distinto al sitio activo de la enzima, se le denomina *regulación alostérica*.

Las enzimas con propiedades alostéricas presentan, en muchos casos, propiedades cooperativas tanto en la unión de sustratos como en la unión de efectores alostéricos. Por esta razón, las enzimas alostéricas se encuentran extensamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en posiciones determinantes en las vías metabólicas, ya que permiten controlar la actividad de enzimas individuales mediante pequeñas fluctuaciones en la concentración de sustratos. Estas proteínas, como se mencionó anteriormente, tienen sitios de unión de ligandos diferentes al sitio activo y su actividad es modulada por estos ligandos, que pueden ser activadores o inhibidores. Estos sitios reciben el nombre de *sitios alostéricos*. Los ligandos que se unen al sitio alostérico se conocen como

moduladores o *efectores alostéricos*. La unión del modulador alostérico causa un cambio conformacional en la enzima y por lo tanto, la afinidad por el sustrato u otro ligando se ve modificada. Un modulador positivo aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato mientras que, por el contrario, un modulador negativo la disminuye. El sitio donde se une el modulador positivo recibe el nombre de sitio activador, mientras que el modulador negativo se une al sitio inhibidor. Aunque no necesariamente existen ambos sitios en todas las enzimas alostéricas.

Las enzimas alostéricas están conformadas por varias subunidades o monómeros, es decir, son oligoméricas. Cuando un ligando se une a un monómero, puede afectar la unión de ligandos idénticos a éste, en otros monómeros del oligómero. Este efecto del ligando recibe el nombre de *interacción homotrópica*. Una *interacción heterotrópica* es el efecto de un ligando sobre la unión de un ligando diferente. Este es el caso de los activadores e inhibidores alostéricos.

La transmisión de los efectos homotrópicos entre monómeros es uno de los aspectos de la *cooperatividad*, la cual podría explicarse como la influencia que tiene la unión de un ligando a un monómero, sobre la unión de otro ligando a otro monómero. Existen dos tipos de cooperatividad:

Cooperatividad positiva. Cuando la unión de un ligando incrementa la afinidad de la enzima por los ligandos subsiguientes, los cuales pueden ser iguales o diferentes del primer ligando unido.

Cooperatividad negativa. Cuando la unión de un ligando reduce la afinidad de la enzima por los ligandos que le siguen.

Las enzimas alostéricas se dividen en dos clases según el efecto del modulador alostérico sobre la K_m y la V_{max} . En la clase K los moduladores alteran la K_m y no la V_{max} , mientras que en la clase V los moduladores alteran la V_{max} pero no la K_m . También podemos encontrar sistemas mixtos, los cuales se presentan comúnmente en enzimas mutantes (Segel, 1993).

La regulación de las propiedades de unión de una enzima alostérica pueden describirse como un equilibrio entre dos estados conformacionales: un estado de baja o nula afinidad por el sustrato, que ha sido definido como el estado T, y un estado de alta afinidad por el sustrato y el activador, definido como el estado R (Segel, 1993).

La importancia de los cambios conformacionales en estas enzimas radica en el efecto que tienen en la actividad enzimática. La interacción del sustrato con la enzima induce un cambio conformacional en ésta, el cual aísla, parcial o totalmente, al sustrato e intermediarios de reacción del disolvente (Bustos-Jaimes, *et al.*, 2002).

Uno de los paradigmas de la regulación alostérica ha sido la hemoglobina. La hemoglobina es una proteína tetramérica encargada del transporte de oxígeno desde los pulmones, las agallas o la piel de un animal para emplearlo en sus procesos respiratorios. Exhibe ambos efectos, homotrópico y heterotrópico. La unión del oxígeno a la hemoglobina se traduce en un efecto homotrópico positivo, ya que aumenta la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Por otro lado, el bifosfoglicerato (BPG), el CO_2 y los iones H^+ y Cl^- , son moduladores heterotrópicos negativos de la unión del O_2 a la hemoglobina ya que, disminuyen su afinidad por el oxígeno y son químicamente diferentes al oxígeno. El oxígeno, ligando natural de la hemoglobina, se une

cooperativamente a ésta, lo que le permite transportar O_2 a regiones del organismo donde la concentración de este gas es menor, liberándolo de forma eficiente.

Otro ejemplo importante de enzimas que poseen regulación alostérica es la fosfofructocinasa (PFK). Esta enzima es un homotetrámero y su regulación es determinante en el control de la glucólisis.

MODELO CONCERTADO MONOD- WYMAN –CHANGEUX

El comportamiento cinético de las enzimas alostéricas puede ser explicado por el modelo de Monod-Wyman-Changeux (Monod *et al.* 1965), el cual propone que las transiciones alostéricas son concertadas manteniendo siempre la simetría molecular. Este modelo asume la existencia de dos estados conformacionales en equilibrio, los cuales se definen como conformaciones R (relajada) y T (tensa).

El modelo se basa en los siguientes postulados:

- Las proteínas alostéricas son oligómeros de monómeros que están asociados de tal manera que ocupan posiciones equivalentes. Esto implica que la molécula posee al menos un eje de simetría.
- Cada subunidad en la proteína es capaz de existir en dos estados conformacionales denominados *T* (tenso y menos afín al sustrato) y *R* (relajado y más afín al sustrato), aún antes de que se adicione un compuesto capaz de unirse.
- Todas las subunidades del oligómero de proteína están en la misma conformación, ya sea todas en *T* o todas en *R*. Los estados mixtos no se generan debido a que las subunidades en distintos estados (*T* o *R*) tienen interacciones poco favorables. Las

dos formas conformacionales de la proteína están en equilibrio en ausencia de moléculas unidas. Este equilibrio se desplaza hacia la forma R en presencia de un efector positivo o hacia la forma T en presencia de un efector negativo.

- Las constantes de disociación de un efector alostérico para las formas T y R son diferentes, porque son estructuralmente distintas.
- Cuando una proteína alostérica va de un estado al otro, se conserva la simetría molecular.

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

La importancia de este modelo radica en que puede explicar la cooperatividad con sólo dos parámetros físicos: la constante de equilibrio o constante alostérica, L , que representa la relación de los estados T a R en ausencia de cualquier molécula ligable

($L=[T_0] / [R_0]$) y el coeficiente de unión no exclusivo, c , que es la relación de las constantes de disociación de los estados R y T ($c= K_T/K_R$) (Figura 1).

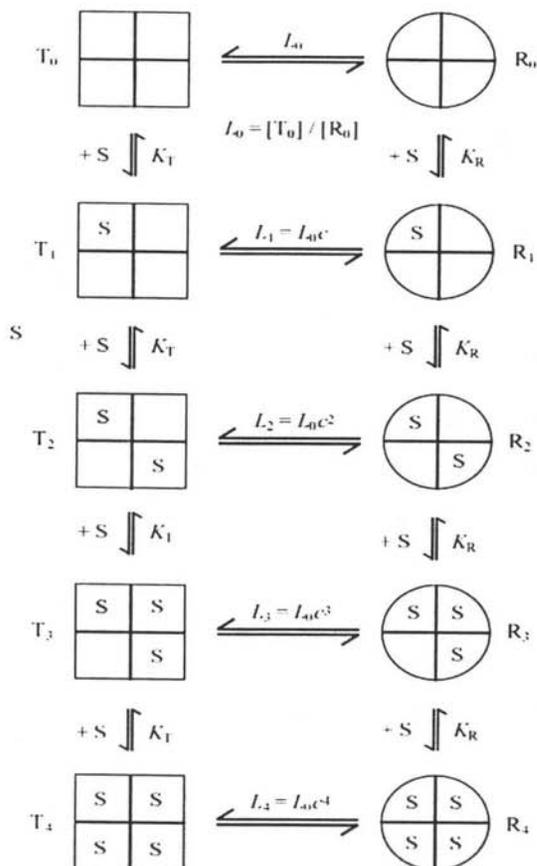


Figura 1 . Representación esquemática de los equilibrios involucrados en el Modelo MWC.

La ecuación general derivada para el modelo de MWC es la siguiente (Segel, 1993):

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

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

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

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

El modelo MWC es esencialmente un modelo de equilibrio y su aplicación a procesos cinéticos es posible asumiendo que la enzima sigue un equilibrio rápido y no

una cinética de estado estacionario ya que, bajo condiciones de estado estacionario, las ecuaciones del modelo alostérico adquieren gran complejidad. Sin embargo, para un sistema unireactante, como lo es la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, las ecuaciones de equilibrio y las de estado estacionario no son diferentes (Dalziel, 1968).

AMINOAZÚCARES

Los aminoazúcares son componentes de la superficie celular de las bacterias y forman parte del esqueleto estructural de péptidoglicano tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, así como también de la capa externa de lipopolisacárido y las cápsulas de bacterias Gram-negativas.

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

patógenos. La rigidez de la estructura de estos carbohidratos, su solubilidad en agua y su gran variedad de configuraciones los hacen ideales para cumplir estas funciones.

Además de su papel estructural y funcional, los aminoazúcares son utilizados por las bacterias como fuente de energía, dado que proveen a la célula tanto de carbono como de nitrógeno. Los aminoazúcares como la D-glucosamina (GlcN) y la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) son utilizados como fuente de carbono por *E. coli*. En particular, la GlcNAc promueve velocidades de crecimiento comparables a las generadas por la glucosa. El crecimiento de *E. coli* en un medio con aminoazúcares como única fuente de carbono, induce la expresión de las enzimas necesarias para el metabolismo de los aminoazúcares, codificadas en el operón divergente *nag* (Figura 2). La expresión del gen *nagE* genera un transportador específico para la GlcNAc del sistema fosfotransferasa (PTS). Los genes *nagB* y *nagA* codifican para dos enzimas, la glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) y la N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa (GlcNAc6P desacetilasa), respectivamente. La expresión de los genes para la desaminasa y la desacetilasa es controlada por una proteína represora codificada por el gen *nagC*. NagC es un regulador transcripcional que controla la expresión de varios genes del sistema PTS en *E. coli*. NagC controla a los tres grupos de genes del regulón *nag*, el operón divergente *nagE-BACD*, el operón *glmUS* y el operón *manXYZ*. Estos tres grupos de genes están implicados en el metabolismo de los aminoazúcares GlcNAc y GlcN.

En ausencia de aminoazúcares en el medio, la glucosamina-6-fosfato sintasa (GlcN6P sintasa) codificada en el gen *glmS*, es responsable de la síntesis *de novo* aminoazúcares en *E. coli* (Figura 3).

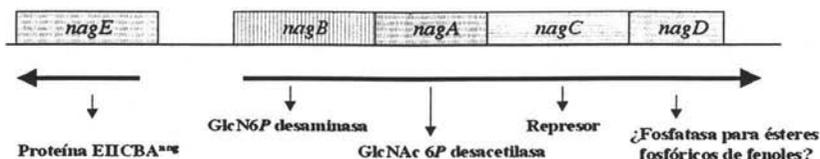


Figura 2. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (Plumbridge, 1992).

El gen *glmM* codifica para la enzima responsable de la conversión de GlcN6P en glucosamina-1-fosfato (GlcN1P) mientras que el gen *glmU* codifica para la enzima responsable de la acetilación de la GlcN1P formando *N*-acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc1P) y posteriormente se sintetiza UDP-GlcNAc, el cuál se utiliza como donador de aminoazúcares en diversas reacciones de transferencia durante la síntesis de peptidoglicanos. La *N*-acetilmanosamina (ManNAc) entra a la célula por acción del transportador *manXYZ* acoplado al sistema PTS, produciendo *N*-acetilmanosamina-6-fosfato (ManNAc6P). El ácido *N*-acetilneurámico (NANA) entra a la célula por un sistema simporte codificado por *nanT*. Dentro de la célula una aldolasa (*N*-acetilneuraminato liasa, *nanA*) rompe el NANA generando ManNAc y piruvato. Las vías de degradación del NANA, ManNAc y GlcNAc convergen a nivel de la GlcNAc6P. La GlcN6P puede ser generada por cuatro diferentes reacciones: 1) transferencia del grupo amida de la glutamina a la Fru6P; 2) reacción reversa de la GlcN6P desaminasa; 3) fosforilación de la glucosamina por una hexocinasa y 4) desacetilación de la GlcNAc6P (Plumbridge y Vimr, 1999; Plumbridge, 1989).

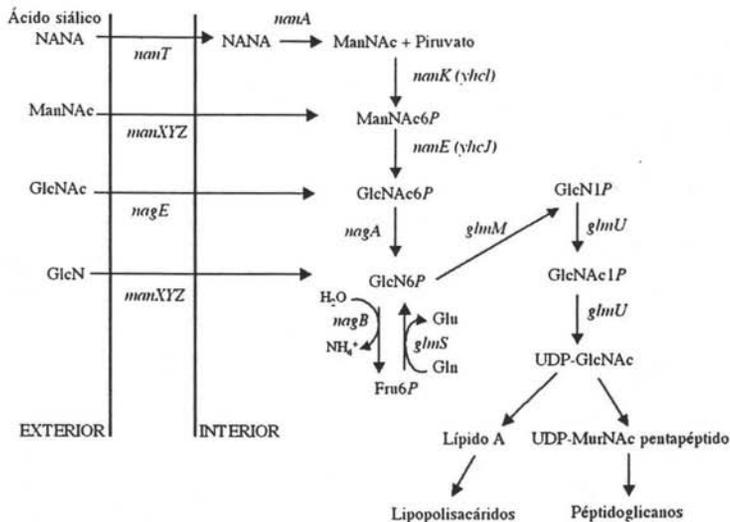


Figura 3. Metabolismo de los aminoazúcares en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) y la vía biosintética (genes *glm*). (Plumbridge y Vimr, 1999; Mengin-Lecreulx y Heijernoort, 1996).

GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa EC 3.5.99.6 antes EC 3.5.1.10) es una enzima alostérica que cataliza la isomerización y posterior desaminación de la glucosamina-6-fosfato generando fructosa-6-fosfato y amonio (Comb y Roseman, 1958; Midelfort y Rose, 1977; Calcagno *et al.*, 1984).

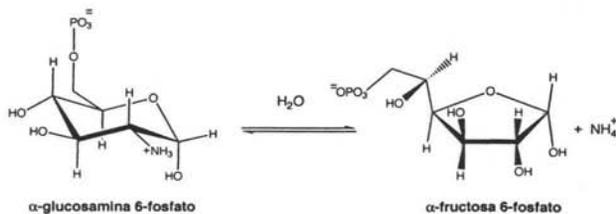


Figura 4. Reacción catalizada por la GlcN6P desaminasa.

La GlcN6P desaminasa es una proteína homohexamérica (Calcagno *et al.*, 1984), su estructura primaria es conocida por la secuencia de nucleótidos del gen *nagB* (Rogers *et al.*, 1988). La secuencia de aminoácidos muestra que cada subunidad está formada por 266 aminoácidos y cuenta con un peso de 29.7 kDa aproximadamente (Figura 5).

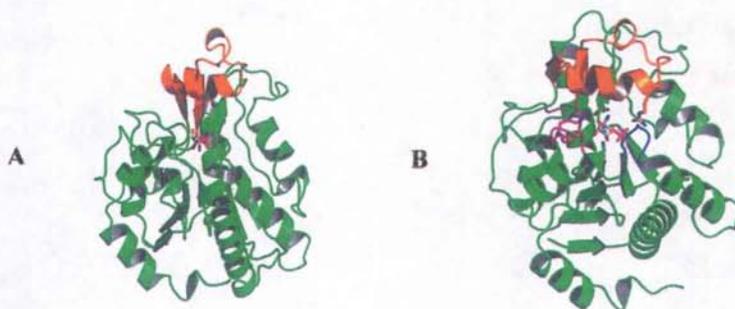


Figura 5. Monómero de GlcN6P desaminasa de *E. coli* en su conformero R. A) vista lateral del monómero; B) vista frontal del monómero. En color naranja se ve la tapa del sitio activo y bajo esta una molécula del inhibidor competitivo glucitolamina-6-fosfato (GlcN-ol-6P).

El arreglo estructural de la GlcN6P desaminasa es de un dímero de trímeros (Figuras 6 y 7) con ejes cristalográfico de orden 3 y 2, y una simetría interna de 32 (Oliva *et al.*, 1995).

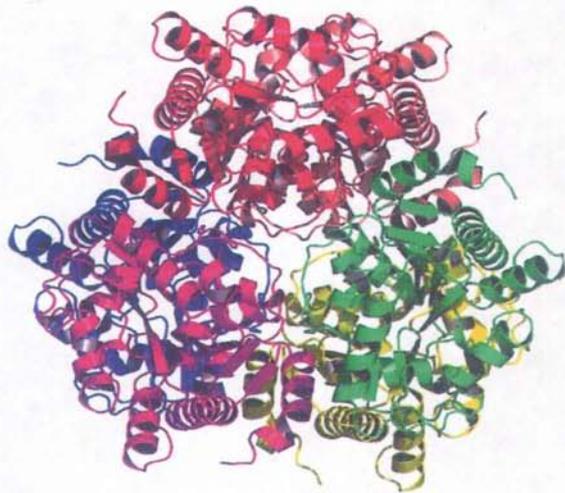


Figura 6. Hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* visto desde el eje de simetría de orden tres.

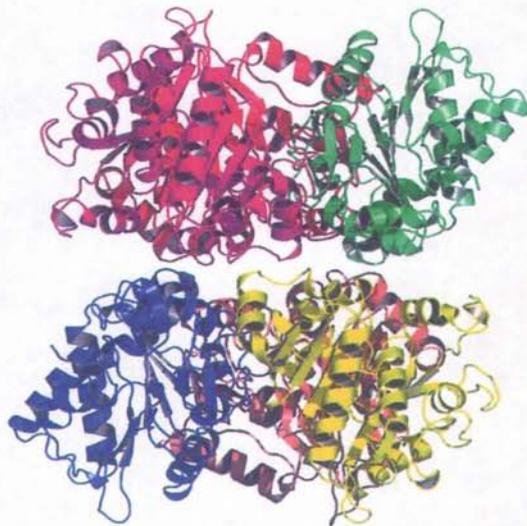


Figura 7. Hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, vista lateral. Arreglo de dímero de trimeros.

La GlcN6P desaminasa ha sido identificada en diferentes especies de animales, protozoarios, hongos y bacterias. Se ha estudiado principalmente en microorganismos como *Candida albicans* (Natarajan y Datta, 1993) y *Escherichia coli* (Altamirano *et al.*, 1991). También se ha encontrado en tejidos de insectos (Benson *et al.*, 1970; Enhofer *et al.*, 1980) y mamíferos (Leloir y Cardini, 1956) y se ha purificado de la corteza de riñón de perro (Lara-Lemus *et al.*, 1992), bovino (Lara-Lemus, 2002) así como de espermatozoides de *Metacricetus auratus* (Parrington, *et al.*, 1996). La desaminasa en mamíferos está presente en concentraciones considerables en espermatozoides maduros.

Las GlcN6P desaminasas humana y de hámster poseen 289 residuos de aminoácidos y sus secuencias son homólogas en los primeros 258 residuos con la desaminasa de *E. coli*. Este segmento posee un plegamiento similar y todos los grupos importantes para llevar a cabo la catálisis y los contactos entre subunidades en la enzima bacteriana.

La glucosamina-6-fosfato desaminasa pertenece a la clase (2-R) aldo-cetosa isomerasas. Presenta en *E. coli* (cepa ATCC11303) un punto isoeléctrico de 6.0-6.1, una constante de sedimentación de 9.0 S, una k_{cat} por subunidad en el sentido de formación de Fru6P y amonio de 158 s^{-1} y de 76 s^{-1} en el sentido inverso. La regulación alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* es el resultado de modificaciones en la afinidad de la enzima por el sustrato sin presentar cambios en su k_{cat} . Este tipo de comportamiento cinético define a un sistema *K* puro (Monod *et al.* 1965). La presencia del activador es suficiente para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato y a su vez, el sustrato modifica la afinidad de la enzima por el activador (Monod *et al.*, 1965).

La GlcN6P desaminasa es activada alostéricamente por la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P), la cual es un efector muy importante en el metabolismo de los amino-azúcares. La GlcNAc6P se une al sitio alostérico de la enzima incrementando la afinidad aparente de ésta por el sustrato lo que provoca una pérdida de la cooperatividad homotrópica. A concentraciones saturantes de activador la GlcN6P desaminasa describe una cinética hiperbólica.

La estructura de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* puede dividirse en una zona interna y otra externa. La zona interna es la responsable de la mayoría de los contactos entre monómeros del hexámero y se encuentra constituida por tres segmentos: un motivo hélice-asa-hélice (residuos 207-233) que mantiene unido al hexámero en el eje de orden tres, un asa que estabiliza los contactos entre monómeros en el eje de orden dos (residuos 244-253) y un giro que se encuentra unido a este fragmento (residuos 137-143) mediante un puente de hidrógeno. La zona externa, la cual representa gran parte de cada monómero, se encuentra formada por los residuos restantes, a excepción del asa formada por los residuos 144-154 y los residuos que se encuentran altamente desordenados cuando la enzima se encuentra en su forma T. El asa constituida por los residuos 144-154 constituye el contacto más directo entre el sitio activo y el sitio alostérico, y posee los residuos responsables de la unión del activador y la catálisis. Este segmento es uno de los pocos de la cadena principal que se encuentran altamente ordenados en ambos conformeros. No obstante, esta región presenta una deformación no rígida durante la transición alostérica (Horjales *et al.*,1999).

TRANSICIÓN ALOSTÉRICA

Como se mencionó anteriormente, la regulación en las propiedades de unión de una proteína alostérica puede describirse como un equilibrio entre dos estados conformacionales diferentes: un estado T y un estado R. En la transición de un estado a otro participan cambios conformacionales a nivel de la estructura cuaternaria, que promueven modificaciones locales en la estructura terciaria de la unidad monomérica y alteran las propiedades de unión de ligandos (Altamirano *et al.*, 1991).

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

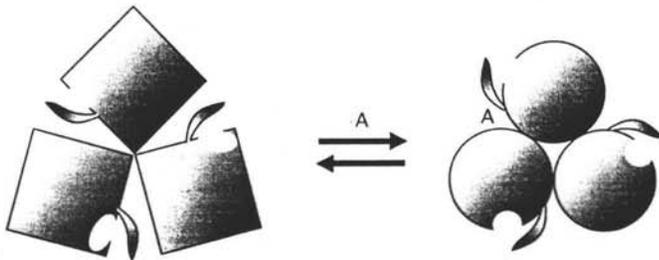


Figura 8. Esquema de la transición alostérica generada por la unión de una molécula de activador.

La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa involucra un rearrreglo de la estructura cuaternaria que ha sido descrito como la rotación en bloque de dos regiones de cada subunidad, sobre un eje paralelo al eje de orden 3 del hexámero.

SITIO ALOSTÉRICO

La glucosamina-6-fosfato desaminasa posee seis sitios alostéricos, los cuales se localizan en las interfases de los monómeros que conforman cada trímero. De este modo, los sitios de unión del activador alostérico (GlcNAc6P) se encuentran formados por dos monómeros vecinos. Este hecho hace notar que se establecen contactos importantes entre subunidades al unirse este ligando. Se dice que el activador se une exclusivamente a la forma R de la enzima, ya que la enzima se transforma inmediatamente a este estado conformacional al unir el activador. El nitrógeno de la cadena principal del residuo Ser152 y las cargas positivas de los residuos Arg158 y Lys160 de un monómero, junto con el grupo amino terminal de la subunidad vecina, unen al fosfato del activador en la forma R. Por el contrario, en la forma T el grupo amino terminal se encuentra a 10 Å de los grupos cargados de los residuos Arg158 y Lys160 y en su lugar se encuentra unido mediante un puente de hidrógeno al oxígeno del grupo carbonilo del residuo Ala150 del monómero vecino (Horjales, *et al.*, 1999). La cadena que contiene a los residuos Arg158 y Lys160, también contiene al residuo Thr161 el cual se une al átomo de oxígeno de la acetoamida del activador alostérico, GlcNAc6P (Oliva, *et al.*, 1995). Otro contacto importante entre monómeros que se presenta en esta región involucra al residuo Tyr254. El grupo hidroxilo de la cadena lateral de Tyr254 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de la Thr161 en el conformero R, mientras que en T hace el mismo

tipo de interacción pero con la Pro149, por lo tanto la Tyr254 funciona como un interruptor de dos posiciones correspondientes a cada estado alostérico (Montero-Morán *et al.*, 1998).

La interfase entre monómeros del sitio alostérico es más grande en el conformero T que en el conformero R, y en esta región de la proteína se presentan una gran cantidad de cargas positivas, las cuales se neutralizan parcialmente con la unión del activador o de fosfato inorgánico. La repulsión electrostática generada por la presencia de cargas positivas es en parte responsable de favorecer la conformación abierta del sitio alostérico en el estado T (Figura 9).

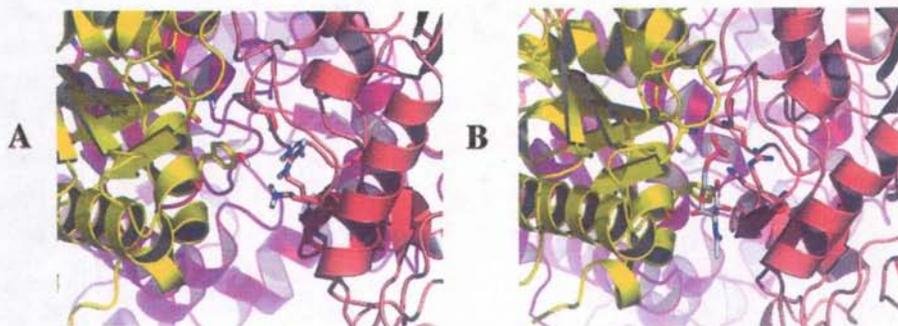


Figura 9. Sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa. A) sitio alostérico vacío; B) sitio alostérico ocupado por GlcNAc6P.

SITIO ACTIVO

El sitio activo de la glucosamina-6-fosfato desaminasa se encuentra formado por dos asas situadas en el extremo C-terminal de las cadenas B y E (Figura 10). Posee una tapa compleja formada por dos hebras b antiparalelas conectadas por el motivo hélice-asa (residuos 158-187). El segmento (164-182) de este motivo se encuentra conectado al resto de la estructura mediante hebras b a el C y al N terminal del motivo hélice-asa. Estas dos hebras son parte de una pequeña hoja b de tres hebras que contiene el residuo Asp72, el cual es la base general que cataliza la enolización del sustrato mediante la sustracción de un protón (Oliva *et al.*, 1995; Montero-Morán *et al.*, 2001). En el segmento helicoidal (167-174) posee al residuo Arg172 el cual es uno de los residuos cargados positivamente que unen al grupo fosfato de la glucosamina-6-fosfato y al inhibidor competitivo glucitolamina-6-fosfato, GlcN-ol-6P (Figura 11). La transición alostérica promueve diferentes cambios en la estructura terciaria principalmente en el asa 136-158 (Horjales *et al.*, 1999), la cual contiene a los residuos catalíticos. Éstos incluyen la triada Asp141, His143 y Glu148 que participan en la catálisis de la apertura del anillo de la piranosa. Por el contrario, la tapa del sitio activo no sufre ningún cambio geométrico asociado a la transición alostérica.

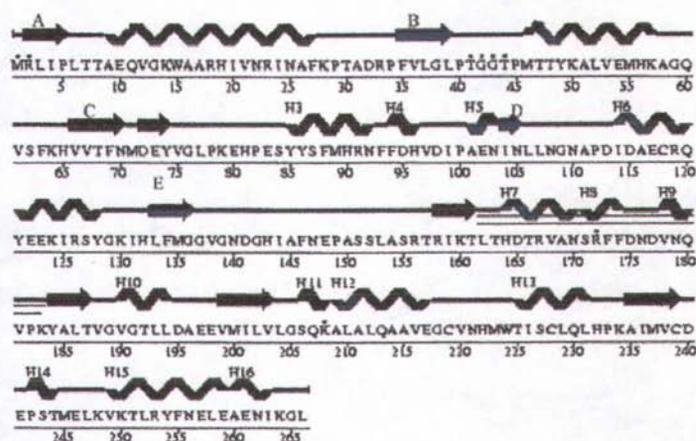


Figura 10. Mapa de la estructura secundaria de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. El motivo correspondiente a la tapa del sitio activo se muestra subrayado. Los asteriscos señalan aquellos residuos que interactúan con el sustrato.

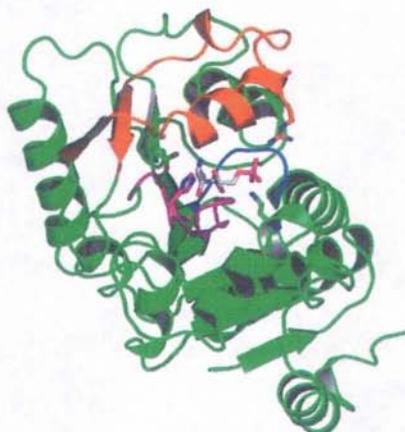


Figura 11. Sitio activo de la GlcN6P desaminasa ocupado por el inhibidor competitivo GlcN-ol-6P. En anaranjado se muestra la tapa del sitio activo.

MECANISMO

El mecanismo catalítico de la GlcN6P desaminasa fue originalmente propuesto por Midelfort y Rose (1977) el cual se basa en el mecanismo general de las isomerasas cetoaldólicas (Rose, 1975). Con base a la estructura del complejo formado por enzima-inhibidor competitivo (GlcN-ol-6P) se propuso un mecanismo catalítico para esta enzima (Oliva *et al.*, 1995), el cual ha sido completado con datos cinéticos con los que se pone en evidencia la relevancia de los residuos del sitio catalítico, His143 y Glu148 en la apertura del anillo del sustrato, glucosamina- 6-fosfato (Montero-Morán *et al.*, 2001).

Este mecanismo (Figura 12) comienza con la apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P por el residuo His143. En este punto, el carboxilato del residuo de Asp72 sustrae el protón del C2 y, de manera concertada, se lleva a cabo la enolización entre C1 y C2 (formación del *cis*-enol-amino).

Posteriormente, este intermediario se convierte en el correspondiente enol-amonio cuando el protón regresa al aminoazúcar en la posición O1. Se han propuesto dos explicaciones sobre cómo puede darse la siguiente etapa. Una de ellas propone que un protón del grupo amino puede ser tomado de nuevo por Asp72 formándose una *cis*-enol-amina (2-amino-2desoxi-D-*arabino*-hex-2-enitol-6-fosfato), la que posteriormente toma el protón de Asp72 en la posición C1 pro-R que al arreglarse forma la fructosimina-6-fosfato (2-desoxi-2-imino-D-*arabino*-hexitol-6-fosfato). El grupo imino reacciona entonces con una molécula de agua produciendo un carbinol-amonio, un intermediario inestable. La otra forma de llegar a este intermediario es si el enlace π entre C1 y C2 del intermediario *cis*-enol-amonio es atacado por una molécula de agua en la cara *re* del intermediario.

La estructura del intermediario *cis*-enol-amonio es muy similar a la del inhibidor competitivo. Este intermediario se descompone en Fru6P y NH₃. Se ha demostrado que el sustrato para la enzima es el ion amonio, de forma que el amoniaco formado en esta etapa debe tomar un protón. Lo más factible, es que lo tome del carboxilo del Asp72 para liberarse como ion amonio (Oliva *et al.*, 1995).

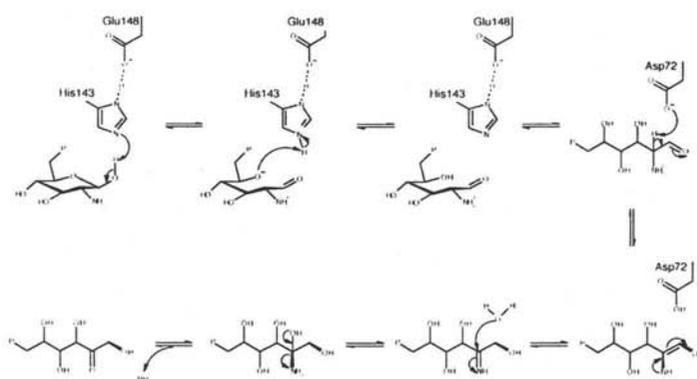


Figura 12. Mecanismo de reacción propuesto para la GlcN6P desaminasa. (Modificado de Montero-Morán *et al.*, 2001).

FLUORESCENCIA

Existen diferentes compuestos químicos que son fotoluminiscentes, los cuales pueden ser excitados por radiación electromagnética y como consecuencia emitir radiación de mayor longitud de onda. Dos de las emisiones más comunes son la fluorescencia y la fosforescencia. La fluorescencia es mucho más importante desde el punto de vista analítico ya que es una poderosa técnica para estudiar interacciones moleculares y aspectos de biología celular, neurología y bioquímica entre otras ramas ya que tiene una gran sensibilidad que permite trabajar con concentraciones nanomolares.

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

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

Todas las moléculas poseen una serie de niveles de energía cercanos entre sí que pueden llegar a niveles de mayor energía después de ser excitadas. Durante este proceso un electrón es promovido a un nivel electrónico energéticamente superior. Las moléculas que pueden alcanzar estos niveles de energía excitados son aquellas en las que se presenta el fenómeno de luminiscencia. Los diferentes estados electrónicos moleculares presentan subniveles que reciben el nombre de estados vibracionales. El primero de estos estados

del primer nivel energético en la molécula corresponde a lo que se conoce como el estado basal (Sauceda, 2003).

Los diferentes estados vibracionales presentan diferencias entre sí considerablemente menores a los estados electrónicos. Se puede acceder a los estados vibracionales mediante procesos menos energéticos que la excitación por fotones. Para la emisión de fluorescencia, es necesario excitar a la molécula con una radiación de cierta longitud de onda para que el último electrón pase de su estado basal a un estado singlete. Una vez excitada la molécula, ésta regresa a su estado basal realizando una serie de pasos. La molécula puede llevar a cabo un movimiento vibracional, lo cuál implica una pérdida de energía. Dicho movimiento depende de las colisiones entre las moléculas de la especie excitada y el tipo de disolvente. También se puede perder energía emitiendo un fotón de una energía menor a aquella con la que se excitó la molécula.

La espectroscopía de fluorescencia se emplea ampliamente en el estudio de péptidos y proteínas. Los aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina y fenilalanina, son usados como sondas de fluorescencia intrínseca acerca de la conformación, dinámica e interacciones intermoleculares de las proteínas. De los tres, el triptofano es la sonda más popular. La fluorescencia del fluoróforo indol es muy sensible al ambiente que lo rodea, esto lo hace una elección ideal para monitorear los cambios conformacionales que ocurren en la proteína así como, sus interacciones con otras moléculas (Chen y Barkley, 1998).

Tipos de fluorescencia

Se presentan tres tipos de fluorescencia:

1. **Fluorescencia de resonancia:** consiste en la emisión de fotones de igual energía que los fotones de excitación. Nunca ocurre en solución debido a las interacciones con el disolvente, pero es común en cristales y en gases.
2. **Fluorescencia de Stokes:** ocurre cuando los fotones emitidos son menos energéticos que los utilizados para excitación, es decir, la radiación de emisión presenta una longitud de onda superior a la radiación de excitación. Este tipo de fluorescencia ocurre principalmente en medios líquidos.
3. **Fluorescencia anti-Stokes:** ocurre si la radiación emitida es más energética que la de excitación. Ocurre al añadir energía térmica al sistema y es frecuente en gases diluidos a altas temperaturas.

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

Fluorómetro

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

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

Interferencias

La intensidad de fluorescencia de una muestra puede verse afectada por los siguientes factores:

- *Viscosidad.* La fluorescencia de un compuesto es mayor en medios más viscosos. En éstos, la energía de transferencia en una solución (procesos no fluorescentes) decrecen por una reducción en los procesos de colisión.
- *Apagamiento (“quenching”).* Este es un proceso en el cual existe una competencia entre la emisión de radiación fluorescente y la formación de una especie no fluorescente a partir del fluoróforo y otra sustancia presente en el medio. Este fenómeno puede ser utilizado intencionalmente, para hacer evidente la interacción del fluoróforo con otra especie, o bien puede ser una interferencia no deseada en la medición.
- *Descomposición fotoquímica.* La luz ultravioleta incidente en la muestra puede causar cambios fotoquímicos o la destrucción del compuesto fluorescente, provocando un decaimiento gradual en la intensidad de fluorescencia. Para evitar esta situación es necesario utilizar la mayor longitud de onda posible en la excitación del compuesto y exponer lo menos posible la muestra a la radiación incidente y a la luz UV del ambiente (Lakowicz, 1999).

OBJETIVOS

Generales

- Estudiar la propagación de la transición alostérica a través del eje de orden 2 de la GlcN6P desaminasa.

Particulares

- Diseñar cebadores para la mutagénesis dirigida.
- Construir una mutante sitio-específica Val249Trp sobre un gen mutante *nagB* que tiene las mutaciones Trp15Tyr:Trp224Tyr.
- Expresar y purificar la mutante Trp15Tyr:Trp224Tyr:Val249Trp.
- Caracterizar cinéticamente la mutante obtenida para validarla como modelo de la enzima silvestre.
- Caracterizar los cambios de fluorescencia debidos a la transición alostérica de la enzima.

METODOLOGÍA Y MATERIAL

Reactivos

La mayoría de las sustancias químicas fueron compradas en Sigma-Aldrich S.A de C.V., México. El activador alostérico, GlcNAc6P, fue preparado por acetilación de la GlcN6P con anhídrido acético y se purificó por cromatografía de intercambio iónico como lo describen Rogers *et al.* (1988). El inhibidor competitivo 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-fosfato, GlcN-ol-6P, fue sintetizado por reducción de GlcN6P con borohidruro de sodio y se purificó por cromatografía de intercambio iónico como ha sido descrito anteriormente Rogers *et al.* (1988).

Plásmidos y mutagénesis

Se empleó el *kit* Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA. E.U.A), partiendo del vector pTZ18R con un inserto de DNA conteniendo una copia del gen *nagB* con 2 mutaciones previas para cambiar los residuos de triptofano naturales (Trp15 y Trp224) por tirosinas. A este plásmido se le denominó pTZ18R*nagBW*-. Con este plásmido se realizó una mutagénesis sitio-específica por PCR empleando oligonucleótidos sintéticos de acuerdo al método de Kunkel descrito por Sambrook *et al.* (1989). Los oligonucleótidos usados para cambiar el codón de Val249 por uno correspondiente a Trp (AAA-TGG) fueron:

F249W 5'-GAGCTGAAATGGAAGACTTTAAGATATT-3' T_m 63,6 C, $\Delta G^{\circ}_{FH} = -5.3$ kcal/mol

R249W 5'-AGTCTTCCATTTTCAGCTCCATGG-3' T_m 67,3 C, $\Delta G^{\circ}_{FH} = -6.5$ kcal/mol

El valor de ΔG°_{FH} corresponde a la energía libre de formación de heterodúplex (Rychlik, 1993) en el extremo 3'OH del oligonucleótido, con lo que garantizamos la generación del producto de PCR.

La mutagénesis se llevó a cabo usando la enzima *Pfu* polimerasa y desoxinucleotidos trifosfato. El programa de termociclado usado se describe a continuación:

Paso	Temp(°C) / tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 / 2 min	1
Desnaturalización	94 / 1 min	25
Hibridación	50 / 1 min	
Polimerización	68 / 10 min	
Extensión final	68 / 15 min	1

Para la digestión del plásmido pTZ18R*nag*BW-, que fue usado como punto de inicio para la mutagénesis, se utilizó la enzima *Dpn*I, que hidroliza el ADN metilado. El producto de la PCR se usó para transformar células competentes de *E. coli* epicurian XL-blue, siguiendo instrucciones del fabricante. Posteriormente se sembraron las células transformadas, seleccionando aquellas capaces de crecer en el medio de cultivo adicionado de 50 mg mL⁻¹ de ampicilina. A las colonias seleccionadas se les hizo una purificación de plásmidos, los cuales se secuenciaron para corroborar la presencia de la mutación deseada. A este plásmido se le denominó en lo sucesivo pTZ18R*nag*B249W.

Transformación

El vector que lleva el gen de la enzima mutante se utilizó para la transformación de una cepa de *E. coli* IBPC590, la cual es Δnag y $\Delta lacI$. Esta cepa no expresa la glucosamina-6-fosfato desaminasa silvestre, mientras que la mutante se expresa de manera constitutiva al estar bajo el control del promotor *lac*. El plásmido pTZ18R*nag*B249W se usó para transformar células competentes de *E. coli* IBPC590 por electroporación utilizando el electroporador *gene pulser II* (BIORAD). Las células se sometieron a un solo pulso de 4 mseg a 2.5 KV, con una capacitancia de 25 μ F y una resistencia 200 W. Estas condiciones generan un campo eléctrico de 12.5 KVcm⁻¹. Para permitir la expresión del gen de resistencia se incubó durante 1 hora a 37°C en medio SOC a 250 rpm y posteriormente se sembró en placas de agar LB (Luria Bertrani) adicionado con ampicilina a una concentración final de 50 mg mL⁻¹.

Expresión de las enzimas mutantes en E. coli

Células de *E. coli* IBPC590 transformadas se inocularon en tubos de 10 mL con caldo LB con ampicilina 50 mg mL⁻¹ y se incubó a 37°C en un agitador orbital a 200 rpm durante 12 h. Posteriormente se utilizó este cultivo para inocular matraces Erlen-Meyer de 250 mL con 100 mL del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones durante 3 h. Este cultivo se empleó como inóculo de matraces Erlen-Meyer de 2 L conteniendo 1 L del mismo medio y se cultivó a 30°C durante 6 h a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 1.

Purificación de mutantes de glucosamina-6-fosfato desaminasa

Las células se centrifugaron a 25,000 g durante 10 min a 4°C y se lavaron con 250 mL de KCl 0.15 M frío y se centrifugaron en las mismas condiciones. Las células lavadas se resuspendieron en un amortiguador de Tris 50 mM, pH 8, EDTA 10 mM a 4°C y se rompieron por sonicación (sonicador marca Cole Parmer) a 4°C, llevando acabo 20 pulsos de 20 s con una amplitud de 40 %. Este procedimiento se realizó dejando reposar las células durante 30 s entre cada pulso para evitar un aumento en la temperatura y la generación de burbujas ya que, esto implicaría la desnaturalización de proteínas. Se centrifugó a 27,000 g para remover restos celulares y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta obtener una saturación de 40%, nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones y se adicionó sulfato de amonio al sobrenadante hasta un 55% de saturación para precipitar a la enzima de nuestro interés y posteriormente purificarla.

La purificación se llevó acabo por cromatografía de afinidad, es decir se hizo pasar el sobrenadante a través de una columna, que tiene moléculas de GlcN6P unidas a agarosa-ácido 6-amino-*n*-decanoico por el grupo amino, de manera que se asemejan al activador alostérico. La proteína deseada se une al ligando inmovilizado mientras que las otras proteínas son eliminadas de la columna. La proteína deseada puede recuperarse, en forma pura, variando las condiciones de elución de modo que se libere la proteína de la matriz cromatográfica. La GlcN6P desaminasa mutante fue eluida con GlcNAc6P a una concentración 10 mM. A continuación la enzima se dializó contra 100 volúmenes de amortiguador de Tris 50 mM (pH 7.5) a 4 °C durante 4 horas.

Cuantificación de enzima

La concentración de esta enzima mutante se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) el cual permite una detección colorimétrica y la cuantificación de proteína total. Este método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por la proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad y selectividad de detección colorimétrica del catión cuproso usando ácido bicinconínico. El complejo generado debido a la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso, es de coloración morada y presenta una máxima absorción a 562 nm la cual es proporcional a la concentración de proteína (Smith *et al.*, 1985).

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de actividad de la enzima se realizó con dirección a la formación de Fru6P en una mezcla de reacción de 200 μL que contiene Tris-HCl (pH 7.7) 100 mM, EDTA 25 mM, concentraciones variables de activador (GlcNAc6P) y una concentración variable de sustrato (GlcN6P). La reacción se inició con la adición enzima cada 10 s y la mezcla de reacción se incubó a 30 °C. La reacción se interrumpió a los 10 minutos mediante la adición de 2 mL de HCl 10 M. La concentración de Fru6P fue determinada por el método de resorcinol como lo describe Davis y Gander (1967), realizando la lectura espectrofotométrica a 512 nm.

Los ensayos se llevaron acabo cuidando siempre que se convirtiera menos del 5% del sustrato inicial para que se cumplieran los criterios de velocidad inicial y empleando una concentración de enzima de 5 nM.

La velocidad inicial se calculó bajo ciertas condiciones de reacción: en ausencia de activador y con diversos intervalos de concentraciones de activador: 0.005, 0.05-0.075, 0.15-0.75 y 1-5 mM.

Ajuste de la cinética

Los datos cinéticos se analizaron por regresión no lineal empleando el programa Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). Todos los datos se ajustaron a la ecuación de Hill y a la ecuación del modelo de Monod.

La ecuación de Hill permite calcular la V_{\max} en condiciones de cooperatividad, y de la ecuación del modelo de Monod podemos obtener los valores de c , L , y K_m del estado R. Para reducir la parametrización de la ecuación de Monod, en los ajustes con diferentes concentraciones de activador, se sustituyeron en ésta los valores de V_{\max} , K_m y c . El valor de V_{\max} se obtiene de cada uno de los ajustes a la ecuación de Hill realizados para cada concentración de activador, el valor de K_m para el estado R se obtiene del ajuste a la ecuación de Monod realizado para la concentración de activador saturante y c del ajuste a la ecuación de Monod para la enzima sin activador.

Fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro ISS (Champaign, IL) PC-1. La concentración de enzima que se empleó fue de 1mM en buffer Tris-HCl 50mM (pH 7.5) y EDTA 10 mM. Se realizaron cuatro experimentos. Primero se tituló la enzima con activador, una vez saturada la enzima con activador se tituló con

inhibidor competitivo. Posteriormente la enzima se tituló con inhibidor competitivo y saturada la enzima se adicionaron diferentes concentraciones de activador alostérico.

Se empleó una excitación a 290 nm y el espectro de emisión se recolectó en un intervalo de 300-400 nm, empleando tres integraciones por lectura. La fluorescencia de los centros espectrales de masa (CEM) se calcularon con los datos de intensidad de fluorescencia (IF) a diferentes longitudes de onda (λ) con la siguiente ecuación:

$$CEM = \frac{\sum_j (\lambda IF_\lambda)}{\sum_i (IF_\lambda)}$$

Los cambios de CEM (ΔCEM) se ajustaron a la siguiente expresión de la ecuación de Hill:

$$\Delta CEM = \frac{\Delta CEM_{\text{lim}} [S]^h}{S_{0.5}^h + [S]^h}$$

RESULTADOS

Mutagénesis

Se obtuvo un producto de PCR correspondiente al peso molecular del plásmido pTZ18*RnagBW*- (Figura 13). El producto de PCR se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* Epicurian Coli XL2-Blue.

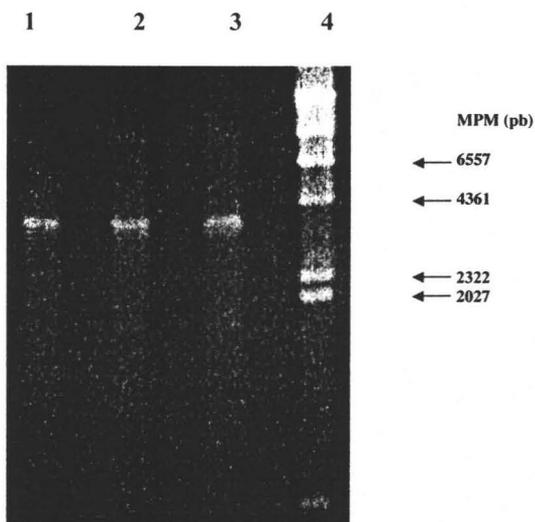


Figura 13. Producto de PCR del plásmido pTZ18*RnagBW*- con los cebadores F249W y R249W. Carril 1,2 y 3, 1, 2 y 3 mL de mezcla de PCR; carril 4, marcador de peso molecular (I-*Hind*III).

Se seleccionaron 2 colonias y se purificaron sus plásmidos y el gen *nagB* contenido en éstos se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. De las dos muestras que se mandaron a secuenciar, se comprobó que la mutación sólo se presentó en uno de los plásmidos, al que en adelante denominaremos pTZ18*RnagB*249W, y éste se utilizó para transformar células

competentes de *E. coli* IBPC590. Esta última cepa es Δnag , por lo cual no expresa, bajo ninguna condición, la GlcN6P desaminasa silvestre.

De la transformación de células competentes de *E. coli* IBPC590 se seleccionaron 3 colonias para la producción de la enzima mutante en base a que las células transformadas poseen la capacidad de crecer en un medio con ampicilina, dicha capacidad es conferida por el plásmido (β -lactamasa). De esta manera sólo tenemos crecimiento de células transformadas.

Las células transformantes se cultivaron como se describe en *Metodología y material*. La enzima se obtuvo después de haber concentrado las células por centrifugación, para posteriormente ser rotas por sonicado. Las células rotas se centrifugaron para eliminar los restos celulares y posteriormente el sobrenadante se fraccionó con $(NH_4)_2SO_4$, primero a una saturación de 40% (saturación a la cual precipitan las proteínas que no son la GlcN6P desaminasa), y posteriormente a una saturación de 55% (saturación a la cual precipita la enzima de interés). La fracción precipitada a 55% de $(NH_4)_2SO_4$ se resuspendió en amortiguador de Tris 50 mM, pH 7.5. Esta disolución se cargó en la columna de afinidad y se eluyó como se describió anteriormente. La enzima obtenida por este método se comporta como una especie electroforéticamente pura (Figura 14).

La concentración de enzima total purificada fue de 6.005 mM. La absorptividad molar que se calculó para la enzima fue de $e = 144046.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A esta enzima con tres mutaciones, Trp15Tyr:Trp224Tyr:Val249Trp, por comodidad le denominamos en lo sucesivo sólo 249Trp.

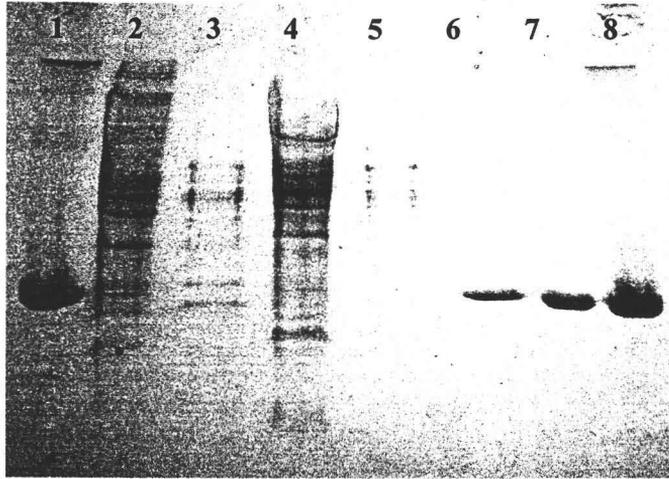


Figura 14. SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación de la mutante 249Trp. Carriles 1 y 8, enzima silvestre; carriles 2 y 3, primer precipitado con sulfato de amonio y sobrenadante; carriles 4 y 5, segundo precipitado con sulfato de amonio y sobrenadante; carriles 6 y 7 fracciones obtenidas después de pasar el extracto a través de la columna de afinidad.

Caracterización cinética

La enzima mutante 249Trp fue caracterizada cinéticamente para validarla como modelo de estudio de la enzima silvestre. El estudio cinético involucró dos partes. Una parte se enfocó a la caracterización cinética de la mutante en ausencia de activador alostérico con el fin de evaluar su comportamiento cooperativo, y en segundo lugar se estudió el efecto del activador alostérico a diferentes concentraciones. Los datos cinéticos obtenidos y ajustados a la ecuación de Hill en ambos casos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación de Hill.

Concentración de activador (mM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M s}^{-1}$)	k_{cat} ($\text{sitio}^{-1} \text{s}^{-1}$)	h	$S_{0,5}$ o K_m^a (mM)
0.0	0.632±0.007	21.066±0.002	3.253±0.072	1.563±0.015
0.005	0.541±0.033	18.033±1.080	2.241±0.211	1.389±0.104
0.05	0.614±0.014	21.600±1.512	1.299±0.052	0.687±0.033
0.075	0.615±0.027	20.500±0.820	1.213±0.077	0.675±0.065
0.15	0.516±0.020	17.267±0.690	1.208±0.072	0.559±0.047
0.5	0.507±0.021	16.900±0.676	1.200±0.078	0.456±0.043
0.75	0.557±0.042	18.567±0.742	1.139±0.120	0.649±0.110
1.0	0.636±0.046	21.200±1.484	1.017±0.124	0.476±0.092
2.0	0.622±0.027	20.733±0.829	1.069±0.068	0.617±0.067
5.0	0.603±0.054	20.100±1.60	1.197±0.150	0.628±0.126

a) en presencia de una concentración saturante de activador.

En ausencia del activador alostérico, la enzima mutante 249Trp, al igual que la silvestre, presenta una evidente cooperatividad homotrópica (Figura 15), que vista a través del coeficiente de Hill (h) es de 3.25 mientras que para la enzima silvestre es de 2.9, demostrando que la cooperatividad en ambas enzimas presenta intensidades similares. Por otra parte, el valor de $V_{\text{máx}}$ de $0.632 \mu\text{M s}^{-1}$, en ausencia de activador, y de $0.603 \mu\text{M s}^{-1}$, a concentración saturante de éste, no son significativamente distintos. En contraste, los valores de $S_{0,5}$ y K_m muestran una gran diferencia. Esto permite decir que la enzima mutante es esencialmente un sistema alostérico tipo K , en el cual la afinidad aparente de la enzima hacia el sustrato se modifica por la presencia del activador alostérico, sin alterar su velocidad máxima.

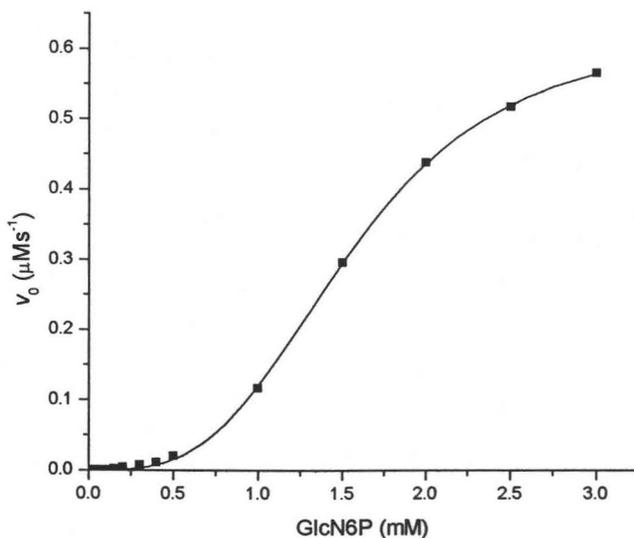


Figura 15. Patrón de velocidad inicial contra concentración de sustrato de la mutante 249Trp en ausencia del activador alostérico, GlcNAc6P. Datos ajustados a la ecuación de Hill.

Tabla 2. Datos cinéticos comparativos de la enzima silvestre y la enzima mutante 249Trp.

Enzima	Sin GlcNAc6P			Con GlcNAc6P	
	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	$S_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mM)
Silvestre	158±8	5.5±0.2	2.9±0.1	158±8	0.55±0.05
249Trp	21.060±0.002	1.563±0.015	3.253±0.072	20.100±0.150	0.628±0.126

La diferencia entre los valores de $S_{0.5}$ de 1.6 y 5.5 mM, para las enzimas mutante y silvestre respectivamente, sugiere que el estado T en la forma mutante se encuentra poco favorecido, provocando que la afinidad aparente por el sustrato se incremente. Por otra parte, la poca diferencia entre los valores de K_m de las enzimas mutante y silvestre indica que, al menos en la forma R, son semejantes. Sin embargo, el análisis de sus propiedades catalíticas demuestra que la mutante 249Trp es menos activa que la enzima silvestre. En conjunto, estos resultados indican que la mutación Val249Trp alteró la conformación estructural de la enzima de tal forma que aquellos residuos responsables de la unión del sustrato quedaron conformacionalmente favorecidos para la unión del sustrato, reduciendo así el valor de $S_{0.5}$. Por otra parte, esta nueva conformación del sitio activo afecta la catálisis de forma negativa, reduciendo la k_{cat} 7.5 veces.

Este análisis preliminar de los datos cinéticos de la mutante 249Trp demuestra que la mutación en esa posición modifica las propiedades catalíticas y de unión de la enzima. Esto a su vez sugiere que la interfase en que se encuentra el residuo Val249, participa activamente en la comunicación interoligomérica en la GlcN6P desaminasa.

El patrón de activación de la mutante 249Trp (Figura 16) muestra que a concentraciones mayores de 0.005 mM de activador alostérico la cooperatividad se pierde, originando un comportamiento hiperbólico que en las cinéticas se refleja en los valores del coeficiente de Hill (h) los cuales, después de esta concentración de activador alostérico, tienden a la unidad. La Figura 16 muestra un ligero efecto inhibitorio por parte del activador alostérico, que se observa como la intersección de las curvas en ausencia de activador y las curvas en presencia de éste. Interpretamos este efecto como una consecuencia del ajuste inducido del activador alostérico unido a su sitio. Esta unión lleva

a la enzima a su conformación estructural R que, sin embargo, debe ser ligeramente distinta de la forma R formada exclusivamente por la unión del sustrato al sitio activo. Este efecto se ha observado en otras mutantes estudiadas en nuestro grupo (Bustos-Jaimes, *et al.*, 2005).

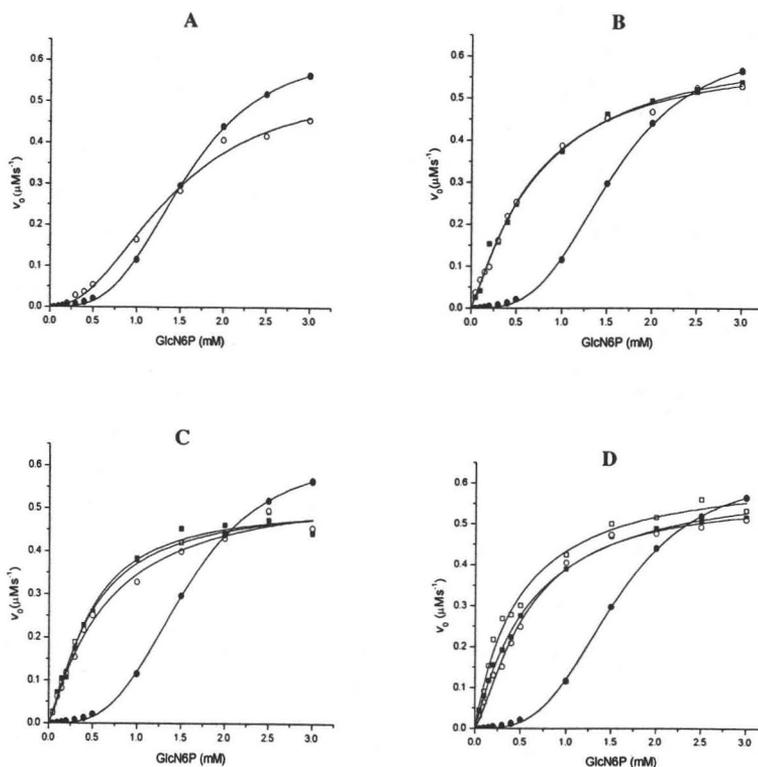


Figura 16. Patrones de velocidad inicial contra concentración de sustrato a distintas concentraciones de activador alostérico. (●) sin activador; Panel A, (○) 0.005 mM GlcNAc6P; Panel B (■) 0.05, (○) 0.075 mM GlcNAc6P; Panel C (□) 0.15, (■) 0.5, (○) 0.75 mM GlcNAc6P; Panel D) (□) 1, (■) 2, (○) 5 mM GlcNAc6P.

Con el propósito de conocer el comportamiento alostérico de la enzima mutante, los datos cinéticos se ajustaron a la ecuación del modelo de Monod-Wyman-Chageux. Los datos ajustados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste al modelo MWC.

Enzima	L	c	K_R (mM)	K_T (mM)
Silvestre	$1 \times 10^6 \pm 19$	0.025 ± 0.0002	0.55 ± 0.05	22.0 ± 2
249Trp	922.49 ± 23.26	0.020 ± 0.003	0.62 ± 0.06	31.63 ± 3

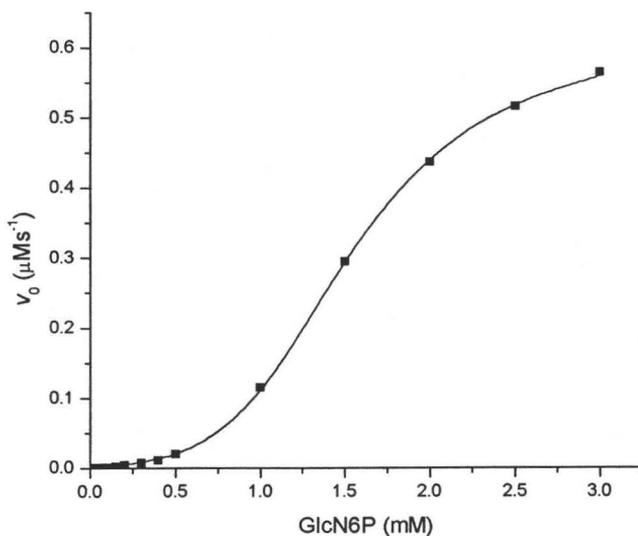


Figura 17. Patrón de velocidades iniciales contra concentración de sustrato para la mutante 249Trp en ausencia de activador alostérico. Datos ajustados al modelo de MWC.

El valor de la constante de equilibrio alostérico, L , para la mutante 249Trp es de 922, que con respecto al valor de la enzima silvestre (1×10^6), muestra que el equilibrio T-R se encuentra desplazado hacia el estado R. Esto corrobora que la mutación ocasionó que el estado conformacional T se encuentre poco favorecido. Por otra parte, los valores del coeficiente de unión no exclusivo, c , indican que ambas enzimas (mutante y silvestre), guardan la misma proporción de afinidad por el sustrato en sus estados R y T.

Para descartar que el comportamiento observado en el estudio cinético de la mutante 249Trp fuera debido a efectos ocasionados por las mutaciones previas que se hicieron para eliminar los residuos de Trp naturales (Trp15Tyr:Trp224Tyr), se llevó a cabo un estudio cinético de la enzima mutante Trp15Tyr:Trp224Tyr en ausencia y en presencia de activador alostérico. Los resultados cinéticos obtenidos y ajustados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos cinéticos de la mutante Trp15Tyr:Trp224Tyr obtenidos del ajuste a la ecuación de Hill.

Enzima	Sin GlcNAc6P			Con GlcNAc6P	
	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	$S_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mM)
W15Y:W224Y	149±10	5.0±0.3	2.8±0.1	144±9	0.65±0.04

La mutante Trp15Tyr:Trp224Tyr muestra un patrón cinético muy similar al de la enzima silvestre en presencia de GlcNAc6P 1mM (Figura 18). En cuanto a los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación de Hill (Tabla 5), se observa que las diferencias entre los valores de los parámetros para la enzima silvestre y la doble mutante son mínimas. Lo anterior sugiere que ambas enzimas son semejantes

estructuralmente pero ligeramente distintas catalíticamente y que la doble mutante tiene un comportamiento similar al de la enzima silvestre. Por otra parte, el análisis comparativo de la doble mutante con la enzima 249Trp (Tabla 5) muestra que cinéticamente se comportan de forma similar en ausencia y en presencia de activador alostérico (Figura 19). Los valores de k_{cat} , $S_{0.5}$, K_m y h obtenidos del ajuste de los datos cinéticos a la ecuación de Hill para ambas enzimas mutantes, ponen en evidencia que la enzima Trp15Tyr:Trp224Tyr y la triple mutante 249Trp (Trp15Tyr:Trp224Tyr:Val249Trp) poseen conformaciones similares pero propiedades catalíticas diferentes. De esta forma, podemos decir que el comportamiento cinético observado en la mutante 249Trp se debe a efectos de la mutación que involucra al residuo presente en la posición 249, que se encuentra en la interfase entre trímeros, y no a efectos debidos a la doble mutación Trp15Tyr:Trp224Tyr.

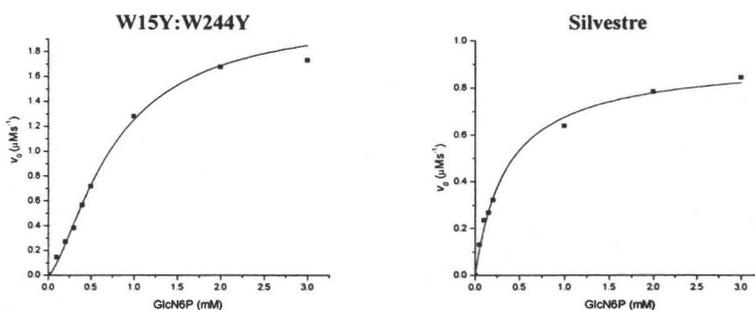
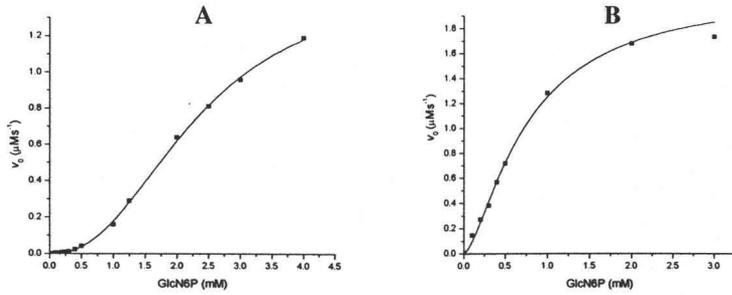


Figura 18. Patrones cinéticos de la enzima silvestre y la enzima Trp15Tyr:Trp224Tyr en presencia de activador alostérico, GlcNAc6P, 1mM.

Trp15Tyr:Trp224Tyr



249Trp

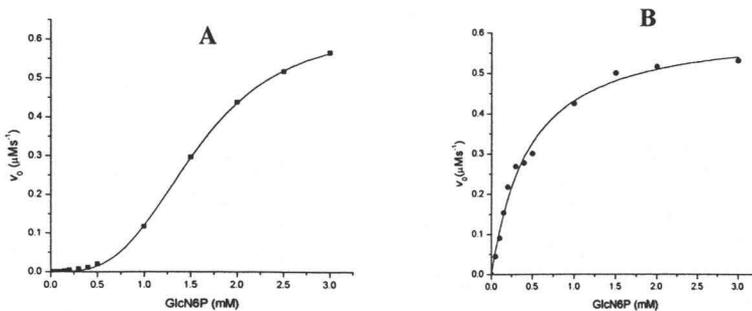


Figura 19. Patrones cinéticos de la triple mutante 249Trp y la doble mutante Trp15Tyr:Trp224Tyr. A) en ausencia de activador alostérico y B) en presencia de activador alostérico 1mM.

Tabla 5. Datos cinéticos comparativos de las enzimas silvestre, mutante 249Trp y mutante Trp15Tyr:Trp224Tyr.

Enzima	Sin GlcNAc6P			Con GlcNAc6P	
	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	$S_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mM)
Silvestre	158±8	5.5±0.20	2.9±0.1	158±8	0.55±0.05
Trp15Tyr:Trp224Tyr	149±10	5.0±0.30	2.8±0.1	144±9	0.65±0.04
249Trp	21±0	1.6±0.01	3.2±0.1	20±0	0.63±0.13

Fluorescencia

Con el propósito de conocer el mecanismo de la transición alostérica, se llevó a cabo un estudio de fluorescencia titulando a la enzima 249Trp con diferentes concentraciones de activador alostérico (GlcNAc6P), ligando del sitio alostérico, y de inhibidor competitivo (GlcN-ol-6P), ligando del sitio activo. Una vez saturada la enzima con activador alostérico, ésta se tituló con inhibidor competitivo y la enzima saturada de inhibidor competitivo se tituló con activador alostérico.

Los espectros de fluorescencia generados durante los experimentos de titulación no presentan cambios significativos en su intensidad de fluorescencia, por lo que no se emplearon en el análisis. Recordemos que un cambio de intensidad importante en un residuo de triptofano requiere de un cambio importante en su ambiente electrónico, como es el caso en los estudios de desnaturalización. Sin embargo, nuestro diseño supone que el residuo de Trp en la posición 249 se moverá sólo ligeramente ya que se encuentra en una región poco flexible del hexámero, por esta razón se analizaron los espectros a través de sus centros espectrales de masa (CEM).

Los valores espectrales de intensidad de fluorescencia (IF) se convirtieron a valores de CEM usando la fórmula descrita en la sección metodológica y finalmente se tradujeron a cambios totales del CEM (Δ CEM), los cuales dan muestra del cambio neto ocurrido en el ambiente electrónico del fluoróforo y, en consecuencia, de la dinámica estructural de la enzima mutante asociada a la transición alostérica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20.

El Δ CEM en los casos de la titulación de la enzima 249Trp con activador alostérico saturada de inhibidor competitivo y de la titulación con inhibidor competitivo saturada de activador alostérico (Figura 20; Panel D y B respectivamente) presentan un comportamiento difícil de describir formalmente, y claramente no se pueden ajustar a la forma de la ecuación de Hill descrita en la metodología. De tal manera que el ajuste se hizo sólo en los experimentos de titulación de la enzima con activador alostérico e inhibidor competitivo. Los cambios en los CEM se muestran en la Tabla 6.

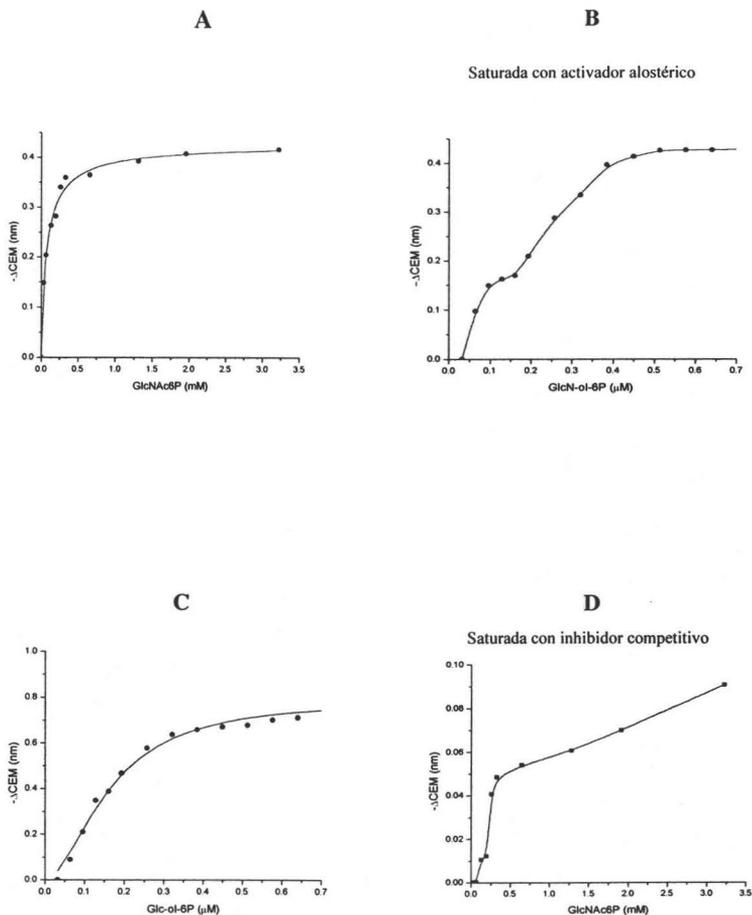


Figura 20. Titulación de la mutante 249Trp con GlcNAc6P y GlcN-ol-6P. Panel A: titulación con GlcNAc6P; Panel B: saturada de GlcNAc6P y titulada con GlcN-ol-6P; Panel C: titulación con GlcN-ol-6P; Panel D: saturada de GlcN-ol-6P y titulada con GlcNAc6P.

Tabla 6. Parámetros obtenidos del ajuste a la ecuación de Hill de los cambios del centro de masa.

Enzima/ligando	$\Delta\text{CEM}_{\text{lim}}$ (nm)	h	$S_{0.5}$ (μM)
Silvestre/GlcN-ol-6P	0.83 ± 0.02	2.40 ± 0.35	1.97 ± 0.13
249Trp/GlcN-ol-6P	-0.79 ± 0.02	1.85 ± 0.17	0.16 ± 0.01
249Trp/GlcNAc6P	-0.43 ± 0.01	0.86 ± 0.10	0.07 ± 0.01

La titulación de la enzima 249Trp con GlcN-ol-6P provoca un efecto hipsocrómico con un $\Delta\text{CEM}_{\text{lim}}$ de -0.793 nm, lo que sugiere que la unión del inhibidor competitivo al sitio activo, que además de causar la transición alostérica, provoca un cambio en el ambiente electrónico del Trp249 haciéndolo más hidrófobo. Esta curva de titulación presenta cooperatividad (Figura 20; Panel D), efecto que se ha visto en otras mutantes estudiadas en nuestro laboratorio (Bustos-Jaimes *et al.*, 2005). Esta cooperatividad ($h = 1.85$) sugiere que la unión del ligando del sitio activo induce cambios conformacionales a nivel de la estructura terciaria, los cuales se propagan a través del hexámero y que el fenómeno de unión del ligando al sitio activo facilita la unión de nuevos ligandos al hexámero y finalmente produce la transición cuaternaria. En el caso de la titulación de la enzima 249Trp con activador alostérico, el patrón de los cambios espectrales del centro de masa (ΔCEM) a diferentes concentraciones de GlcNAc6P muestra un comportamiento hiperbólico el cual se refleja en un coeficiente de Hill cercano a uno. Sorprendentemente, la unión del activador alostérico no es cooperativa, contrario a lo esperado ya que la estructura cristalográfica de la enzima silvestre sugiere que en la forma R el sitio alostérico debería estar formado, aumentando así su afinidad

por este ligando tras la ocupación del primer sitio alostérico. La unión de GlcNAc6P al sitio alostérico origina un cambio cuaternario concertado que lleva al hexámero completo a su forma R, produciendo un $\Delta CEM_{lim} = -0.43$ nm. Este efecto también es hipsocrómico, e indica que la transición alostérica producida por el llenado del sitio alostérico genera un cambio en el ambiente electrónico del residuo Trp249 parecido al producido por el llenado del sitio activo. Sin embargo, la diferencia entre los valores de ΔCEM_{lim} para la enzima saturada de GlcN-ol-6P (RI₆) y aquella saturada de GlcNAc6P (RA₆) indica que las conformaciones R alcanzadas en cada caso son distintas. Por otra parte, la presencia de cooperatividad durante el llenado del sitio activo y su ausencia durante el llenado del sitio alostérico sugieren la existencia de distintos mecanismos para producir la transición alostérica.

Cuando titulamos a la mutante Trp249 previamente saturada con otro ligando que la lleva a su conformero alostérico R, deseamos probar que los estados cuaternarios R producidos por ambos ligandos sean similares. En este caso, obtenemos comportamientos bifásicos difíciles de interpretar en términos estructurales. La ocupación del sitio activo en la enzima saturada con activador alostérico (Figura 20, Panel B) transmite una señal a través de la interfase entre trímeros, lo que sugiere que las interacciones que desencadenarían la transición cuaternaria desde el sitio activo se encuentran disponibles aún después de que ocurrió la transición cuaternaria desde el sitio activo. Lo cual es congruente con otros estudios realizados en nuestro grupo (Bustos-Jaimes, *et al.*, 2005).

En el experimento contrario (Figura 20, Panel D), la ocupación del sitio alostérico produce cambios conformacionales debidos al ajuste inducido en el sitio alostérico. Incluso, la parte final de la curva sugiere la existencia de cooperatividad negativa en la

unión del activador a la enzima en su confórmero alostérico R. Esto parece ir en contra del modelo MWC. Sin embargo, desde una perspectiva funcional, si los sitios alostéricos no ocupados del confórmero R presentaran menor afinidad por su ligando, no existirían consecuencias cinéticas observables ya que la enzima sólo requiere un sitio ocupado para alcanzar el confórmero alostérico R. Los cambios en el CEM observados en ambas titulaciones, $RA_6 \rightarrow RA_6I_6$ y $RI_6 \rightarrow RI_6A_6$, muestran que existen diferencias estructurales entre los estados RA_6 , RI_6 , y RA_6I_6 , resultado que concuerda con estudios previos de nuestro grupo (Bustos-Jaimes *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Se construyó una mutante con un solo residuo de triptofano en la posición 249, la cual se encuentra en la interfase entre trímeros de la enzima. El comportamiento cinético de esta mutante es similar al comportamiento de la enzima silvestre, lo que nos permitió emplearla como modelo de la transición cuaternaria de la enzima silvestre.

La interfase entre trímeros del hexámero de la glucosamina-6-fosfato desaminasa participa activamente en la comunicación entre trímeros y en la propagación de los cambios conformacionales en la transición alostérica.

El confórmero R formado con el activador alostérico es catalíticamente distinto al confórmero que forma el sustrato en ausencia de activador alostérico.

El mecanismo de la transición alostérica inducida por la ocupación del sitio activo es distinto al mecanismo de la transición alostérica generada desde el sitio alostérico de la enzima mutante.

Se demostró nuevamente que los estados cuaternarios R de esta enzima tienen diferencias estructurales debidas a los ligandos que tienen unidos.

PERSPECTIVAS

Comprobar por estudios de unión con ligandos radiactivos la asociación entre el número de moléculas de ligando unido con los cambios del CEM observados.

Estudiar las posibles diferencias estructurales observadas a través de los cambios en el CEM, mediante un estudio cristalográfico. Aunque es posible que dichos cambios sólo estén relacionados con cambios de flexibilidad y no con cambios geométricos formales en la región de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 266-272.
- Altamirano, M.M., Hernandez-Arana, A., Tello-Solis, S., y Calcagno, M.L. (1994). Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamina-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **220**, 409-413.
- Arreola, R. (1996). Estudios estructurales sobre la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* y otras especies. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bustos, I. (2001). Estudio de la flexibilidad en el motivo asa/ β B'/helice5/asa/ β C' (158-187) en la regulación de la glucosamina-6-fosfato de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM.
- Bustos-Jaimes, I., Sosa-Peinado, A., Rudino-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. *J. Mol. Biol.* **319**, 183-189. Errata en *J. Mol. Biol.* **322**, 903.
- Bustos-Jaimes, I., Ramírez-Costa, M., De Anda-Aguilar, L., Hinojosa-Ocaña, P. y Calcagno, M.L. (2005). Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **44**, 1127-1135.
- Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui R. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.
- Chen, Y. y Barkley M.D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**, 9976-9982.
- Comb, D.G. y Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* **232**, 807-827.
- Davis, J.S., y Gander, J.E. (1967). A reevaluation of the procedure of Roe for determination of fructose. *Anal. Biochem.* **19**, 72-79.
- Drickamer, K. (1991). Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* **67**, 1029-1032.

Fermini, B. y Nathan, R.D. (1991). Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* **260**, H735-H743.

Glick, G.D., Toogood, P.L., Wiley, D. C., Skehel, J. J., and Knowles, J.R. (1991). Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 23660-23669.

Guilbault, G.G. Practical fluorescence. Theory, methods and techniques. 1973, Marcel Dekker, N.Y., U.S.A.

Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, M. L., Garratt R. C. y Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamina-6-phosphate desaminasa: the structure of the state T at 2.3 Å resolution. *Structure*, **7**, 527-537.

Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence Spectroscopy. 1999, Plenum Press Pub. Co., U.S.A.

Lara-Lemus, R. (1991). Estudio cinetico y caracterizacion molecular de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de corteza renal de bovino. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.

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

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

Lara-González, S., Dixon, H.B.F., Mendoza-Hernandez, G., Altamirano, M.M. y Calcagno, M.L. (2000). On the role of the N-terminal group in the allosteric function of Glucosamine-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**, 219-227.

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

Mengin-Lecreux, D., y van Heijenoort, J. (1996). Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32-39.

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

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

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

Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. y Altamirano, M.M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **37**, 7844-7849.

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

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

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

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

Plumbridge J.A. (1992) A dominant mutation in the gene for the Nag repressor of *Escherichia coli* that renders the *nag* regulon uninducible. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1011-1017

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

Plumbridge, J., y Vimr, E. (1999). Convergent pathways for utilization of the amino sugars *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmannosamine, and *N*-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 47-54.

Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J. y Söll, D. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* *nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the *N*-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* **62**, 197-207.

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

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

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

Segel, I.H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. 1993, Wiley-Interscience, N.Y., U.S.A.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**,76-85.