

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS FACULTAD DE QUÍMICA.**

**ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN ALOSTÉRICA DE LA
GLUCOSAMINA 6-FOSFATO DESAMINASA DE *Escherichia coli*
EN HETEROHEXÁMEROS MUTANTES.**

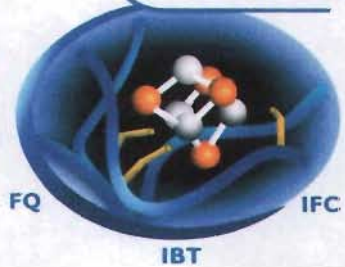
T E S I S

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

M. EN C. ARMANDO LUCUMÍ MORENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO L. CALCAGNO

Ciencias
Bioquímicas



MÉXICO, D.F.

2005

m347299



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE QUÍMICA E
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

Of. No. PMDCB/459/2005

M. en BQ. ARMANDO LUCUMI MORENO
Alumno del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 25 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Construcción de heterohexámeros de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* para el estudio de la transición alostérica", dirigida por el Dr. Mario Luis Calcagno Montans.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

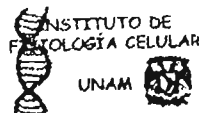
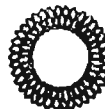
PRESIDENTE	Dr. Armando Gómez Puyou
VOCAL	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
VOCAL	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
VOCAL	Dra. Adela Rodríguez Romero
SECRETARIO	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
SUPLENTE	Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros
SUPLENTE	Dr. Edgar Vázquez Contreras

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 29 de abril de 2005.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo



**A Patricia, Beatriz Helena, Julián Mauricio, Claudia Rocío y mis
padres, sin su apoyo y comprensión hubiese sido imposible
sacar adelante este trabajo. Sigo en deuda con ellos por todo el
tiempo que les quite.**

Agradecimientos.

A toda mi familia por el apoyo y animo que siempre me dieron para poder sacar esta empresa adelante.

A mi amigo Mario Calcagno por todo lo que me enseñó y la valiosa amistad que siempre me ha brindado.

A todos los miembros del laboratorio de fisicoquímica de proteínas entre los años 2002 a 2005, fueron fundamentales en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial Drs. Juan Pablo Pardo Vazquez y Rogelio Rodríguez Sotres, sus siempre, bienvenidas críticas contribuyeron mucho en mi formación.

A toda la comunidad de la Universidad Santiago de Cali, en Cabeza del Dr Heberth Celín Navas ya que creyeron en mi y me facilitaron las cosas para trasladarme hasta México.

A todos los que compartieron en el “gato macho” conmigo, esos momentos de bohemia fueron fundamentales para limpiar el alma y aclarar las ideas.

A Eliécer, Reyna, Viviana, Martín, Holber, Fabian, Antonio por todo lo que me ayudaron en los momentos mas difíciles.

En fin a toda la gente que de una u otra forma compartió conmigo este sueño a todos quiero agradecerles infinitamente por su apoyo.

Este trabajo conto con el apoyo de los proyectos **DGAPA-PAPIIT IN228703** y **CONACYT 41328Q.** y la **DGEP, UNAM.**

CONTENIDO	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Cooperatividad y Alosteroismo.....	3
1.1.1 La teoría de Hill.....	5
1.1.2 La teoría de Adair.....	6
1.1.3 La teoría de Wyman.....	8
1.1.4 El modelo de Monod-Wyman-Changeux.....	9
1.1.5 El modelo de Koshland-Nemethy-Filmer.....	13
1.1.7 El modelo general.....	15
1.2 . La glucosamina 6 fosfato desaminasa de <i>Escherichia coli</i>	18
1.2.1. Generalidades.....	18
1.2.2. Mecanismo catalítico de la GlcN6P desaminasa.....	20
1.2.3. Estructura de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i>	22

1.2.4. El sitio activo.....	24
1.2.5. El sitio alostérico.....	26
1.2.6. Cinética de la GlcN6P desaminasa.....	28
1.2.7. Transición alostérica en la GlcN6P desaminasa.....	29
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
2.1.Construcción de heterohexámeros como herramienta para el estudio de las proteínas alostéricas.....	33
3. OBJETIVO.....	34
4. METODOLOGIA	34
4.1 Diseño y construcción de mutantes en los residuos Arg172A y Lys208-Glu.....	34
4.2. Sobre expresión, purificación y caracterización de la GlcN6P desaminasa silvestre y mutantes Arg172-Ala, Lys208-Glu, Lys208-Val y la doble mutante Arg172-Ala: Lys208-Glu.	35
4.3. Determinación de la concentración de urea necesaria para disociar la GlcN6P desaminasa.....	36

4.4. Disociación y reasociación de la Glucosamina 6P desaminasa de <i>E.coli</i>	37
4.5. Diseño y Construcción de la triple mutante L3I:R172A:K208E	37
4.6 Caracterización de la triple mutante L3I:R172A:K208E.....	38
4.7. Construcción de heterohexámeros.....	38
4.8. Separación de los heterohexámeros.....	39
4.9. Identificación de los heterohexámeros.....	39
4.10. Caracterización cinética del heterohexámero 3:3.....	40
4.11. Reactividad de tioles con DTNB en el heterohexámero 3:3...	40
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Determinación de la concentración de urea necesaria para disociar la GlcN6P desaminasa.....	40
5.2. Disociación / reasociación de la Glucosamina 6P desaminasa de <i>E.coli</i>	41

5.3. Caracterización de la mutante L3I:R172A:K208E.....	44
5.4. Cinética de la triple mutante.....	46
5.5 Construcción de heterohexámeros.....	46
5.6. Separación de los diferentes heterohexámeros.	47
5.7. Caracterización cinética del heterohexámero 3:3.....	51
5.8. Titulación de cisteínas con DTNB	54
6. DISCUSIÓN	55
7. PERSPECTIVAS	60
8. BIBLIOGRAFÍA	62
9. MANUSCRITO ANEXO	68

RESUMEN

La enzima GlcN6P desaminasa (E.C 3.5.99.6) de *Escherichia coli* (EcGNPD) cataliza la isomerización y desaminación de la glucosamina-6-P (GlcN6P) en fructosa 6-P y ion amonio. Está constituida por seis subunidades iguales dispuestas con simetría 3₂ y es una enzima alostérica de tipo *K* clásico, activada por la *N*-acetilglucosamina-6-P (GlcNAc6P). Para estudiar la propagación de la transición alostérica a todo el hexámero, hemos construido heterohexámeros combinando subunidades silvestres y mutantes en una misma molécula. En este trabajo presentamos un estudio de la función alostérica en los heterohexámeros 3:3, obtenidos al combinar cadenas silvestres y cadenas portadoras de la triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu, que suprime la capacidad para unir sustrato. La mutante además contiene una etiqueta marcadora (Ile3) para facilitar la identificación de las cadenas por secuenciación de Edman y gracias a los reemplazos Arg172-Ala y Lys208-Glu, introduce una diferencia de carga que facilita su separación cromatográfica. Las enzimas silvestre y triple mutante se purificaron por cromatografía de afinidad alostérica. Una mezcla 1:1 de enzima silvestre y triple mutante se disoció en urea 8M y se reasoció en una columna preparativa de Superdex S-200. De la mezcla de heterohexámeros se aislaron las especies 3:3 por cromatografía de intercambio iónico y los picos se identificaron por electroforesis nativa en gel y por secuenciación N-terminal. Los estudios cinéticos y de unión a ligandos revelan que este híbrido cuaternario carece de cooperatividad homotrópica y en ausencia del activador parece bloqueado en la forma alostérica T. La activación heterotrópica es de tipo mixto y se produce en

las seis subunidades por igual, que muestran valores silvestres de k_{cat} . Esto además excluye la existencia de hexámeros mixtos RT, comprobándose el carácter concertado de la transición.

SUMMARY

Glucosamine-6-phosphate deaminase (E.C 3.5.99.6) from *Escherichia coli* (EcGNPD) catalyzes the deamination and isomerization of glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) producing Fru6P and ammonium ion. EcGNPD contains six identical subunits arranged with 32 symmetry; it is a *K*-type allosteric enzyme, activated by *N*-acetylglucosamine 6 phosphate (GlcNAc6P). With the purpose of studying the propagation of the allosteric conformational changes to the whole hexamer, we constructed heterohexameric forms of the enzyme by mixing wild-type and mutation-bearing subunits. In this work we present the study of the homotropic transition in the 3:3 hexamers formed by wild-type chains and chains containing a mutation that impairs GlcN6P binding (Leu3-Ile:Arg172-Ala: Lys208-Glu). Arg172 and Lys208 replacements affect substrate binding and make smaller the *pI*, thus easing its purification by ion-exchange chromatography. The Leu3-Ile mutation introduces a marker for chain identification by amino acid sequencing. The wild-type and mutant deaminase was purified by allosteric-site affinity chromatography. Heterooligomers were obtained by unfolding in 8M urea a 1:1 mixture of WT and the mutant form of the enzyme; this was chromatographed in a Superdex S-200 preparative column. The mixture was then fractionated by anion-exchange FPLC and the 3:3 heterohexamer was purified and identified by native gel electrophoresis and Edman sequencing. Kinetic and ligand-binding studies

reveal that this quaternary hybrid lacks of homotropic cooperativity and appears to be blocked in the allosteric T-state. It is heterotropically activated by GlcNAc6P, with a mixed-effect which involves the six subunits, displaying a k_{cat} close to the wild-type value. These results also show that the transition associated to GlcNAc6P binding is symmetrical, thus excluding the formation of RT mixed hexamers.

1. ANTECEDENTES

1.1. Cooperatividad y Alostereismo

Una de las consecuencias más interesantes de la evolución estructural y funcional de las proteínas es la aparición de mecanismos para la generación y propagación de los cambios conformacionales que son la base de la regulación de su función. El estudio de estos mecanismos es una de las áreas de frontera de la ciencia de proteínas. Se han descrito diferentes modelos para explicar estos fenómenos que incluyen estudios de proteínas clásicas con propiedades regulatorias como la hemoglobina (durante muchas décadas único caso conocido de una proteína con comportamiento cooperativo), enzimas alostéricas y receptores de membrana. (Debru y col.1983, Koshland y col. 2002). Desde el punto de vista estructural, los fenómenos de cooperatividad y alosterismo se han asociado con grandes cambios en la estructura cuaternaria de la proteína, lo que se conoce como transición alostérica, aunque no se excluyen los cambios conformacionales a nivel terciario generados por la unión del ligando. Estos últimos se conocen como "ajuste inducido" (Koshland y col. 1966). Estos cambios

reveal that this quaternary hybrid lacks of homotropic cooperativity and appears to be blocked in the allosteric T-state. It is heterotropically activated by GlcNAc6P, with a mixed-effect which involves the six subunits, displaying a k_{cat} close to the wild-type value. These results also show that the transition associated to GlcNAc6P binding is symmetrical, thus excluding the formation of RT mixed hexamers.

1. ANTECEDENTES

1.1. Cooperatividad y Alostereismo

Una de las consecuencias más interesantes de la evolución estructural y funcional de las proteínas es la aparición de mecanismos para la generación y propagación de los cambios conformacionales que son la base de la regulación de su función. El estudio de estos mecanismos es una de las áreas de frontera de la ciencia de proteínas. Se han descrito diferentes modelos para explicar estos fenómenos que incluyen estudios de proteínas clásicas con propiedades regulatorias como la hemoglobina (durante muchas décadas único caso conocido de una proteína con comportamiento cooperativo), enzimas alostéricas y receptores de membrana. (Debru y col.1983, Koshland y col. 2002). Desde el punto de vista estructural, los fenómenos de cooperatividad y alosterismo se han asociado con grandes cambios en la estructura cuaternaria de la proteína, lo que se conoce como transición alostérica, aunque no se excluyen los cambios conformacionales a nivel terciario generados por la unión del ligando. Estos últimos se conocen como "ajuste inducido" (Koshland y col. 1966). Estos cambios

estructurales representan las bases físicas para explicar los fenómenos de cooperatividad y alosterismo (Wyman y col. 1963).

El alosterismo o “diferente forma o geometría” es uno de los más importantes mecanismos para regular la función proteica, éste resulta del acoplamiento de cambios conformacionales entre sitios cercanos y sitios distantes de la molécula proteica. Se han descrito dos tipos de comportamientos alostéricos, llamados: 1) efectos homotrópicos, en los que la unión de un ligando en un sitio de un oligómero genera un cambio conformacional que modifica la afinidad por ese ligando en sitios idénticos de otras subunidades de la misma molécula. 2) efecto heterotrópicos, en los que la unión de un ligando a un sitio del oligómero genera en la proteína un cambio conformacional tal que se modifica la afinidad de sitios diferentes por un ligandos diferentes en otras subunidades del mismo oligómero (Wyman y col. 1963).

Históricamente aparecieron dos modelos para explicar los fenómenos de cooperatividad y alosterismo en las proteínas, el modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC) (Monod y col. 1965) y el modelo secuencial de Koshland-Némethy-Filmer (KNF) (Koshland y col. 1966). Cabe mencionar que estos modelos se nutrieron de las investigaciones realizadas previamente por A.V Hill (1910), G. S. Adair (Adair 1925), L. Pauling (Pauling y col. 1935) y J. Wyman (Wyman y col.1963).

A lo largo del tiempo el fenómeno de la cooperatividad ha sido asociado con grandes cambios en la estructura de la proteína. Tomemos como ejemplo a la hemoglobina, que está compuesta por cuatro subunidades. Su curva de saturación con O_2 es sigmoide, tal como si cada molécula de O_2 se uniese a la

hemoglobina con una constante de disociación menor que la precedente y mayor que la siguiente. Lo sorprendente de esto es que la afinidad aparente para la cuarta molécula de O₂ que se une a la proteína es entre 100 a 1000 veces más alta que para la primera (Perutz y col.1968). El incremento en la afinidad por el ligando no puede ser explicado entonces por la presencia de cuatro sitios de unión no interactuantes y con diferentes afinidades intrínsecas. Este incremento en la afinidad por el O₂ a medida que aumenta la saturación de la hemoglobina con el O₂ fue explicado a principios del siglo pasado suponiendo que los sitios de unión al O₂ interactúan entre sí, es decir la unión del O₂ a un sitio causaría un incremento en la afinidad de los otros sitios y así sucesivamente. A este fenómeno se le llamó cooperatividad (Adair, 1925).

1.1.1 La teoría de Hill

Una de las primeras hipótesis propuesta para explicar la sigmoideidad de la curva de saturación de la hemoglobina con el oxígeno fue elaborada por A.V. Hill (1910). Su idea consistió en que la molécula de hemoglobina ligaba simultáneamente más de una molécula de oxígeno y a partir de ahí desarrollo la siguiente ecuación para describir el fenómeno.

$$\bar{Y} = \frac{K [O_2]^h}{1+K [O_2]^h} \quad (1)$$

En donde \bar{Y} es la función de saturación, K es la constante de equilibrio y $[O_2]$ la concentración de oxígeno. La gráfica que describe la ecuación (1) es una curva sigmoide.

La hipótesis de Hill y su correspondiente ecuación implican que el parámetro h (según la notación actual) es igual al número de moléculas de oxígeno ligadas por cada molécula de hemoglobina y puede ser determinado mediante un procedimiento gráfico basado en la siguiente igualdad, derivada de la ecuación de Hill.

$$\ln (Y/(1-Y)) = \ln K + h \ln X$$

La gráfica de $\ln (Y/(1-Y))$ vs $\ln X$ corresponde a una recta de pendiente h y de ordenada en el origen $\ln K$. Esta gráfica se conoce como gráfica de Hill. En particular, para el caso de la hemoglobina se obtiene que los puntos están aceptablemente alineados en un rango de saturación de entre 10 y 90%, de acuerdo a una recta de pendiente $h = 2.9$.

El posterior conocimiento de que la hemoglobina ligaba cuatro moléculas de oxígeno en lugar de 2.9 puso en evidencia que la hipótesis de Hill era incorrecta. Hay que anotar que aunque la ecuación de Hill no se cumple, la gráfica de Hill sigue siendo una herramienta valiosa para detectar cooperatividad porque la pendiente h de esta gráfica conocida como coeficiente o número de Hill, indica la presencia o ausencia de cooperatividad. Cuando $h = 1$ no existe cooperatividad, y ésta es positiva cuando $h > 1$ o negativa cuando $h < 1$.

1.1.2 La teoría de Adair

En 1925, G. S. Adair publicó una teoría en la que se postulaba que la molécula de hemoglobina se oxigenaba en cuatro pasos elementales, en cada uno de los cuales únicamente ligaba una molécula de oxígeno. Los pasos elementales propuestos por Adair son los siguientes:



A partir de estos equilibrios Adair dedujo la ecuación que actualmente lleva su nombre.

$$Y = \frac{K_1 [\text{O}_2] + 2K_1K_2[\text{O}_2]^2 + 3K_1K_2K_3 [\text{O}_2]^3 + 4K_1K_2K_3K_4 [\text{O}_2]^4}{4 (1 + K_1 [\text{O}_2] + K_1K_2[\text{O}_2]^2 + K_1K_2K_3 [\text{O}_2]^3 + K_1K_2K_3K_4 [\text{O}_2]^4)} \quad (2)$$

En donde Y corresponde a la función de saturación de la hemoglobina, $[\text{O}_2]$ equivale a la concentración de oxígeno, los términos K_1 , K_2 , K_3 y K_4 corresponden a las constantes de asociación para cada uno de los equilibrios. (Adair, usó constantes de asociación. Esta costumbre se conserva sólo entre los que trabajan con hemoglobina).

Esta ecuación tiende a la ecuación de Hill si las constantes de asociación K_2 , K_3 y K_4 son muy pequeñas con respecto a K_1 . Las constantes K_i ($i = 1, 2 \dots n$) de la ecuación de Adair se llaman constantes macroscópicas de asociación (Adair 1925). En el caso particular de la hemoglobina, la ecuación de Adair muestra que la curva de saturación sigmoide implica que la afinidad de un sitio por el oxígeno depende del estado de ocupación de los sitios vecinos. La teoría de Adair permite vincular los fenómenos cooperativos de la hemoglobina con las constantes termodinámicas que rigen cada paso de la asociación con el oxígeno. En su

carácter de teoría fenomenológica, la de Adair no hace hipótesis sobre la causa de los fenómenos, sino que da un marco descriptivo que permite una representación cuantitativa de las observaciones. Es una teoría sobre la cooperatividad porque permite vincular determinadas observaciones (por ejemplo, curvas de saturación sigmoideas) con propiedades necesarias de las constantes termodinámicas (por ejemplo, que la afinidad de un sitio libre en una molécula en la que hay sitios ocupados es mayor que en el caso en que todos los sitios estén libres, es decir, en una molécula la ocupación de algunos sitios aumenta la afinidad de los que están libres).

Por otra parte, la teoría de Adair abarca posibilidades que fueron descubiertas en sistemas reales bastante tiempo después de que la teoría fuera enunciada, en particular la existencia de cooperatividad negativa (Koshland y col. 1963). Una curva de saturación no sigmoide y no hiperbólica puede ser descrita en el contexto de la teoría de Adair como una situación en la que la afinidad de un sitio disminuye con la ocupación de los sitios vecinos (cooperatividad negativa). Una consecuencia trivial pero fundamental de esta teoría, es que una molécula con un solo sitio de unión no puede exhibir fenómenos de cooperatividad y que en este caso, la curva de saturación es necesariamente hiperbólica.

1.1.3 La teoría de Wyman

Años más tarde J. Wyman (1963) desarrolló una teoría puramente termodinámica sobre las interacciones de una macromolécula proteica con sus ligandos. La teoría de Wyman al igual que la de Adair también está basada en el comportamiento cooperativo de la hemoglobina. Los efectos cooperativos

evidenciados por las curvas de saturación con oxígeno indican cambios en la afinidad de los sitios de la hemoglobina por el oxígeno, a medida que éste es captado. Estas modificaciones en la afinidad por un ligando dependientes del grado de saturación respecto a ese mismo ligando fueron denominadas por Wyman "efectos homotrópicos". Los efectos homotrópicos resultan de la influencia mutua entre sitios de un mismo tipo (por ejemplo sitio activo). Por otro lado la afinidad de un sitio por el oxígeno puede modificarse cuando la hemoglobina interactúa con otros ligandos (como los H^+ en el caso del efecto Bohr). A este tipo de interacción entre ligandos diferentes Wyman le llamó "efectos heterotrópicos" (Wyman y col. 1963).

La teoría de Wyman describe un formalismo termodinámico que impone ciertas relaciones necesarias entre distintas variables observadas (Wyman y col. 1963).

1.1.4 El modelo de Monod-Wyman-Changeux

Hacia fines del año 1965, Monod, Wyman y Changeux publicaron un modelo de las interacciones alostéricas que habría de tener una importante repercusión en varios dominios de la investigación biológica.

El modelo plantea que las proteínas alostéricas son oligómeros simétricos con subunidades idénticas, y que cada subunidad existe en "al menos" dos estados conformacionales en equilibrio (tenso o T y relajado o R) que poseen diferentes afinidades por los ligandos. La premisa básica del modelo es que la proteína se interconvierte entre los dos conformeros, T y R, de forma concertada y que el equilibrio preexiste a la unión de los ligandos (Monod y col. 1965).

Este modelo tiene la propiedad singular de ser consistente con un considerable número de observaciones cinéticas (Changeux 1998), a pesar de estar fundado en un pequeño número de postulados sumamente exigentes. Esta característica hizo que este modelo fuese epistemológicamente ejemplar; sus rígidos postulados orientaron la investigación sobre la estructura cuaternaria de las proteínas para comprobar su validez. Uno de los innegables éxitos del modelo consiste en que el carácter desafiante de sus postulados fue responsable de la abundante investigación sobre la dinámica conformacional de las proteínas que se lleva a cabo desde 1965.

Los siguientes son los postulados planteados por el modelo de MWC:

- 1) La proteína alostérica es un oligómero que se presenta en dos formas que coexisten en equilibrio, una forma R (relajada) y una forma T (tensa).
- 2) Los oligómeros constan de un número n de subunidades en una misma molécula, las cuales pertenecen a una misma forma (R o T). No existen híbridos RT.
- 3) La relación entre los oligómeros en la forma T y la forma R en ausencia de ligandos, esta descrita por una constante de equilibrio $L_0 = T_0/R_0$, siendo T_0 la concentración de la enzima en forma T y sin ligando, R_0 la concentración de la enzima en la forma R y sin ligando y L_0 corresponde a la constante de equilibrio entre las dos formas vacías de la proteína.
- 4) Las constantes de disociación de un efector alostérico para las formas T y R son diferentes, por que las dos formas son estructuralmente diferentes.
- 5) Cuando la proteína cambia de un estado conformacional a otro se conserva la simetría molecular.

Un concepto fundamental en el desarrollo del modelo es la función de saturación \bar{Y} , la cual se define como la fracción de subunidades ocupadas con el sustrato (S).

Si se supone que la unión del sustrato a las subunidades es un proceso que llega rápidamente al equilibrio, que la liberación de productos es un proceso lento (en comparación con el anterior) y que la velocidad de la reacción catalítica es proporcional a la concentración de los complejos subunidad-sustrato independientemente que las subunidades sean R o T, entonces la función de saturación es igual al cociente v/V . Siendo v velocidad inicial y V velocidad máxima.

La diferente afinidad de las cada una de las dos formas de la enzima por el sustrato está definida por el parámetro $c = K_m^R / K_m^T$. Si un sustrato tiene igual afinidad por las dos formas de la enzima entonces $c = 1$, el equilibrio T-R no cambia con la concentración de sustrato y la función de saturación es una hipérbole.

El modelo también define las propiedades alostéricas de los oligómeros con respecto a los efectos heterotrópicos. Son efectores alostéricos aquellos ligandos que se unen a un oligómero en un lugar diferente al sitio activo que se denomina sitio alostérico. De lo anterior derivan algunas propiedades que son:

- a) Las proteínas alostéricas son oligoméricas
- b) Las interacciones alostéricas están relacionadas con alteraciones en la estructura cuaternaria de las proteínas (modificaciones en las caras de contacto de las subunidades).

c) Los efectos homotrópicos en el modelo siempre son positivos (el modelo excluye la cooperatividad negativa).

d) Los efectos heterotrópicos pueden ser positivos o negativos (activación o inhibición alostérica).

Muy pocos sistemas alostéricos presentan solamente efectos heterotrópicos, como es el caso de la GlcN6P sintasa de mamíferos (Broschat y col. 2002) o la homocitrato sintasa tipo 1 de levadura (Andi y col. 2005).

El aparente hallazgo de enzimas con cooperatividad negativa (Koshland y col. 1963) u otras que muestran curvas de velocidad en función de la concentración de sustrato, con más de un punto de inflexión (Teipel y Koshland 1969), fue tomado como un serio argumento en contra de los postulados del modelo de MWC. De hecho un sistema que presente una curva de saturación proteína–ligando con cooperatividad negativa no es consistente con el modelo MWC. Éste es el caso de las enzimas gliceraldehído 3-P deshidrogenasa y la tirosil-tRNA sintetasa (Fersht, 1999). En el caso de ésta última, Fersht y col. comprobaron que la aparente cooperatividad negativa se debe a una asimetría preexistente (Fersht, 1999). Cabe agregar que en muchos casos la denominada "cinética de la mitad de los sitios", la mezcla de isoenzimas con afinidades diferentes o la preexistencia de asimetría, como el caso de la tirosil-tRNA sintetasa, producen un comportamiento cinético semejante al de la cooperatividad negativa (Fersht, 1999).

Uno de los postulados básicos del modelo de MWC es que las subunidades en un oligómero tienen todas la misma conformación y que la transición alostérica implica la modificación conformacional simultánea de todas las subunidades de la molécula. Este postulado confiere una elegante simplicidad

a la representación matemática del modelo y las estructuras cristalográficas de la mayoría de las proteínas alostéricas confirman este hecho, con algunas excepciones, como es el caso de la Groel (Aharoni y Horowitz 1997).

El modelo de MWC también propone la existencia de tres clases de comportamientos cinéticos para los sistemas alostéricos. Los sistemas K , son aquellos en los que la unión de un efector a la enzima cambia la constante de afinidad aparente por el sustrato pero no la V o k_{cat} de la reacción, debido a que tanto el efector como el sustrato tienen afinidades diferentes por las formas T o R. En los sistemas V el sustrato tiene la misma afinidad por los dos conformeros (T y R) y la unión del efector no modifica la constante de unión aparente del sustrato pero produce un cambio en la V o k_{cat} . Ahora bien, si el efector tiene mayor afinidad por la forma R, funcionará como un activador (sistemas V positivos) pero por el contrario si la afinidad mayor del efector favorece la forma T, el efector será un inhibidor (sistemas V negativos). A todos los sistemas que presentan a la vez efecto K y V se les conoce como sistemas mixtos. En la Figura 1 se muestra una representación esquemática del modelo de MWC.

1.1.5 El modelo de Koshland-Nemethy-Filmer

En 1966, Koshland, Némethy y Filmer publicaron un modelo que muestra que la aplicación de la teoría del "ajuste inducido" propuesta por Koshland en 1963 podía explicar la existencia de cinéticas cooperativas para enzimas oligoméricas. La teoría del "ajuste inducido" manifiesta que la unión de un ligando a una enzima puede causarle a esta cambios conformacionales que determinen la alineación de los grupos catalíticos en la orientación correcta (Koshland y col.

1963). Estos cambios conformacionales son generados por la unión del ligando y la conformación que se obtiene no existe en cantidad apreciable en ausencia del mismo. A diferencia del modelo de MWC, el modelo KNF supone que las subunidades de una proteína oligomérica pueden exhibir cambios conformacionales que si bien modifican las propiedades de las subunidades vecinas, en cambio no las "fuerzan" a adoptar su misma conformación. En consecuencia el modelo KNF asume la existencia de oligómeros híbridos.

Los postulados del modelo secuencial son los siguientes .

- 1) La proteína oligomérica en ausencia del ligando existe en una única conformación .
- 2) La unión de un ligando en una subunidad induce en ésta un cambio conformacional.
- 3) La estabilidad conformacional de un oligómero depende de las regiones de contacto entre las subunidades. Estas regiones ("interfases", "intercaras" o "dominios de unión") van a ser caracterizadas por una energía libre que se le llama energía libre de interfase. A través de las modificaciones de las energías libres de las interfases, el cambio conformacional de una subunidad modificará la estabilidad conformacional del oligómero.

El modelo KNF puede ser considerado una interpretación molecular de la ecuación de Adair (Adair 1925). En general el número de constantes ajustables es igual al número de sitios de unión. Éstas son constantes complejas, producto de constantes elementales. Las ecuaciones para este modelo son muy complejas y el paquete de constantes elementales no se puede descomponer, por lo que únicamente se pueden ajustar las constantes de Adair. Sin embargo, a diferencia

de las constantes de Adair, a las que se les puede asignar cualquier valor, las constantes del modelo KNF están restringidas por los postulados del modelo y toman en cuenta la geometría del oligómero alostérico. Mientras que el modelo de MWC está basado en cambios en la estructura cuaternaria, el modelo de KNF se basa principalmente en cambios en la estructura terciaria. A diferencia del modelo de MWC el modelo de KNF prevé la existencia de oligómeros cuya cinética de saturación presente cooperatividad negativa.

El modelo KNF es difícilmente distinguible del modelo de MWC en los casos de cooperatividad positiva y la polémica sobre la validez de estos modelos para explicar los efectos homotrópicos en la interacción hemoglobina-oxígeno aún no ha finalizado. Un esquema del modelo de KNF se presenta en la Figura 1.

1.1.7 El modelo general

En 1967 M. Eigen puntualizó que el modelo de MWC y de KNF son casos extremos de un modelo general que incluye todas las posibles combinaciones; el esquema se asemeja a un tablero de ajedrez (Figura 1), que por razones de simetría para el caso de la hemoglobina serían 54 estados posibles. El modelo de KNF se mueve diagonalmente a través del tablero y el de MWC se mueve por los bordes superior e inferior del tablero (Figura 1).

El modelo general combina los dos modelos KNF y MWC y se han analizado todas las derivaciones matemáticas de las constantes (Eigen y col. 1967). Lamentablemente las expresiones matemáticas obtenidas son demasiado complejas como para emplearse en el ajuste de datos experimentales.

Décadas de investigación han llevado a la conclusión de que el mecanismo exacto

mediante el cual se lleva a cabo la transición alostérica es muy complejo. Además puede ser muy diferente entre una proteína y otra, aunque se han estudiado a fondo unos pocos arquetipos. Las bases moleculares del alosterismo han sido estudiadas en considerable detalle y para algunas proteínas bien conocidas su cambio conformacional es entendido a nivel atómico. Es así como el alosterismo se presenta como uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad enzimática y proteica en general (Tatkwong-lau y Fersht 1989, Changeux 1998, Fushinobu y col. 1998, Sakash y col. 2000, Bronagh y col. 2001, Goyal y col. 2001, Scoot y col. 2002, Fenton y Reinhart 2003, Gunasekaran 2004, Bray y Duke 2004, Ortigosa y col. 2004, Alvarez-Añorve y col. 2005, Vincent y col. 2005, Barroso, y col. 2005, Islam y col. 2005, Tsuruta y col. 2005).

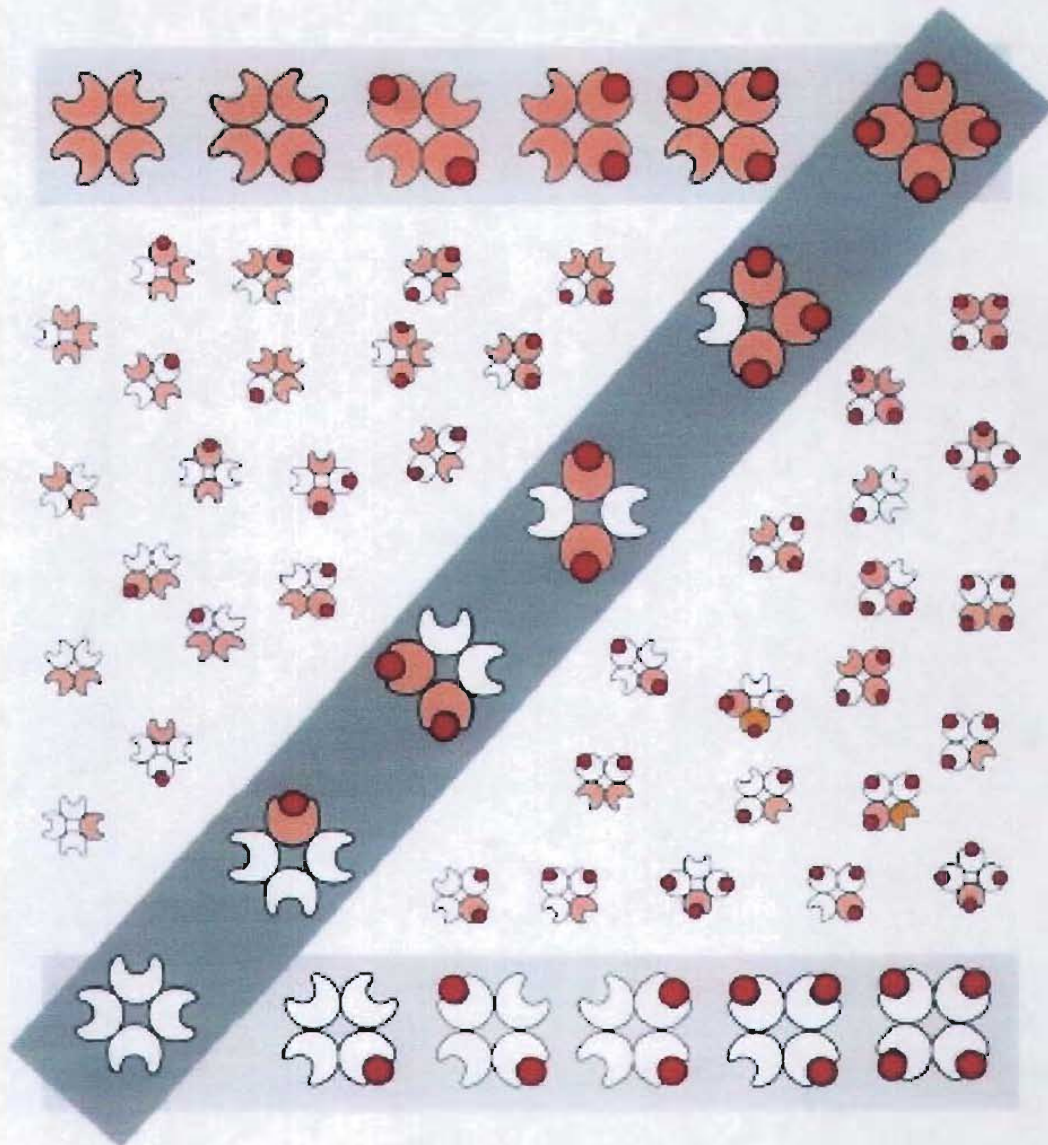


Figura 1. Estados de la molécula de hemoglobina predichos por diferentes modelos alostéricos. Para simplificar, la molécula se muestra como un arreglo simétrico de subunidades idénticas, cada una de las cuales puede existir en uno de 2 estados conformacionales (anaranjado o blanco) y pueden unir una molécula de oxígeno (esfera roja). Con este formalismo hay 54 diferentes estados conformacionales posibles de la molécula (asumiendo que los estados rotacionales y las imágenes especulares son equivalentes). Los estados conformacionales predichos por el modelo KNF o MWC son mostrados al doble del tamaño para resaltar. El modelo KNF asume que un estado conformacional se da cuando la subunidad es ocupada por el ligando, estos estados son mostrados en la diagonal gris oscuro. El modelo MWC asume que todas las subunidades adquieren la misma conformación simultáneamente, estos estados se muestran a lo largo de las barras horizontales en gris claro. El modelo general de alosteria incorpora los 54 posibles estados conformacionales de la molécula. En este modelo la progresión de un estado conformacional al siguiente es un proceso probabilístico gobernado por la mecánica estadística, note sin embargo que no todos los estados conformacionales están ocupados de igual forma y que la evidencia experimental muestra que los estados

conformacionales mas probables son los predichos por el modelo de MWC. Tomado de Bray y Duke 2004.

1.2 . La glucosamina 6 fosfato desaminasa de *Escherichia coli*

1.2.1. Generalidades

La glucosamina 6 fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6) de *E. coli* es un buen modelo para el estudio de las bases estructurales de la regulación alostérica. Esta enzima cataliza la isomerización y desaminación de la glucosamina 6 fosfato (GlcN6P) formando fructosa 6 fosfato (Fru6P) e ion amonio (Figura 2) (Comb y col. 1958, Milderfort y Rose, 1977, Calcagno y col. 1984).

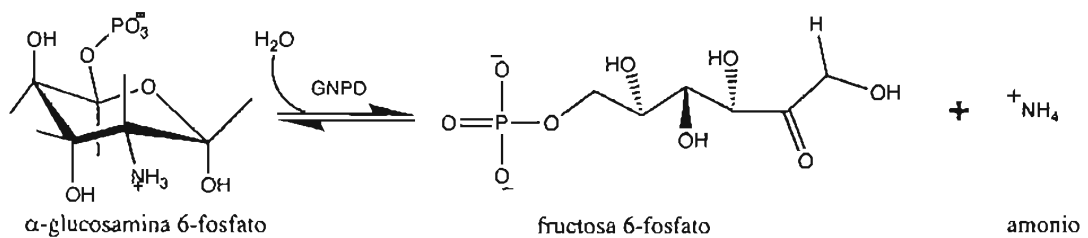


Figura 2. Reacción de isomerización y desaminación llevada a cabo por la GlcN6P desaminasa.

La enzima un hexámero de 266 residuos de aminoácidos por monómero, es muy importante para la regulación coordinada de la utilización y la síntesis de aminoazúcares por la bacteria (Figura 3) (Plumbridge y col. 1993, Alvarez-Añorve y col 2005). Los aminoazúcares son componentes de la pared celular bacteriana y pueden ser tomados del medio cuando están disponibles o sintetizados a partir de fructosa 6 fosfato y glutamina. La *N*-acetil-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P, activador alostérico de la GlcN6P desaminasa), juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de los genes del catabolismo (operón *nagBACDE*) y de la

biosíntesis (operón *glm SUM*) de los aminoazúcares (Plumbridge y col. 1990, 1993).

(Figura 4)

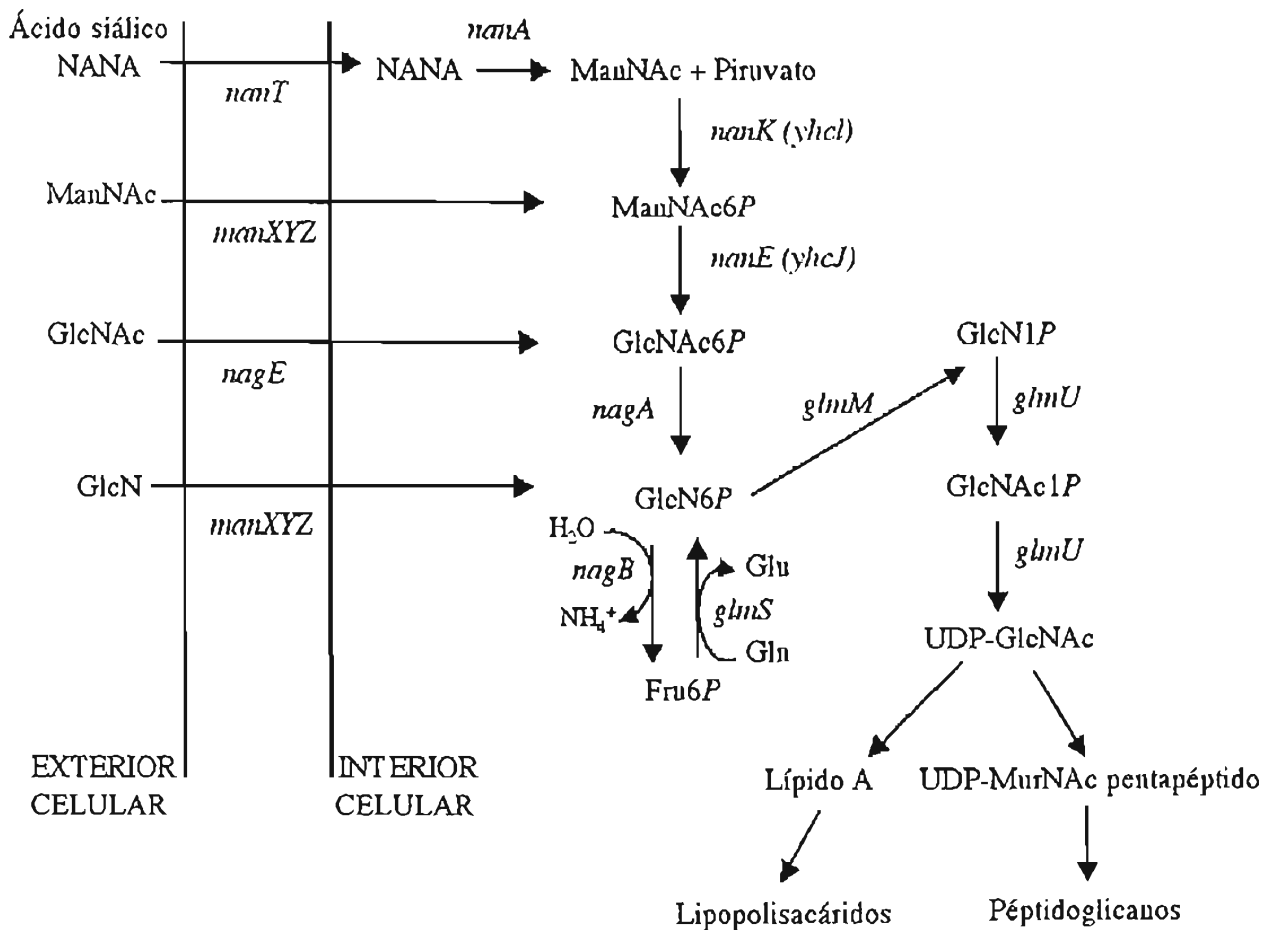


Figura 3. Metabolismo de los aminoazúcares en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) la vía biosintética (genes *glm*). Los que codifican para proteínas transportadoras de aminoazúcares son denominados *nanT*, *nanXYZ*, *nagE*. (Tomado de Plumbridge y Vimr, 1999 y Mengin-Lecreulx y Heijenoort 1996).

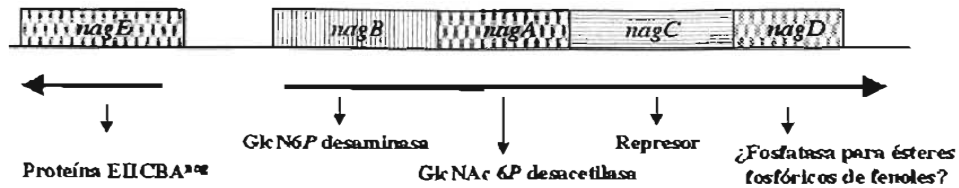


Figura 4. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (tomado de Plumbridge y col.1992).

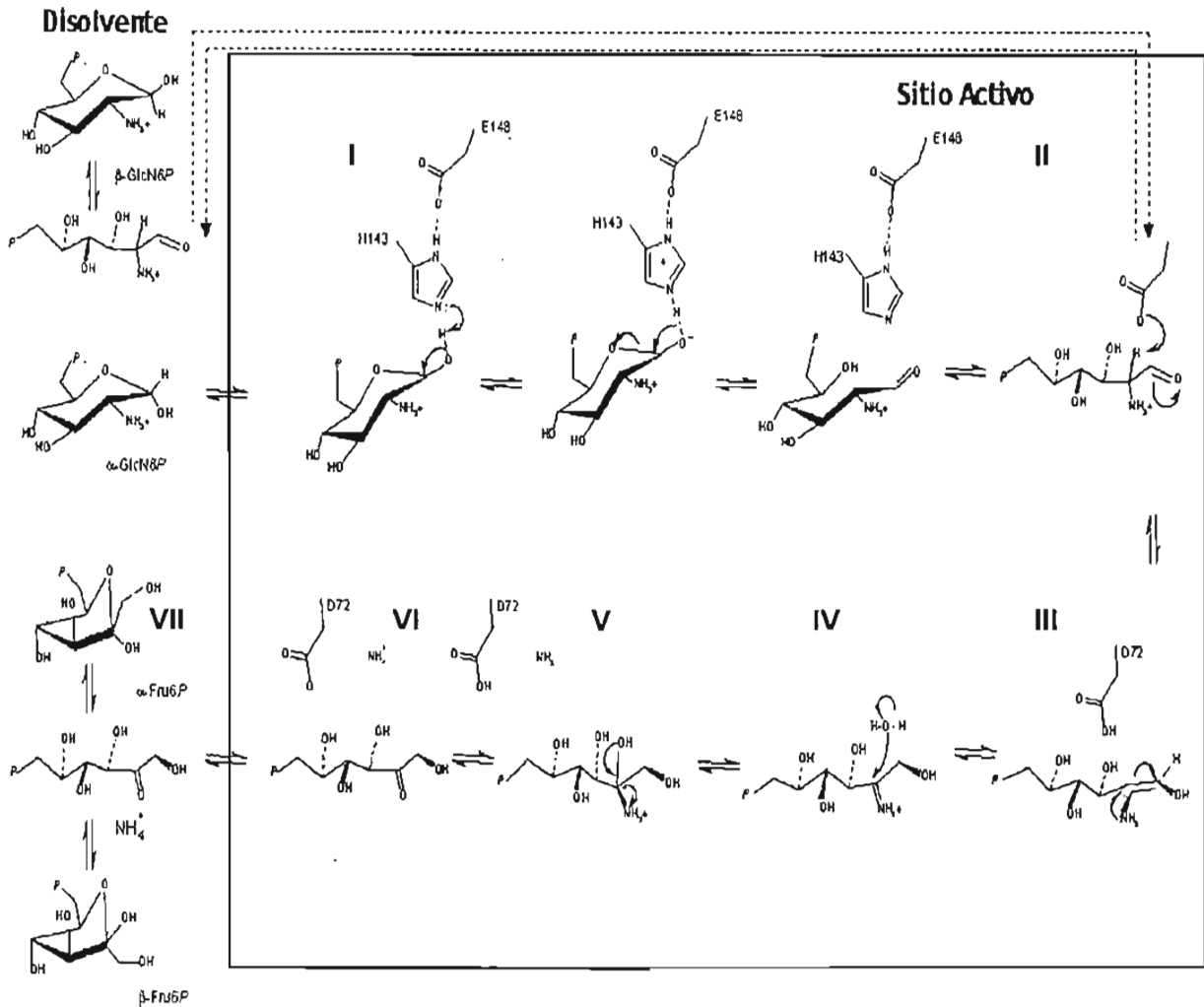
La GlcN6P deasaminasa fue descrita en riñón de cerdo (Leloir y Cardini 1956) y caracterizada posteriormente en *E. coli* (Comb y Roseman 1966), *Candida albicans* (Nataranjan y Datta 1993), corteza renal canina y bovina (Lara-Lemus y col. 1993, 1992) y de espermatozoides de *Metacricetus auratus* (hámster dorado) (Parrington y col. 1996). Más recientemente, Calcagno y col. han purificado y estudiado la GlcN6P desaminasa humana, correspondiente al gen del cromosoma 5, conocida como GNPI-1 (Álvarez-Añorve y col., no publicado). La estructura de esta enzima en su forma R con ion sulfato en sus doce sitios ligantes, se resolvió a una resolución de 1.75 Å por difracción de rayos (Arreola y col. 2004).

En el 2001 se logró clonar un gen parálogo de la GNPI-1 el cual se conoce como GNPI-2, pero su purificación y caracterización se encuentra aún en proceso.

1.2.2. Mecanismo catalítico de la GlcN6P desaminasa

El mecanismo químico de la reacción catalizada por la GlcN6P desaminasa fue descrito inicialmente por Midelfort y Rose (1977) y analizado en términos estructurales por Oliva y col. (1995) y por Montero-Morán y col. (2001), utilizando

mutagénesis dirigida y modificaciones químicas. El siguiente es un esquema de la visión actual del mecanismo catalítico de la enzima (esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de catalítico de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* I. Apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P, la cual queda unida a la enzima por su grupo amonio. II. El carboxilato del Asp72 sustrae un protón del C2. III. A la vez que ocurre el paso 2 se lleva a cabo la enolización entre C1 y C2 del aminoazúcar (formación de un *cis*-enol-amonio) IV. El protón del residuo 72 se transfiere al átomo de oxígeno del carbonilo en C1. V. Seguidamente una molécula de agua reacciona con el enlace π (C1=C2) del intermediario *cis*-enolamónio VI. La carbinolamina formada en el paso anterior pierde el protón del átomo de oxígeno en C2 (hacia el carboxilato de D72).VII. La especie anterior es sumamente inestable y mediante un mecanismo

concertado, el alcóxido formado oxida a C2 para formar un carbonilo cetónico y liberar amoniaco. (Tomado de Montero-Morán y col. 2001).

1.2.3. Estructura de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*

La estructura de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* ha sido estudiada por cristalografía de rayos X (Oliva y col. 1995, Horjales y col. 1999, Rudiño-Piñera y col. 2002). La enzima se presenta como un homohexámero constituido por monómeros de 266 aminoácidos (29.7 kDa) y presenta un eje de simetría de orden 2 y otro de orden 3, por lo que se puede describir como un dímero de trímeros o un trímero de dímeros, (Oliva y col.1995) (Figura 5). Cada monómero presenta un plegamiento de tipo α/β abierto con siete hebras β paralelas rodeadas por ocho hélices α ; además presenta tres hebras β antiparalelas, y entre dos de las cuales se encuentra una hélice α y una asa que conforman la tapa del sitio activo (Figura 6). El arreglo de plegamiento de esta proteína es único (llamado "GlcN6P deaminase fold") y es compartido con las 6P gluconolactonasas y las glucosamina 6P desaminasas de bacterias gram positivas como la de *Bacillus subtilis* (Vincent y col. 2005).

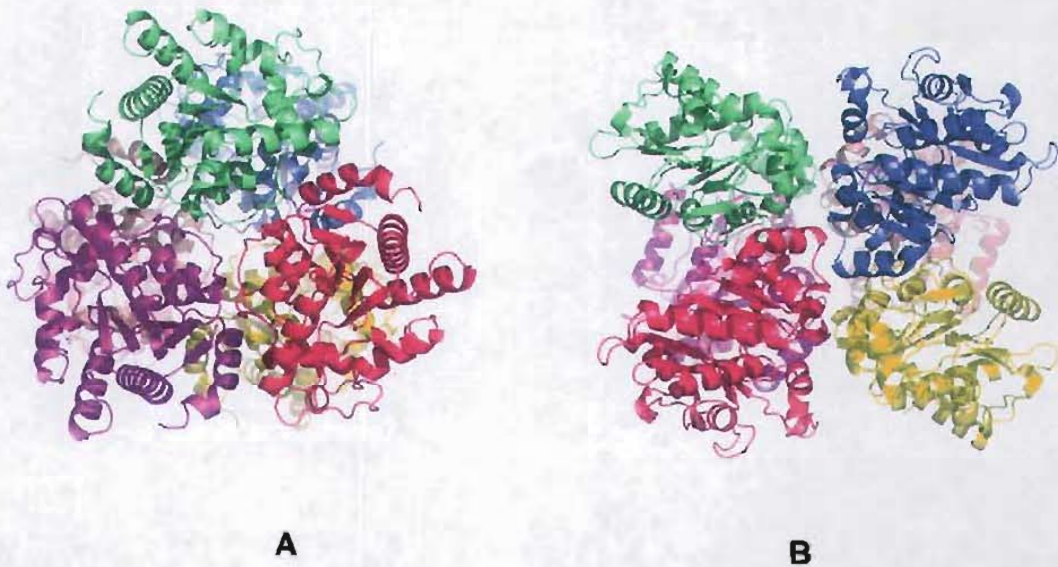


Figura 5. En A se muestra el hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* observado desde el eje de simetría de orden tres, en B se muestra un hexámero en vista lateral, mostrando un arreglo de dímero de trímeros. (Realizado en PyMol versión 0.98).

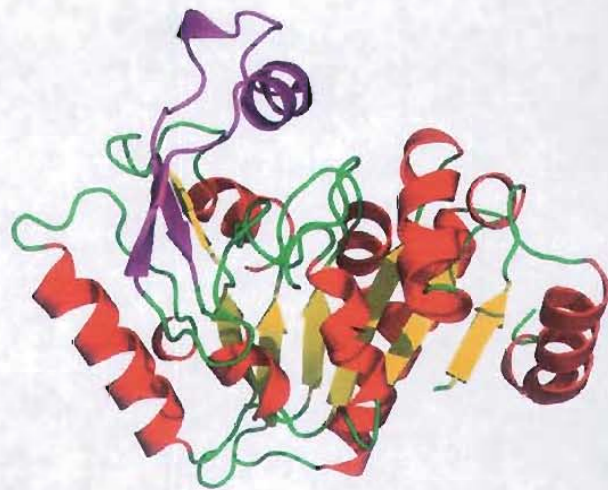


Figura 6. Monómero de la GlcN6P desaminasa donde se muestra la estructura terciaria α/β abierta. La tapa del sitio activo se muestra en morado.

1.2.4. El sitio activo

En el plegamiento de la GlcN6P desaminasa es característico que el sitio activo esté separado del disolvente por dos o más asas del extremo C-terminal. No existe en estas estructuras α/β abiertas un patrón uniforme en la estructura de la tapa del sitio activo, sin embargo la ubicación de esta tapa puede predecirse en la mayoría de los casos. La tapa de sitio activo contiene la hebra β (158-161) que posee dos residuos ligantes del fosfato del sitio alostérico, (Arg 158, Lys 160) y del grupo acetilo de la GlcNAc6P (Thr 161), un asa o giro (162–164), seguida de una hélice compleja (164-174); se trata de una hélice α que en el residuo 170 se transforma en una hélice 3_{10} , (una vuelta y media de hélice 3_{10}). El segmento 3_{10} contiene un residuo del sitio activo Arg172, que de acuerdo con la cristalografía (Oliva y col. 1995), une el grupo fosfato del sustrato. Al final de la hélice aparece el residuo Phe174, cuya cadena lateral se proyecta hacia una región hidrofóbica y es fundamental para mantener la estabilidad estructural de este motivo (Rudiño-Pinera y col. 2001, Bustos-Jaimes y col. 2002). Las interacciones de este motivo que forma la tapa del sitio activo además de ser un dispositivo para aislar el complejo enzima-sustrato del disolvente acuoso, desempeña un papel clave en la conexión del sitio activo con el sitio alostérico. La cavidad del sitio activo se localiza entre la tapa del sitio activo, la hélice 5, el asa que va del residuo 175 al 183 y el “bolsillo” formado por el asa 3 (40-46), asa 10 (137-158) y el asa 6 (72-84) (Figura 7).

El motivo 136 a 158 contiene residuos que forman parte del sitio catalítico de la GlcN6P desaminasa. En la estructura cristalográfica del complejo que la

enzima forma con el inhibidor competitivo la glucitolamina-6-P (GlcN-ol-6P), la GlcN-ol-6P se orienta hacia el N ϵ 2 de la His143; a su vez esta histidina hace contacto a través de su N δ 1 con el O δ 1 del Asp141 a una distancia de interacción de 2.9 Å y con el O ϵ 1 del Glu148 (3.1 Å). Este arreglo recuerda el sistema intercambiador de protones presente en algunas enzimas, como las proteasas de serina, pero con un grupo ácido extra (Oliva y col.1995). Otro residuo importante es el Asp72, que está orientado hacia el C2 del GlcN-ol-6P haciendo interacción de puente de hidrógeno (2.9 Å) con el O1 del (GlcN-ol-6P). (Figura 7).

La estructura del sitio activo modelado con el sustrato en su forma cíclica muestra que el O5 del anillo piranosico, está en contacto con el N ϵ 2 de la His143; esta estructura corresponde a la enzima en su conformación R. En la forma T (cristalizada sin ligandos) se aprecia que la cadena lateral del Glu148 se dirige al sitio alostérico, alejándose de la His143, para hacer un puente salino con la Lys160 (Horjales y col. 1999) (Figura 7).

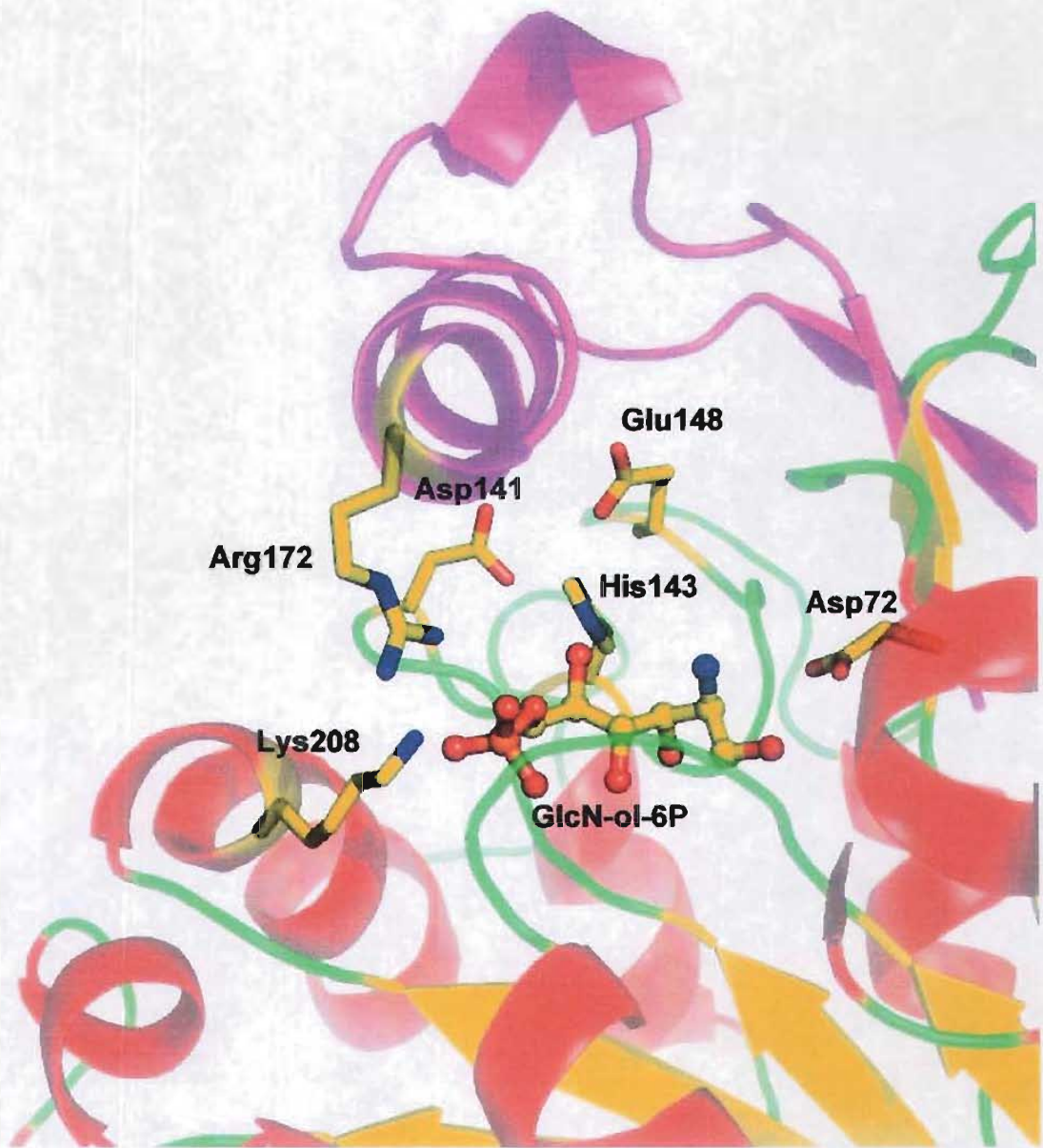


Figura 7. Sitio activo de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* ocupado con una molécula de GlcN-ol-6P. Se muestran los residuos de aminoácidos involucrados en el pegue del fosfato y los residuos de aminoácidos catalíticos, la tapa del sitio activo esta representada en morado.(hecho en PyMol versión 0.98)

1.2.5. El sitio alostérico.

Los sitios alostéricos se encuentran en los espacios entre las subunidades que forman los trímeros (Figura 8), de modo que dos subunidades vecinas contribuyen a formar los sitios de unión del activador. Esto significa que al

unirse el ligando alostérico se establecen nuevos contactos entre las subunidades.

El sitio alostérico se encuentra totalmente desarmado en el conformero T. Los residuos que participan en la unión del fosfato de la GlcNAc6P son el extremo amino terminal de una subunidad y los residuos Arg158, Lys160, Ser151 y el grupo amino de la cadena principal de Ser152 de la subunidad adyacente (Figura 8). Otros residuos importantes son la Tyr121 y la Tyr254, la primera se encuentra asociada a cambios estructurales y funcionales generados por la unión del ligando del sitio activo (Altamirano y col. 1994).

Los datos cristalográficos del conformero R muestran que la Tyr254 forma parte del sitio alostérico (Oliva y col. 1995) pero no participa directamente en la unión de la GlcNAc6P. La Tyr254 forma un puente de hidrógeno a través de su hidroxilo fenólico con el residuo Thr161 de la cadena polipeptídica vecina, pero esta interacción se desplaza al grupo CO de la cadena principal en la posición 149 cuando la enzima se encuentra en la forma T. El grupo amino terminal está a más de 10Å de distancia de la Lys158 y de la Arg160. En este conformero el sitio está más abierto que en la forma R, la repulsión electrostática generada por todos los residuos cargados que se localizan en esta región, puede ser un componente importante en la estabilidad termodinámica de la forma T. (Lara-González tesis doctoral, resultados no publicados).

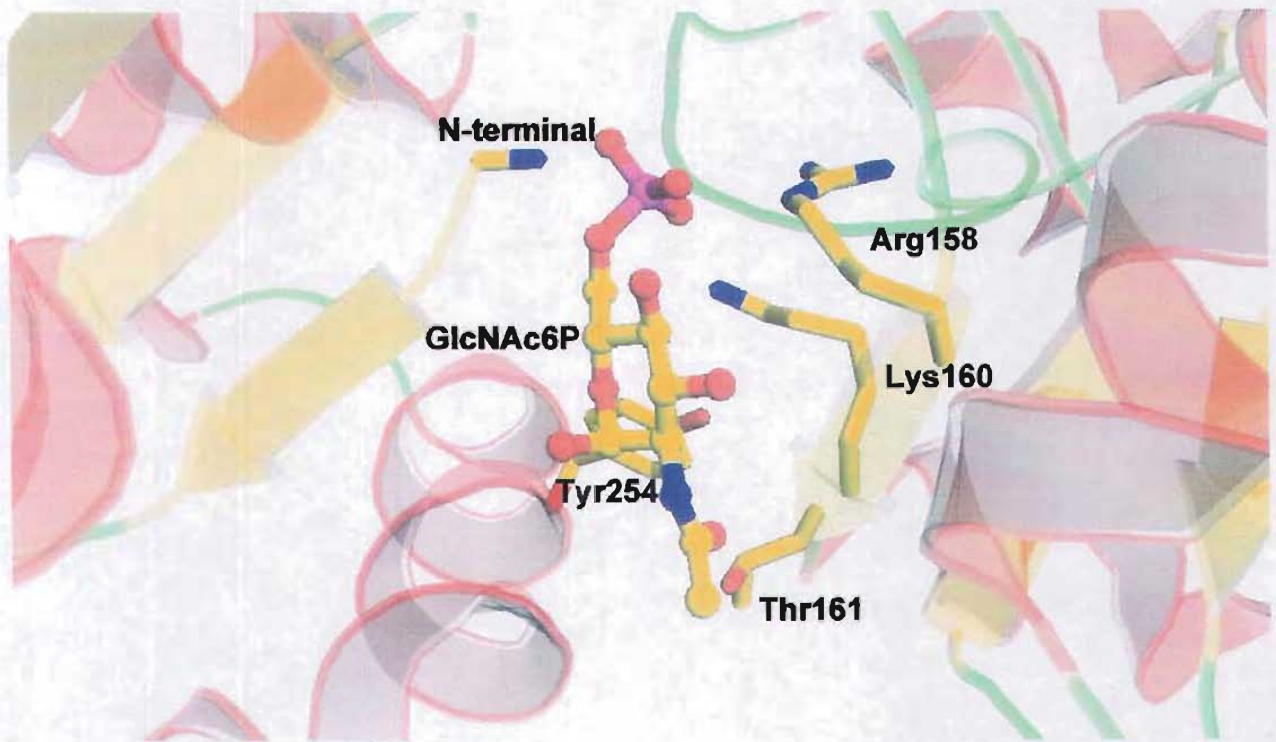


Figura 8. Sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa *E.coli* ocupado con una molécula de GlcNAc6P, se muestran los residuos involucrados en la unión del activador alostérico (Hecho en Pymol 0.98).

1.2.6. Cinética de la GlcN6P desaminasa

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* presenta un mecanismo cinético de equilibrio rápido y exhibe cooperatividad homotrópica positiva con respecto a sus sustratos, la GlcN6P y la fructosa 6P; la cinética alostérica de esta enzima se puede explicar con el modelo concertado de MWC, para el caso de fijación exclusiva del activador y fijación no exclusiva del sustrato (Calcagno y col. 1984). La GlcNAc6P activa a la enzima incrementado su afinidad aparente por el sustrato, sin cambiar el valor de la k_{cat} (sistema *K*). La GlcNAc6P se une exclusivamente a la forma R produciendo cinéticas hiperbólicas a concentraciones saturantes (Altamirano y col.

1995) (Figura 9). Un sistema K no implica necesariamente que $k_{cat}^R = k_{cat}^T$, como ha sido demostrado por Cisneros y col. (2004).

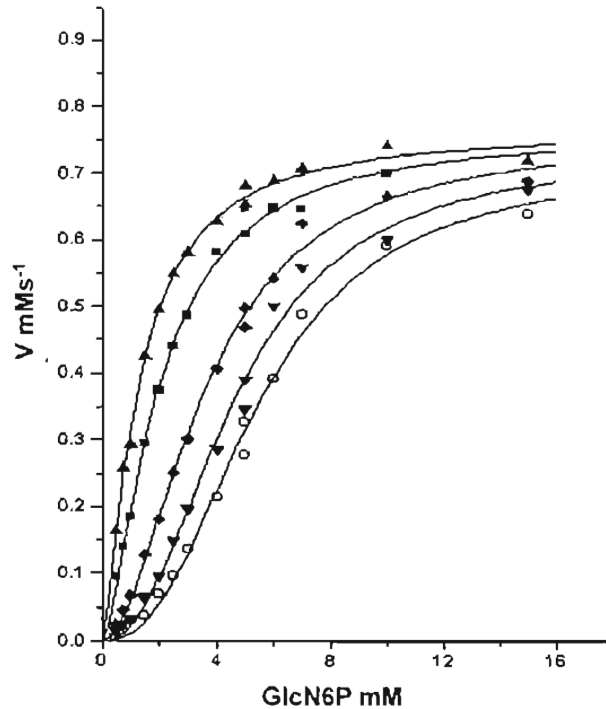


Figura 9. Curvas de velocidad vs concentración de sustrato, en ausencia y a concentraciones crecientes de activador, de la GlcN6P desaminasa de *E.coli*. \circ sin activador, \blacktriangledown 0.05 mM de activador \blacklozenge 0.1 mM de activador \blacksquare 0.5 mM de activador \blacktriangle 1mM de activador. Tomado de Montero-Morán 1998.

1.2.7. Transición alostérica en la GlcN6P desaminasa

Se ha obtenido la estructura cristalográfica de la enzima en las formas R (PDB 1dea, 1hor, 1hot) y T (PDB 1cd5, 1fsf) y se han descrito los cambios estructurales producidos por la transición alostérica (Oliva y col. 1995, Horjales y col. 1999, Rudiño-Piñera y col. 2001). La transición implica un rearrreglo de la estructura cuaternaria de la enzima, que se describe como una rotación de cuerpo rígido en dos regiones en cada subunidad del hexámero, que giran alrededor de

un eje paralelo al eje de orden tres. La comparación de los contactos entre las subunidades en las seis superficies interfaciales heterólogas alrededor del eje de simetría triple revela que la transición T-R crea y rompe varias de estas interacciones. Un cambio llamativo en esta cara de contacto, que se asocia con la transición cuaternaria, es el desplazamiento de la cadena lateral de la Tyr254, que cambia su contacto con la subunidad vecina, funcionando a la manera de un interruptor de dos posiciones. En la forma T, el OH fenólico construye un puente de hidrógeno con el CO del esqueleto polipeptídico en el residuo 149, mientras que en el conformero R el contacto se recorre a la posición 161. Al suprimir esta interacción por mutagénesis (Tyr254-Phe) (Montero-Morán y col. 1998) se obtiene una enzima con la misma estructura pero en la que la afinidad de la forma T por la GlcN6P disminuye casi un orden de magnitud (aumento del parámetro c en la ecuación de MWC). La interacción suprimida es una de las que contribuyen a la distorsión mínima pero crítica del sitio activo, disminuyendo su afinidad por el sustrato. La liberación de esta interacción lleva a la enzima a una estructura terciaria T más cercana a la de R, con el consiguiente cambio en el ΔG_w^0 ($\Delta\Delta G_w^0$) de 4.9 kJ mol^{-1} (Montero-Morán y col. 1998). Otras modificaciones producen cambios en la misma dirección, como por ejemplo la transaminación química específica del grupo amino terminal, que suprime una interacción del amino terminal con un CO del esqueleto polipeptídico en la posición 151 (Lara-González y col. 2000). Los efectos son parecidos a los producidos por la mutación Tyr254-Phe, lo que revela que en la transición de T a R se pierde otro contacto que contribuye a que la forma T tenga una baja afinidad por el sustrato.

Estos mecanismos permiten la conexión funcional entre en el sitio alostérico

y el sitio catalítico, están mediados por el motivo $\beta\alpha\beta$ que forma la tapa cuya porción basal es parte del sitio alostérico y de una de las caras de contacto heterólogas del hexámero (Rudiño-Piñera y col. 2002).

Recientemente, Bustos-Jaimes y col. (2005) utilizando fluorescencia intrínseca de triptofanos colocados en posiciones previamente seleccionadas, confirmaron la existencia de por lo menos dos mecanismos distintos de inicio de la transición cuaternaria, uno para cada tipo de sitio ligante.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los fenómenos alostéricos han sido estudiados por métodos cinéticos y fisicoquímicos, métodos de biología estructural combinados con técnicas de ingeniería de proteínas. Sin embargo, el uso de mutantes sitio específicas para el estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa tiene la limitación de generar oligómeros en los que todas las subunidades son portadoras de la misma o las mismas mutaciones.

En nuestro laboratorio se han construido mutantes que afectan la unión de los sustratos, que suprimen el sitio alostérico, que transforman el sistema de activación en uno del tipo V o que reducen drásticamente la catálisis sin afectar significativamente la unión de los sustratos o inhibidores competitivos (Altamirano y col. 1992, 1993, 1994, 1995. Montero-Morán y col. 1998, 2001, Lara-González y col. 2000, Bustos-Jaimes y col. 2002, 2005, Cisneros y col. 2004).

La estructura de dímero de trímeros, con dos tipos de caras de contacto entre subunidades vecinas (tres intercaras en los tres ejes dobles y seis en el eje triple, tres en cada trímero) plantea el problema de la propagación de la transición

y el sitio catalítico, están mediados por el motivo $\beta\alpha\beta$ que forma la tapa cuya porción basal es parte del sitio alostérico y de una de las caras de contacto heterólogas del hexámero (Rudiño-Piñera y col. 2002).

Recientemente, Bustos-Jaimes y col. (2005) utilizando fluorescencia intrínseca de triptofanos colocados en posiciones previamente seleccionadas, confirmaron la existencia de por lo menos dos mecanismos distintos de inicio de la transición cuaternaria, uno para cada tipo de sitio ligante.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los fenómenos alostéricos han sido estudiados por métodos cinéticos y fisicoquímicos, métodos de biología estructural combinados con técnicas de ingeniería de proteínas. Sin embargo, el uso de mutantes sitio específicas para el estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa tiene la limitación de generar oligómeros en los que todas las subunidades son portadoras de la misma o las mismas mutaciones.

En nuestro laboratorio se han construido mutantes que afectan la unión de los sustratos, que suprimen el sitio alostérico, que transforman el sistema de activación en uno del tipo V o que reducen drásticamente la catálisis sin afectar significativamente la unión de los sustratos o inhibidores competitivos (Altamirano y col. 1992, 1993, 1994, 1995. Montero-Morán y col. 1998, 2001, Lara-González y col. 2000, Bustos-Jaimes y col. 2002, 2005, Cisneros y col. 2004).

La estructura de dímero de trímeros, con dos tipos de caras de contacto entre subunidades vecinas (tres intercaras en los tres ejes dobles y seis en el eje triple, tres en cada trímero) plantea el problema de la propagación de la transición

cuaternaria concertada. Las evidencias cinéticas y espectrofotométricas sugieren que está parece propagarse de igual manera en ambas interfases.

Las mutaciones interfaciales nunca han creado asimetrías en la activación homotrópica (Bustos-Jaimes 2005). La activación asimétrica por GlcNAc6P ha sido descrita en las mutantes Tyr121-Ser y Tyr121-Thr (Altamirano y col. 1995), lo que aún no ha recibido una explicación estructural.

Otra situación sin resolver es que la forma T de la enzima no ha sido caracterizada cinéticamente, ya que se carece de un inhibidor alostérico de fijación exclusiva para este conformero y no se ha encontrado como bloquear la enzima en el conformero T por mutagénesis. Una evidencia de que la forma T es catalítica la obtuvo recientemente Cisneros y col. (2004).

Por otra parte, un estudio termodinámico de la transición homotrópica (Bustos Jaimes y col., 2000) muestra que el equilibrio alostérico alcanza un $\Delta G^\circ = 0$ cuando están llenos tres sitios activos ($n/2$) con moléculas de GlcN6P. Esta conclusión parece ser una propiedad inherente al modelo de MWC (Bustos Jaimes, comunicación personal).

Si bien se ha teorizado, para esta enzima, sobre la base de dos estados conformacionales límites, R y T, existen evidencias estructurales (Rudiño-Piñera y col. 2001) y espectrofotométricas (Bustos-Jaimes y col. 2002) sobre la movilidad independiente del motivo que forma la tapa del sitio activo. Esto lleva a plantear la existencia de sub-estados conformacionales locales con estructura cuaternaria R, pero no propagados a todo el hexámero, que hasta ahora han escapado a la experimentación cinética y termodinámica. Éstas y otras situaciones sin resolver sobre el comportamiento alostérico de esta enzima, pueden contestarse mediante

el uso de mutantes sitio específicas localizadas en algunas de las subunidades del hexámero, formando heterohexámeros mixtos con cadenas silvestres.

2.1. Construcción de heterohexámeros como herramienta para el estudio de las proteínas alostéricas.

La formación *in vitro* de heterooligómeros entre subunidades silvestres y mutantes, y la producción de quimeras cuaternarias de proteínas alostéricas, ha sido usada como una herramienta para explorar la transmisión intramolecular de señales regulatorias. Los pioneros en este tipo de estudios fueron Tatkwong-lau y Fersht (1989) que construyeron heterotetrámeros con dos mutantes de la fosfofructocinasa de *E. coli* y dilucidaron el mecanismo mediante el cual se une el activador alostérico de esta enzima. El grupo de Engel construyó heterooligómeros de la glutamato deshidrogenasa de *Clostridium symbiosium* para estudiar el mecanismo de comunicación entre las subunidades de esta enzima hexámerica, utilizando híbridos 1:5 de dos mutantes (Goyal y col. 2001). Igualmente, este mismo grupo, logró establecer que una sola subunidad mutada no disminuía la k_{cat} de la enzima (Bronagh y col. 2001). Por otro lado Sakash y col. (2000), utilizando una técnica similar, establecieron que sólo dos interacciones de las seis posibles que involucran al residuo Glu239 de la aspartato transcarbamoilasa de *E. coli*, eran suficientes para restaurar tanto la transición homotrópica como la heterotrópica de esta enzima. Scoot y col. (2002), usando híbridos de la fructosa 1,6 bisfosfatasa de hígado de cerdo, demostraron que en esta enzima existen varias rutas para la inhibición alostérica. Fushinobu y col. (1998) trabajando con híbridos de la lactato deshidrogenasa de la bacteria *Bifidobacterium longum* comprobaron que la enzima

mantenía su simetría durante la transición alostérica. Más recientemente, el grupo de Reinhart construyó heterotetrámeros de la fosfofructocinasa de *Bacillus stearothermophilus* y describió una red de comunicación alostérica en esta enzima (Ortigosa y col. 2004). Con esta misma herramienta se averiguó el mecanismo de inhibición por sustrato de la fosfofructocinasa de *E. coli*. (Fenton y Reinhart 2003).

La herramienta de la construcción de híbridos cuaternarios puede ser valiosa para el estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

3. OBJETIVO

Construir heterohexámeros de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* que contengan subunidades silvestres y subunidades mutantes que sean incapaces de unir ligandos del sitio activo, como una herramienta para estudiar cómo se desencadenan y se propagan los cambios conformacionales, que son la base de la transición alostérica y la cooperatividad en esta enzima.

4. METODOLOGIA

4.1 Diseño y construcción de mutantes en los residuos Arg172A y Lys208-Glu

Los modelos cristalográficos de la GlcN6P desaminasa (Figura 7), sugieren la importancia de los residuos Arg172 y Lys208, en la unión del sustrato. Por esta razón decidimos mutar ambos residuos para buscar una o varias mutantes que perdieran la capacidad de unir los ligandos del sitio activo, con el fin de utilizarlas en la construcción de los heterohexámeros.

mantenía su simetría durante la transición alostérica. Más recientemente, el grupo de Reinhart construyó heterotetrámeros de la fosfofructocinasa de *Bacillus stearothermophilus* y describió una red de comunicación alostérica en esta enzima (Ortigosa y col. 2004). Con esta misma herramienta se averiguó el mecanismo de inhibición por sustrato de la fosfofructocinasa de *E. coli*. (Fenton y Reinhart 2003).

La herramienta de la construcción de híbridos cuaternarios puede ser valiosa para el estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

3. OBJETIVO

Construir heterohexámeros de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* que contengan subunidades silvestres y subunidades mutantes que sean incapaces de unir ligandos del sitio activo, como una herramienta para estudiar cómo se desencadenan y se propagan los cambios conformacionales, que son la base de la transición alostérica y la cooperatividad en esta enzima.

4. METODOLOGIA

4.1 Diseño y construcción de mutantes en los residuos Arg172A y Lys208-Glu

Los modelos cristalográficos de la GlcN6P desaminasa (Figura 7), sugieren la importancia de los residuos Arg172 y Lys208, en la unión del sustrato. Por esta razón decidimos mutar ambos residuos para buscar una o varias mutantes que perdieran la capacidad de unir los ligandos del sitio activo, con el fin de utilizarlas en la construcción de los heterohexámeros.

mantenía su simetría durante la transición alostérica. Más recientemente, el grupo de Reinhart construyó heterotetrámeros de la fosfofructocinasa de *Bacillus stearothermophilus* y describió una red de comunicación alostérica en esta enzima (Ortigosa y col. 2004). Con esta misma herramienta se averiguó el mecanismo de inhibición por sustrato de la fosfofructocinasa de *E. coli*. (Fenton y Reinhart 2003).

La herramienta de la construcción de híbridos cuaternarios puede ser valiosa para el estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

3. OBJETIVO

Construir heterohexámeros de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* que contengan subunidades silvestres y subunidades mutantes que sean incapaces de unir ligandos del sitio activo, como una herramienta para estudiar cómo se desencadenan y se propagan los cambios conformacionales, que son la base de la transición alostérica y la cooperatividad en esta enzima.

4. METODOLOGIA

4.1 Diseño y construcción de mutantes en los residuos Arg172A y Lys208-Glu

Los modelos cristalográficos de la GlcN6P desaminasa (Figura 7), sugieren la importancia de los residuos Arg172 y Lys208, en la unión del sustrato. Por esta razón decidimos mutar ambos residuos para buscar una o varias mutantes que perdieran la capacidad de unir los ligandos del sitio activo, con el fin de utilizarlas en la construcción de los heterohexámeros.

Las mutaciones se realizaron por mutagénesis dirigida utilizando el protocolo de Stratagene[®]. La mutante Arg172-Ala se construyó sobre el gen de la enzima silvestre y la doble mutante sobre el gen de la mutante Lys208-Glu, que al igual que la mutante Lys208-Val, se habían obtenido previamente en el laboratorio. Los genes *nag B* (silvestre y mutantes) estaban insertados en el vector pTZ18R. Con este vector se transformó la cepa de *E. coli* IBPC590, que es Δnag y $\Delta lacI$. Con este vector se expresa constitutivamente la desaminasa y, por lo que es Δnag , no tiene expresión cromosómica del gen *nagB*. Para verificar la inserción de las mutaciones se realizó secuenciación de DNA de doble cadena para cada una de las mutantes.

4.2. Sobreexpresión, purificación y caracterización de la GlcN6P desaminasa silvestre y mutantes Arg172-Ala, Lys208-Glu, Lys208-Val y la doble mutante Arg172-Ala:Lys208-Glu.

Con la idea de establecer cuál o cuáles de las mutantes diseñadas cumplía con el requisito de ser incapaz de unir los ligandos del sitio activo, se realizó el estudio cinético de las mutantes Arg172-Ala, Lys208-Val, Lys208-Glu y la doble mutante Arg172-Ala:Lys208-Glu. También se estudió la unión de ligandos por dicroísmo circular (DC) en el ultravioleta cercano para la mutante Arg172-Ala:Lys208-Glu y se titularon con DTNB las cisteínas de la doble mutante Arg172-Ala:Lys208-Glu y de la mutante Lys208-Glu. Está bien establecido que los cambios en el DC en el UV cercano y la reactividad de los tioles de las cisteínas 118 y 239 sirven para monitorear la transición alostérica de esta enzima

(Altamirano y col. 1992,1993, Bustos-Jaimes y col. 2002). Se encontró que el residuo Arg172 es fundamental para la unión de los ligandos del sitio activo en el conformero T y por lo tanto es fundamental para el desencadenamiento de la transición de T a R. Este trabajo ha sido enviado para publicación a la revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Su aceptación fue condicionada al envío de una versión revisada. (En el anexo se adjunta el manuscrito y la carta del editor).

4.3. Determinación de la concentración de urea necesaria para disociar la GlcN6P desaminasa

La EcGlcN6P desaminasa es una proteína muy estable a la disociación por dilución, a diferencia de otras enzimas como la fosfofructocinasa de *E. coli* (Fenton y col. 2003). Por tal razón buscaron otros medios para disociar la enzima como primer paso para poder construir heterohexámeros. Para tal fin se usó urea como agente disociante. Con la finalidad de establecer la concentración de urea y el tiempo necesario para lograr este efecto, la enzima, a una concentración de 3 μ M, fue expuesta a concentraciones de urea entre 2 a 9 M. A cada una de estas mezclas de enzima y desnaturizante se le verificó la actividad enzimática a concentraciones saturantes de sustrato y activador alostérico. Como control se utilizó la enzima en igual concentración pero disuelta en amortiguador Tris 50 mM pH 7.7. Las mediciones se realizaron a los 5, 15, 25, 35, 45, 55 y 65 minutos y a las 18 y 24 horas.

4.4. Disociación y reasociación de la Glucosamina 6P desaminasa de *E. coli*.

El segundo paso para la construcción de los heterohexámeros fue lograr que la enzima disociada se pudiese reasociar formando nuevamente el hexámero activo. Para establecer las condiciones de disociación y reasociación de la GlcN6P desaminasa, la enzima fue expuesta a urea 8 M por diferentes tiempos (5 minutos, 1, 2, 18 y 24 horas) seguida de cromatografía de filtración molecular en la columna Superdex S-200 (Amershan Pharmacia). La columna había sido calibrada con proteínas de radio de Stokes conocido. La columna previamente equilibrada con amortiguador Tris 50 mM pH 7.7, fue cargada con la muestra y se corrió durante una hora a un flujo de 0.5 cm min^{-1} ($= 0.5 \text{ mL min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) en un cromatógrafo Waters 600S. Está reportado que la matriz en la columna facilita el replegamiento *in vitro* de las proteínas. (Altamirano y col.1999, Fahey y col. 2000, Li y col. 2004).

4.5. Diseño y Construcción de la triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu.

La caracterización de las mutantes Arg172-Ala, Lys208-Val, Lys208-Glu y de la doble mutante Arg172-Ala:Lys208-Glu mostró que todas ellas, excepto la Lys208-Val, son inactivas en ausencia de activador. Esto las hace adecuadas para la construcción de los heterohexámeros que nos interesan. Nos decidimos por la doble mutante ya que, además de cumplir la condición anterior, nos permite generar una diferencia de pI con respecto a la enzima silvestre, lo que facilita su separación por electroforesis o isoelectroenfoque nativos y por cromatografía de intercambio iónico. Con la finalidad de identificar a los diferentes heterohexámeros

formados utilizando la secuenciación de Edman, se añadió la mutación Leu3-Ile. La mutación se realizó por mutagénesis dirigida sobre el gen de la doble mutante Arg172-Ala:Lys208-Glu y se verificó por secuenciación de DNA de doble cadena.

4.6 Caracterización de la triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu.

La mutante fue caracterizada cinéticamente y se verificó su estabilidad estructural por cromatografía de filtración molecular en la columna Superdex S-200 en condiciones nativas, de la misma forma como se realizó para la enzima silvestre. Para corroborar si el patrón de disociación / reasociación era igual al de la enzima silvestre, se incubó la enzima en urea 8 M durante 5 minutos y se pasó luego por la columna de filtración molecular. El cambio de pI de la triple mutante se verificó por electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 4, 6 y 8%, isoelectroenfoque y cromatografía de intercambio aniónico (columna Waters AP-1), utilizando como referencia la enzima silvestre.

4.7. Construcción de heterohexámeros.

Para construir los heterohexámeros de las enzimas triple mutante y silvestre, éstas se mezclaron en proporciones de 1:1, 5:1, o 1:5 a una concentración final de proteína de 10 μ M, en urea 8 M, durante 5 minutos, al cabo de los cuales la mezcla se pasó por la columna de filtración molecular analítica de Supérdex 200 o para producir heterohexámeros en gran cantidad la columna preparativa Hi-load S-200, a un flujo de 0.5 cm min⁻¹ durante 1 hora en la columna analíticas o 4 horas en la columna preparativa.

Se colectaron los diferentes picos y se concentraron por centrifugación a 3000 x g durante media hora en tubos Amicon Ultra (Millipore) con filtros de corte en 10.000 Da. Todas las fracciones se ensayaron para actividad a concentración saturante de sustrato y activador. El pico correspondiente a los hexámeros se utilizó para el siguiente paso, que es la separación de las diferentes especies híbridas.

4.8. Separación de los heterohexámeros.

Las especies híbridas que teóricamente se pueden formar para una proteína hexamérica de simetría 32 son 11, distribuidas en la siguiente forma: un híbrido 5:1, tres isómeros del híbrido 4:2, tres isómeros 3:3, tres isómeros 2:4 y un híbrido 1:5, además de los correspondientes homohexámeros silvestre y mutante (Figura 18). Aprovechando la diferencia de pI existente entre ambas enzimas se realizó la separación de las diferentes especies híbridas por cromatografía de intercambio aniónico en la columna Waters AP-1 a un flujo de 0.5 cm min⁻¹. La proteína se cargó en Tris HCl 50 mM a pH 7.5 y KCl 20 mM, y se eluyó con un gradiente lineal de KCl de 120 a 300 mM durante tres horas. Las fracciones colectadas se concentraron en tubos Amicon (Millipore) de corte en 10.000 Da.

4.9. Identificación de los heterohexámeros.

Para identificar las diferentes especies híbridas a las fracciones colectadas en el punto anterior se les realizó la secuenciación amino terminal por el método de Edman. También se realizaron electroforésis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no denaturalizantes, de cada uno de los picos colectados.

4.10. Caracterización cinética del heterohexámero 3:3.

Se procedió a caracterizar cinéticamente el heterohexámero 3:3 de acuerdo al protocolo descrito en el manuscrito anexo sección de metodología. Los ensayos se hicieron sin activador y en presencia de activador a concentraciones que variaron entre 0.1 a 2.5 mM.

4.11. Reactividad de tioles con DTNB en el heterohexámero 3:3

A los heterohexámeros 3:3 se les midió la reactividad de los tioles de igual forma como se hizo para las mutantes Lys208-Glu y la doble y triple mutantes Arg172-Ala:Lys208-Glu, Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu como se describe en el manuscrito anexo sección de metodología.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de la concentración de urea necesaria para disociar la GlcN6P desaminasa.

Como primer paso, se estudió el efecto de la urea sobre EcGNPD silvestre. Se expuso la enzima (3 μ M) a concentraciones de urea entre 2 a 9 M y se le midió la actividad a concentraciones saturantes de sustrato y activador alostérico, en muestras tomadas entre los 5 y los 65 minutos de exposición a la urea. Se observó que sólo las concentraciones de urea 8 y 9 M tenían un efecto inactivante sobre la enzima, el cual ya se hacía evidente a los 5 minutos de exposición a la urea, los resultados se muestran en la Figura 10. Con base en estos resultados se decidió usar urea 8 M para realizar el estudio de la disociación de la GlcN6P.

4.10. Caracterización cinética del heterohexámero 3:3.

Se procedió a caracterizar cinéticamente el heterohexámero 3:3 de acuerdo al protocolo descrito en el manuscrito anexo sección de metodología. Los ensayos se hicieron sin activador y en presencia de activador a concentraciones que variaron entre 0.1 a 2.5 mM.

4.11. Reactividad de tioles con DTNB en el heterohexámero 3:3

A los heterohexámeros 3:3 se les midió la reactividad de los tioles de igual forma como se hizo para las mutantes Lys208-Glu y la doble y triple mutantes Arg172-Ala:Lys208-Glu, Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu como se describe en el manuscrito anexo sección de metodología.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de la concentración de urea necesaria para disociar la GlcN6P desaminasa.

Como primer paso, se estudió el efecto de la urea sobre EcGNPD silvestre. Se expuso la enzima (3 μ M) a concentraciones de urea entre 2 a 9 M y se le midió la actividad a concentraciones saturantes de sustrato y activador alostérico, en muestras tomadas entre los 5 y los 65 minutos de exposición a la urea. Se observó que sólo las concentraciones de urea 8 y 9 M tenían un efecto inactivante sobre la enzima, el cual ya se hacía evidente a los 5 minutos de exposición a la urea, los resultados se muestran en la Figura 10. Con base en estos resultados se decidió usar urea 8 M para realizar el estudio de la disociación de la GlcN6P.

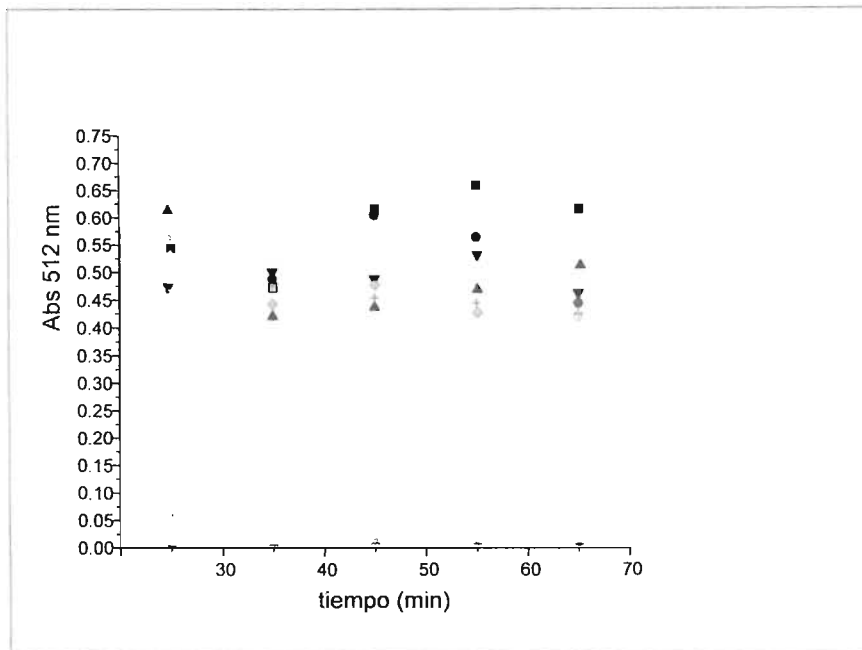


Figura 10. Inactivación de la GlcN6P desaminasa por urea, ■nativa, ●urea 2 M, ▲ urea 3 M, ▼ urea 4 M, ◆urea 5 M, + urea 6 M, × urea 7 M, * urea 8M, - urea 9 M.

5.2. Disociación y reasociación de la glucosamina 6P desaminasa de *E. coli*.

Con la finalidad de establecer el tiempo de exposición en urea 8 M, suficiente para disociar la GlcN6P desaminasa como monómeros en un proceso reversible, la enzima fue expuesta a urea 8 M durante 5 minutos, 1, 2, 18 y 24 horas. Seguidamente las distintas preparaciones se pasaron por columnas de filtración molecular (Superdex S200 analítica y S200 Hi-Load preparativa) con la finalidad de separar la urea y favorecer la reasociación y separar las especies que no se reasocian a hexámeros. El cromatograma evidenció un patrón de reasociación bastante complejo con especies de diferentes radios de Stokes (R_S). Se obtuvo un pico, con un R_S estimado en 70.9 Å, que identificamos como

agregados inespecíficos, luego un pico con un R_s 45.3 Å que identificamos como el hexámero, seguido de dos picos de R_s de 40.5 y 32.5 Å, que tal vez sean, respectivamente, el dímero y el monómero plegado. (Figuras 11 y 12). También se observó que a medida que aumenta el tiempo de exposición a urea 8 M se favorece la formación del monómero desplegado, el cual tiene un R_s de 48.4 Å (no mostrado). Los experimentos de renaturalización mostraron que este último proceso es irreversible. Se observó que la formación de agregados se favorece al aumentar la concentración de proteína. Por lo anterior escogimos utilizar la enzima hasta una concentración 10 μ M y exponerla a urea 8 M durante 5 minutos, condición que produce monómeros plegados y solubles. Previamente habíamos evidenciado la reasociación de los monómeros en la columna. El gel de filtración molecular tendría un triple papel: a) separar la urea de la proteína, b) ayudar a la reasociación de los monómeros plegados y c) separar cromatográficamente el hexámero replegado y reconstituido de los agregados o de las especies que no se reasociaron.

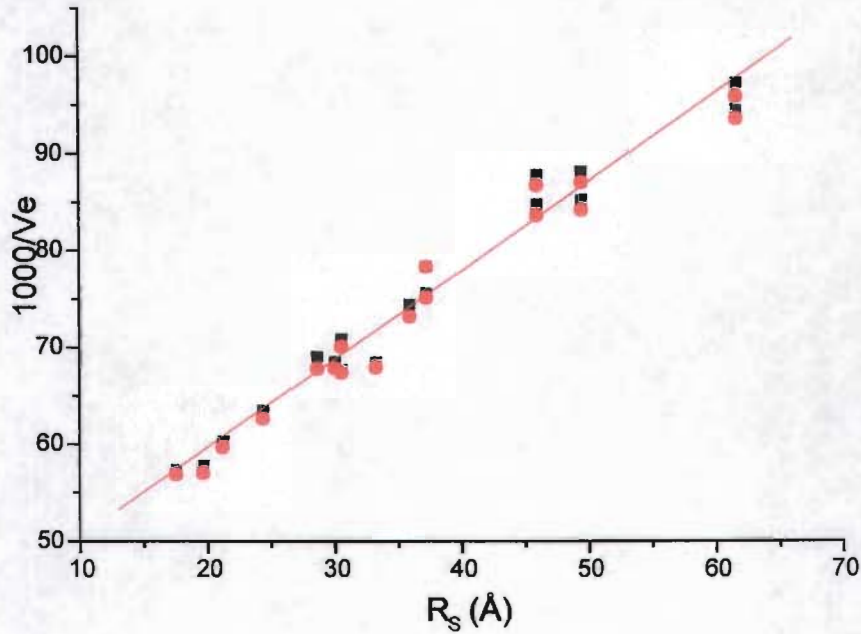


Figura 11. Curva de calibración columna de filtración molecular superdex 200. Detección por: ■ absorbancia a 280 nm e ● intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación 295 nm).

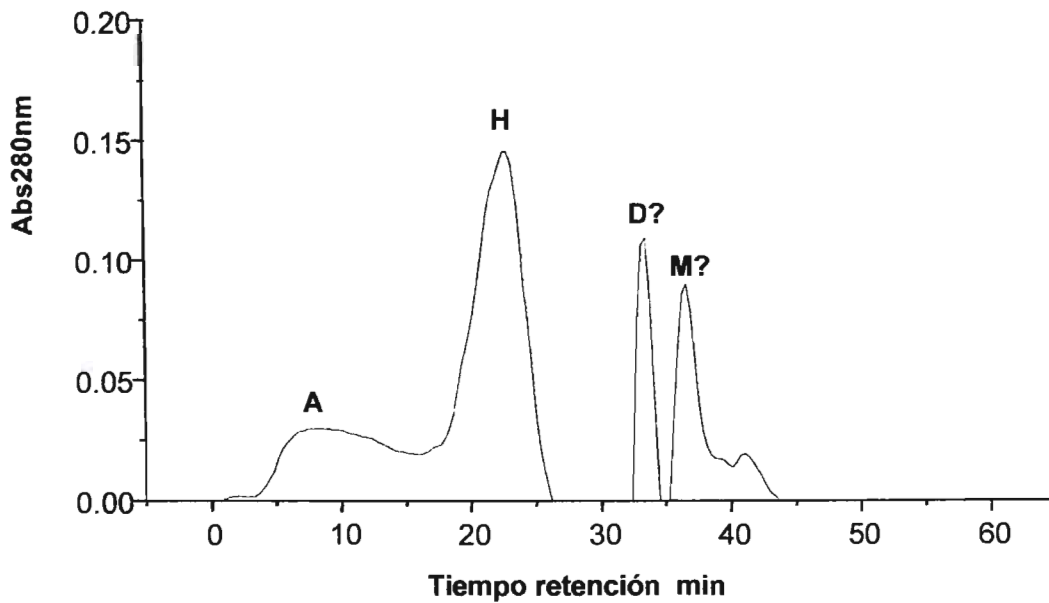


Figura 12. Patrón de reasociación de la GlcN6P desaminasa Columna Superdex 200 después de haber sido expuesta a urea 8 M durante 5min. A corresponde a los agregados cuyo radio de Stokes es de 70.9 Å, H es el hexámero cuyo radio de

Stokes es 45.3 Å, D? y M? Con radios de Stokes de 40.5 Å y 32.5 Å respectivamente, probablemente podrían ser el dímero y el monómero plegado.

5.3. Caracterización de la mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu

Para establecer que tan diferente era enzima silvestre de la triple mutante esta última fue caracterizada con respecto a sus propiedades de carga superficial, propiedades hidrodinámicas en condiciones nativa y expuesta a urea 8 M durante 5 minutos y cinéticamente, siempre utilizando como control la GlcN6P desaminasa silvestre. Los resultados obtenidos muestran una clara separación por diferencia de cargas de la triple mutante y la enzima silvestre; (Figuras 13 y 14). Los valores de pI obtenidos por isoelectroenfoque fueron de 7.1 para la enzima silvestre y 7.5 para la triple mutante (figura 13).

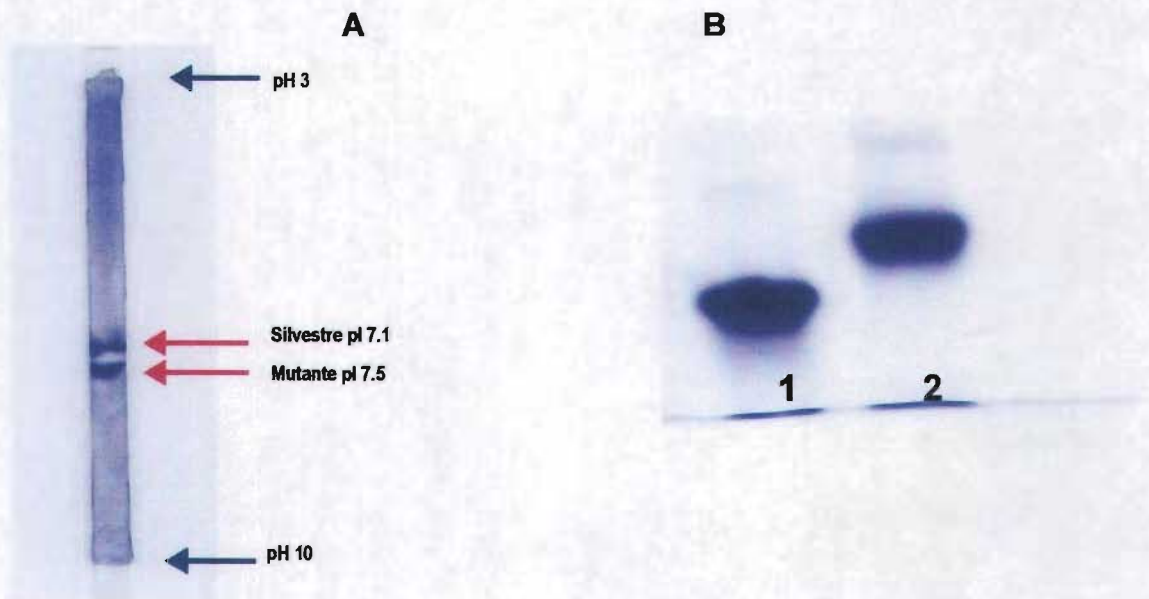


Figura 13. A. Isoelectroenfoque enzimas silvestres y triple mutante. B. Electroforesis nativa de la GlcN6P desaminasa, gel de poliacrilamida al 6%. Que muestra las diferencias en pI. Triple mutante, 2. enzima silvestre. Las enzimas se usaron a una concentración de 3 μ M. Como control siempre se utilizó la enzima silvestre.

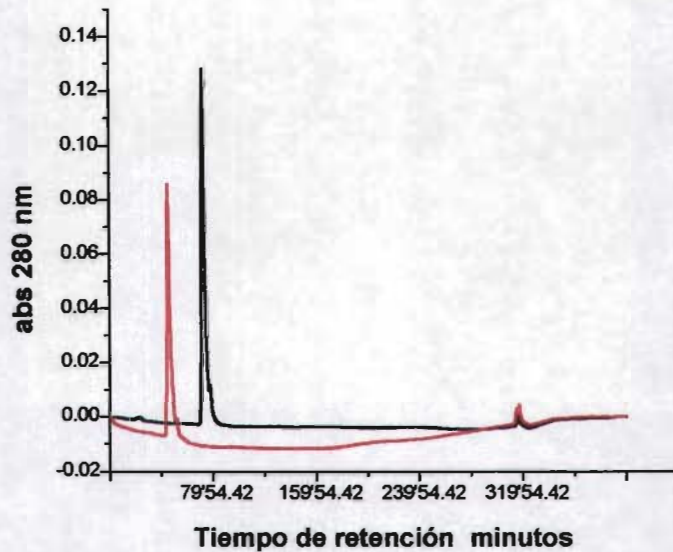


Figura 14. Separación de la triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu y la enzima silvestre por cromatografía de intercambio aniónico. Columna Waters AP-1. enzima silvestre 2 μ M, — triple mutante 3 μ M. —

El comportamiento cromatográfico de esta enzima reconstituida, revela que no presenta diferencias significativas en sus propiedades hidrodinámicas, con respecto a la enzima silvestre (Figura 15).

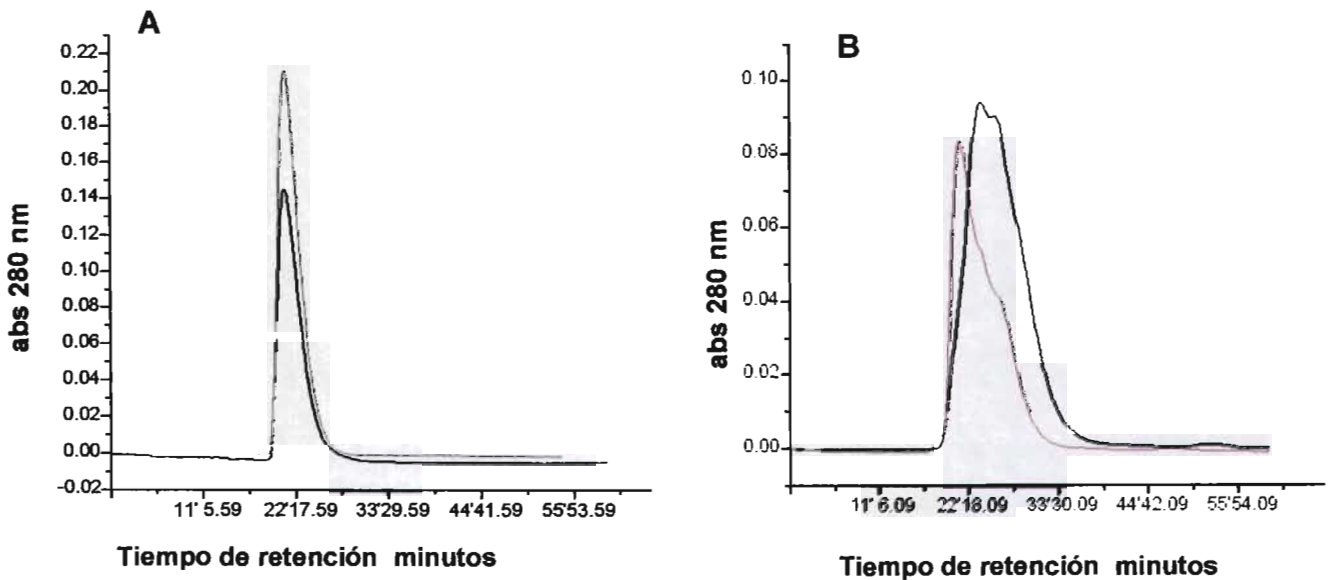


Figura 15. Cromatogramas de la GlcN6P desaminasa a. Enzima silvestre y triple mutante en condiciones nativas. b. enzima silvestre y triple mutante después de 5 minutos de exposición a urea 8M, columna superdex 200. — Enzima silvestre — triple mutante L3I:R172A:K208E.

5.4. Cinética de la triple mutante

La triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu, presenta una cinética idéntica a la de doble mutante R172A:K208E (Ver manuscrito anexo figura 3 y sección de resultados). Al realizar el estudio cinético de esta mutante en ausencia de activador y a concentraciones de sustrato entre 0 a 30 mM, encontramos que la enzima es prácticamente inactiva, siendo imposible calcular constantes cinéticas en estas condiciones (Figura 16).

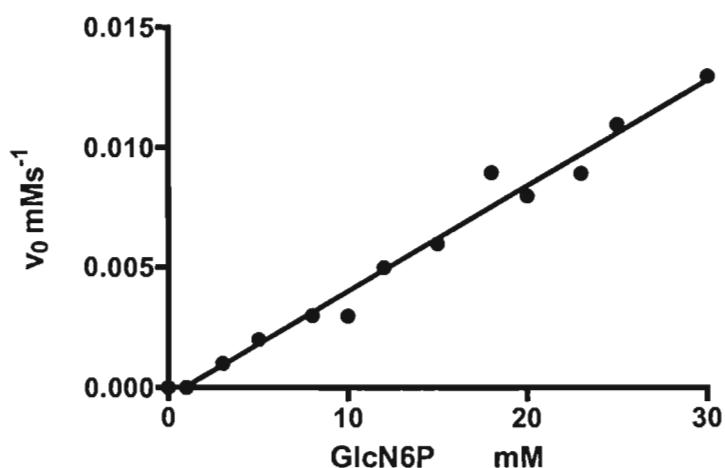


Figura 16. Cinética de la triple mutante sin activador y hasta 30 mM de sustrato.

5.5 Construcción de heterohexámeros.

Para construir los heterohexámeros las enzimas silvestre y triple mutante se mezclaron en proporción 1:5, 5:1 y 1:1 en urea 8 M durante 5 minutos; seguidamente se pasó esta solución por la columna de filtración molecular (como se describe en la metodología sección 4.5). Se colectaron 4 picos (Figura 17); el perfil de elución es semejante al de la enzima silvestre (Figura 12). Las

fracciones se concentraron por centrifugación a 3000 x g durante media hora en tubos Amicon Ultra® (Millipore) con filtros de corte en 10.000 Da. La fracción correspondiente a los heteroxámeros se utilizó para el siguiente paso, que es la separación de las diferentes especies híbridas.

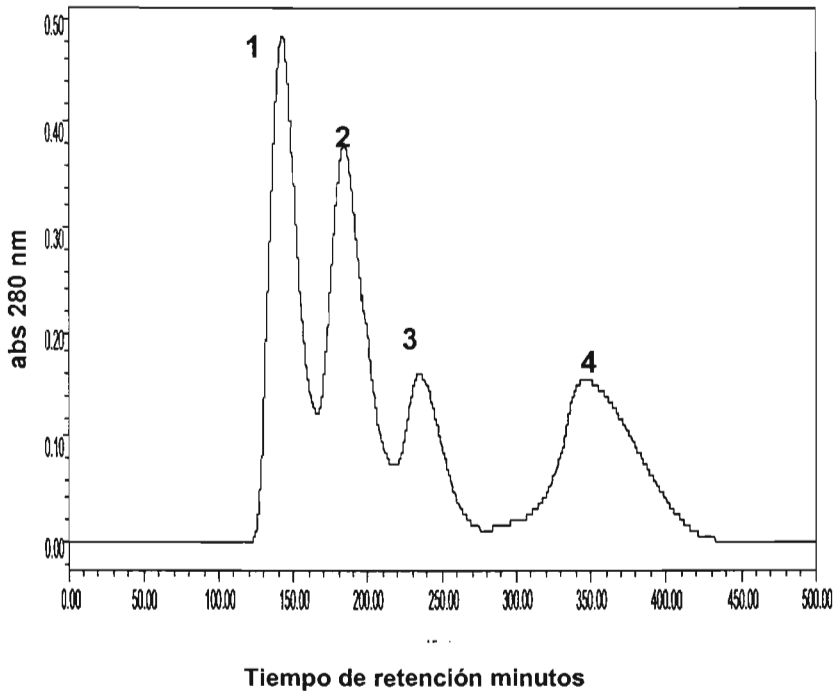


Figura 17. Escalamiento de la producción de heterohexámeros por filtración molecular en superdex S-200. El pico 2 corresponde a los heterohexámeros, el pico 1 consiste en agregados, los picos 3 y 4 son especies no identificadas

5.6. Separación de los diferentes heterohexámeros.

Las diferentes especies híbridas que se pueden generar teóricamente para una proteína hexámerica se muestran en la (Figura 18). Con el propósito de separar los diferentes heterohexámeros formados, basándonos en las diferencias de pI, el pico correspondiente al hexámero (donde estarían los diferentes heterohexámeros) fue sometido a cromatografía de intercambio aniónico. Se

obtuvieron 8 picos (Figura 19). El patrón cromatográfico resultó ser independiente de la proporción en la que se mezclaron las enzimas, ya que en todos los casos se obtuvo un pico mayoritario y en la misma posición. Este pico, mostró en el tercer ciclo de la secuenciación de Edman, cantidades iguales de leucina y de isoleucina. Esto sugiere que obtuvimos heterohexámeros 3:3, aunque una mezcla equimolar de las especies 4:2 y 2:4 daría el mismo resultado. Para corroborar que teníamos una sola combinación de subunidades, como lo sugiere el pico único en la cromatografía de intercambio aniónico, se realizaron electroforésis no desnaturizantes e isoelectroenfocados, que revelaron una sola especie (Figuras 19 y 20).

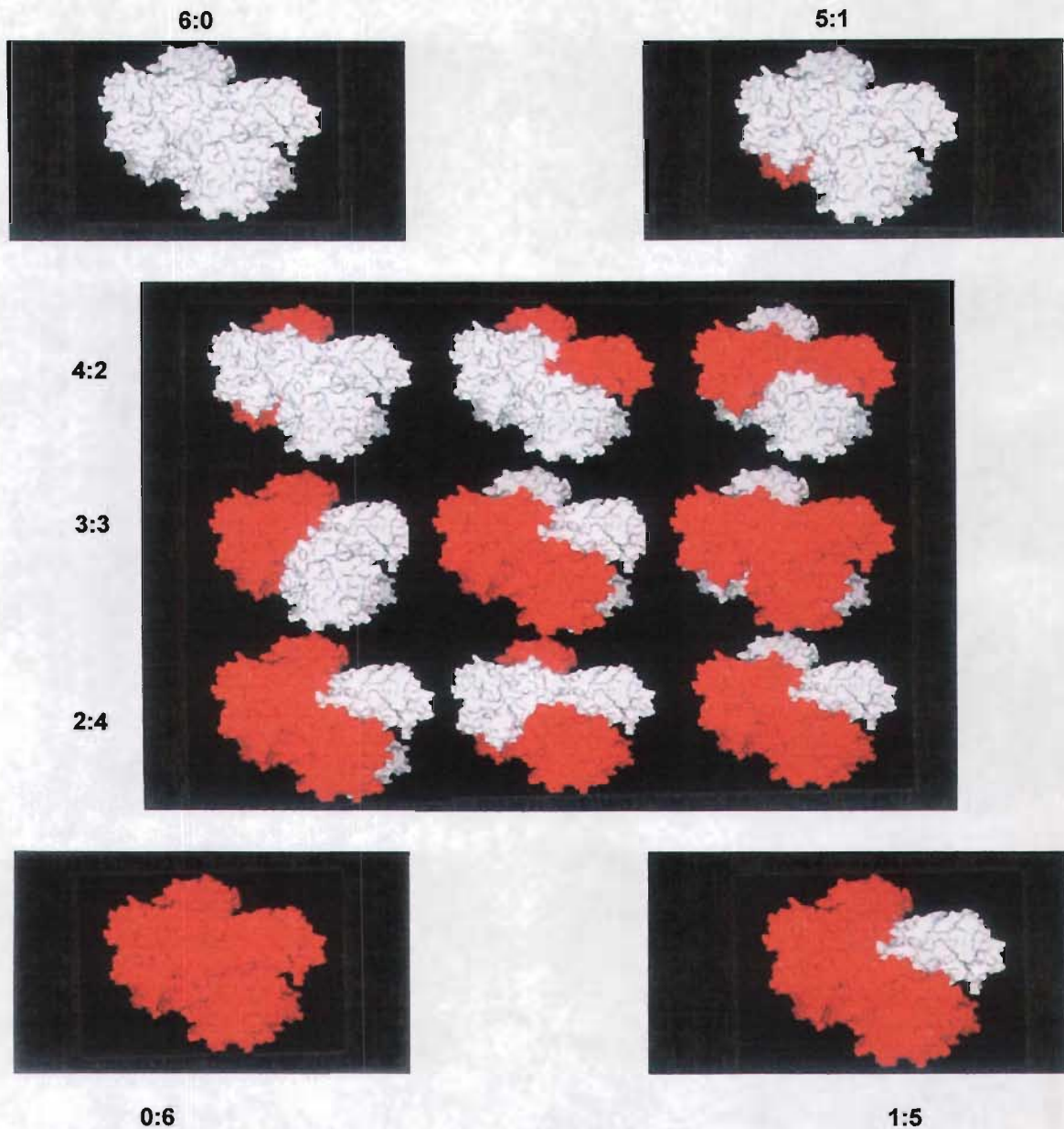


Figura 18. Combinaciones posibles de heterohexámeros formados con dos tipos diferentes de subunidades. Además de los 11 posibles heterohexámeros se podrían formar los dos homohexámeros.

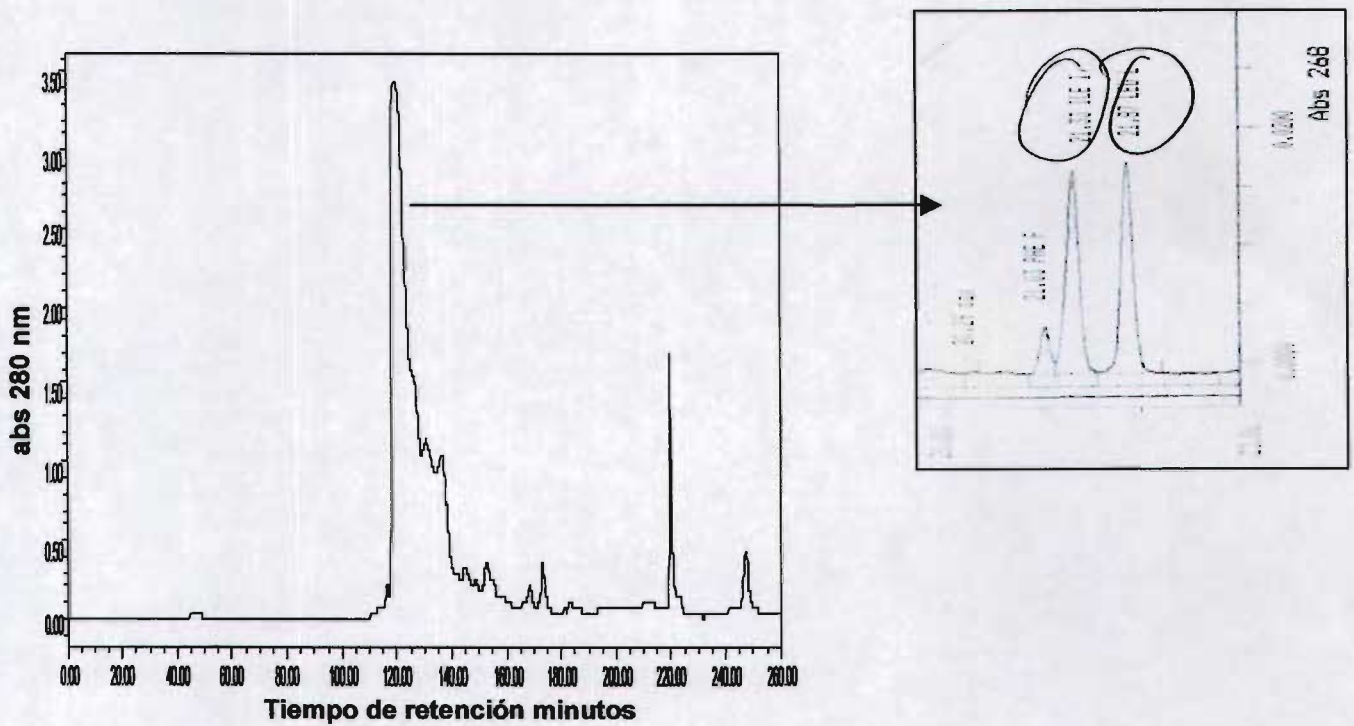


Figura 19. Separación de heterohexámeros columna Waters AP-1; al pico mayoritario se le realizó secuenciación amino terminal, revelando en el tercer ciclo proporciones iguales de leucina y de isoleucina (recuadro).

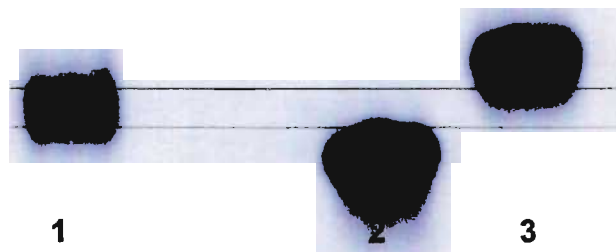


Figura 20. Identificación de heterohexámeros 3:3 por electroforesis nativa. 1.heterohexámero 3:3. 2. triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu. 3. enzima silvestre.

5.7. Caracterización cinética del heterohexámero 3:3.

Se procedió a caracterizar cinéticamente el heterohexámero 3:3. Se ensayó sin activador y con concentraciones variables del mismo en el intervalo 0.1 a 2.5 mM. Se observó que el heterohexámero 3:3 tiene un comportamiento alostérico de tipo V, con activación heterotrópica pero desprovisto de cooperatividad (activación homotrópica) ya que aun a altas concentraciones de sustrato y en ausencia de activador, el heterohexámero 3:3 presenta cinética hiperbólica. La ausencia de cooperatividad indica que en estas condiciones la unión de la GlcN6P al sitio activo no es capaz de desencadenar por sí misma la transición alostérica. El valor de la k_{cat} en ausencia del activador es aproximadamente un orden de magnitud menor que el obtenido con la misma preparación, a concentración saturante de GlcNAc6P. A saturación con activador la constante catalítica es similar a la de la enzima silvestre. Los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22, y en la tabla 1. Los valores de k_{cat} para el heterohexámero 3:3 se calcularon en ambos casos considerando seis sitios catalíticos por molécula de enzima. Dado que la triple mutante tiene una k_{cat} de 6.6 s^{-1} (a GlcNAc6P saturante) y el valor de la k_{cat} para la enzima silvestre es 160 s^{-1} (para cualquier concentración de activador, incluyendo cero, ya que es un sistema K puro), llama la atención que saturado de activador el heterohexámero presente un valor de k_{cat} de 199 s^{-1} .

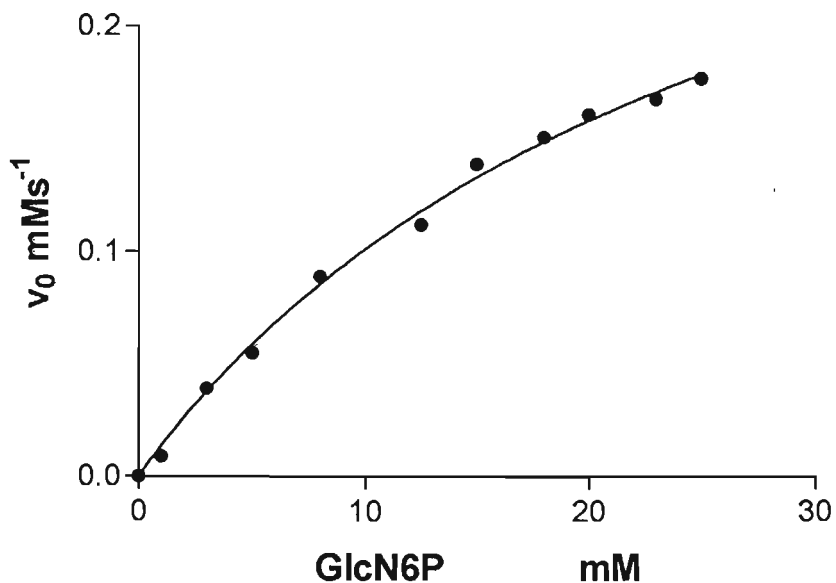


Figura 21. Cinética del heterohexámero 3:3 a altas concentraciones de sustrato y en ausencia de activador.

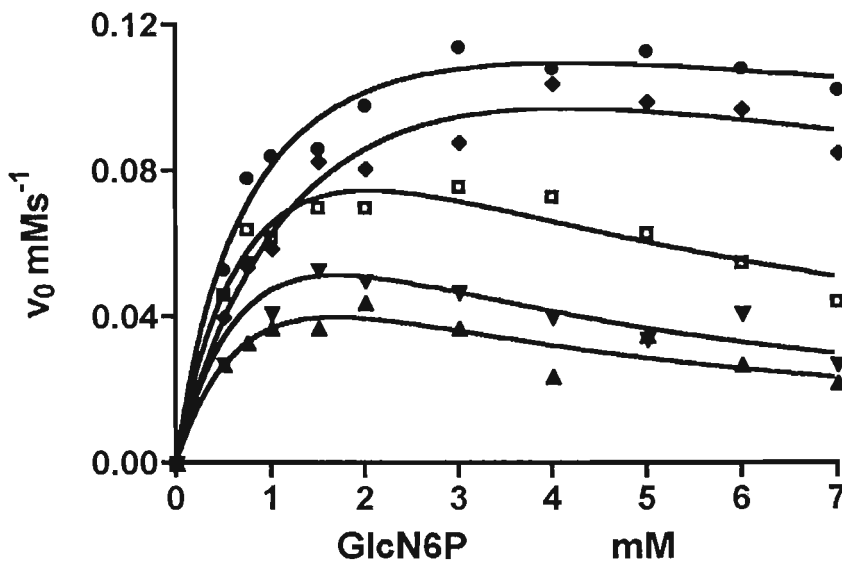


Figura 22. Cinética con activador del Heterohexámero 3:3. (▲) 0.1 mM GlcNAc6P, (▼) 0.5 mM GlcNAc6P, (□) 0.75 mM GlcNAc6P, (◆) 1mM GlcNAc6P,(●) 2.5 mM GlcNAc6P. Los datos fueron ajustados a la ecuación (2) del manuscrito anexo sección de resultados.

En la tabla 1 se muestran las constantes cinéticas de heterohexámero 3:3 la triple mutante y la enzima silvestre.

Tabla 1. Características cinéticas de la triple mutante Leu3-Ile:Arg172-Ala:Lys208-Glu, el heterohexámero 3:3 y la enzima silvestre.

Enzima	K_m^R mM ^a	K_m^I mM	k_{cat} sin activador s ⁻¹	k_{cat} con activador s ⁻¹	Patrón alostérico
Silvestre	0.55 ± 0.05	27.5 ± 2.0 ^b	158 ± 8 ^b	160 ± 7 ^a	K clásico
Triple mutante	0.31 ± 0.03	inactiva	inactiva	6.6 ± 0.051 ^c	V
Heterohexámero 3:3	0.86 ± 0.09	26 ± 2.6 ^c	16.5 ± 1.3 ^a	199 ± 11 ^c	Mixto

^a datos obtenidos en condiciones saturantes de GlcNAc6P y ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten- Henri.

^b datos obtenidos en ausencia de GlcNAc6P y ajustados a la ecuación general del modelo Monod-Wyman-Changeux

^c datos obtenidos en ausencia GlcNAc6P y ajustados a la ecuación de Hill con inhibición por sustrato.

A diferencia de las enzimas mutantes portadoras de la mutación Arg172-Ala, el heterohexámero 3:3 presenta inhibición por sustrato que disminuye con el incremento en la concentración de activador alosterico (Figura 22).

La K_d para el activador calculada a partir del regráfico de las V aparentes en función de la concentración de GlcNAc6P fue de 65 μ M (Figura 23), que equivale al doble de la K_d para la enzima silvestre (30 μ M) y es similar a la K_d de las mutantes Arg172-Ala y Lys208-Val (78 μ M).

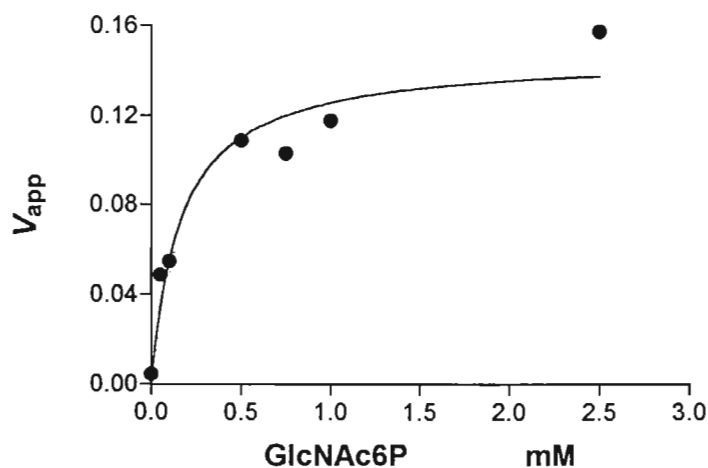


Figura 23. Regráfico V_{app} aparentes en función de la concentración de GlcNAc6P.

5.8. Titulación de cisteínas con DTNB

Se realizó la medición de las cisteínas reactivas con DTNB del heterohexámero 3:3 de la misma forma como se describe en el manuscrito anexo sección de metodología. Evidenciándose que el heterohexámero 3:3 no experimenta la transición alostérica como consecuencia de la ocupación del sitio activo, aunque es activado alostéricamente por la GlcNAc6P. Estos datos concuerdan con lo encontrado en los estudios cinéticos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Determinación del número de grupos tioles de cisteínas reactivos con DTNB en la enzima silvestre y el heterohexámero 3:3. Efecto de altas concentraciones de GlcN-ol-6P y GlcNAc6P.

Enzima	Sin ligando	GlcN-ol-6P 1 mM	GlcNAc6P 2.5 mM
Silvestre	12.2	0	0
Heterohexámero 3:3	11.5	12.5	0

6. DISCUSIÓN.

Se desarrolló una técnica para la construcción de heterohexámeros de la glucosamina 6P desaminasa *in vitro*, esta técnica además de ser usada para construir híbridos entre subunidades mutadas y subunidades silvestres, puede ser usada para la construcción de quimeras cuaternarias entre glucosaminas 6P desaminasas de diferentes especies, por lo cual se convierte en una herramienta valiosa para el estudio de las propiedades de comunicación entre subunidades de esta familia de enzimas. La construcción de heterooligómeros tanto *in vivo* como *in vitro* se ha venido utilizando en los últimos años como una herramienta novedosa en el estudio de las proteínas alostéricas. Muchos de esos estudios muestran que subunidades mutadas en diferentes sitios (sitio activo, alostérico o intercaras) pueden asociarse con subunidades silvestres dando lugar a enzimas que cambian su patrón de comportamiento cinético (Tatk Wong-lau y Fersht 1989 Goyal y col. 2001, Bronagh y col. 2001, Sakashi y col. 2000, Scoot y col. 2002 Fushinobu y col. 1998, Fenton y Reinhart 2003, Ortigosa y col. 2004), también se ha reportado que monómeros de enzimas homólogas o paralógicas, pueden reasociarse entre sí dando origen a híbridos catalíticamente activos (Zomosa-Signoret y col 2003, Osterman y col. 1994, Greene y col. 1993, Kang y col.1996, Witkowski y col.1996). Esto ha permitido conocer diferentes aspectos sobre el funcionamiento de estas enzimas.

Se conoce la estructura cristalográfica de la de GlcN6P desaminasa humana tipo 1 (Arreola y col. 2004), la cual tiene un comportamiento cinético muy diferente a la enzima de *E.coli* a pesar de ser estructuralmente muy similar (Álvarez-Añorve

tesis de maestría, no publicado). Construir heterohexámeros entre estas dos enzimas u otras como la de *Bacillus subtilis* la cual recientemente se ha reportado que posee una estructura monómerica y al parecer no es alostérica (Vincent y col. 2005), podría ayudar a entender mejor el comportamiento de esta familia de enzimas así como su evolución.

Un aspecto limitante en la construcción de los híbridos cuaternarios de cualquier enzima, es el poder generar monómeros que conserven la capacidad de reasociarse como oligómero. Son muchos los métodos que se han usado *in vitro* para lograr esto, el grupo de Reinhart (Fenton y col. 2003 y Ortigosa y col. 2004) preparó heterotetrámeros de la fosfofructocinasa de *E. coli* y *Bacillus stearothermophilus* disociando la enzima por dilución y reasociando con KSCN. Por otro lado Zomosa-Signoret y col. (2003). hicieron híbridos entre la triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, desnaturalizando las proteínas en 6M de cloruro de guanidinio y renaturalizando por dilución.

Utilizando una estrategia diferente Sakash y col. (2000) construyeron híbridos de la aspartato transcarbamoilasa de *E. coli*, clonando en plásmidos diferentes las subunidades catalíticas y regulatorias y después de sobreexpresarlas en cepas diferentes y purificarlas, hicieron los híbridos cuaternarios *in vitro* por mezcla en diferentes proporciones de las subunidades catalíticas y regulatorias. Aghanajan y col. (2001) utilizaron urea 4M para hacer híbridos de la glutamato deshidrogenasa de *E. coli* y reasociaron los monómeros por dilución de la urea. Debido a que la glucosamina 6P desaminasa no se disocia por dilución, es muy resistente a agentes desnaturizantes como urea y cloruro

de guanidinio y su desplegamiento completo no es reversible, en este estudio utilizamos una nueva estrategia para la reasociación de los monómeros de la GlcN6P deaminasa de *E. coli*, cual fué utilizar como matriz de replegamiento la matriz de las columnas filtración molecular Superdex 200 o S-200, tal como previamente se ha reportado en estudios de replegamiento para otras proteínas. (Altamirano y col. 1999, Fahey y col. 2000, Li y col. 2003). Como ya se explicó en la sección de resultados la columna hace tres efectos que son: a) separar la urea de la proteína, b) ayudar a la reasociación de los monómeros plegados y c) separar aquellas especies de la enzima que no se reasociaron.

Entender las bases de el comportamiento cooperativo y alostérico en una enzima homohexámerica simple como la GlcN6P desaminasa con un solo sitio activo por subunidad y seis sitios alostéricos ubicados en las intercaras entre los monómeros representa un desafío formidable. El estudio de la función alostérica de esta enzima, implica caracterizar los cambios locales generados por la unión de los ligandos (ajuste inducido), así como también la propagación a sitios distantes dentro de la misma subunidad, lo que afecta los contactos en las intercaras y desencadena un cambio en la estructura cuaternaria de la molécula. Estos cambios alostéricos ocurren en forma de “todo o nada” entre dos conformeros estables separados por una barrera de energía libre, la cual es accesible a la experimentación termodinámica (Bustos-Jaimes y Calcagno 2001).

Debido a que en la GlcN6P desaminasa los sitios de unión del activador alostérico están formados por dos caras de contacto heterólogas entre subunidades, la unión del activador y el cambio en estructura cuaternaria asociado se pueden visualizar como un proceso directo y probablemente en un solo paso . Es de

esperarse que la conexión entre la ocupación del sitio catalítico y la transición alostérica sea un proceso mas complejo, mediado por cambios conformacionales propagados (Horjales y col. 1999, Rudiño-Piñera y col. 2002 y Bustos-Jaimes y col. 2002 y 2005). Si bien las evidencias fisicoquímicas y cristalográficas muestran la existencia de solamente dos conformeros cuaternarios estables, no se excluye que ambos estados presenten una variedad de subestados conformacionales locales, circunscritos al plegamiento terciario de las subunidades, y que no llegarían a modificar su arreglo cuaternario (Mattevi y col 1996).

En este estudio hemos logrado construir una GlcN6P desaminasa heterohexamérica que es incapaz de transmitir la transición homotrópica desde el sitio activo, según lo muestran los resultados cinéticos y las mediciones de la reactividad de tioles con DTNB (Tablas 1 y 2). Esto sucede, a pesar de que el heterohexámero 3:3 posee tres subunidades silvestres, que en la construcción híbrida en ausencia del activador ya no se comportan como tal.

Lo anterior sugiere que la presencia en el heterohexámero 3:3 de tres subunidades incapaces de unir los ligandos del sitio activo (GlcN6P y GlcN-ol-6P), impiden el cambio conformacional propagado a todo el hexámero, que le hubiese conferido la conformación R por la vía homotrópica.

Se descarta por lo tanto que los ligandos del sitio activo sean capaces de llevar a las tres subunidades silvestres al estado R mientras las mutantes permanecen en la conformación T, dando lugar a estructuras mixtas TR.

Estos resultados confirman el carácter concertado de la transición alostérica en esta enzima, lo cual concuerda con los resultados cristalográficos (Horjales y col. 1999,

Rudiño-Piñera y col. 2002) y fisicoquímicos (Bustos-Jaimes y col. 2001, 2002 y 2005).

Con los resultados aquí presentados no podemos saber, si la k_{cat} de 16.5 s^{-1} del heterohexámero 3:3 (tabla 1), corresponde a las tres subunidades silvestres en estado T, mientras las tres subunidades mutadas se mantienen inactivas. Si éste fuese el caso, el cálculo de la k_{cat} debería de hacerse con base a tres sitios catalíticos por molécula y no seis. De esta forma, k_{cat} de los sitios silvestres en T sería de 33.0 s^{-1} . Como ésta ha sido la primera vez que se obtuvo una GlcN6P desaminasa bloqueada en el conformero T, es también la primera vez que podemos medir la k_{cat}^T . Mientras que la K_m^T puede estimarse de los datos cinéticos (Cisneros y col. 2004), no es posible conocer k_{cat}^T . El punto ha sido ampliamente discutido por Cisneros y col., quienes demuestran que aunque $k_{cat}^R > k_{cat}^T$ la enzima se comportará como un sistema *K* típico, siempre que la afinidad diferencial por el ligando, dada por el parámetro *c* (Ecuación 1 manuscrito anexo) sea grande (*c* pequeño, menor de 0.05 para nuestra enzima). Entonces en el caso de la enzima silvestre, la catálisis por la forma T queda totalmente eclipsada por la de la forma R y sólo se revela cuando *c* tiene a valores cercanos a 1, y la enzima se comporta como un sistema *V*. Esto ha sido ampliamente discutido por Cisneros y col. (2004).

El heterohexámero 3:3 nos ha permitido obtener una k_{cat}^T , que posiblemente corresponda a las subunidades silvestres, aunque no se descarta en el hexámero híbrido, que las subunidades mutadas también sean catalíticas y que las silvestres sean menos catalíticas que en el homohexámero silvestre.

La saturación con GlcNAc6P da lugar a un panorama completamente diferente. La ocupación de los sitios alostéricos, que en el heterohexámero 3:3 se

encuentran intactos, induce la transición alostérica T-R. Esta evidencia se apoya en los resultados cinéticos y en la medición de tioles reactivos con DTNB (Tabla 1 y 2). Cabe señalar que la K_{dis} para la GlcNAc6P es de apenas el doble de el valor para la enzima silvestre (Tabla 1). El heterohexámero 3:3 a concentración saturante de activador, presenta cinética hiperbólica con una K_m semejante a la de la enzima silvestre. Esto no es inesperado, dado que hemos combinado subunidades que en sus respectivos homohexámeros presentaban valores similares de K_m . Un resultado inesperado es, sin embargo, el valor de la constante catalítica del heterohexámero 3:3 activado por la vía heterotrópica, que es semejante al de la enzima silvestre (Tabla 1).

En el caso de que las tres subunidades silvestres y las tres mutantes se comportaran como en los correspondientes homohexámeros, sería de esperar una k_{cat} media aparente del orden de los 80 s^{-1} por sitio, bajo cinética hiperbólica ya que todas las subunidades tienen valores de K_m semejantes (Cornish-Bowden A., 2004); sin embargo se observa un valor mucho mayor. Dado que los valores k_{cat} han sido calculados para hexámeros de seis sitios catalíticos, el valor de 199 s^{-1} por sitio en el heterohexámero 3:3 revela que las subunidades mutadas han adquirido, en el heterooligómero activado heterotrópicamente por GlcNAc6P, una capacidad catalítica por lo menos igual a la de las subunidades silvestres.

7. PERSPECTIVAS.

1. Queda pendiente la redacción de un artículo con los resultados de la segunda parte de esta tesis, centrado principalmente en las propiedades del heterohexámero 3:3. Para completar este artículo necesitamos hacer algunos

experimentos complementarios, pero no indispensables. Las curvas de saturación por GlcNAc6P y especialmente por GlcN-ol-6P, obtenidas por medidas de la unión directa de los ligandos radiactivos, nos darían las estequiometrías correspondientes. Esperamos verificar que el heterohexámero protagonista de esta tesis une seis moléculas de GlcNAc6P por molécula híbrida, pero sólo tres moléculas de GlcN-ol-6P. La obtención de espectros diferenciales de DC en relación con la unión de ligandos reforzaría los resultados de medidas de unión directa.

2. Para cristalizar la construcción 3:3, ya se inició una colaboración. Tal vez este heterohexámero 3:3 sea una especie isomérica pura, o una de los isómeros sea más insoluble y se formen los cristales. De hecho, la desaminasa de *E. coli* ha sido una proteína relativamente fácil de cristalizar y se puede ser moderadamente optimista.

3. Otras derivaciones de esta tesis que pueden ser el punto de partida de nuevos proyectos, incluyen la purificación, identificación y estudio de las otras especies de heterohexámeros formados con nuestro procedimiento. Interesan en particular las especies 1:5 y 5:1, que no forman isómeros y son de interpretación más directa. Será interesante ver el efecto de un solo sitio activo funcional o de un solo sitio activo no ligante, sobre el comportamiento de la molécula.

4. En la misma línea del punto anterior, se podrá trabajar en la construcción de heterohexámeros con mutantes del sitio alostérico, aprovechando las mutantes en

las posiciones Arg158 y Lys160, que ya están construidas por separado y caracterizadas cinéticamente así como cristalizada la mutante Lys160-Glu.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adair G. S., Bock A. V, and Field H. Jr. (1925) The hemoglobin system the oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 63: 529-545.
2. Aghajanian S, and Engel P.C. (1998). Use of protein engineering to explore subunit interactions in an allosteric enzyme: construction of iter-subunit hybrids in *Clostridium symbiosum* glutamate dehydrogenase. *Protein Engineering.* 11: 569-575.
3. Aharoni A, and Horovitz. (1997). A Detection of changes in pairwise interactions during allosteric transitions: coupling between local and global conformational changes in GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 :1698-702.
4. Altamirano M. M, Hernández-Arana A, Tello-Solís B, and Calcagno M.L. (1994). Spectrochemical evidences for the presence of a tyrosyl residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 220:409-413.
5. Altamirano M. M, Plumbridge J. A, and Calcagno M.L. (1992). Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in Glucosamine-6- phosphate deaminase from *Escherichia coli* and study of their functional role by site- directed mutagenesis. *Biochemistry.* 31: 1153-1158.
6. Altamirano M.M, Plumbridge J.A, and Calcagno M.L. (1993). Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* has trimer of dimers structure with three inter-subunit disulfides. *Biochem. J.* 295:645-648.
7. Altamirano M.M, Plumbridge J.A, Horjales E and Calcagno M.L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* Glucosamine 6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry.* 34: 6074-6082.
8. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. (1999). Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol.* 17:187-91.
9. Alvarez-Anorve LI, Calcagno ML, Plumbridge J. (2005). Does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *J Bacteriol.* 187: 2974-82.

las posiciones Arg158 y Lys160, que ya están construidas por separado y caracterizadas cinéticamente así como cristalizada la mutante Lys160-Glu.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adair G. S., Bock A. V, and Field H. Jr. (1925) The hemoglobin system the oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 63: 529-545.
2. Aghajanian S, and Engel P.C. (1998). Use of protein engineering to explore subunit interactions in an allosteric enzyme: construction of iter-subunit hybrids in *Clostridium symbiosum* glutamate dehydrogenase. *Protein Engineering.* 11: 569-575.
3. Aharoni A, and Horovitz. (1997). A Detection of changes in pairwise interactions during allosteric transitions: coupling between local and global conformational changes in GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 :1698-702.
4. Altamirano M. M, Hernández-Arana A, Tello-Solís B, and Calcagno M.L. (1994). Spectrochemical evidences for the presence of a tyrosyl residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 220:409-413.
5. Altamirano M. M, Plumbridge J. A, and Calcagno M.L. (1992). Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in Glucosamine-6- phosphate deaminase from *Escherichia coli* and study of their functional role by site- directed mutagenesis. *Biochemistry.* 31: 1153-1158.
6. Altamirano M.M, Plumbridge J.A, and Calcagno M.L. (1993). Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* has trimer of dimers structure with three inter-subunit disulfides. *Biochem. J.* 295:645-648.
7. Altamirano M.M, Plumbridge J.A, Horjales E and Calcagno M.L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* Glucosamine 6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry.* 34: 6074-6082.
8. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. (1999). Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol.* 17:187-91.
9. Alvarez-Anorve LI, Calcagno ML, Plumbridge J. (2005). Does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *J Bacteriol.* 187: 2974-82.

10. Andi B, West AH, Cook PF. (2005). Regulatory mechanism of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: I. Kinetic studies. *J Biol Chem*. May 16. [Epub ahead of print].
11. Antonini E, Wyman J, Brunori M, Bucci E, Fronticelli C, Rossi-Fanelli A. (1963). Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. iv. the bohr effect in human hemoglobin measured by proton binding. *J. Biol Chem*. 238:2950-7.
12. Arreola R, Valderrama B, Morante ML, Horjales E. (2003). Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Lett*. 551:63-70.
13. Barroso JF, Carvalho RN, Flatmark T. (2005). Kinetic analysis and ligand-induced conformational changes in dimeric and tetrameric forms of human thymidine kinase 2. *Biochemistry*. 44:4886-96.
14. Bray D, and Duke T. (2004). Conformational spread: the propagation of allosteric states in large multiprotein complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 33:53-73
15. Bronagh M. H, and Engel P.C, (2001). Construction, separation and properties of hybrid hexamers of glutamate dehydrogenase in which five of the six subunits are contributed by the catalytically inert D165S. *Eur. J. Biochem*. 268: 1173-1180.
16. Broschat KO, Gorka C, Page JD, Martin-Berger CL, Davies MS, Huang Hc HC, Gulve EA, Salsgiver WJ, Kasten TP. (2002). Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem*. 277:14764-70.
17. Bustos-Jaimes I, and Calcagno M.L. (2001). Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys*. 394: 156-160.
18. Bustos-Jaimes I, Ramirez-Costa M, De Anda-Aguilar L, Hinojosa-Ocana P, Calcagno ML. (2005). Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. 44:1127-35.
19. Bustos-Jaimes I, Sosa-Peinado A, Rudiño-Piñera E, Horjales E, and 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.
20. Calcagno M, Campos P. J, Mulliert G. And Suástegui J. (1984). Purification, Molecular and Kinetic Properties of glucosamine 6-phosphate Isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 787:165-173.

21. Changeux JP. and Edelstein S. J. (1998) Allosteric Receptors after 30 Years. *Neuron*. 21: 959–980.
22. Cisneros D.A, Montero-Morán G.M, Lara-González S, and Calcagno M.L. (2004) Inversion of the allosteric response of *Escherichia coli* glucosamine 6-P deaminase to *N*-acetilglucosamine 6-P, by single amino acid replacements, *Arch.Biochem.Biophys*. 421:77-84.
23. Comb D.G., y Roseman S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232: 807-827. cooperativity. *J Biol Chem.*; 277:46841–46844.
24. Cornish-Bowden A. (2004) Fundamentals of enzyme kinetics. Third edition. PORTLAND PRESS.
25. Debru C. (1983) L'Esprit des protéines, Hermann, Paris.
26. Eigen M. Kinetics of reaction control and information transfer in enzymes and nucleic acids(1967). *Nobel Symp*. 5: 333–369.
27. Fahey EM, Chaudhuri JB, Binding P. (2000). Refolding and purification of a urokinase plasminogen activator fragment by chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 737: 225-35.
28. Fenton A.W and Reinhart G.D. (2003). Mechanism of substrate inhibition in *Escherichia coli* phosphofrutokinase. *Biochemistry*. 42 :12676-12681.
29. Fersht. A. (1999). Structure and mechanism in protein science. W.H Freeman and Company.
30. Fushinobu S, Ohta T, y Matsuzawa H. (1998). Homotropic activation via the subunit interaction and allosteric symmetry revealed on analysis of hybrid enzymes of lactate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 2971-2976.
31. Goyal A, Wang X, Engel P.C. (2001) Allosteric behaviour of 1:5 hybrids of mutant subunits of *Clostridium symbiosum* glutamate dehydrogenase differing in their amino acid specificity. *Biochem. J*. 360: 651-656.
32. Greene PJ, Maley F, Pedersen-Lane J, Santi DV (1993). Catalytically active cross-species heterodimers of thymidylate synthase. *Biochemistry*. 32 :10283-8.
33. Gunasekaran K. Buyong M. and Nussinov R. (2004). Is Allostery an Intrinsic Property of All Dynamic Proteins? *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 57:433–443.
34. Hill, A. V. (1910) *J. Physiol. (Lond.)* 40, IV- VII.

35. Horjales E, Altamirano M M, Calcagno M L, Garratt R. C, y Oliva G. (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T-state at 2.3Å resolution. *Structure*. 7:527-537.
36. Horjales, E, Altamirano M.M, Calcagno M.L, Dauter Z, Wilson K, Garratt R.C, and Oliva, G. (1992). Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 226: 1283-1286
37. Hu Y, Riesland L, Paterson AJ, Kudlow JE. (2004). Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *J Biol Chem*. 279:29988-93.
38. Kang C, Kim S, Fromm HJ. (1996). Subunit complementation of *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase. *J Biol Chem*. 271:29722-8.
39. Koshland D.E, Nemethy G, and Filmer D. (1966). Models in Proteins Containing Subunits Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical *Biochemistry*. 5 : 365-385.
40. Koshland DE. jr.(1963). Correlation of structure and function in enzyme action. *Science*. 142:1533-4.
41. Lara-González S, Altamirano M.M, Dixon H.B.F, Mendoza-Hernández G. and Calcagno, M.L. (2000). On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 301:219-228.
42. Lara-Lemus R, Libreros-Minotta C. A, Altamirano M.M. and Calcagno M. (1992). Purification and Characterization of Glucosamine-6-phosphate Deaminase from dog kidney. *Arch. Biochem.. Biophys*. 297: 213-220.
43. Lara-Lemus R. and Calcagno M.L. (1998).Glucosamine 6-Phosphate deaminase from beef kidney is an Allosteric System of the V-type. *Biochim. Biophys Acta*. 1388:1-9.
44. Lau Tat-kwong F, and Fersht A.R. (1989) Dissection of the effector binding site and complementation studies of *Escherichia coli* phosphofrutokinase using site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. 28: 6841-6847.
45. Leloir L.F, and Cardini C.E. (1956). *Biochem. Biophys. Acta* .20: 33-42.
46. Li M, Su ZG, Janson JC. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr Purif.*;33(1):1-10.
47. Mengin-Lecreulx D, van Heijenoort J. (1994). Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the glmU gene

product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J Bacteriol.* 176 : 5788-5795.

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

49. Monod, J, Wyman, J. and Changeux, J.P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118.

50. Montero-Morán G M, Lara-González S, Álvarez-Añorve L I, Plumbridge J A. and Calcagno M L. (2001). The active site of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase: the multiple functional roles of His143 in catalysis and allosteric regulation. *Biochemistry* 40: 10187-10196.

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

52. Natarajan K, and Datta A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 9206 – 9214.

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

54. Ortigosa A.D, J.M. Kimmel, Reinhart G.D. (2004). Disentangling the Web of Allosteric Communication in a Homotetramer: Heterotropic Inhibition of Phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry.* 43: 577-586.

55. Osterman A, Grishin NV, Kinch LN, Phillips MA. (1994) Formation of functional cross-species heterodimers of ornithine decarboxylase. *Biochemistry.* 33:13662-7.

56. Parrington J, Swann K, Shevchenko V.I, Sesay A. K, Lai F.A, (1996) *Nature*, 379: 364-368.

57. Pauling L. (1935). The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21: 186–191.

58. Perutz M. F. (1990). Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Cambridge University Press.

59. Plumbridge J.A, Cochet O, Souza J.M, Altamirano M.M, Calcagno M.L. and Badet B.(1993). Co-ordinated regulation of amino sugar synthesising and degrading enzymes in *Escherichia coli* K12 . *J. Bacteriol.* 175: 4951-4956

60. Rudiño-Piñera E, Morales-Arrieta S, Rojas-Trejo S. P. and Horjales E. (2002). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in

Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase, *Acta Cryst. D (Biological Crystallography)* 58: 10-20.

61. Sakash J.B, Chan R.B, Tsuruta H. y Kantrowitz E.R. (2000). Three of the six possible intersubunit stabilizing interactions involving Glu-239 are sufficient for restoration of the homotropic and heterotropic properties of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 752-758.

62. Scott W.N, Honzatko R.B, and Fromm H.J. (2002). Hybrid tetramers of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase reveal multiple pathways of allosteric inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 15539-15545.

63. Teipel J, Koshland D.E Jr. (1969) The significance of intermediary plateau regions in enzyme saturation curves. *Biochemistry*. 8:4656-63.

64. Tsuruta H, Kihara H, Sano T, Amemiya Y, Vachette P (2005). Influence of nucleotide effectors on the kinetics of the quaternary structure transition of allosteric aspartate transcarbamylase. *J Mol Biol*. 348:195-204.

65. Vincent F, Davies GJ, Brannigan JA. (2005). Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the NagB superfamily? *J Biol Chem*. 280:19649-55.

66. Witkowski A, Joshi A, Smith S. (1996) Fatty acid synthase: *in vitro* complementation of inactive mutants. *Biochemistry*. 35:10569-75.

67. Zhang, J. Zhang, W, Zou, D, Chen, G, Wan T, Li, N. and Cao X. (2003). Cloning and Functional Characterization of GNPI2, a Novel Human Homolog of Glucosamine 6-phosphate Isomerase/Oscillin. *J. Cell. Biochem*. 88: 932-940.

68. Zomosa-Signoret V, Hernandez-Alcantara G, Reyes-Vivas H, Martinez-Martinez E, Garza-Ramos G, Perez-Montfort R, Tuena De Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A.(2003). Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*. 42:3311-8.

M A N U S C R I T O

A N E X O

From: "ABB" <abb@elsevier.com>
Date: 7 de junio de 2005 06:20:57 PM GMT-05:00
To: <mario@laguna.fmedic.unam.mx>
Subject: ABBI-05-138R1: Interim Decision

Ms. No.: ABBI-05-138R1

Title: The functional role of Arg172 in substrate binding and the triggering of the allosteric

transition in Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase

Archives of Biochemistry and Biophysics

Dear Dr. Calcagno,

Thank you for submitting your revised manuscript to Archives of Biochemistry and Biophysics. I would be willing to accept a revised manuscript in which the issues below have been addressed.

Please submit your revision online by logging on to the ABB Elsevier Editorial System:

<http://ees.elsevier.com/yabbi/>

Your username is: MCALCAGNO

Your password is: ATB6408

You can find the manuscript record listed under "Submissions Needing Revisions." Click "Revise" when you are ready to submit your revision. (If you have forgotten your password, please click the "Forget your password" link located on the log-in screen.)

Please note that it is a Journal policy to allow no more than two months for manuscript revision.

When submitting your revised paper, please include a separate document called "Response to Reviews" detailing your responses to the comments of the reviewers. Please also include electronic source files for the text and figures that can be used for publication should the manuscript be accepted. These files should include the text, tables and figure legend in an editable format (MS Word preferred) and all figures saved individually as TIF or EPS files.

Thank you again for submitting your work to Archives of Biochemistry and Biophysics.

Yours sincerely,

Paul Fitzpatrick

Executive Editor

Archives of Biochemistry and Biophysics

Reviewers' comments:

This manuscript submission is a second submission and the authors have performed an acceptable job of addressing most of the somewhat major concerns that arose during the first submission. The authors should be commended for their persistence in pushing for the publication of some very interesting results.

This paper is a mutagenesis probing of the active site of GlcN6P deaminase. Results of kinetic, thiol modifications, and CD spectroscopic measurements of the

mutants are interpreted due to changes in flexibility of an active site loop. These results are extrapolated to attempt to conclude some meaning regarding protein function and allosteric regulation in the wild type enzyme.

The intro, MM, and Results read well and have not greatly been modified since the first version. The abstract has been re-written due to the authors own motivation and not due to requests of the previous reviewers. The articulation in the discussion is much improved.

The presentation of data in Fig 3 is much improved; however the authors should confirm that the Figure Legend for Fig3D lists the symbols for the three highest GlcNAc6P concentrations is correct; based on data trends in the Fig, the assignment in the Legend appears to be reversed for these three concentrations.

The use of K_d vs K_{dis} should be standardized throughout the paper.

The sentence in the Results (pg9) that reads "The set of curves in Fig. 3A were ." is not clear. I believe this is what is meant: "The set of curves in Fig. 3A were individually fitted to the Hill equation; GlcNAc6P dependent changes of the resulting apparent V were fitted to a hyperbola to obtain a K_{dis} for the activator."

A clarification should be made in the Discussion, Pg 13, last sentence: "A possible interpretation

.between Arg 172 and Glu 208 in the Lys 208-Glu mutation that could

"

The newly collected CD data is improved. It might be a cleaner presentation if the equivalent Arg172-Ala:Lys208-Glu mutation (no ligand) spectra were used in C and D of Figure 4. I did not feel that the second point raised by the previous reviewer 2 was sufficiently addressed. I am not a CD expert, but if the small differences at low wavelength between wild type (no ligand) and the Arg172-Ala:Lys208-Glu mutation (no ligand) are due to noise or acceptably small, then it appears that a simple statement could be added to the results that read something like: At least for the representative Arg172-Ala:Lys208-Glu mutation no global conformational changes caused by the mutations themselves are apparent based on CD spectra (Fig.4).

The interpretation regarding the affected affinity to the T-state seems well grounded. Apparently, the ref. 9 has a system for following binding affinities for the substrate as a function of effector. If such an analysis is performed, does the data agree that the extrapolation of substrate binding affinities goes to infinity in the absence of substrate or does it only decrease to some level? This might be a more direct support for loss of T-state substrate binding in the mutants compared to the indirect thiol modification and CD measurements, both of which may monitor a substrate dependent structural rearrangement that is altered by the mutation.. If the extrapolation of affinity does not go to infinity, then the argument would be that the mutations affect k_{cat} in the T-state as well as decreasing (not abolishing) the affinity- as was greatly emphasized in the results of the previous review and has not yet completely been addressed. A few simple statements might address if both apparent affinity and k_{cat} of the T-state is altered in the mutants.

There are now multiple examples where mutations can be used to separate cooperativity from allostery and both of these properties from ligand affinity. Therefore, the extrapolation of binding affinity to the T-state to the potential that the active site flap is an allosteric trigger is not supported. If the mutations alter substrate affinity to the active site, then cooperativity would be affected even if the

trigger for cooperativity is in some part of the active site other than the flap. In fact there are several statements in the paper that to this reviewer seem contradictory to the idea that the active site flap is the allosteric trigger, mainly those that state that the flexibility of the active site flap is independent of allostery. Thermodynamics would argue if the changes in flap dynamics changes allostery, then changes in allostery must change the flap of the dynamics. Based on this, the statement that (pg 14) "The lid motif moves independently of the allosteric transition and it plays a key role in connecting the active and allosteric site." is contradictory within itself and should be corrected. My conclusion is that I think the final conclusions of the manuscript should not be extrapolated beyond "altered binding of substrate to the T-state" to include "the allosteric trigger built in the active site flap"; such a change in the manuscript would maintain the conclusions supported by the results, does not subtract from the overall finding, and can be made with minor corrections.

The functional role of Arg172 in substrate binding and the triggering of the allosteric transition in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase

Armando Lucumí-Moreno^{*1} and Mario L. Calcagno^{*}

Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, D.F

Subject Area

Protein Biochemistry and Biophysics

Running Title

Allosteric role Arg172 and Lys208 in glucosamine-6-P deaminase

Footnotes

^{*}Corresponding authors. Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM, P.O. Box 70-159, Mexico City, D.F., 04510, México; E-mails: armando@bq.unam.mx or mario@bq.unam.mx
Telephone +52 (55) 56232259, Fax +52 (55) 56162419.

¹Permanent address: Depto. de Ciencias Básicas, Fac. de Salud, Universidad Santiago de Cali, Cali-Valle, Colombia

³Abbreviations used: GlcN6P, glucosamine 6-phosphate; GlcNAc6P, *N*-acetylglucosamine 6-phosphate; GlcN-ol-6P, 2-amino-2-deoxyglucitol-6-phosphate; CD, circular dichroism; DTNB, 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoate), MWC equation: Monod-Wyman-Changeux equation.

Abstract

Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* (GlcN6P deaminase, EC 3.5.99.6) is an allosteric enzyme, activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate, which converts glucosamine 6-phosphate into fructose 6-phosphate and ammonia. X-ray crystallographic structural models have showed that Arg172 and Lys208, together with a segment of the main chain backbone, are involved in binding the substrate phospho group of the enzyme in the R (activated) state. A set of mutants of the enzyme involving the targeted residues was constructed to analyze the role of Arg172 and Lys208 in deaminase allosteric function. The mutant enzymes were characterized by kinetic, chemical and spectrometric methods, revealing conspicuous changes in their allosteric properties. The study of these mutants indicated that Arg172 has a unique role in substrate binding to the T state. We propose that this first displaces the active site lid, triggering the allosteric transition from the active site and resulting in homotropic cooperativity.

Keywords: Glucosamine-6-phosphate deaminase, allosteric transition, allosteric trigger, homotropic-heterotropic coupling, active-site lid.

Introduction

Archetypal allosteric proteins modulate their functional properties through conformational changes involving the quaternary structure of the molecule. These structural changes are driven by ligand-binding energy and propagate through the protein from the specific binding sites to distant locations, and reach the intersubunit interfaces [1]. These propagated signals eventually trigger a concerted rearrangement of the protein subunits, although they can also be detected when they operate in an unproductive way [2]. A key requirement to understanding allosteric function is the identification of the mechanisms connecting the local events at the ligand binding sites with the quaternary structural rearrangement, that is, the allosteric transition. The interactions at the binding-sites involve a small number of amino acid residues and it is expected that some specific contacts should be determinant for the propagation of the local conformational relaxation to the distal locations within the protein molecules [3-5]. The current literature shows a considerable diversity in the details of the allosteric mechanisms of the most studied allosteric proteins [6-9], thus emphasizing the value of studying different experimental models. In this work we analyze the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*, which is a valuable model for the study of the generation and propagation of conformational changes associated with the allosteric function [2]. This enzyme catalyzes the deamination and isomerization of glucosamine 6-phosphate (GlcN6P), producing fructose 6-phosphate and ammonium ion and it is allosterically activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) [10,11]. *E. coli* GlcN6P deaminase is a homohexamer whose structure has been solved by X-ray crystallography for both R and T allosteric states [12,13], so that the T-R transition has been described from the comparison of both extreme conformations, as a displacement of two rigid entities within each monomer [13]. The allosteric kinetics of this enzyme have been well

characterized. The allosteric behavior of GlcN6P deaminase can be accurately explained by the symmetry model of Monod, Wyman and Changeux (MWC model, [14]), as previously shown [15, 16, 2].

The enzyme activity is regulated by GlcNAc6P binding, which produces a change of the apparent affinity for the substrate, while its catalytic constant remains invariant *i.e.* it is a classic *K*-system [11,17]. The active site of the enzyme includes a motif forming a lid, which isolates the active site from the bulk solvent. The lid motif is formed by two antiparallel β -strands connected by a loop-helix-loop segment (residues 158-187). This segment contains functionally important residues, including Arg172, which has been described as a phosphate binding residue in the active-site, plus three other residues that are part of the allosteric site, Arg158, Lys160 and Thr161 [12]. The phospho group O-atoms of GlcN6P appear at interaction distance to the N η atom of Arg172 and the N ζ atom of Lys208, as well as to two amino groups of main chain residues in the loop 41-44 (Fig. 1). The two salt bridges are assumed to be the most important interactions for substrate binding [12]. While most of the functional active-site residues, mainly the catalytic ones, are located in areas of structural stability, the substrate-binding residue Arg172 is part of the lid, which is a highly flexible motif, whose mobility is not restricted by the T-R transition [2,18].

The structural model derived from the crystals formed in phosphate buffer show that the active and the allosteric sites bind phosphate ions in the same positions as the phospho groups of GlcN6P and GlcNAc6P, respectively [12]. These structures that contain 12 phosphate ions per molecule are all in the R state and their α -carbon traces are essentially identical [12]. We can thus infer that the phosphate ion *per se* is able to build all the interactions required to stabilize the enzyme in the R state. Moreover, these crystallographic structures are also entirely

superimposable on those obtained for the wild-type enzyme when the allosteric site is occupied by GlcNAc6P and the active site is empty, with the sole exception of the lid motif, which appears more disordered when the active-site is free [18]. Additionally, the mutant form Lys160-Glu, which eliminates one of the phosphate-binding groups in the allosteric site, and prevents GlcNAc6P binding, yielded crystals with the R structure when it was co-crystallized with GlcN-ol-6P. The structural model of the Lys160-Glu mutant show the active site occupied by an inhibitor molecule, while the allosteric site is free. The superimposition of the α -carbon traces of the R-state monomer of this mutant (excluding the lid), with the corresponding wild-type R structures with both sites occupied, shows the same fold. On the other hand, and as expected, the ligand-free Lys160-Glu mutant crystallizes in the T state [18,19]. These observations provide evidence that *E. coli* GlcN6P deaminase reaches the same R conformation upon saturation by active-site ligands (either the substrate or the dead-end inhibitor, 2-amino-2-deoxyglucitol 6-phosphate, GlcN-ol-6P) or by the allosteric activator, GlcNAc6P.

The mechanisms linking T-R quaternary change with the first interaction events in the active site remain mostly unknown and can involve different induced-fit states and complex propagation pathways through the tertiary structure of the subunit. Fluorescence titration experiments using a set of single-tryptophan mutants revealed the existence of local conformational changes and their propagation, when the allosteric transition was triggered from the active site. These studies also confirmed the crystallographic observation that the active site-lid mobility can be independent of the T-R transition [2].

The residues involved in phosphate or phospho-group binding, are good candidates for being the ones involved in the primary interactions at the active and allosteric sites and the ones responsible for the homotropic-heterotropic coupling. In this work, we have explored the role of two residues, Arg172 and Lys208, which were pointed out by crystallography as playing a key role in substrate

binding in the active site of *E. coli* GlcN6P deaminase.

Materials and Methods

Chemicals.

Most chemicals and biochemicals were from Sigma-Aldrich S.A. de C.V. The affinity gel used for GlcN6P deaminase purification (*N*-6-aminohexanoyl-glucosamine-6P agarose) was prepared as already reported [11]. The dead-end inhibitor, GlcN-ol-6P, was synthesized according to Midelfort and Rose [10] and purified as described [15]. The allosteric activator, GlcNAc6P, was prepared and purified according to Leloir and Cardini [20].

Bacterial strains and mutagenesis.

Site directed mutations (Lys208-Glu, Lys208-Val, Arg172-Ala, and the double mutant Arg172-Ala:Lys208-Glu) were produced by oligonucleotide-directed mutagenesis, using the commercial kit QuickChange from Stratagene. Mutagenesis was carried out on the phagemide pTZ18R*nagB* containing the wild-type gene for *E. coli* GlcN6P deaminase, or the desired mutant form of the gene *nagB*. The plasmids carrying the mutant forms of GlcN6P deaminase were used to transform the host strain for expression, the strain IBPC590 Δ *nag*, where expression of the chromosomal copy of the *nagB* gene was eliminated by insertion of a kanamycin-resistance cassette. This strain is in addition Δ *lac*, so that expression of the deaminase is constitutive (21).

Purification and assay of wild-type and mutants forms of GlcN6P deaminase with replacements at positions Arg172 and Lys208.

Wild-type GlcN6P deaminase from *E. coli* and its site-specific mutants Lys208-Glu, Lys208-Val, Arg172-Ala and the double mutant Arg172-Ala:Lys208-Glu, were purified by allosteric-site affinity chromatography. The previously reported procedure [11] was used without modifications, because the mutations did not affect the chromatographic behavior of these mutant forms of the enzyme. The purity of deaminase preparations was verified by SDS-PAGE and their concentrations were calculated using the molar absorptivity reported for the wild-type enzyme [11], because these mutant forms of the enzyme did not involve aromatic residues.

Kinetic measurements

GlcN6P deaminase was assayed kinetically in the direction of fructose 6-P formation by the measurement of fructose 6-P concentration at fixed times as previously described (11). The progress of the reaction was always kept below 5 % conversion of the initial amount of substrate. Kinetic data were analyzed by nonlinear regression analysis using the program GraphPad Prism 4.0b for Macintosh.

Measurement of the reactive thiol groups in mutant deaminases in positions 172 and 208.

The number of reactive thiol groups in the native and SDS-denatured samples were determined by titration with 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoate), (DTNB), at pH 8.0 in the presence of 2.5 mM EDTA. The increase of absorbance at 412 nm was measured in a double-beam spectrophotometer, as described [22]. Measurements were performed either in the absence of ligands or in the presence of high concentrations of either the dead-end inhibitor GlcN-ol-6P or the allosteric activator GlcNAc6P, used to promote the allosteric transition [23]. From the time course of the absorbance change, the stoichiometry of the reaction and its pseudo-first-order rate constant were calculated by non-linear regression analysis. Wild-type enzyme was also measured

as reference.

GlcNAc6P and GlcN-ol-6P binding sensed by circular dichroism spectrometry.

Binding of GlcN-ol-6P to the active site produces a positive circular dichroism (CD) signal at 287-290 nm, which has been identified as a local signal (induced fit). Binding of GlcNAc6P or GlcN-ol-6P produces a negative change of ellipticity between 268-277 nm that has been primarily correlated with the quaternary transition [24]. These UV CD signals were used for monitoring GlcNAc6P or GlcN-ol-6P binding to the enzyme. The spectra were obtained with a Jasco J-715 CD spectropolarimeter. Protein samples (10 μ M) were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and data were collected at 25 $^{\circ}$ C; averages of ten runs were taken for each wavelength [24]; spectral data were corrected with suitable blanks and to allow volume increase.

Results

Allosteric kinetics of the Lys208-Val and Lys208- Glu mutant forms of GlcN6P deaminase. The lysine residue at position 208 was replaced by either valine or glutamate. Lys208-Val mutant enzyme displays homotropic cooperativity, with a Hill coefficient of 1.7. The velocity versus substrate curve can be well fitted to the following form of the Monod et al. equation [14]:

$$v_0 = \frac{V [L c \alpha (1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}]}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad (1)$$

Where $\alpha = [\text{GlcN6P}]/K_{mR}$, n is the number of active sites per molecule, $c = K_m^R/K_m^T$ and L is the MWC allosteric constant. The mutant enzyme is less allosteric (lower L , higher c) and its k_{cat} value is one order of magnitude lower than the wild-type enzyme (Fig. 2 and Table 1). The

activation pattern is of the mixed K - V type; the heterotropic effect increases k_{cat} and decreases $K_{0.5}$ up to saturation, when the enzyme displays hyperbolic kinetics (Fig. 3A). It is worth to note that the K_m^{R} obtained from data in Fig. 2 as a MWC parameter is a good approximation, within experimental and fitting error, of the corresponding K_m value from Michaelis-Henri fit (Tables 1 and 2). The set of curves in Fig. 3A were individually fitted to the Hill equation (lines in Fig. 3A); from the hyperbolic change of the apparent V with GlcNAc6P concentration, a K_{dis} value for the activator can be calculated from data fitted to hyperbola. The obtained dissociation constant for GlcNAc6P, 78 μM , is nearly twice the wild-type value (Table 2). Data in Table 2 also show that the K_m value for Lys208-Val, assayed under hyperbolic kinetics, is similar to that of the wild-type enzyme, while its k_{cat} is one order of magnitude lower.

The velocity versus substrate curves of Lys208-Glu deaminase reveal a different allosteric behavior; this mutant form is entirely inactive in the absence of GlcNAc6P, but a measurable low activity appears upon addition of the allosteric activator. The fully heterotropically activated enzyme at saturating concentrations of GlcNAc6P (7.5 mM) displays hyperbolic kinetics with a k_{cat} 200 times lower than the other three mutants reported in this study and 3600 times lower than the wild-type enzyme. (Table 2 and Figure 3B); contrastingly, this fully activated enzyme has a K_m value similar to the wild-type or Lys208-Val deaminases (Table 2). The affinity for the allosteric activator is somewhat reduced with respect to the wild-type enzyme (K_d , nearly seven times higher, Table 2). It is worth noting that Lys208-Glu, like all the mutant enzymes described here, was purified by affinity chromatography using an immobilized analog of GlcNAc6P, a procedure that requires a functional allosteric site.

Kinetics of Arg172-Ala mutant GlcN6P deaminase.

This mutant deaminase is inactive in the absence of GlcNAc6P, which behaves as an essential activator increasing the apparent V and decreasing $K_{0.5}$ (Fig. 3C). As in the case of Lys208-Glu, the enzyme recovers its substrate-binding capacity by heterotropic activation. The curves of velocities versus substrate concentration at increasing GlcNAc6P concentrations reveal positive cooperativity. At high activator levels, cooperativity diminishes and substrate inhibition becomes significant (Fig. 3C). The set of curves were individually fitted to the following form of the Hill equation that contains a substrate inhibition term:

$$v_o = \frac{V [S]^h}{K_M + [S]^h \{1 + [S]/K_I\}} \quad (2)$$

At saturating GlcNAc6P concentration, the Hill coefficient approaches to unity and substrate inhibition is maximal. The substrate inhibition constant decreases with GlcNAc6P concentration, and reaches 16 mM at 5 mM activator concentration, which is close to saturation. The analysis of the change of the apparent V versus GlcNAc6P concentration, which is hyperbolic, allowed an estimation of a K_{dis} for the activator and a limit V ; from the latter, a k_{cat} value was calculated, while from the variation of the apparent K with the activator, a limit (K_m) value of 1.67 ± 0.18 mM was obtained, when h approaches to 1. While this value is three times higher than the wild-type K_m , the corresponding k_{cat} is nearly 15 times lower (Table 2).

Kinetics of the double mutation Arg172-Ala:Lys208-Glu.

To replace both groups involved in phospho-group binding at the active site, we constructed the mutation Arg172-Ala:Lys208-Glu. The kinetic analysis of this mutant enzyme showed kinetics similar to that of Arg172-Ala, with a more prominent substrate inhibition that increases with the allosteric activator concentration. As shown for Arg172-Ala enzyme, its activity is negligible in the absence of GlcNAc6P but its activity was restored in the presence of the activator. Velocities versus substrate concentration data were fitted to equation 2 (Fig. 3D). Data in Table 2 show that the double mutation did not modify the wild-type like K_m values of the enzyme in the R state and that its k_{cat} was comparable to that of Lys208-Val enzyme.

The allosteric transition of Lys208-Glu and Arg172-Ala:Lys208-Glu, examined through thiol group reactivity.

It has been previously shown that the allosteric transition of *E. coli* GlcN6P deaminase can be monitored by the change of reactivity of the thiol groups of Cys118 and Cys239 [22, 23]. These cysteine residues react with the thiol reagent DTNB when GlcN6P deaminase is in the T allosteric conformation but they become hidden when the enzyme reaches the R state after saturation by either active site or allosteric site ligands [22, 23]. We used this property to probe the quaternary state of the mutant enzymes Lys208-Glu and Arg172-Ala:Lys208-Glu, which are catalytically inactive in the absence of GlcNAc6P (Table 3). The number of reactive thiol groups per molecule of GlcN6P deaminase, was measured in the ligand-free enzyme and in the presence of a saturating concentrations of GlcNAc6P or 1 mM GlcN-ol-6P. Measurements performed on the wild-type enzyme are included for reference. When both mutant deaminases were driven to the R state by heterotropic activation with GlcNAc6P, the previously observed protection effect towards DTNB is apparent. However, the addition of GlcN-ol-6P did not change the thiol group reactivity, even at high concentrations of this inhibitor (saturation cannot be defined for this

ligand). These data are consistent with the observation that active site of both analyzed mutant deaminases are incapable of binding GlcN-ol-6P, a substrate analog, except in the presence of GlcNAc6P.

CD spectral changes produced by ligand binding to Arg172-Ala:Lys208-Glu deaminase.

CD spectrometry was used to confirm the absence of binding properties at the active site of Arg172-Ala:Lys208-Glu deaminase, which was taken as a representative example of the set mutant forms devoid of homotropic effect. As previously shown, the occupation of the active site of the wild-type deaminase can be monitored by the positive change in ellipticity at 287-290 nm (Fig. 4A) [15, 24]; this signal originated locally, probably by the induced-fit at the active site; it appears to be independent of the T-R transition because GlcNAc6P binding does not produce a significant spectral change at this wavelength range. However, either GlcN-ol-6P or GlcNAc6P binding does produce a negative signal at 268-277 nm, which is mainly due to the quaternary transition [24]. For reference, the spectral changes for the wild-type enzyme, are shown in Figs. 4A and 4B. We used these spectral properties to establish the cause of the inactivity of the Lys208 mutants in the absence of GlcNAc6P, taking as an example Arg172-Ala:Lys208-Glu. As shown in Fig. 4C, the addition of GlcN-ol-6P to this mutant, even at high concentrations, did not produce any spectral change at 287-290 nm. This result is in agreement with thiol group measurements and explains the inactivity of the mutant in the absence of GlcNAc6P as a consequence of the loss of substrate binding ability.

The addition GlcNAc6P (33 times the K_{dis}) produced the expected negative spectral change at 268-277 nm (Fig. 4D). Moreover, the addition of GlcN-ol-6P to a sample previously saturated with the allosteric activator did not produce further changes in the range 268-277 nm, although the peak at 288 nm shows a small negative change (Fig. 4D).

Discussion

The four studied mutants of GlcN6P deaminase display marked alterations in their catalytic and allosteric properties. Only one of them, Lys208-Val, is active in the absence of the activator, displaying homotropic positive cooperativity. GlcNAc6P activates the enzyme, producing at saturation hyperbolic kinetics, with a k_{cat} value of 1/20 times the wild-type value. The data of velocity versus substrate concentration gave a good fit to equation 1 (Fig. 2), the MWC equation for the case of non-exclusive binding of the substrate, although the corresponding parameters differ considerably from the wild-type values (Table 1). The Lys208-Val mutant enzyme is less allosteric, with lower L and higher c values than the wild-type enzyme. The K_m^R from this fit is, within experimental and fitting error, the same value as the K_m for the fully heterotropically activated enzyme. From an average of these values we obtained a K_m^T value of 5 mM, by using the expression $K_m^T = K_m^R/c$ (Table 1). V -type activation is apparent, which can be a consequence of the increase of c , as shown by Cisneros et al. [17].

The other three mutants are essentially inactive without GlcNAc6P; while one of them, Lys208-Glu, is virtually inactive even when at full heterotropic activation, when it reaches a k_{cat} of 1/3500 times the wild-type value (Table 2). In contrast, the mutants Arg172-Ala and Arg172-Ala:Lys208-Glu display k_{cat} values of 1/13 and 1/25 of the wild-type value. At subsaturating concentrations of the activator they also display mixed K - V activation (Fig. 3 and Table 2).

The low activity of Lys208-Glu deaminase contrasts with the activity of the other three mutant forms studied in this research. The ratio $k_{\text{cat}} \text{ Lys208-Val} / k_{\text{cat}} \text{ Lys208-Glu}$ is 175, thus indicating that the negative charge of glutamate is the responsible for the impairment of the active site structure and function. A possible interpretation of this result is the formation of an ionic interaction between Arg172 and Glu208 that could restrict the mobility of the active site-lid.

Rudiño-Piñera et al [18] have described the high mobility of the lid when GlcN6P deaminase is in the T state and also in the enzyme-activator complex, when the active site is empty, as well as its relative fixation when GlcN-ol-6P is bound [18]. The lid motif moves independently of the allosteric transition and it plays a key role in connecting the active and the allosteric site [2, 18, 24]. Bustos-Jaimes et al. [24] analyzed the Phe174-Ala mutation of *E. coli* GlcN6P deaminase, which completely disorders the lid structure, as shown by X-ray crystallography. The Phe174-Ala mutant does not bind active site ligands in the T state [24], as it happens with the present mutants excluding, Lys208-Val. Heterotropic activation restored the active-site binding in this mutant deaminase, which displays k_{cat} and K_m values similar to that of the wild-type enzyme. The proposed ionic interaction Arg172-Glu208 that would decrease the structural flexibility of the active site lid could explain the observed marginal activity of Lys208-Glu mutant deaminase. As in Phe174-Ala mutant, the interference on the lid mobility abolished the ability of the enzyme in the T state to bind the substrate, and in consequence, it suppressed the homotropic effect. This result points out Arg172, the assumed substrate-binding residue in the lid [12], as playing an essential role in binding GlcN6P when the enzyme is in the T state and the lid is freely mobile.

In the set of mutants studied, only Lys208-Val has an available positively charged group in the lid for substrate binding, because in Lys208-Glu mutant, Arg172 is involved in the local ionic interaction. It is precisely Lys208-Val the only mutant of this set that is active in the absence of GlcNAc6P and which still displays homotropic cooperativity with a Hill coefficient of 1.7. This result strengthens the idea that Arg172 plays a unique role in substrate binding to the T state. It has been demonstrated that the T state of the wild-type deaminase binds GlcN6P with low affinity (K_m^T , 24 mM) [16, 17], and that this conformer is catalytically active [17]. The results, summarized in table 2, indicate that Arg172 is essential for the first binding event at the active site in the T state. The absence of this residue deprives the ligand-free enzyme of substrate

binding ability, which can be restored only by heterotropic activation. It is reasonable to consider that this arginine is the origin of a structural perturbation that reaches the allosteric site at the base of the lid motif (β -strand 158-187) and which triggers the allosteric transition.

From the analysis of their X-ray structures, Rudiño et al. [18], proposed a mechanism for the transmission of the conformational changes at the active site towards the subunit interface. This mechanism implies that the active site lid and loop 44-47 move toward each. The latter is linked to the Tyr254 switch of the allosteric site [16]. This triggering mechanism does not exclude the role that we propose of Arg172, indeed the initial substrate binding in the T state could be linked to the lid's movement causing it to move towards the loop 44-47, as described by Rudiño et al. [18]. Although the functional coupling between the active and the allosteric sites can be complex and proceeds through several alternative pathways [2], the present evidence highlights the critical role of Arg172 on the dynamics of the lid and the allosteric coupling.

In spite of crystallographic evidence that Arg172 and Lys208 are involved in phospho group binding in the R-state enzyme [12], the mutations described here did not affect significantly the K_m values for the fully heterotropically activated enzyme. This result is perhaps surprising, although it is in agreement with previous reports illustrating the reshaping of the active site by GlcNAc6P binding in wild-type enzyme and also in the lid mutant Phe174-Ala [18, 24]. In our set of mutants it is apparent that heterotropic activation almost completely restored substrate binding, up to the wild-type level, while catalytic constants remained lower by more than one order of magnitude. This suggests that the role of the two positively charges residues examined in this research is mainly related to the acquisition of the proper geometry of the bound substrate or reaction intermediates in the R conformer of the enzyme.

The measurement of thiol group reactivity and the ligand-induced CD spectral changes (Fig. 4 and Table 3) indicate that the GlcNAc6P-saturated mutants described here reach a

conformational state that presents spectral and chemical properties that are characteristic of the R state and this suggests that the allosteric transition operates in these mutants in the same way as it does in the wild type enzyme. Additionally, the allosterically activated state attained by these mutant deaminases upon saturation with GlcNAc6P, has K_m values that are close to wild-type values (Table 2).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Drs. Jacqueline Plumbridge, Rosario A. Muñoz-Clares, Ismael Bustos-Jaimes and Eduardo Mizraji for a critical reading of the manuscript and many fruitful discussions and Laura I. Alvarez-Afiorve for her valuable technical assistance. This research was supported by grants from DGAPA-PAPIIT (Project IN228703) and CONACYT (Project 41328Q). A.L.M. was recipient of a doctoral fellowship and a research grant from DGEP, UNAM.

References

- [1] A. R. Fersht, W. H. Freeman and Co., New York. (1999)
- [2] I. Bustos-Jaimes, M. Ramírez-Costa, L. DeAnda-Aguilar, P. Hinojosa-Ocaña, M.L. Calcagno, *Biochemistry* 44 (2005) 1127-1135.
- [3] I. Luque, S. A. Leavitt, E. Freire, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31 (2002) 235-256.
- [4] E. Freire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 11680-11682.
- [5] I. Luque, E. Freire, *Proteins* 4 (Suppl.) (2000) 63-71.
- [6] M.F. Perutz, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (1990)
- [7] C. De Staerke, F. Van Vliet, Xu-Guang Xi, C. Swarupa Rani; M.Ladjimi; Jacobs, A., M. F. Triniolles; G. Hervé, G., R. Cunin, *J. Mol. Biol.* 246 (1995) 132-143.

- [8] F. van Vliet, X. Xu-Guang, C. De Staercke, B. Wannemaeker, A. Jacobs, J. Cherfils, M.M Ladjimo, G. Hervé, G., Cunin, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (1991) 9180-9183
- [9] A.D. Ortigosa, J.M. Kimmel, G.D Reinhart, *Biochemistry* 43 (2004) 577-586.
- [10] C. Midelfort, I. A. Rose, *Biochemistry* 16 (1977) 1590-1596
- [11] M. L. Calcagno, P. J. Campos, G. Mulliert, J. Suástegui, *Biochim. Biophys. Acta* 787 (1984) 165-173.
- [12] G. Oliva, M. R. M Fontes, R. C. Garratt, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno, E. Horjales, *Structure* 3 (1995) 1323-1332.
- [13] E. Horjales, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno, R. C. Garratt, G. Oliva, *Structure* 7 (1999) 527-537.
- [14] J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88-118.
- [15] M. M. Altamirano, J. A. Plumbridge, E. Horjales, M. L. Calcagno, *Biochemistry* 34 (1995) 6074-6082.
- [16] G.M. Montero-Morán, E. Horjales, M.L. Calcagno, M.M. Altamirano, *Biochemistry* 37 (1998) 7844-7849.
- [17] D.A. Cisneros, G.M. Madero-Morán, S. Lara-González, M.L. Calcagno, *Arch. Biochem. Biophys.* 412 (2004) 77-84.
- [18] E. Rudiño-Piñera, S. Morales-Arrieta, S. P. Rojas-Trejo, E. Horjales, *Acta Cryst.* 58 (2002) 10-20.
- [19] Rudiño-Piñera, E., Lara-Gonzalez, S., Rojas-Trejo, S., Calcagno, M. L., and Horjales, E., *SSRL Activity Report* 7-122 (1998), 3A88Bp (<http://www-ssrl.slac.stanford.edu/pubs/>).
- [20] L. F. Leloir and C. E. Cardini, *Biochim. Biophys. Acta:* (1956) 33-42.
- [21] J. Plumbridge, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 2053-2062.
- [22] M.M. Altamirano, J. A. Plumbridge, M.L. Calcagno. *Biochemistry* 31 (1992) 1153-1158.

- [23] M.M. Altamirano, C.A. Libreros-Minotta, R. Lara-Lemus, M.L. Calcagno, Arch. Biochem. Biophys. 269 (1989) 555-561.
- [24] I. Bustos-Jaimes, A. Sosa-Peinado, E. Rudiño-Piñera, E. Horjales, M.L. Calcagno, J. Mol. Biol. 319 (2002) 183-189. Erratum: Ibid. 322 (2002) 903.
- [25] DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002), <http://www.pymol.org>

Table 1. Monod-Wyman-Changeux parameters of Lys208-Val mutant form of GlcN6P deaminase enzyme corresponding to data in Fig. 2 fitted to Eq (1). Data for the wild-type enzyme, included for reference, were taken from Cisneros et al.[17].

enzyme form	k_{catR} (s^{-1})	K_{mR} (mM)	c	L
	158 ± 8^a	0.71 ± 0.05^a	0.022 ± 0.007	$6 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^5$
Wild-type	155 ± 7^b	0.68 ± 0.08^b		
	7.73 ± 0.75^a	0.69 ± 0.11^a	0.18 ± 0.02	160^c
Lys208-Val	0.30 ± 0.05^b	1.14 ± 0.05^b		

^aThe wild type enzyme was saturated with the allosteric activator. Data fitted to Michaelis-Henri equation.

^bIn the absence of the allosteric activator. Data fitted to equation 1.

^cManually fitted.

Table 2. Kinetic and binding constants for the mutant forms Arg172-Ala, Lys208-Val, Lys208-Glu, Arg172-Ala:Lys208-Glu and for the wild-type GlcN6P deaminase.

Enzyme form	K_m^a (mM)	k_{cat}^a (s^{-1})	k_{cat}^b (s^{-1})	$K_{dGlcNAc6P}^c$ (μM)
Wild-type	0.55 ± 0.05	160 ± 7.0	158 ± 8.0	30 ± 3.0
Lys208-Glu	0.61 ± 0.07	$4.43 \times 10^{-2} \pm 0.2 \times 10^{-2}$	Inactive	215 ± 60
Lys208-Val	0.69 ± 0.11	7.73 ± 0.75	0.3 ± 0.03	78.0 ± 12.5
Arg172-Ala	1.67 ± 0.18	11.76 ± 0.82	Inactive	78.6 ± 2.9
Arg172-Ala:Lys208-Glu	0.33 ± 0.03	6.12 ± 0.06	Inactive	27.2 ± 4.8

^a Data obtained in presence of a saturating concentration of GlcNAc6P and fitted to Michaelis-Henri equation.

^b Data obtained in absence of GlcNAc6P, fitted to the Hill equation.

^cData obtained from the change of the apparent V values with GlcNAc6P concentration.

Table 3. Determination of reactive thiol groups of cysteine residues with DTNB in the wild-type and mutant Arg172-Ala:Lys208-Glu GlcN6P deaminase. Effect of high concentrations of GlcN-ol-6P and GlcNAc6P.

Enzyme form	Thiol groups measured per mol of enzyme		
	No ligand	GlcN-ol-6P (1 mM)	GlcNAc6P (2.5 mM)
Wild-type	12.2	0	0
Lys208-Glu	11.6	11.8	0
Arg172-Ala:Lys208-glu	11.8	12.1	0

Legends to figures

Figure 1. Stereo view of the active site of GlcN6P deaminase, showing a bound phosphate ion and the residues involved in its binding: Arg172 in the active site lid, Lys208 and the backbone segment 41-44. The active site lid is colored in magenta. This image was drawn with the program Pymol X11 hybrid [25], using the coordinates for *E. coli* GlcN6P deaminase complexed with inorganic phosphate (PDB 1DEA)

Figure 2. Plot of initial velocity versus substrate concentrations for the mutant Lys208-Glu of *E. coli* GlcN6P deaminase. The experimental data were fitted to equation (1) by non-linear regression analysis; the corresponding parameters are shown in table 1.

Figure 3. Plots of initial velocity versus substrate concentration (GlcN6P) for the mutant forms of GlcN6P deaminase with replacements at positions 172 and 208, obtained at variable GlcNAc6P concentrations. Data were fitted by non-linear regression analysis to equation (2). The corresponding fitted parameters and their fit standard error are given in table 2. **A) Lys208-Val.** 0 (■), 0.25 mM (▲), 1 mM (▼), 2.5 mM (◆), 5 mM (●) **B) Lys208-Glu** the GlcNAc6P concentrations were: 0 (■), 0.25 mM (▲), 0.5 mM (▼), 1 mM (◆), 5 mM (●), 7.5 mM (□) **C) Arg172-Ala.** 0 (■), 0.025 mM (▲), 0.05 mM (▼), 0.075 mM (◆), 0.1 mM (●), 0.25 mM (□), 1mM (△), 5 mM (▽). **D) Arg172-Ala:Lys208-Glu.** 0 (■), 0.05 mM (▲), 0.1 mM (▼), 0.25 mM (◆), 0.5 mM (●), 0.75 mM (□), 1 mM (△), 2.5 mM (▽), 5mM (◇).

Figure 4. Near-UV CD spectra of wild-type and double mutant form of Arg172-Ala:Lys208-Glu GlcN6P deaminase. **A)** Wild-type enzyme, ligand free (.....) and added with 1 mM GlcN-ol-6P (—); **B)** Wild-type enzyme, ligand free (.....), added with 5 mM GlcNAc6P (---) and added with both ligands: 5 mM GlcNAc6P and 1 mM GlcN-ol-6P (—); **C)** Arg172-Ala:Lys208-Glu mutant enzyme, ligand free (.....) and added with 1 mM GlcN-ol-6P (—). **D)** Arg172-Ala:Lys208-Glu mutant enzyme, ligand free (.....), added with 5 mM of GlcNAc6P (---), and added with both ligands: 5 mM of GlcNAc6P and 1 mM of GlcN-ol-6P (—).

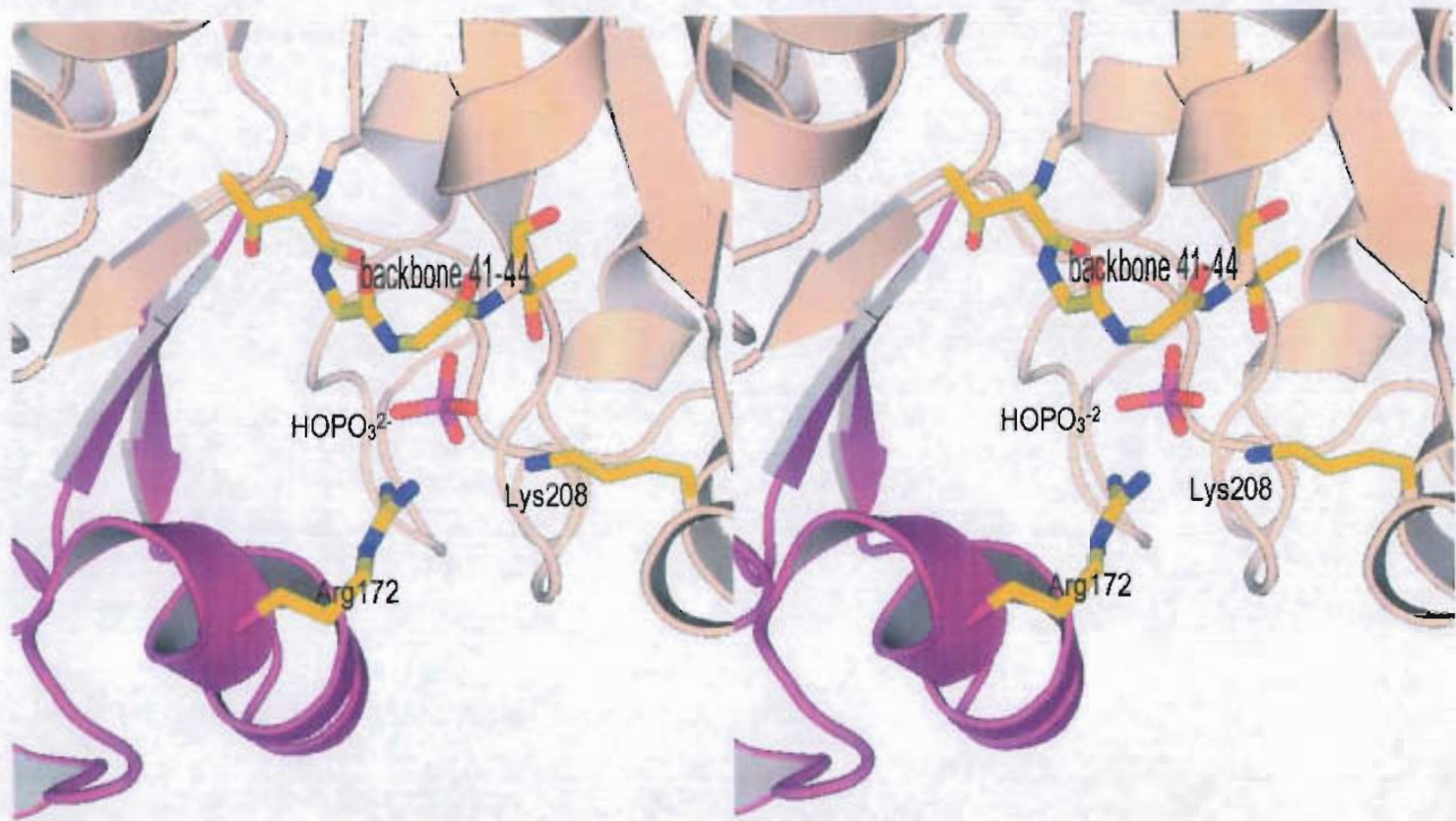


Figure 1.

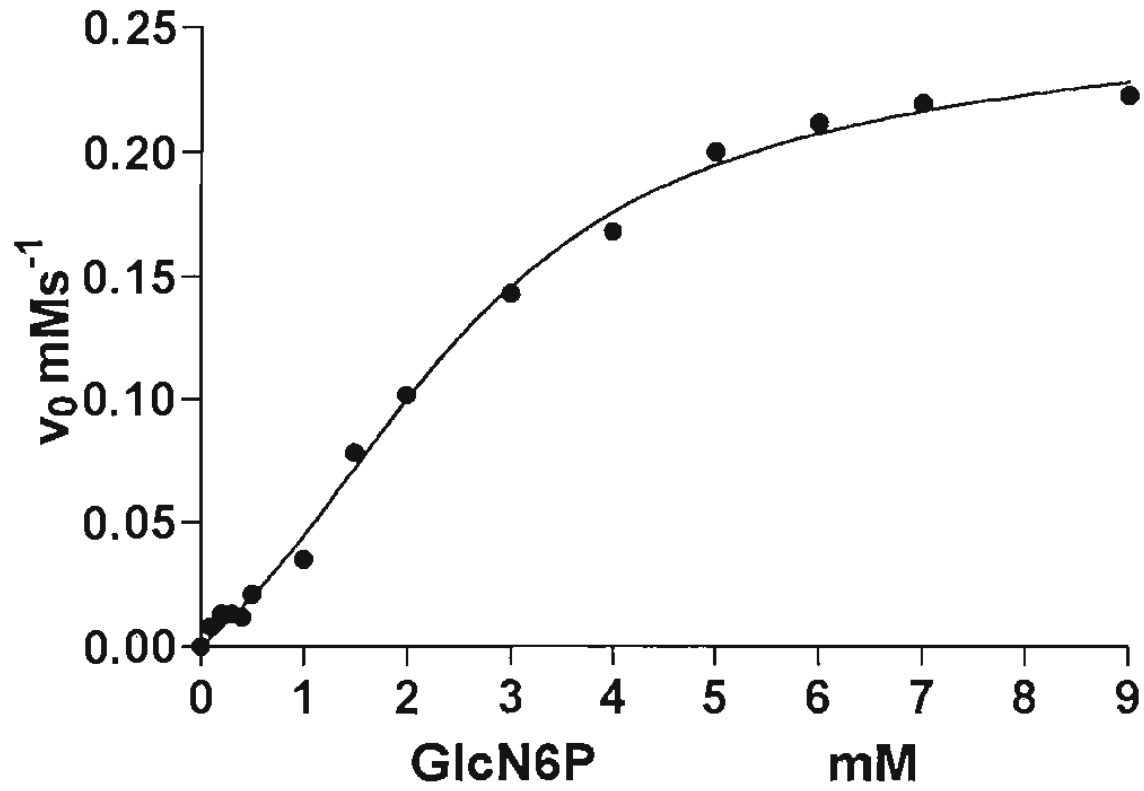


Figure 2

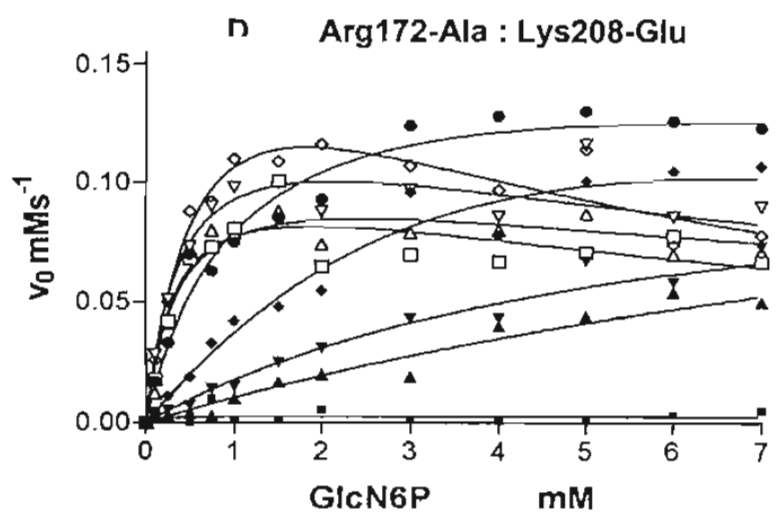
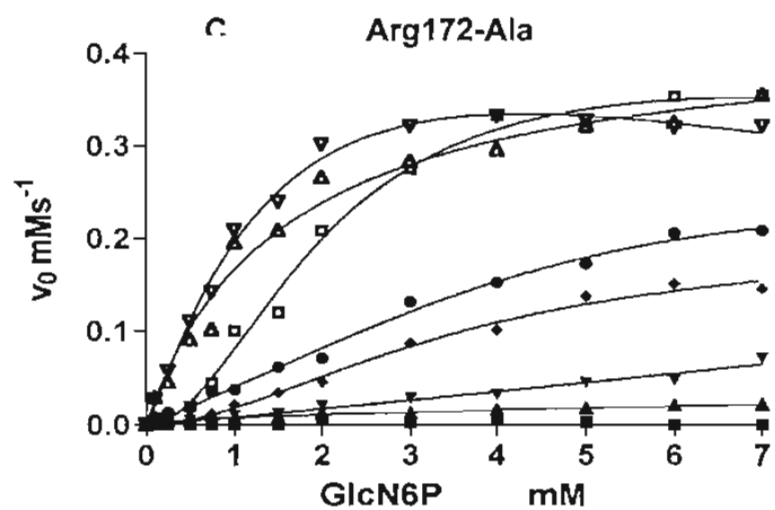
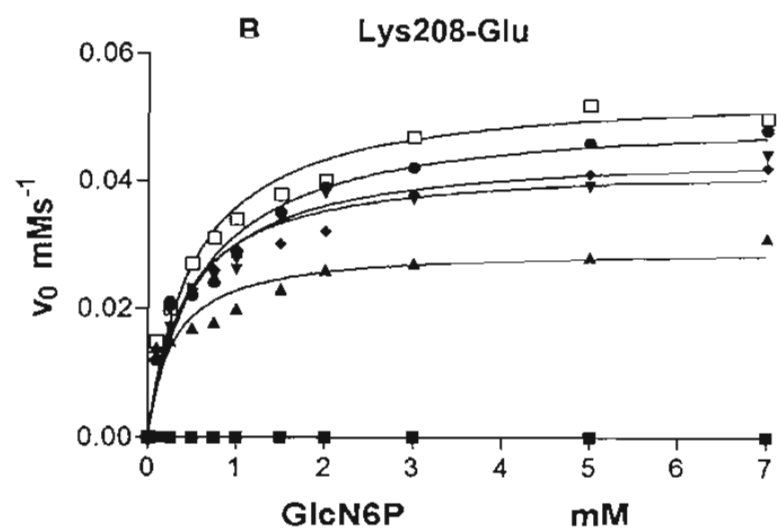
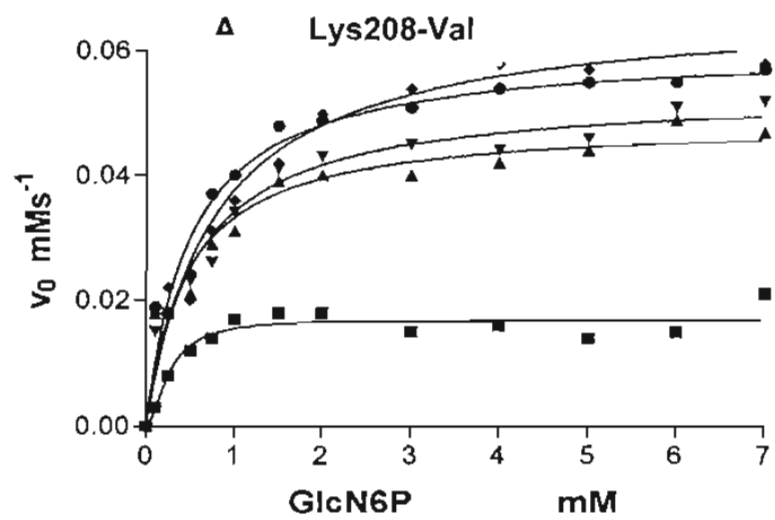


Figure 3.

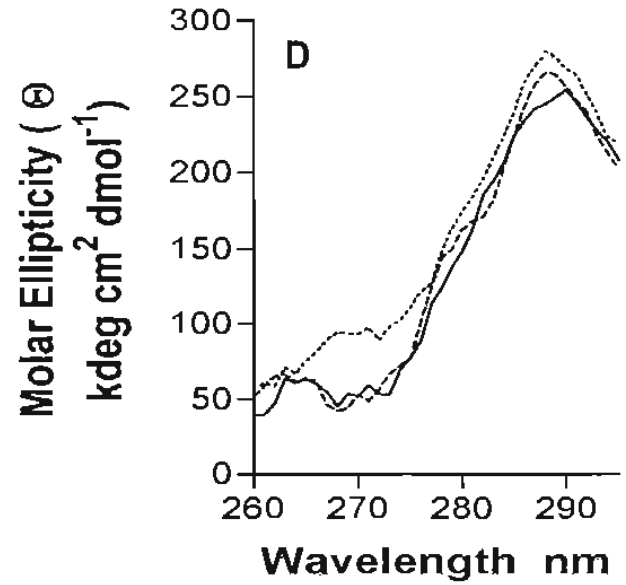
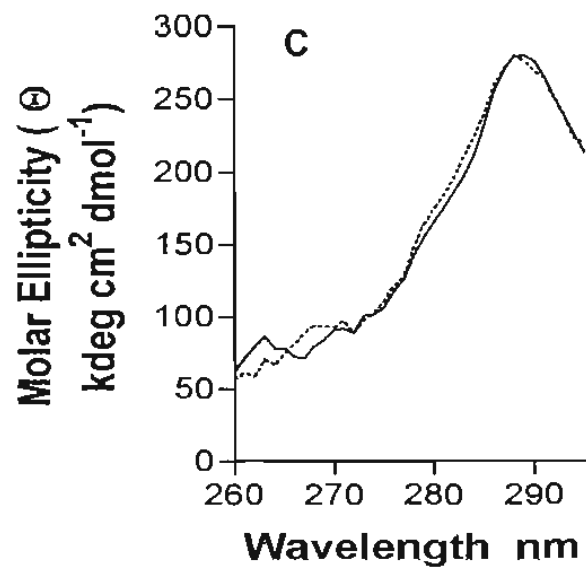
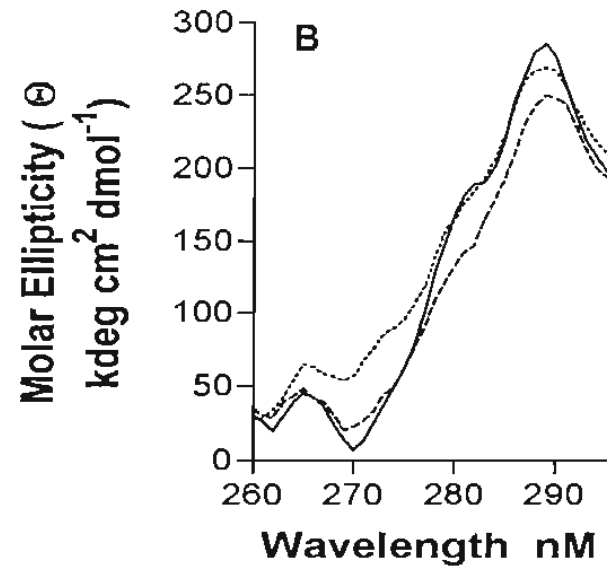
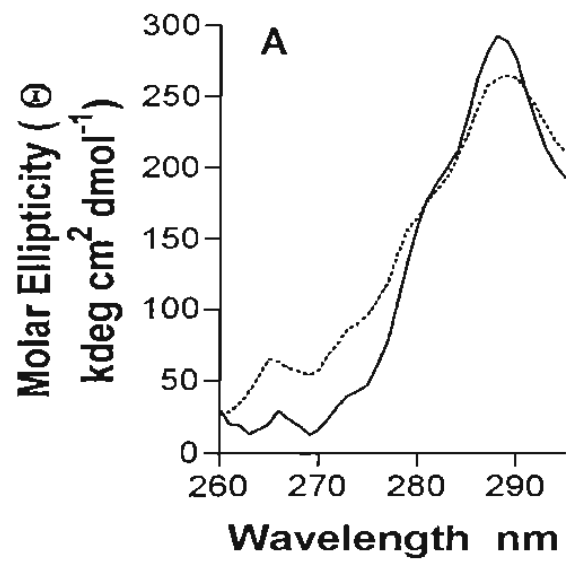


Figure 4