

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ENZIMAS Gln6P  
DESAMINASA BACTERIANA Y HUMANA DESDE EL  
PUNTO DE VISTA DE SU MECANISMO Y REGULACIÓN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(ORIENTACIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**LAURA ILIANA ALVAREZ AÑORVE**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO LUIS CALCAGNO MONTANS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D.F.



NOVIEMBRE 2005

0350022



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.



Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **ALVAREZ AÑORVE LAURA ILIANA** con número de cuenta **82266161** con la tesis titulada: **Estudio comparativo de las enzimas GlcN6P desaminasa bacteriana y humana desde el punto de vista de su mecanismo y regulación**, bajo la dirección del(a) **Dr. Mario Luis Calcagno Montans**.

Presidente:	Dra. Luisa Alvarina Alba Lois
Vocal:	Dr. Edmundo Chávez Cossio
Secretario:	Dr. Mario Luis Calcagno Montans
Suplente:	Dr. Ismael Bustos Jaimes
Suplente:	Dr. Alejandro Sosa Peinado

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 11 de octubre del 2005

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## ***AGRADECIMIENTOS:***

De manera muy especial a mi querido director de Tesis el Dr. Mario L. Calcagno por la acertada dirección de éste trabajo, por el apoyo incondicional y la confianza que me brindó, por su inagotable paciencia, por compartir su tiempo y su entusiasmo, por todo lo aprendido durante estos años pero sobre todo por su disponibilidad para apoyar a todos los que hemos necesitado de él y ser un ejemplo de calidad humana y guía para todos sus compañeros de trabajo.

**Mi más sincero agradecimiento a los demás miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias a éste trabajo.**

al Dr. Edmundo Chavez Cossio

a la Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

al Dr. Alejandro Sosa Peinado

al Dr. Ismael Bustos Jaimes

a la Universidad Nacional Autónoma de México.

**DEDICO ESTA TESIS:**

**A DIOS**

Por ser la gran base en donde se posan todos los valores de mi vida.

**A MIS PADRES**

Quienes me han dado los principios para seguir adelante en la vida.  
Quienes me han apoyado en las decisiones trascendentales.  
Quienes me han permitido elegir y construir mi camino.  
A quienes agradezco el poder estar aquí y que con amor supieron fijar  
en mí el seguir luchando y siempre seguir.  
A quienes debo conocer el camino del esfuerzo y dedicación.  
A quienes dedicaré ahora y siempre todo mi esfuerzo.

**A MIS HERMANAS**

Con quienes he compartido grandes momentos y caminado juntas en  
ésta vida y con el deseo de que triunfen en todos sus esfuerzos.

**A MIS AMIGOS**

Todas aquellas personas especiales cuyos nombres no necesito mencionar  
y que han compartido a lo largo del tiempo diversas etapas de mi vida.

**A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO**

Por las cosas que hemos aprendido y compartido juntos.  
Por su importante y constante ayuda.  
Por su inestimable apoyo en todo momento, pero sobre todo  
por su valiosa amistad y ayuda desinteresada en cosas que van mas allá de  
una tesis.

*A una persona muy especial que me ha apoyado en todo momento y con  
la cual he compartido momentos maravillosos, a tí Carlos.*

## RESUMEN.

La enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa (EC 3.5.99.6) cataliza la conversión reversible de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa 6-fosfato (Fru6P) y ion amonio y es una enzima clave en la regulación del catabolismo de los aminoazúcares en varias especies. No obstante que esta enzima ha sido principalmente estudiada en microorganismos [Midelfort C. y Rose I. A 1977; Plumbridge J.A. y col. 1993, Calcagno M. y col. 1984, Vincent F. y col. 2005], se ha encontrado también en varios eucariotes superiores tales como insectos [Benson R.L. y Friedman S; 1970; Enghofer E. y Kress H; 1980] y mamíferos [Leloir L. F. y Cardini C. E; 1956; Pattabiraman T. N. y col. 1961, Schevchenko V. y col. 1998], esta enzima está ausente en plantas.

La glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPD) es la desaminasa más estudiada tanto desde el punto de vista estructural, [Oliva, y col.1995, Horjales E. y col.1999, Rudiño-Piñera y col. 2002] y funcional [Calcagno y col. 1984, Altamirano y col. 1987,1991,1994 y 1995, Montero Morán y col. 1998 y 2001, Lara González y col. 2000 y 2001, Bustos-Jaimes y col. 2001 y 2002, Cisneros A. y col. 2004 , Lucumí A. y col. 2005] y es una típica enzima alostérica de tipo *K*, activada por la *N*-acetilglucosamina 6-P y que sigue una cinética alostérica monodiana [Altamirano y col. 1995, Montero-Morán y col. 1998].

Los vertebrados terrestres poseen dos GNPD parálogas llamadas GNPD-1 y GNPD-2 que difieren en longitud y presentan elevada homología de secuencia de aminoácidos en 240 residuos; las GNPD-1 de mamíferos (humanos, ratón y hámster) tienen un elevado valor de identidad entre sí; cuentan con 289 residuos, 23 más que la enzima de *E. coli* y son homólogas

de la enzima bacteriana, en el segmento 1 a 258 el cual contiene todos los grupos relevantes para la catálisis y para establecer los contactos entre las subunidades. El segmento 258-289 de las GNPD-1 forma el extremo C-terminal y no tiene una contraparte homóloga con las desaminasas de otros microorganismos.

El propósito de este trabajo es la caracterización cinética de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa humana 1 (hGNPD-1) y su activación alostérica atípica por GlcNAc6P. El gen de la desaminasa humana fue clonado en una cepa de *Escherichia coli*, carente de GNPD y purificada por cromatografía de afinidad por el sitio alostérico .

La hGNPD-1 presenta una cinética de activación alostérica más compleja debido a que el modulador alostérico es un fuerte activador de tipo *V* y un discreto inhibidor de tipo *K*, al que solemos llamar activador, por ser el efecto predominante. La inhibición por sustrato y el efecto *K* negativo (aumento de la  $K_m$  aparente con la concentración del activador) se comportan como dos fenómenos independientes. Basándonos en lo anterior proponemos un modelo cinético para explicar la activación alostérica de la hGNPD-1 en el cual la GlcNAc6P se comporta como un activador esencial para la catálisis pero no para la unión del sustrato e incluye además un complejo abortivo generado por la unión de GlcNAc6P al sitio de la GlcN6P.

Como un intento para entender el papel funcional de la extensión C-terminal de la hGNPD-1, se construyeron 2 mutantes truncadas en el C-terminal y se estudiaron sus propiedades alostéricas. Los resultados indican que éste segmento C-terminal no es el causante del comportamiento cinético atípico de la hGNPD-1 ni tiene un papel importante en la estabilidad de su plegamiento.

## SUMMARY.

The enzyme Glucosamine-6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6) catalyses the conversion of D-glucosamine 6-phosphate into D-fructose 6-phosphate and ammonia and it is a key enzyme in the regulation and catabolism of amino sugars in several species. Although this enzyme has been studied mainly in microorganisms [Midelfort C. y Rose I. A 1977; Plumbridge J.A. y col. 1993, Calcagno M. y col. 1984, Vincent F. y col. 2005], it has also been currently characterized in a variety of eucaryotic organisms such as insects [Benson R.L. y Friedman S; 1970; Enghofer E. y Kress H; 1980] and mammals [Leloir L. F. y Cardini C. E; 1956; Pattabiraman T. N. y col. 1961, Schevchenko V. y col. 1998], this enzyme has not been found in plants yet.

The enzyme Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* (EcGNPD) is the best studied deaminase and has been well characterized both from the structural [Oliva, y col.1995, Horjales E. y col.1999, Rudiño-Piñera y col. 2002] and functional aspects [Calcagno y col. 1984, Altamirano y col. 1987,1991,1994 y 1995, Montero Morán y col. 1998 y 2001, Lara González y col. 2000 y 2001, Bustos-Jaimes y col. 2001 y 2002, Cisneros A. y col. 2004, Lucumí A. y col. 2005] it is a typical K-system allosteric enzyme which is activated by GlcNAc6P and displays an allosteric behavior described by the Monod model. [Altamirano y col. 1995, Montero-Morán y col. 1998].

Terrestrial vertebrates present two paralogous GNPd called GNPd-1 y GNPd-2 that differ in size and share a high homology through their sequences in the first 240 aminoacid residues; the GNPd-1 enzymes of mammalian (human, mouse and hamster) share a high value of identity between them; they present a sequence of 289 aminoacid residues, 23 more than the complete sequence of *Escherichia coli* and show homology with the bacterial enzyme over the 1-258 ungapped overlapped segment which contains all the groups that play a central role for the



catalysis and are responsible for the inter-monomeric interactions. The segment 258-289 of the GNP-1 enzyme constitutes the C-terminal segment and does not have homology with the deaminases of microorganisms.

The purpose of this work is the kinetic characterization of the human recombinant glucosamine 6-phosphate deaminase (hGNPD-1) and its atypical allosteric activation by GlcNAc6P. The *GNPI 1* gene was cloned into an *Escherichia coli* strain which carries a null mutation in the chromosomal copy of the *nagB* gene and the resulting protein was purified by allosteric-site affinity chromatography.

The hGNPD-1 displays a complex allosteric kinetic activation because the allosteric modulator is a strong type V activator and a weak type K inhibitor, we called it activator due to the former being the main effect. The substrate inhibition and the K negative effect (the increase of the apparent  $K_m$  with the activator concentration) behave like two independent phenomena. According to previous data we propose a kinetic model to explain the allosteric activation of the hGNPD-1 where GlcNAc6P behaves as an essential activator for the catalysis but not for substrate binding, the model includes an abortive complex caused by the binding of GlcNAc6P to the site of the GlcN6P.

With the aim of understanding the role of the non-homologous C-terminal extension of GNP-1, we performed the construction of two C-terminal truncated forms of this enzyme to study their allosteric properties. Our results show that this C-terminal segment does not modify the hGNPD-1 atypical kinetic behavior nor does it play an important role in the stability of its folding.

## INTRODUCCIÓN.

### *Metabolismo de aminoazúcares en bacterias y en animales.*

Los aminoazúcares son monosacáridos en los cuales uno de sus grupos hidroxilo se encuentra sustituido por un grupo amino. Los 2-amino-2 desoxiaminoazúcares aparecen como componentes de la superficie celular de las bacterias y forman parte del esqueleto estructural de los peptidoglicanos en eubacterias (pared celular), así como también de la capa externa de lipopolisacárido de las bacterias gram negativas.

Los aminoazúcares son abundantes en la naturaleza y también forman parte de diferentes biopolímeros simples o complejos. Son constituyentes de la quitina, que es un homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidos por enlaces  $\beta$ 1-4 y también se encuentran en diversas proteínas glicosiladas. La mayoría de los glicoconjugados (carbohidratos unidos covalentemente a proteínas o lípidos; glicoproteínas y glicolípidos) de las superficies celulares de mamíferos contienen aminoazúcares, incluyendo residuos de ácido siálico. El glucosaminoglicano ácido hialurónico contiene unidades alternas de ácido D-glucurónico y la *N*-acetilglucosamina y forma disoluciones claras y muy viscosas que sirven de lubricante en el líquido sinovial y le confieren su consistencia gelatinosa al humor vítreo del ojo de los vertebrados. El hialuronato es también un componente esencial de la matriz extracelular de cartílagos y tendones, es importante mencionar que los glicosaminoglicanos también se unen covalentemente a proteínas específicas, (proteoglicanos). El sulfato de condroitina contribuye a la resistencia a la tensión de los cartílagos, tendones, ligamentos y las paredes de la aorta, el sulfato de dermatán contribuye a la estructura de la dermis y también está presente en los vasos sanguíneos y en las válvulas cardíacas.

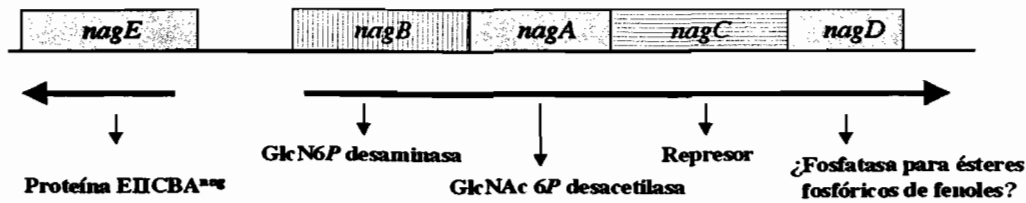
Los sulfatos de queratán no tienen ácido urónico y su contenido en sulfato es variable, están presentes en la córnea, cartílago, hueso y en diversas estructuras córneas formadas por células

mueras: cuernos, pelos, pezuñas, uñas y garras. La heparina (un glucosaminoglucano) es un anticoagulante natural producido en los mastocitos y liberado en la sangre, en donde inhibe la coagulación por unión y estimulación de la proteína anticoagulante antitrombina III.

Como podemos observar, el papel de los carbohidratos en las propiedades de las glicoproteínas puede ser tan diverso como: 1) mantener la conformación estructural de una proteína, 2) determinar el tiempo de vida media de glicoproteínas y células circundantes (Drickamer,1991) 3) controlar la permeabilidad de la membrana, 4) regular el metabolismo y la división celular (Fermín y Nathan 1991, Glick y col.1991) y 5) presentar un papel en el reconocimiento celular.

### ***La GlcN y la GlcNAc.***

Los aminoazúcares como la D-glucosamina (GlcN) y la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) se pueden utilizar como fuente de carbono en *E. coli*. En especial, la GlcNAc promueve velocidades de crecimiento comparables a las producidas por la glucosa (Álvarez Añorve y col. 2005). El crecimiento de *E. coli* en un medio con aminoazúcares como única fuente de carbono, induce la expresión de las enzimas necesarias para el metabolismo de los aminoazúcares, codificadas en el operón divergente *nagE*, *nagBACD* (Figura 1). Los genes *nagB* y *nagA* codifican para las enzimas glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) y N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa (GlcNAc6P desacetilasa) respectivamente, el gen *nagC* codifica para una proteína represora del regulón *nag*, la N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P) que evita la unión de la proteína NagC a sus operadores y por lo tanto es el coinductor del regulón [Plumbridge J. A; 1991 y Plumbridge J. A. y Kolb A; 1998 ].

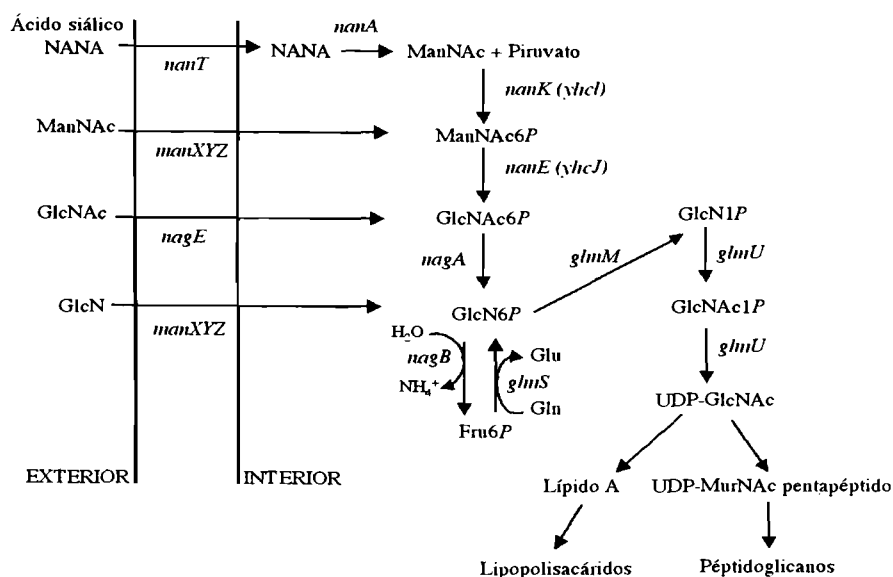


**Figura 1. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (tomado de Plumbridge J. A., 1992).**

El metabolismo de la GlcN y la GlcNAc (Fig. 2) se lleva a cabo por los procesos catabólicos en los que participan los productos de la expresión de los genes del operón *nag* y por los procesos anabólicos que se llevan a cabo por las proteínas de los genes *glm*. Ambos aminoazúcares son introducidos por los componentes del sistema de fosfotransferasa (PTS) codificados por los genes *manXYZ* y *nagE* respectivamente (Postma y col.1996). Durante el tránsito por la membrana los aminoazúcares son fosforilados a expensas del fosfo-*enol*-piruvato y posteriormente se degradan hasta Fru6P y amonio por los productos de los genes *nagA* y *nagB*. Cuando la GlcN y la GlcNAc están presentes en el medio, se utilizan para la formación de peptidoglicanos y lipopolisacáridos. En ausencia de aminoazúcares, la GlcN6P sintasa, producto del gen *glmS* es esencial ya que se encarga de la generación de GlcN6P. El gen *glmM* codifica para la enzima responsable de la conversión de GlcN6P en glucosamina 1-fosfato (GlcN1P) mientras que el gen *glmU* codifica para una proteína bifuncional para las funciones enzimáticas de la acetilación de la GlcN1P, formando *N*-acetilglucosamina 1-fosfato (GlcNAc1P) y de la síntesis de la UDP-GlcNAc. Éste es el donador de aminoazúcares en diversas reacciones de transferencia durante la síntesis de péptidoglicanos. La *N*-acetilmanosamina (ManNAc) entra a la célula por acción del transportador ManXYZ acoplado al sistema PTS, produciendo *N*-acetilmanosamina 6-fosfato (ManNAc6P). El ácido *N*-acetilneurámico (NANA) entra a la célula por un sistema de simporte codificado por *nanT*. Dentro de la célula, una aldolasa (*N*-

acetilneuraminato liasa, *nanA*) rompe al NANA generando ManNAc y piruvato. Las vías de degradación del NANA, ManNAc y GlcNAc convergen a nivel de la GlcNAc6P (Curtis S. y col. 1975, Jones-Mortimer y col. 1980, Postma y col. 1996).

La GlcN6P puede ser generada por cuatro reacciones diferentes: 1) transferencia del grupo amida de la glutamina a la Fru6P; 2) reacción reversa de la GlcN6P desaminasa; 3) fosforilación de la glucosamina por una hexocinasa y 4) desacetilación de la GlcNAc6P (Plumbridge y Vimr, 1999 y Plumbridge, 1989).



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

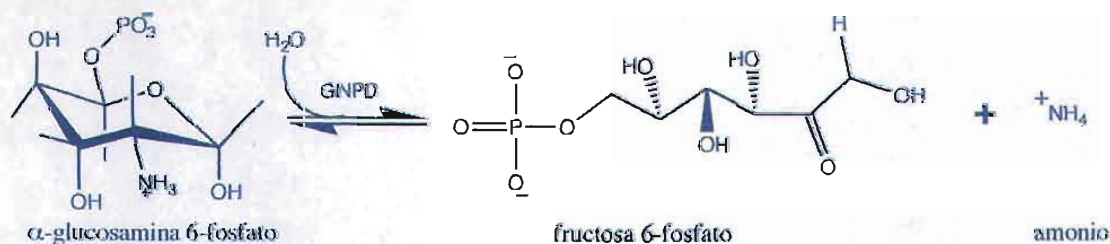
### ***Metabolismo de los aminoazúcares en mamíferos:***

El metabolismo de aminoazúcares en mamíferos es esencialmente el mismo que el de *E. coli*, a excepción de un cambio en el orden de las reacciones. En los mamíferos la GlcN6P sufre primeramente una reacción de acetilación para dar GlcNAc6P seguida de una isomerización que

produce GlcNAc1P, mientras que en las bacterias, la isomerización de la GlcN6P precede a la acetilación.

**La GlcNAc6P Desaminasa.**

La enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6 antes EC 5.3.1.10) que cataliza la isomerización y desaminación reversible de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y ion amonio (Figura 3) es una enzima clave en la regulación del catabolismo de los aminoazúcares en varias especies. Esta regulación involucra en *E. coli* el control transcripcional de los genes relacionados con la utilización de la glucosamina (Plumbridge y col. 1993) y la activación alostérica de la GNPd por la *N*-acetilglucosamina 6 fosfato (GlcNAc6P).



**Figura 3. Reacción de isomerización y desaminación catalizada por la GlcN6P.**

Esta enzima pertenece a la clase de las aldosa-cetosa isomerasas. Las enzimas de este grupo (5.3), catalizan la toma de un hidrógeno del C2 de la aldosa, que transfieren a la cetosa, o lo opuesto en la reacción reversa, presentando como intermediario de la reacción un *cis*-enediol.

La GlcN6P desaminasa fue descubierta por Leloir y Cardini en 1956, quienes la purificaron a partir de riñón de cerdo. Estos autores observaron la activación de la enzima por GlcN6P, y más tarde, en 1958, Comb y Roseman purificaron la enzima a partir de *E. coli* y de riñón de cerdo.

No obstante que la GlcN6P desaminasa ha sido principalmente estudiada en microorganismos (Midelfort C. y Rose I. A; 1977; Plumbridge J.A. y col. 1993; Calcagno M. y col. 1984;

Vincent, F. y col. 2005) se ha encontrado también en varios eucariotes superiores tales como insectos. (Benson R.L. y Friedman S; 1970 Enghofer E. y Kress H; 1980) y mamíferos (Leloir L. F. y Cardini C. E; 1956; Pattabiraman T. N. y col. 196, Schevchenko V. y col. 1998) pero está ausente en plantas.

La glucosamina 6- fosfato desaminasa de *E. coli* (EcGNPD) es la desaminasa más estudiada tanto desde el punto de vista estructural, (Oliva, y col. 1995, Horjales E. y col. 1999, Rudiño-Piñera y col. 2002) como funcional, (Calcagno y col. 1984, Altamirano y col. 1987, 1991, 1994 y 1995, Montero Morán y col. 1998 y 2001, Lara González y col. 2000 y 2001, Bustos-Jaimes y col. 2001 y 2002, Cisneros A. y col. 2004, Lucumí A. y col. 2005) y es una típica enzima alostérica de tipo *K*, activada por la *N*-acetilglucosamina 6-P y que sigue una cinética alostérica monodiana (Altamirano y col. 1995).

En mamíferos, existen dos genes que codifican para la *GlcN6P* desaminasa los cuales difieren en longitud y comparten identidad en 240 residuos (Figura 4). La secuencia de la desaminasa de cadena larga (GNPD-1) en mamíferos (humanos, ratón y hámster) tiene una elevada identidad entre las diferentes especies, esta enzima cuenta con 289 residuos aminoácidos, 23 más que la enzima de *E. coli* y es homóloga con la enzima bacteriana sólo en el segmento 1 a 258. Éste contiene todos los grupos relevantes para la catálisis y para los contactos entre las subunidades, los cuales son semejantes a los de la desaminasa bacteriana. El segmento 258-289 de la enzima GNPD-1 de mamífero que forma el extremo C-terminal no tiene una contraparte homóloga con las desaminasas de otros organismos.

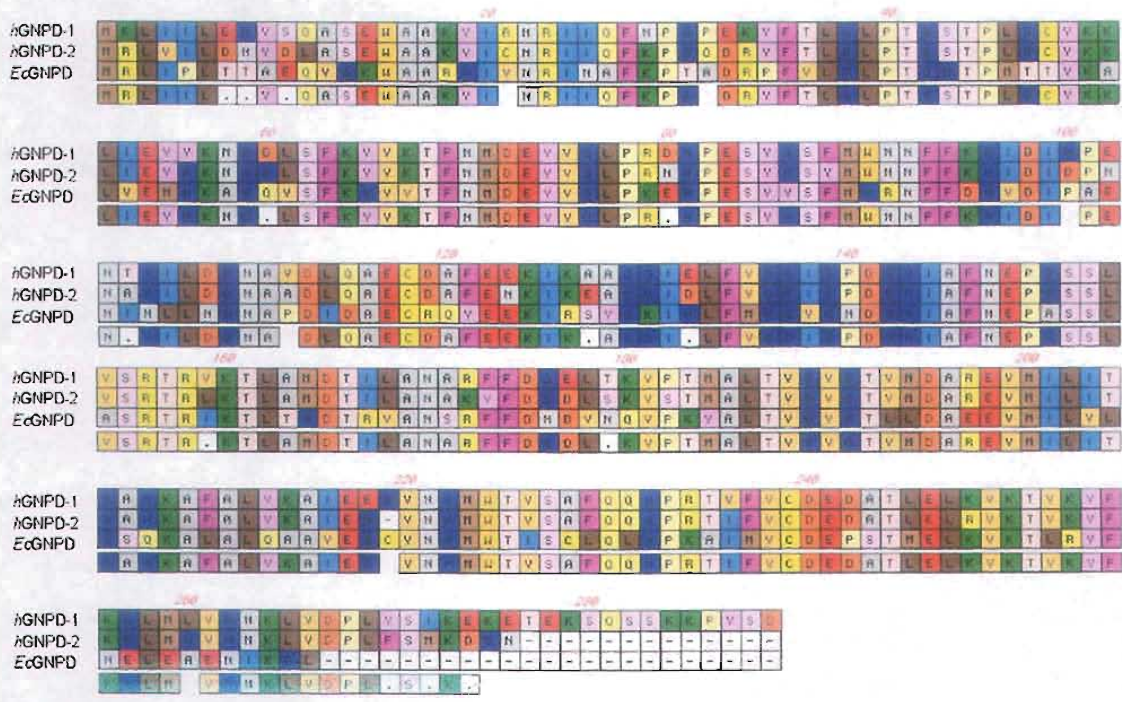
En mamíferos, la enzima ha sido purificada de corteza de riñón de perro (Lara-Lemus R. y col. 1992) y de bovino (Lara-Lemus R. y col. 1998), la enzima de espermatozoide de hámster (*Metacryctus auratus*) también ha sido purificada y su gene clonado y secuenciado [Hebert L. M. y col. 1996].

Se ha demostrado por análisis del cDNA en hámster, que la GlcN6P desaminasa en mamíferos se localiza principalmente en riñón e intestino delgado, en concentraciones menores en bazo, testículo, ovario, cerebro, pulmón y corazón y en niveles muy bajos, en músculo esquelético e hígado (Wolosker y col. 1998). Es importante mencionar que en condiciones fisiológicas la desaminasa sintetiza fructosa 6-fosfato, siendo su papel biológico el proveer hexosas hacia la vía glucolítica. La GlcN6P desaminasa es la única enzima que puede facilitar la transferencia de hexosaminas provenientes de macromoléculas estructurales como glicoproteínas y glicolípidos hacia la vía glucolítica; esta posibilidad de funcionar como una fuente de energía está estrechamente relacionada con la localización con la que se encuentra la desaminasa. Esta enzima, tanto en el riñón, como en el intestino delgado, se localiza en el epitelio transportador cuya actividad específica es una de las más altas en el organismo (Wolosker y col. 1998). En el cerebro la desaminasa se localiza en las neuronas y se concentra principalmente en las terminales sinápticas, que son las regiones más demandantes de energía de las neuronas, debido a los procesos de exocitosis y endocitosis de las vesículas sinápticas. De igual forma, la movilidad de los espermatozoides consume una gran cantidad de energía y los espermatozoides poseen una alta concentración de esta enzima (Parrington y col. 1996).

Las desaminasas humanas han sido las más estudiadas; el primer gen conocido fue el que codifica para la GlcN6P desaminasa humana de cadena larga (GNPI-1), el cual fue clonado inicialmente a partir de cDNA de células mieloides y también de melanocitos normales (códigos Swissprot P46916 y N46023, respectivamente). Más tarde fue clonado de otras líneas celulares y desde principios del 2001 se ha localizado en el genoma humano completo en el que también se encontró que existía un gen parálogo desconocido hasta entonces (*GNPI 2*). (Arreola R. y col. 2003).



Uno de los genes de la GNPD codifica para una cadena polipeptídica de 289 residuos aminoácidos (GNPD-1) y ha sido mapeado en el cromosoma humano 5 en la banda 5q31 (Shevchenko, V. y col. 1998). El gen fue oficialmente llamado (*GNPI 1*). El segundo gen (*GNPI 2*) se localiza en el cromosoma 4 en la banda 4p13, y codifica para una cadena polipeptídica de 275 residuos (GNPD-2).



**Figura 4. Alineación de las enzimas hGNPD-1, hGNPD-2 y Ec GNPD.**

Es importante mencionar que la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de GNPD-1 y GNPD-2 son 87.55% idénticas en el segmento correspondiente a los aminoácidos 1-274 (Arreola R. y col.2003).

Ambos genes parálogos han sido expresados en células BHK-21, una línea celular derivada de epitelio de hígado de hámster (Çayli, A. y col. 1999) y sus niveles de transcripción han sido determinados en diferentes tejidos humanos encontrándose que ambos transcritos aparecen en diferente proporción en las muestras probadas (Zhang J. y col. 2003).

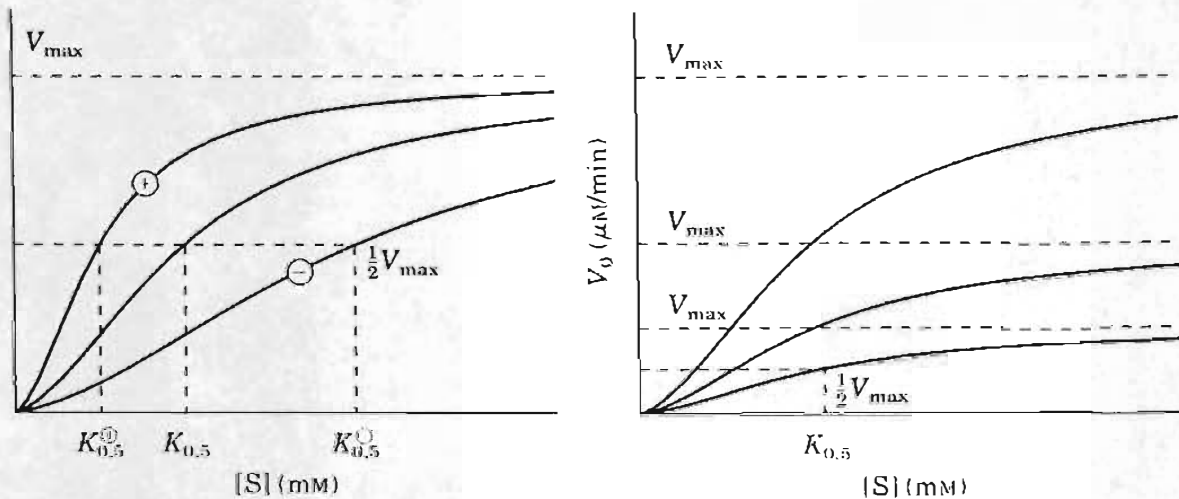
En nuestro laboratorio la hGNPD-2 recombinante se ha obtenido pura como un monómero inactivo, no obstante, se ha observado que en presencia de GlcNAc6P se forman pequeñas cantidades de hexámero activo inestable (Ruiz Rojina, comunicación personal, no publicado). La hGNPD-1 es un hexámero estable y catalíticamente activo. De igual manera que la mayoría de las GNPD conocidas desde las bacterias a los vertebrados, esta enzima es alostéricamente activada por GlcNAc6P.

La existencia natural de un homohexámero estable de la GNPD-1 está bien documentada. Lara-Lemus, R. y Calcagno, M.L. (1998) purificaron la desaminasa de riñón de bovino y reportaron la activación alostérica atípica por GlcNAc6P. Esta enzima puede ser reconocida como un homohexámero de cadenas pesadas en base a su secuencia de aminoácidos N-terminal y a la masa molecular de sus subunidades. El homohexámero se encuentra también presente como la forma única de la enzima en espermatozoides de hámster (Hebert L. M. y col. 1996) y ratón (Amireault P, y Dube F. 2000).

### ***Activación alostérica por GlcNAc6P***

La activación alostérica por GlcNAc6P se observa en todas las desaminasas animales estudiadas hasta ahora. El control alostérico de la GlcN6P desaminasa de riñón de perro es esencialmente similar al de la enzima de *E. coli*. La cinética de ambas desaminasas, la de *E. coli* (Calcagno M. y col. 1984) y la de riñón de perro (Lara-Lemus R. y col. 1992) pueden ser bien descritas por el modelo alostérico de Monod, Wyman y Changeux (Monod J. y col. 1965). Estas enzimas se comportan como sistemas tipo *K*, lo cual significa que el control alostérico opera por medio de la modificación de la afinidad aparente de la enzima por su sustrato, sin cambio en su constante catalítica. Lara Lemus y col. 1992 fueron los primeros en estudiar una GlcN6P desaminasa de mamífero desde el punto de vista cinético y regulatorio. Su trabajo sobre la desaminasa de corteza de hígado de bovino demostró que esta enzima presenta una cinética alostérica poco

común; se comporta como un sistema de tipo V, en el cual el valor de la  $k_{cat}$ , se incrementa con la concentración del activador alostérico y tiende a cero en ausencia del activador (Figura 5). Los datos de Roberto Lara Lemus (Tesis de doctorado, UNAM, 1999) revelan que en el riñón de bovino se encuentran ambas cadenas, la ligera y la pesada. Esto fue interpretado en nuestro laboratorio como la consecuencia de una modificación por proteólisis. Lara Lemus obtuvo pequeñas cantidades de homohexámero ligero de bovino, además de oligómero pesado y lo que probablemente hayan sido especies mixtas. Sus resultados muestran que la isoenzima de cadenas ligeras presenta una cinética de activación alostérica semejante a la desaminasa de *E. coli*. En contraste, el homohexámero de cadena larga, que ha sido estudiado más en detalle, no cataliza sino en presencia del activador alostérico y el efecto de éste es aumentar la  $V$  límite ( $V_{MAX}$ ) (este comportamiento alostérico atípico también lo presenta la hGNPD-1 recombinante) y se correlaciona con sólo 36 reemplazos de aminoácidos en la parte homóloga de ambos genes, la mayor parte de los cuales se concentran en los extremos N y C terminales.

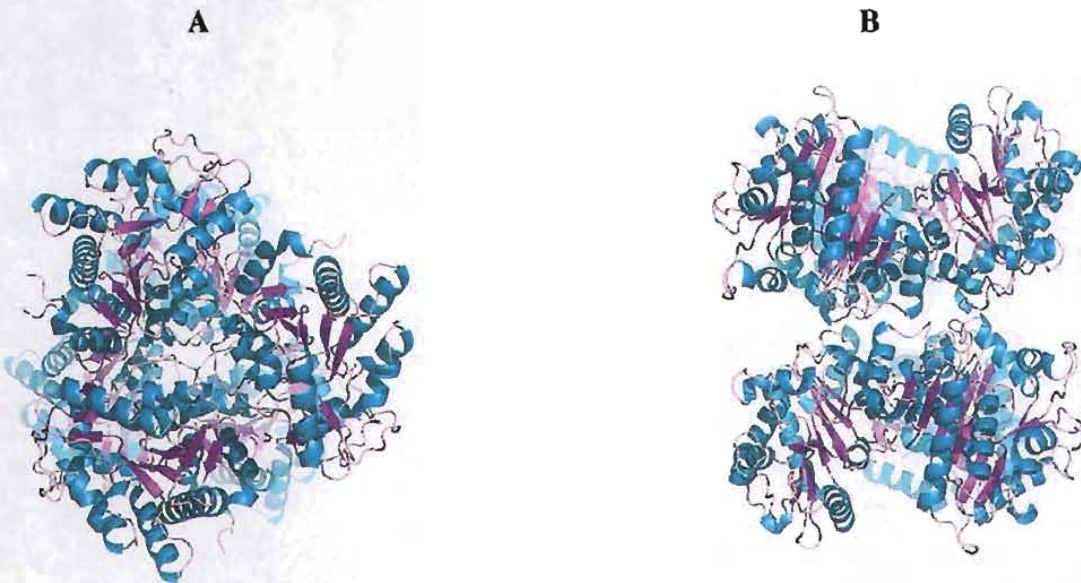


**Figura 5.** Se muestran 2 cinéticas de activación alostérica en A) sistema K típico y en B) sistema V típico.

### ***La EcGNPD.***

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* (EcGNPD) ha sido la desaminasa más estudiada y caracterizada en detalle, ya sea en su forma silvestre, por modificaciones químicas y por construcción de mutantes sitio específicas (Altamirano y col. 1992 y 1994; Montero Morán y col. 1998 y 2001, Lara González y col. 2000, Bustos-Jaimes y col. 2001 y 2002, Cisneros A. y col. 2004, Lucumí A. y col. 2005). También se ha resuelto la estructura tridimensional de los conformeros T y R (Horjales y col. 1999; Oliva y col. 1995, Rudiño-Piñera y col. 2002).

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es una proteína homohexamérica, compuesta por subunidades de 266 aminoácidos y 29.7 kDa de masa molecular por cadena polipeptídica. El hexámero puede describirse como un dímero de trímeros con un eje cristalográfico de simetría de orden tres y tres ejes no cristalográficos de orden 2, perpendiculares al eje de orden 3 (Oliva y col. 1995) (Figuras 6A y 6B). El monómero es una estructura  $\alpha/\beta$  abierta dominada por una hoja central de siete hebras  $\beta$  paralelas, rodeada en ambos lados por ocho hélices  $\alpha$  y una hélice  $3_{10}$ .



**Figura 6.** En A se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* observándose desde el eje de simetría de orden tres, en B se muestra un hexámero en vista lateral mostrando un arreglo de dímero de trímeros (Bustos Jaimes , 2005).

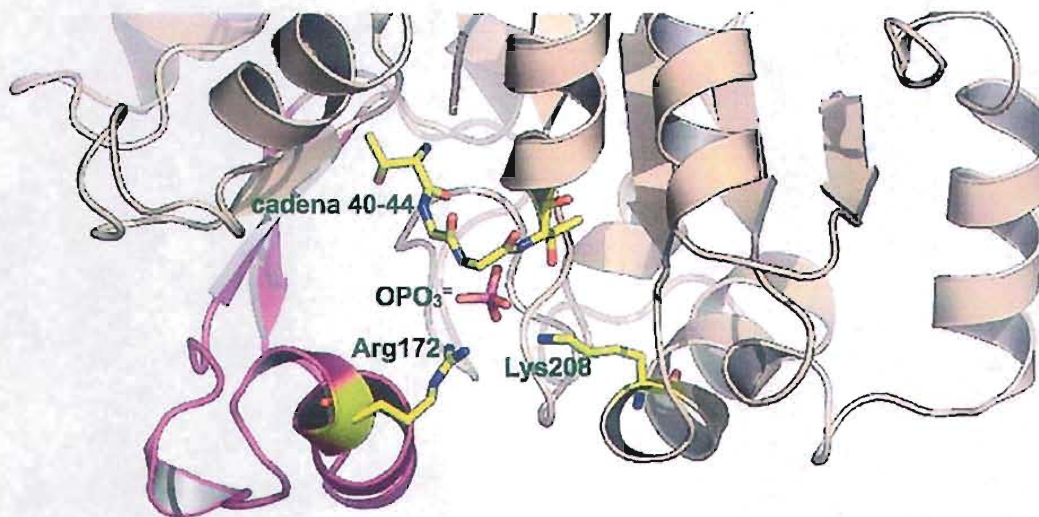
Las hélices se han numerado secuencialmente de la 1-8 y las hebras de la hoja beta de la A- G. La hebra C continua en su extremo C-terminal formando parte de una segunda hoja  $\beta$  antiparalela de tres cadenas (A B y C). La forma funcional de la enzima es el hexámero cuya masa es de 178 kDa, presenta un punto isoeléctrico de 6.0-6.1 y una constante de sedimentación de 9.0 S. La enzima que actualmente sobreexpresamos en el laboratorio proviene de la cepa K12, presenta una  $K_m$  para la GlcN6P de 0.75 mM y una  $k_{cat}$  de  $158 \text{ s}^{-1}$  por subunidad (Lara González y col. 2000).

### ***El sitio Activo***

La estructura cristalográfica del sitio activo en el conformero R se obtuvo cocrystalizando a la GlcN6P desaminasa con un inhibidor competitivo; el 2-amino-2-desoxiglucitol-6-fosfato

(GlcNol-6P) que es un análogo de un intermediario extendido de la reacción de esta enzima. La cavidad del sitio activo de cada monómero está localizada entre el motivo que forma la tapa del sitio activo formado por la hélice 5 y el asa 175-183, y el bolsillo formado por el asa 3 (residuos 40-46), el asa 10 (residuos 137-158) y el asa 6 formada por los residuos 72-84 .

En la estructura cristalográfica, el fosfato presente en el sitio activo está unido por puentes salinos a la Lys 208 y la Arg 172 y por puentes de hidrogeno a la cadena principal en el asa formada por los residuos 40-44 (Oliva G. y col. 1995). El inhibidor competitivo se encuentra unido de forma extendida con su O5 apuntando hacia el Nε2 de la His 143, esta His está en contacto a través de su Nδ1 con el O1 del Asp 141 y el Oε1 del Glu 148 (Fig. 7). Otro residuo importante es el Asp 72, el cual se encuentra orientado hacia el hidrógeno en C2 del azúcar y hace un puente de hidrógeno con el O1 del inhibidor (Oliva G. y col. 1995).



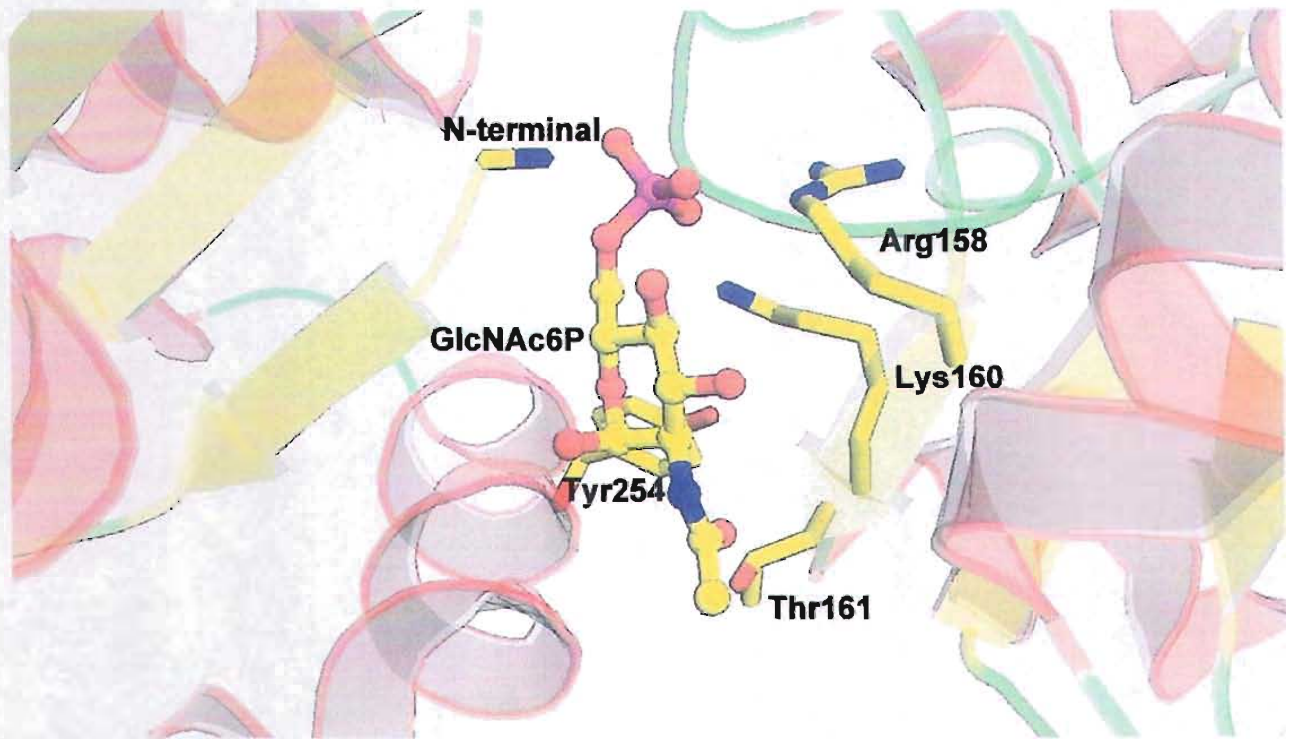
**Figura 7. Estructura del sitio activo de la GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* en el conformero R. Se muestran algunos residuos importantes tanto para la unión del sustrato como para la catálisis. El inhibidor competitivo, la GlcN-ol-6P aparece unido al sitio. (Tomado de Lucumí y Calcagno, 2005).**

### *El sitio alostérico.*

En 1995 se publicó la estructura de la forma R de la enzima de *E. coli* a partir de datos cristalográficos de difracción de rayos X a 2.1 Å de resolución. Se resolvieron los complejos enzima-Pi (fosfato inorgánico ocupando los sitios activo y alostérico), enzima-GlcNAc6P y enzima-GlcN-ol-6P. Este último ligando es un inhibidor sin salida, que ocupa el sitio activo (Oliva y col. 1995). Los sitios alostéricos se encuentran en los espacios entre las subunidades que forman los trímeros; de este modo, los sitios de unión del activador alostérico se encuentran formados por dos subunidades vecinas. Los sitios alostéricos existen sólo en el conformero R, el grupo fosfo de la molécula del activador alostérico se liga de la misma forma que el fosfato inorgánico, presenta contactos mediante puentes salinos con la Arg 158 y la Lys 160 y por un puente de hidrógeno al nitrógeno de la cadena principal del residuo 152 y al Oδ de la Ser 151 de la subunidad (Oliva G. y col. 1995) (Figura 8). La única interacción del grupo fosfo con la subunidad adyacente es por un puente de hidrógeno con el grupo amino N-terminal.

El átomo O3 del activador alostérico se encuentra unido por un puente de hidrógeno al carbonilo del esqueleto principal a nivel del residuo 159. La parte hidrofóbica del grupo acetilo se une por contactos de van der Waals con el residuo Ile 159.

Es importante mencionar que el modelo de la forma T a 2.3 Å se obtuvo en ausencia de ligandos (Horjales E. y col. 1999). El sitio alostérico en la forma T se encuentra desarmado, el grupo amino terminal está a más de 10 Å de distancia de la Lys 158 y la Arg 160, este sitio está más abierto que en la conformación R, quizá se debe a la repulsión electrostática generada por todos los residuos cargados que se localizan en esta región.



**Figura 8. Detalle del sitio alostérico de la EcGNPD. Se representan los residuos importantes del sitio alostérico y en el centro la molécula de GlcNAc6P (original).**

### ***La hGNPD-1***

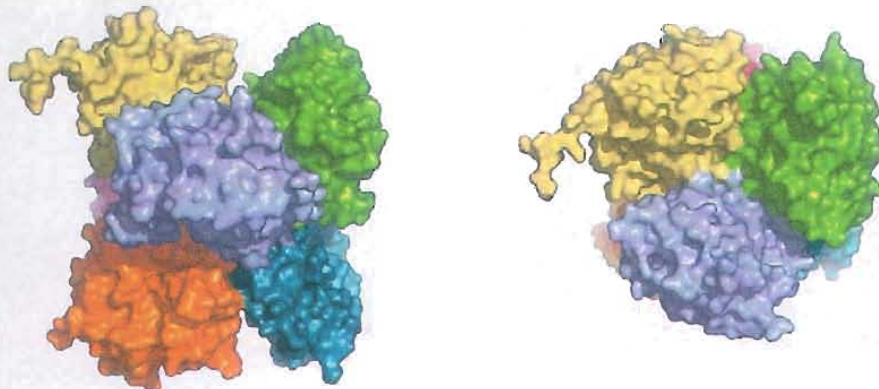
La desaminasa humana (hGNPD-1) alcanzó gran interés en el área de biología reproductiva desde que Parrington y cols. publicaron en 1996 la purificación de una proteína de espermatozoides de hámster a la que llamaron oscilina. Esta proteína induce una serie de oscilaciones del calcio intracelular en los huevos fecundados de hámster. Este hecho es un desencadenador esencial para la activación del huevo y el desarrollo embrionario temprano. Más tarde se confirmó que la actividad a la que estos autores llamaron oscilina e identificaron con la GlcN6P desaminasa (Parrington J. y col. 1996), en realidad es una proteína diferente que estaba presente como impureza en su preparación de desaminasa. (Wolny Y. M. y col. 1999). Posteriormente, se demostró que las oscilaciones de  $Ca^{++}$  en huevos fertilizados dependen de



una fosfolipasa espermática específica. La presencia de la hGNPD-1 en espermatozoides de mamífero fue ampliamente confirmada, aunque su papel funcional es todavía controvertido.

La hGNPD-1 fue cristalizada y su estructura de rayos X se resolvió a 1.75 Å (PDB código 1NE7). Los cristales de la enzima crecieron en gota pendiente a 18 °C y el cristal seleccionado para las medidas de difracción había crecido en una gota con 10 mg ml<sup>-1</sup> de proteína en una solución de 1.68 M de sulfato de amonio, 10 mM de *N*-acetilglucosamina 6-fosfato y 0.1 mM de 2-amino-2-desoxi-D glucitol-6-fosfato a pH 7 (Arreola R. y col. 2003).

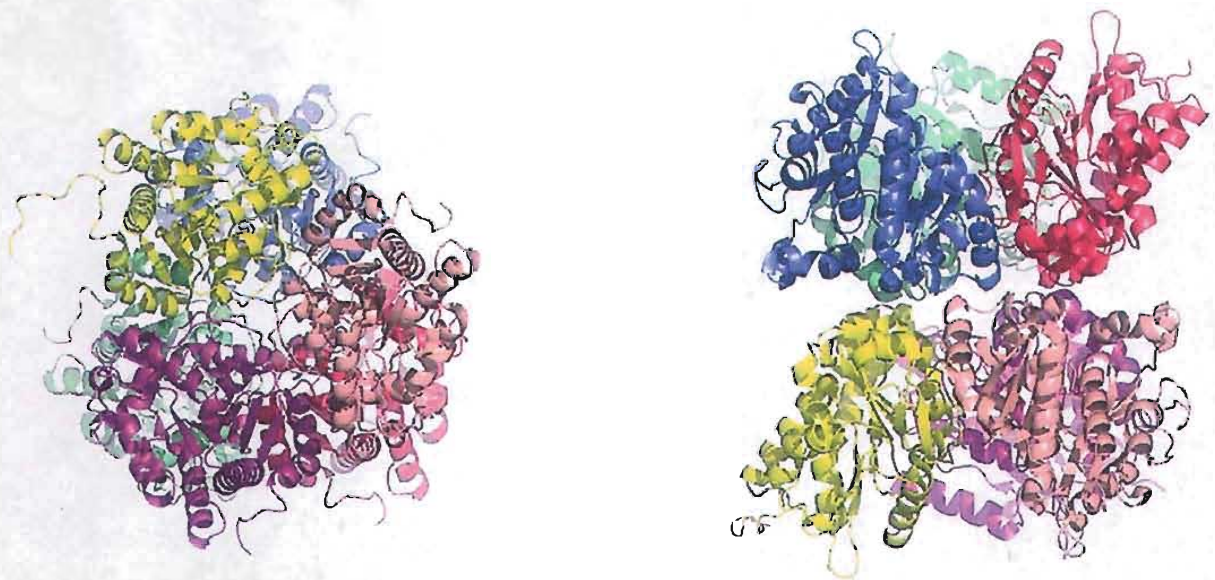
La estructura tridimensional de la enzima fue resuelta por reemplazo molecular con base en la estructura del hexámero de *E. coli*; la unidad asimétrica contiene 6 monómeros con una molécula de activador alostérico, una molécula de trehalosa y un ion sulfato en conformación alternada con una molécula de inhibidor competitivo en cada monómero .



**Figura 9. Representación en superficie del hexámero de la hGNPD-1. La cadena A aparece en amarillo (Figura original, basada en las coordenadas PDB 1NE7).**

En este estudio cristalográfico llevado a cabo en el conformero R de la hGNPD-1 con el sitio alostérico ocupado por el activador alostérico GlcNAc6P , el ion sulfato en el sitio activo (Tesis de doctorado de Rodrigo Arreola Alemón, código PDB 1D9T) y la estructura clasificada en el

PDB como 1NE7 en la que se resuelve la densidad de una molécula del inhibidor sin salida, 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-fosfato (GlcN-ol-6P) en el sitio activo se observa que la enzima humana es una enzima hexamérica que exhibe esencialmente el mismo plegamiento del monómero y presenta los mismos contactos entre las subunidades que la enzima de *E. coli*. El monómero de la hGNPD-1 contiene además el segmento no homólogo en el extremo C-terminal, (residuos 267 a 289), que aparece resuelto hasta el residuo 281 solamente en una de las cadenas polipeptídicas (monómero A). Esto es un artefacto de cristalización y no implica que en solución el hexámero no sea simétrico. (Figura 10). La cadena entre el residuo 276 y el extremo C-terminal (289) se puede considerar un caso de proteína naturalmente desestructurada (Uversky N.V. 2002).

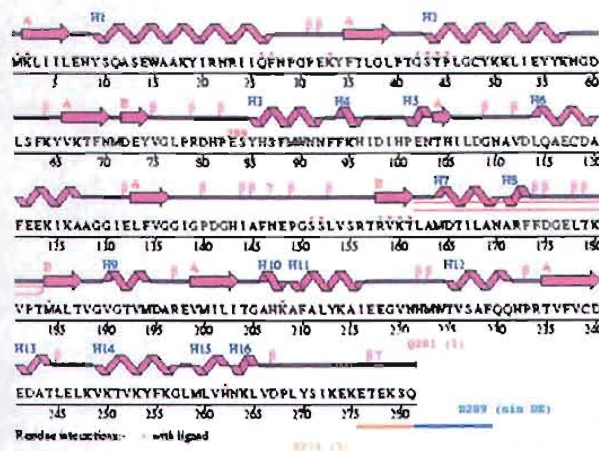


**Figura 10. Representación del hexámero de la hGNPD-1 en el cual podemos apreciar los extremos C-terminales de los monómeros. En el monómero A (en amarillo) se observó densidad electrónica hasta el residuo 281 (Figura original PDB código 1NE7).**

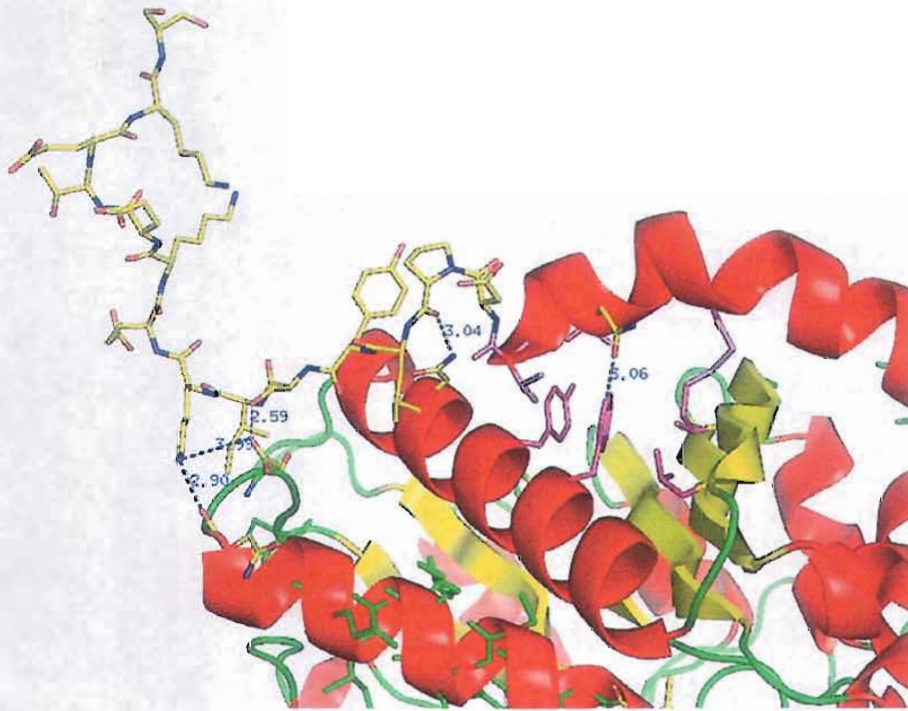
El extremo C-terminal presenta una densidad electrónica visible hasta el residuo Glu 274 en 5 de los 6 monómeros de la unidad asimétrica, los residuos Lys 275 a Asp 289 estuvieron totalmente desordenados en casi todos los monómeros con excepción del monómero A donde se observó densidad electrónica hasta el residuo 281. En este caso, los residuos 278 a 281 mostraron contactos cristalinos con el hexámero vecino, es importante mencionar que no se detectó densidad electrónica para los residuos 282-289 en el monómero A; la causa de esta aparente asimetría fue explicada anteriormente (Arreola R. y col. 2003) (Figuras 11 y 12 ).

### *El sitio activo.*

La cavidad del sitio activo de cada monómero se localiza entre el motivo que forma la tapa (segmento 158-187) y el bolsillo formado por el asa 3 residuos 40-45, asa 10 residuos 137-157 y asa 6 residuos 75-82.



**Figura 11. Estructura secundaria de la hGNPD-1. El extremo C-terminal presenta una densidad electrónica visible hasta el residuo Glu 274 en 5 de los 6 monómeros, los residuos Lys 275 a Asp 289 estuvieron totalmente desordenados en casi todos los monómeros con excepción del monómero A donde se observó densidad electrónica hasta el residuo 281(sección naranja) no se detectó densidad electrónica para los residuos 282-289 en el monómero A (sección azul).**



**Figura 12. Extremo C-terminal de la hGNPD-1. El extremo C-terminal del monómero A de la hGNPD-1 (del residuo 259 en adelante) interactúa con el resto de la proteína por medio de contactos hidrofóbicos (residuos Ile 4, Leu 6, Trp 15, Tyr 19, Met 259, Leu 265 y Val 266 en púrpura) así como por una serie de puentes de hidrógeno (indicados por líneas punteadas) que involucran la cadena principal y los residuos de cadena lateral (original).**

Los residuos que establecen contactos con el ion sulfato o el ion fosfato en la desaminasa humana y en *E. coli*, respectivamente, son los mismos a excepción del residuo Ser 43 (que es Gly en *E. coli*). Este residuo adopta 2 conformaciones alternativas, una contactando el ion sulfato y la otra contactando con Arg 172 en la tapa del sitio activo.

### ***La tapa del sitio activo.***

Los intermediarios de la reacción y los estados de transición en las reacciones catalizadas por enzimas deben estar rodeados por grupos químicos de la molécula de la enzima. En la mayoría de los casos la catálisis eficiente también depende del aislamiento del disolvente de las especies químicas transitorias. Ambos requerimientos son satisfechos por los cambios conformacionales locales que ocurren en el centro catalítico. La tapa que completa y cierra el sitio activo en las enzimas con plegamiento  $\alpha/\beta$  abierto muestra una variación estructural considerable. Algunas enzimas en esta familia estructural presentan una tapa formada por un segmento de hélice, como es el caso de las lipasas y la triosa fosfato isomerasa (Derewenda Z.S y col. 1995).

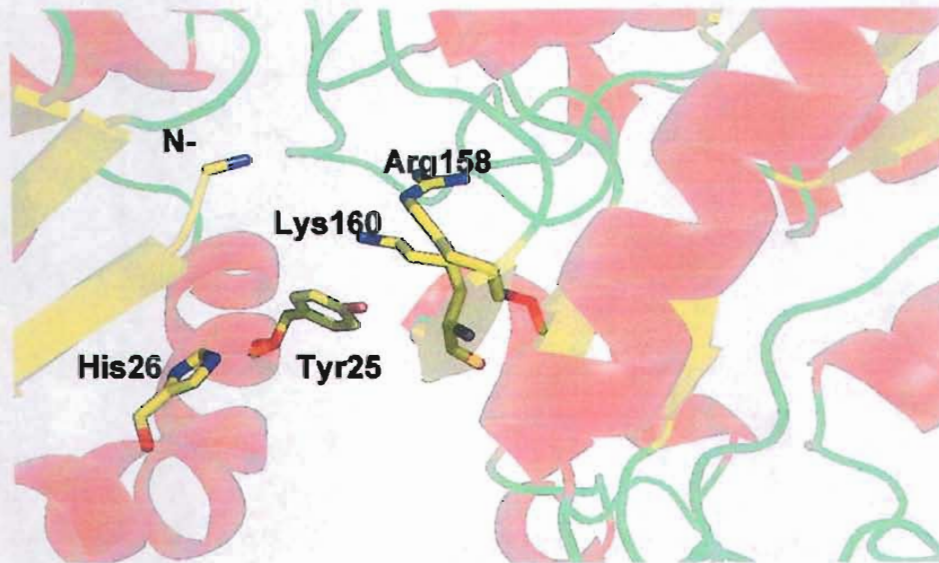
La GlcN6P desaminasa, tanto bacteriana como humana, presenta un motivo complejo que cubre el sitio activo. Éste está formado por dos cadenas  $\beta$  antiparalelas conectadas por un segmento giro-hélice-giro. Este motivo contiene residuos que son parte del sitio activo y del sitio alostérico y abarca el segmento 158-187 de la secuencia. La hélice central de 10 residuos tiene su extremo C-terminal anclado al núcleo de la enzima por interacciones hidrofóbicas entre la cadena lateral de la Phe 174 en la tapa y un bolsillo hidrofóbico en el núcleo de la molécula. También contiene a la Arg 172, el cual es uno de los residuos cargados que pegan el grupo  $-OPO_3^{2-}$  del substrato en el sitio activo (Lucumí-Moreno A. y Calcagno M.L. 2005). La cadena  $\beta$  en el lado N-terminal del motivo de la tapa contiene los residuos Arg 158 y Lys 160, que contribuyen cada uno con una carga positiva al sitio de pegue del activador alostérico.

La transición alostérica para la GlcN6P desaminasa ha sido descrita como rotación de cuerpo rígido de 2 zonas de cada subunidad del hexámero alrededor de un eje paralelo al eje de orden 3 del hexámero. La comparación de las coordenadas cristalográficas de la enzima en sus estados T y R también muestra distintos cambios en la tapa del sitio activo. En la enzima de *E. coli*, los átomos que forman éste motivo muestran un claro incremento en su flexibilidad como lo revelan

los factores B cristalográficos. Este es el principal cambio a nivel de la tapa asociado a la transición alostérica y parece afectar más a su vibración que a su geometría (Rudiño-Piñera y col. 2002).

#### ***El sitio alostérico.***

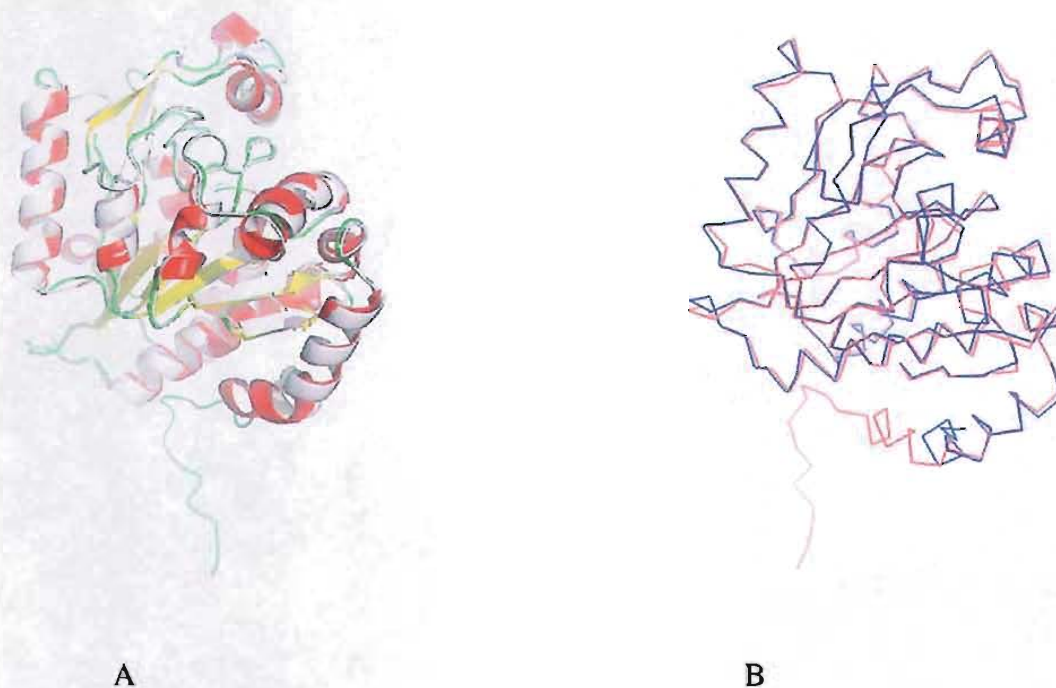
Cada hexámero de la enzima presenta seis sitios alostéricos y se encontraron otras tantas moléculas de GlcNAc6P en las hendiduras entre dos monómeros. La estructura del sitio es esencialmente igual al de la enzima de *E. coli* (Oliva G. y col. 1995) (Figura 13).



**Figura 13. Detalle del sitio alostérico de la hGNPD-1. Se representan los residuos importantes del sitio alostérico (original).**

#### ***Diferencias entre la EcGNPD y la hGNPD-1.***

En el estudio cristalográfico se observa que el plegamiento del monómero de la hGNPD-1 presenta unas pequeñas diferencias con respecto al monómero de la EcGNPD además de la existencia de un largo segmento no homólogo en el extremo C-terminal. (Figura 14).



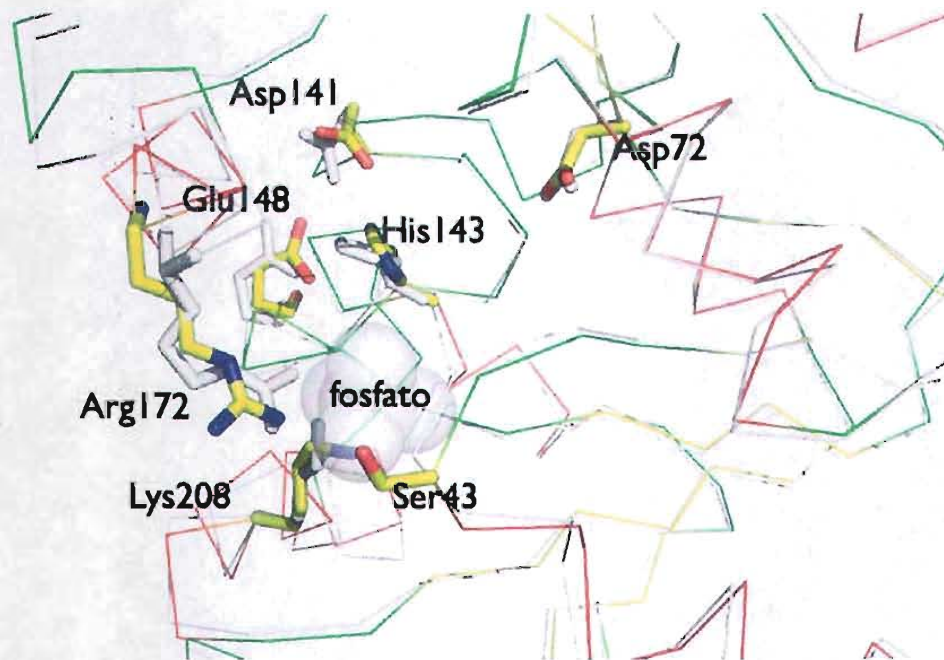
**Figura 14. Superposición del trazo de C $\alpha$  de los monómeros de la *EcGNPD* (en azul) y la *hGNPD-1* (en rojo) (coordenadas PDB código 1NE7 empleando el programa PyMol versión 0.98).**

La superposición de cuerpo rígido entre las 2 estructuras monoméricas muestra diferencias en la cadena principal en el extremo C-terminal empezando en el residuo Leu 258. En la *hGNPD-1* se presenta una nueva estructura compuesta por una hélice corta (residuos 259-266) y una asa extendida (residuos 267 a 274); esta asa extendida constituye un ancla para la hélice que comprende los residuos 249-266, la cual da soporte al asa 240-249, responsable de las interacciones entre los monómeros cercanos al eje de orden 2 del hexámero. El ancla en el extremo C-terminal de la enzima de *E. coli*, es mucho más flexible que la que se presenta en la *GNPD-1* y pudiera ser una de las determinantes estructurales que generan las diferencias en el comportamiento alostérico entre la enzima humana y la de *E. coli*.

En relación al sitio activo las diferencias entre la enzima hGNPD-1 y la EcGNPD se localizan en las asas que unen al sustrato en particular en la tapa del sitio activo (residuos 162-182) y en el asa de unión del fosfato (residuos 41-44).

Un análisis detallado en las seis cavidades de sitio activo en los diferentes monómeros de la hGNPD-1 muestran un ion sulfato y una molécula de GlcN-ol-6P (el inhibidor competitivo) en cada sitio activo, ambas moléculas en conformaciones alternas. Los residuos en el sitio activo de estas dos enzimas están altamente conservados, con excepción de la Ser 43, porción en la que la enzima de *E. coli* la ocupa una Gly. La cadena lateral de esta está colocada en una posición que le permite construir un puente de hidrógeno con el fosfato del inhibidor (o el ion sulfato) en la enzima humana. Además la Ser 43 está localizada en el asa de unión al fosfato (residuos 41-44) que es una de las pocas regiones donde aparecen diferencias entre la enzima humana y la bacteriana (Figura 15). El residuo Ser 43 también aparece en una posición adecuada para unir a la arginina 172, que es un ligando del sustrato y por lo tanto capaz de competir por éste, conduciendo a un cambio conformacional de la tapa del sitio activo (residuos 162-185). En las densidades electrónicas se aprecian ambos rotámeros de la cadena lateral de la Ser 43, la orientada hacia el fosfato y la orientada hacia la Arg 172.





**Figura 15. Sitio activo de la hGNPD-1 en el conformero R. Se muestran algunos residuos importantes tanto para la unión de sustrato como para la catálisis, en color se muestra la estructura de la hGNPD-1 y en gris la estructura de la EcGNPD-1 (PyMol versión 0.98).**

La tapa del sitio activo presenta diferencias conformacionales entre los diferentes monómeros cuando la enzima se encuentra unida al inhibidor y que son algo diferentes a la conformación de la tapa en la enzima de *E. coli*, que cierra más la cavidad del sitio activo (Rudiño Piñera y col. 2002).

#### ***Sitio alostérico.***

La hendidura del sitio alostérico esta rodeada por estructuras secundarias similares a las presentes en *E. coli*, excepto por la region C-terminal que en la desaminasa humana es una cadena más larga que contiene el nuevo ligando His 262, ausente en la EcGNPD. Esta histidina forma un puente de hidrógeno con el oxígeno 1 del activador y el Nε2 y esto hace que el sitio alostérico se vea mas estrecho que el de la enzima de *E. coli*.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

La identidad entre las secuencias de aminoácidos entre los segmentos homólogos (1-260) de la hGNPD-1 y de la EcGNPD es de 57.9%, con un índice de similitud del 75%; la alineación estructural (superposición de los modelos estructurales derivados de los datos cristalográficos) revela un plegamiento igual, sólo diferenciable por pequeños detalles, como se explicó en las páginas 26 y 27.

A pesar de esta gran semejanza estructural, la enzima hGNPD-1 presenta una cinética de activación alostérica por GlcNAc6P distinta de la de su homóloga de *E. coli*. Una diferencia importante entre ambas radica en la presencia de un extremo C-terminal (aminoácidos 267 al 289) en la enzima humana, segmento que no presenta su enzima homóloga en *E. coli*, otra característica importante de la hGNPD-1 es la presencia de una serie de interacciones en el segmento C-terminal, entre los residuos 268 y 275, contactando con la hélice 1 y el giro que une la hélice 2 con la beta 3, en el módulo externo de la molécula. Estas interacciones, que no existen en la enzima EcGNPD, podrían ser fundamentales en el mecanismo de transmisión de los cambios conformacionales entre las subunidades en el proceso de activación alostérica.

Por lo anterior nos planteamos la pregunta de qué papel juega este extremo C-terminal en la cinética de activación alostérica, así como en la estabilidad de su plegamiento.

Podría suponerse que los mecanismos de acoplamiento entre el sitio activo y el sitio alostérico podrían ser diferentes en mamíferos y en bacterias y que éstas interacciones jueguen un papel clave en la función de la enzima.

## **OBJETIVOS.**

En éste trabajo nos propusimos:

- 1) Realizar un estudio cinético de la enzima hGNPD-1 especialmente en relación con la activación alostérica.
- 2) Plantear un modelo de la activación alostérica de esta enzima.
- 3) Explorar la función del extremo terminal de la enzima construyendo mutantes en las que se interrumpa la transcripción en puntos cuidadosamente seleccionados con base a las estructuras cristalográficas. Las posiciones escogidas fueron 268 y 275, en las cuales se introdujeron codones de terminación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### ***Reactivos Químicos.***

La mayoría de las sustancias químicas utilizadas fueron compradas en Sigma-Aldrich S.A. de C.V., México.

El gel de cromatografía de afinidad por el sitio alostérico fue preparado en nuestro laboratorio; contiene moléculas de GlcN6P unidas por el grupo amino a la 6-aminohexanoil agarosa (6-aminohexanoil agarosa 4B, Amersham-Pharmacia) para formar el ligando inmovilizado *N*-6-aminohexanoil-GlcN6P, que es un análogo del activador alostérico.

El activador alostérico, GlcNAc6P, fue preparado en el laboratorio debido a su elevado costo comercial. Su síntesis se basa en la acetilación de la GlcN6P con anhídrido acético en bicarbonato y su posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico.

### ***Biológicos.***

La cepa de *Escherichia coli* empleada para la expresión de la proteína fue la IBPC590, construida por la Dra. Jacqueline Plumbridge del Instituto de Biología Físicoquímica de París, Francia. Esta cepa fue derivada de la JM101, en la que se bloqueó el gen *nagB* (gen de la

glucosamina 6-fosfato desaminasa) por inserción de un *cassete* de resistencia a kanamicina; otra característica de esta cepa es que es *lacI*<sup>-</sup> (no contiene el gen *lacI*), por lo que expresa la proteína en forma constitutiva.

### ***Clonación, expresión y purificación de la hGNPD-1 silvestre en E. coli***

El gen *GNPI 1* de la desaminasa humana fue clonado del cDNA de células mieloides HA1541 y donado por el Dr. Nobuki Miyajima (Kazusa DNA Research Institute Chiba, Japan) en un segmento de DNA clonado en el vector Bluescript SK+.

Con la finalidad de obtener una clona más corta con el gen estructural *GNPI 1*, se cortó un segmento de 992 pares de bases desde el sitio PstI localizado a 12 nucleótidos hacia el extremo 5' del codón de inicio, hasta el sitio BstXI, localizado aproximadamente a 110 pares de bases hacia el extremo 3' del codón de terminación.

Este fragmento fue clonado en el vector pTZ19R y digerido con PstI y SmaI, en esta construcción el gen está localizado hacia el extremo 3' del promotor *lac*; finalmente, este vector fue utilizado para transformar la cepa de *E. coli* K12 IBPC 590 (*nagB::kan, recA1, Δ lacI*). También se utilizó en algunos casos la cepa JM101, en la que la expresión se realiza bajo el control del gen *lacI* por lo que requiere el agregado de IPTG al medio de cultivo. La cepa de *E. coli* fue transfectada con el vector por electroporación y la selección de las bacterias que tenían el plásmido se realizó utilizando ampicilina. El nivel de expresión fue adecuado y esencialmente el mismo con ambas cepas. La expresión fue suficiente como para permitir la purificación de la desaminasa humana recombinante en la escala de decenas de miligramos, lo que permitió el desarrollo del proyecto de cristalización en colaboración con el Dr. E. Horjales del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### ***Procedimiento de purificación***

La Bacteria portando el plásmido pTZ19R fue cultivada en medio LB suplementado con 2% de glicerol (v/v) y ampicilina (100 µg/ml), el cultivo se prolongó por 8 horas a 30°C y la biomasa se colectó por centrifugación (3000g × 15 min). Las células se rompieron por sonicación y los residuos separados por centrifugación a 27000g × 45 minutos. El extracto fue fraccionado con sulfato de amonio (porcentaje de saturación de 40-55%) y el precipitado fue resuspendido en 50 ml de amortiguador de Tris- HCl 50 Mm pH 8.2. La solución de proteína fue aplicada a una columna de afinidad de 6-aminohexanoil glucosamina 6-P agarosa, una resina de cromatografía de afinidad por el sitio alostérico que resulta altamente específica para la GlcN6P desaminasa. La columna se equilibró con Tris HCl 50 mM pH 8.2, se pasó la fracción de precipitación en sulfato de amonio previamente diluída para bajar la fuerza iónica de la muestra a menos de 0.1 y la GlcN6P se eluyó con 3 veces el volumen de la columna de una solución de GlcNAc6P (sal de potasio) 10 mM.

La enzima se obtuvo en un solo pico de actividad, que es electroforéticamente homogéneo; luego se concentró por precipitación con sulfato de amonio (70% de saturación) conservándose a 5 °C.

### ***Electroforesis***

Se verificó la presencia de la enzima sobreexpresada en las distintas etapas de purificación, empleando geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Como marcador se utilizó la enzima pura *EcGNPD* (WT de *E. coli*). La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie R-250.

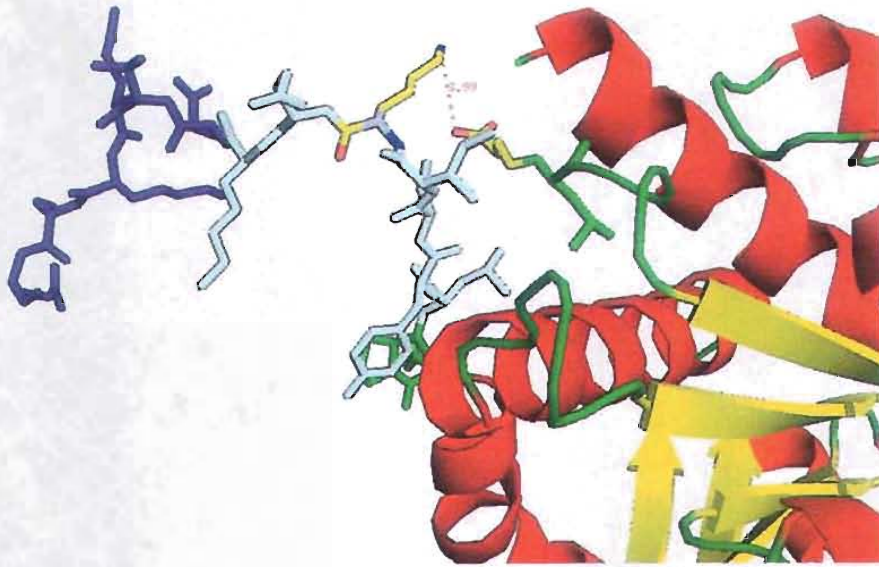
### ***Ensayos cinéticos.***

La determinación de la actividad de la enzima por medida de las velocidades iniciales se realizó en el sentido desaminante de la reacción utilizando un método colorimétrico a tiempos fijos. La enzima se desaló en una columna de exclusión molecular HR 10/10 (Superose, Amersham-Pharmacia) y luego se pasó por una columna Hi-Trap (Amersham-Pharmacia) en la que se inmovilizó fosfatasa alcalina. Esto tiene por finalidad la eliminación de la GlcNAc6P por hidrólisis de su grupo fosfo. La concentración de la enzima fue calculada mediante su absorbancia a 280 nm en agua, usando la absortividad molar conocida de la *EcGNPD* ( $\epsilon = 0.202 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se utilizaron mezclas de reacción de 200  $\mu\text{L}$  que contenían Tris-HCl 100mM pH 7.7, EDTA 250 mM y concentraciones variables de sustrato (GlcN6P). Las velocidades iniciales se determinaron en ausencia y en presencia de concentraciones variables de activador alostérico (GlcNAc6P) o de inhibidor competitivo (GlcN-ol-6P). Las reacciones fueron iniciadas por la adición de la enzima y las mezclas se incubaron a 30°C, por tiempos variables, interrumpiendo la reacción por la adición de 2ml de HCl 10M. La concentración de fructosa-6P se determinó con la adición de 0.5ml de resorcinol, incubando por 10 minutos a 70°C. Después de enfriar a temperatura ambiente se hicieron las lecturas espectrofotométricas a 512nm comparadas con una curva patrón de fructosa como describen en Roe y col. (1934). Las reacciones se llevaron a cabo cuidando que se convirtiera menos del 5% del sustrato inicial. Todos los ensayos se realizaron por lo general empleando una concentración de enzima de 15 nM.

### ***Ajuste de los datos cinéticos***

Los datos fueron analizados por regresión no-lineal utilizando el programa *Prism for Macintosh* Version 4.06.

### ***Mutantes truncadas del extremo C-terminal.***



**Figura 16. Extremo C-terminal de la hGNPD-1. Los segmentos gris y morado respectivamente corresponden a los fragmentos de cadena suprimidos en las mutantes 268 y 275 fin, hay que tomar en cuenta que el segmento 281-289 no posee estructura cristalográfica y no se representa en la figura. (PyMol versión 0.98).**

### ***Clonación, expresión y purificación de las mutantes truncadas en las posiciones 268 y 275.***

La construcción de las mutantes truncadas en los aminoácidos 268 y 275 se realizó mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido convirtiendo respectivamente un codón de Pro y un codón de Lys en un codón de terminación (UAA) para mutar el gen *nag B* insertado en el vector PTZ19R. Con este vector se transformó la cepa de *E. coli* IBPC590  $\Delta$ *nag* y  $\Delta$ *lacl* que expresa la desaminasa constitutivamente; de ahora en adelante nos referiremos a éstas construcciones como las mutantes (268 fin y 275 fin).

Las condiciones del cultivo, lavado de la bacteria y fraccionamientos con sulfato de amonio fueron las mismas que se emplearon con la desaminasa humana silvestre a excepción de la mutante 268 fin en la cual se omitió el fraccionamiento salino y se aplicó el extracto crudo directamente a la columna.

El procedimiento de purificación se llevó a cabo empleando el gel de cromatografía de afinidad alostérica anteriormente empleada con la hGNPD silvestre; en todos los casos, una vez obtenida cada mutante por elución de la columna de afinidad, se precipitó la proteína con sulfato de amonio al 70% de saturación (equivalente al 50% p/v) y se conservó a 5°C. Se verificó la presencia de la enzima en las distintas etapas de la purificación, cómo se ha descrito previamente para la hGNPD silvestre.

Ambas mutantes se conservaron en glicerol o precipitadas en sulfato de amonio, para conservarlas en glicerol se colectaron las fracciones de la elución donde se encontró la enzima y se dializaron durante toda la noche contra 2 litros de un amortiguador de Tris 50 mM pH 8.2 que contenía fosfatasa alcalina; posteriormente, la muestra se concentró en glicerol como se ha descrito. Para su conservación en sulfato de amonio la enzima pura se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación (equivalente al 50% p/v), ésta muestra se conservó a 5°C.

En la mutante 268 fin se llevaron a cabo una serie de cromatogramas con la finalidad de determinar la estabilidad del hexámero, ya que los ensayos cinéticos indicaban que esta mutante presentaba cierta inestabilidad, con este fin se inyectaron 250µL de la enzima conservada en glicerol a una columna de exclusión molecular HR 10/10 Shephadex G-25 (Pharmacia Biotech) esta columna fue equilibrada previamente durante 1 hora con una mezcla de Tris 80 mM pH 7.7 y KCl 80 mM (proporción 9:1) utilizando una velocidad de flujo de 0.5ml/min. y una presión máxima de 500psi. El cromatograma se muestra en los resultados.



### *Determinación de la velocidad enzimática*

La determinación de la actividad en velocidades iniciales de las enzimas 268 fin y 275 fin así como las condiciones de ensayo se realizaron de la misma manera que para la enzima silvestre, variando las concentraciones de enzima de acuerdo a las condiciones del experimento.

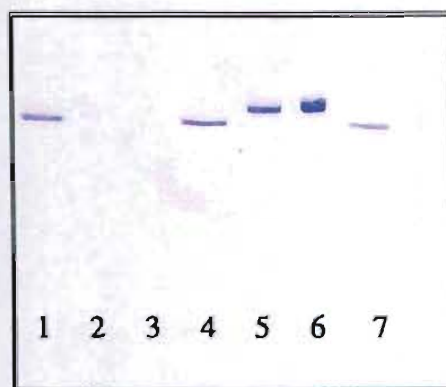
### **LA hGNPD-1: RESULTADOS**

#### *Cultivo*

El nivel de expresión de proteína fue adecuado y el rendimiento esencialmente el mismo, tanto con la cepa IBPC 590 (constitutiva) como con la JM101 (inducible por IPTG). La expresión fue suficiente como para permitir la purificación de enzima en la escala de decenas de miligramos. Se decidió utilizar la cepa constitutiva que no requiere de IPTG.

#### *Electroforesis*

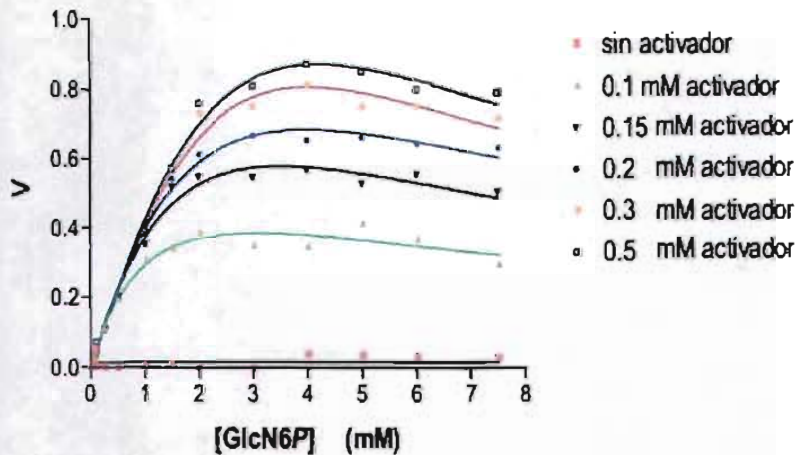
La presencia y la pureza de la enzima hGNPD-1 se verificó mediante geles de PAGE-SDS en las diferentes etapas del proceso de purificación, desde las colonias aisladas en placa hasta la proteína eluída de la columna de afinidad. (Figura 17).



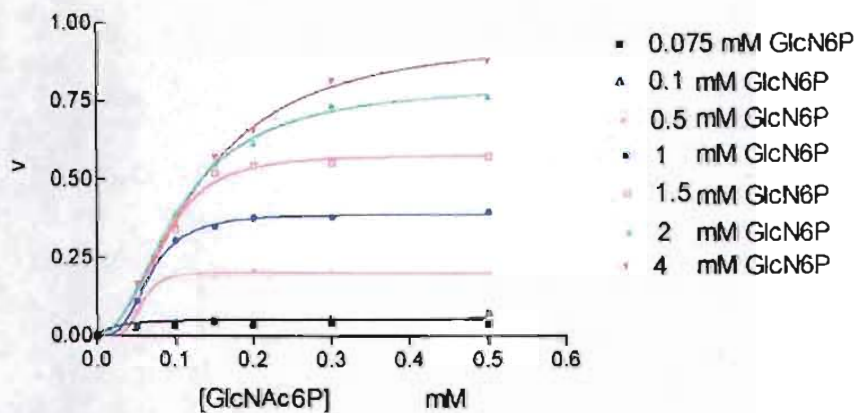
**Figura 17. Gel PAGE-SDS de la enzima hGNPD-1 pura, en los carriles 1, 4 y 7 se observa la enzima pura *Ec* GNPD, en el 5 y 6 la hGNPD-1 .**

## Estudio Cinético

A



B



**Figura 18.** Se utilizó la ecuación 1b para analizar los datos de velocidad en función de la concentración de sustrato; cada curva, obtenida a valores fijos de concentración de GlcNAc6P, se calculó por separado. Para analizar los datos de velocidad en función de la concentración de activador a diferentes concentraciones fijas de sustrato, se utilizó la clásica ecuación de Hill.

A) Velocidades iniciales graficadas contra la concentración de sustrato a diferentes concentraciones de GlcNAc6P.

B) Velocidades iniciales graficadas contra la concentración de GlcNAc6P a diferentes concentraciones de sustrato.

Los datos de velocidad de reacción en función de la concentración de GlcN6P, a diferentes concentraciones del activador alostérico, GlcNAc6P, fueron ajustados separadamente para cada serie, a la siguiente expresión:

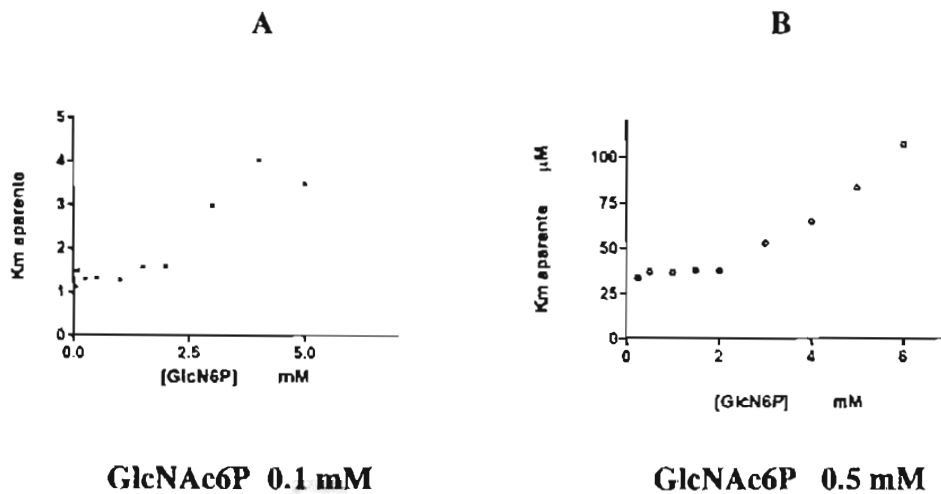
$$v = \frac{VS^h}{K_{0.5}^h + S^h + \frac{S^{2h}}{K_i}} \quad \text{ecuación 1a}$$

Es una ecuación empírica, que describe una cinética michaeliana modificada, en la que se ha agregado un coeficiente de Hill  $h$  y un término en el denominador para tomar en cuenta la inhibición por sustrato. Los resultados preliminares revelan que la cooperatividad que daría lugar a un valor de  $h > 1$ , es mínima y no significativa. En consecuencia, se simplificó la ecuación 1a, haciendo  $h = 1$ , lo que permite redefinir a la  $K_{0.5}$  como  $K_m$ .

$$v = \frac{VS}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad \text{ecuación 1b}$$

Para verificar la ausencia de cooperatividad en las curvas velocidad-sustrato, éstas se analizaron por medio de la transformación de Acerenza y Mizraji (Acerenza L. y Mizraji E. 1996) (Figura 19). Esta transformación permite graficar y analizar el valor puntual de la  $K_m$  aparente aparte

para cada **concentración** de sustrato. La ausencia de cooperatividad se manifiesta como un trazo paralelo al eje de la abscisa; la función es decreciente si hay cooperatividad positiva y viceversa. La inhibición por sustrato se manifiesta como un incremento lineal en la  $K_m$  aparente, lo que se observa en la **Figura 19B** para los puntos a concentración alta de sustrato.



**Figura 19. Análisis de las curvas velocidad-sustrato por medio de la transformación de Acerenza y Mizraji (en A, valor puntual de la  $K_m$  para los datos correspondientes a la concentración de activador de 0.1 mM, y en B valor puntual de la  $K_m$  para los datos correspondientes a la concentración de activador de 0.5 mM en la cual se presenta la inhibición por sustrato más intensa).**

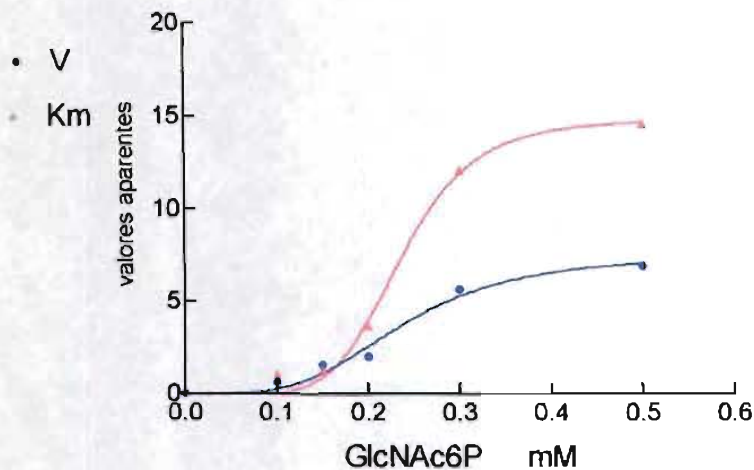
**Tabla 1. Parámetros cinéticos de la enzima hGNPD-1 silvestre.**

$k_{cat}$	46.8 s <sup>-1</sup>
$K_m$	0.6 mM
$K_i$	13.4 mM
$K_a$	0.15 mM
$K_i (= K_m \times L)$	0.22 mM
$h$	2.35

Las curvas velocidad-sustrato a diferentes concentraciones fijas de GlcNAc6P muestran:

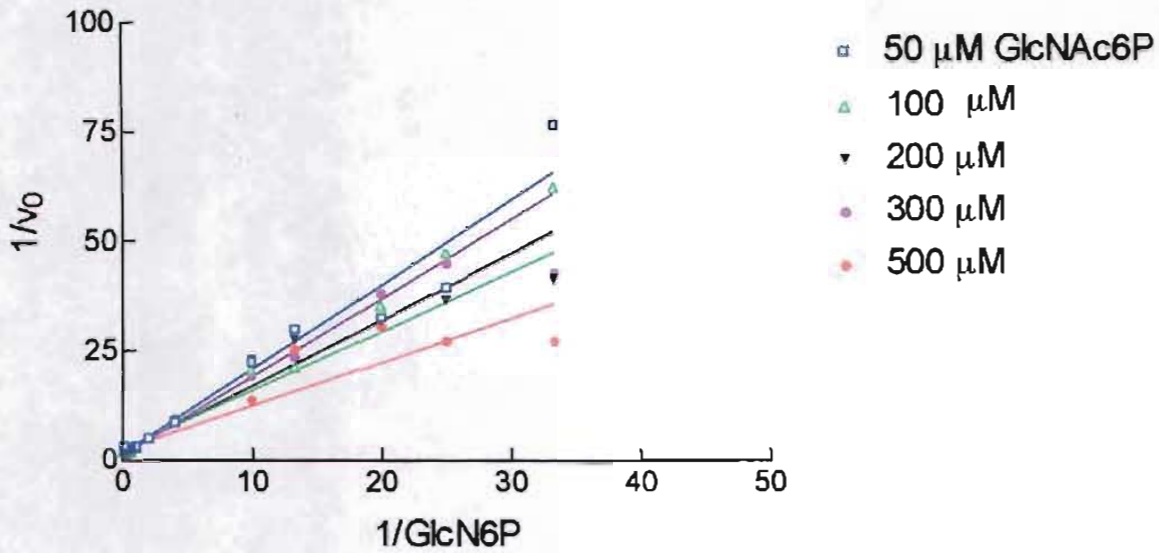
- 1) Ausencia de reacción en ausencia del activador. El modulador alostérico se comporta como un activador esencial.
- 2) No se observa cooperatividad; las curvas muestran una cinética michaeliana modificada por inhibición por sustrato.
- 3) El modulador alostérico es un fuerte activador de tipo  $V$  (modifica la  $V$  límite ( $V_{MAX}$ )) y un discreto inhibidor de tipo  $K$  (modifica la  $K_m$ ) (Figura 18).

La inhibición por sustrato y el efecto  $K$  negativo (aumento de  $K_m$  aparente con la concentración del "activador") (Figura 20) se comportan como dos fenómenos independientes de acuerdo con el modelo mostrado en la página 42.



**Figura 20. Valores aparentes de  $V_0$  y  $K_m$  de la hGNPD-1 a diferentes concentraciones de GlcNAc6P.**

- 4) La inhibición por sustrato aumenta con la concentración de GlcNAc6P



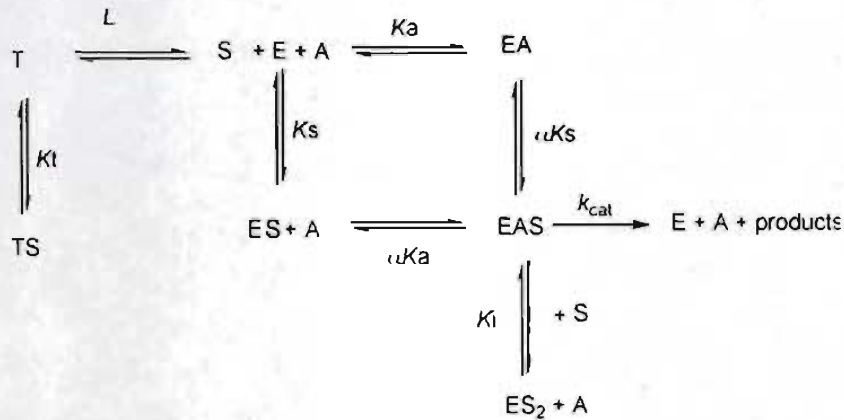
**Figura 21. Gráfica doble recíproca de los datos de la Figura 18 A.**

La gráfica doble recíproca nos da un patrón intersecante, modificado en la proximidad del eje  $1/v$  debido a la inhibición por sustrato, (no se aprecia en la figura debido a la escala), se puede describir un efecto combinado de activación alostérica tipo  $V$  e inhibición tipo  $K$ .

5) La cinética de la enzima-GlcNAc6P presenta cooperatividad positiva, con un coeficiente de Hill ( $h$ ) de 2.35. Los valores de  $h$  y de  $K_d$  aparente para la GlcNAc6P son iguales cuando se obtienen a partir del efecto  $V$  positivo como del efecto  $K$  negativo, lo que sugiere que ambos fenómenos están ligados a un mismo evento molecular.

6) La inhibición causante del efecto  $K$  negativo no es de tipo competitivo por lo que se descarta que entre en juego la unión promiscua de la GlcNAc6P en el sitio activo.

Basándonos en los puntos anteriores podemos proponer el siguiente modelo empírico :



Suponiendo condiciones de equilibrio rápido, podemos proponer este cuadrado termodinámico modificado. La adición ordenada del activador primero y del sustrato después se descarta cinéticamente (el regráfico doble recíproco del efecto de la GlcNAc6P da un patrón intersecante y no paralelo). Tampoco el orden obligado sustrato-activador es compatible con la cinética observada.

El modelo cristalográfico de la forma correspondiente al conformero R de EcGNPD (único conocido hasta ahora), (Arreola-Alemón y col. 2003) no admite más que complejos binarios enzima-GlcN6P-GlcNAc6P; en la estructura no hay cabida para complejos ternarios con dos moléculas de sustrato o con dos moléculas de activador en el mismo sitio. La inhibición por sustrato, aumenta con el activador y para tomarla en cuenta en la ecuación se requiere un término cuadrático en S. Se propone como una explicación posible del aumento de la inhibición por sustrato causado por (A) un desplazamiento de A por S, de acuerdo a este equilibrio, que se agregó al modelo: ESA + ES2 + A.

La cooperatividad de la unión de la GlcNAc6P se toma en cuenta al incluir un coeficiente de Hill. Se postula que esta cooperatividad deriva de la transición alostérica entre las formas T y E.

El efecto  $K$  negativo surge de que  $K_m^R > K_m^T$ . La expresión derivada de este modelo, suponiendo cinética en equilibrio rápido, es:

$$v = \frac{V \frac{SA^h}{\alpha KaKs}}{1 + S \left( \frac{1}{Ks} + \frac{1}{LKl} \right) + \frac{A^h}{Ka} + \frac{SA^h}{\alpha KaKs} + \frac{S^2 A^h}{\alpha KaKsKi}} \quad \text{Ecuación 2}$$

*Validación preliminar del modelo precedente por ajuste a la ecuación 2 por regresión no-lineal múltiple.*

Se ajustaron los datos del experimento mostrado en la Figura 18 a la ecuación 2, por regresión no lineal de tres variables. Se desparametrizó el procedimiento con los siguientes criterios: se tomaron como fijos los valores de  $V$ ,  $h$ ,  $K_a$  y  $K_i$ , usando los datos que aparecen en la Tabla 1. Se ajustaron los parámetros  $L$ ,  $K_i$ ,  $K_m$  y  $\alpha$ , obteniéndose los datos que se muestran en la Tabla 3. El valor de  $\alpha$  no se ajusta, lo que sugiere que el modelo propuesto no es exacto, aunque los trazos que se observan en la Figura 22 demuestran que la ecuación 2 puede ser una buena aproximación a la descripción de la cinética de la hGNPD-1.

Como se puede apreciar en la figura y en la calidad de los ajustes, el modelo del esquema y la ecuación 2 son una primera aproximación hacia la descripción cinética de la compleja función alostérica de esta enzima.



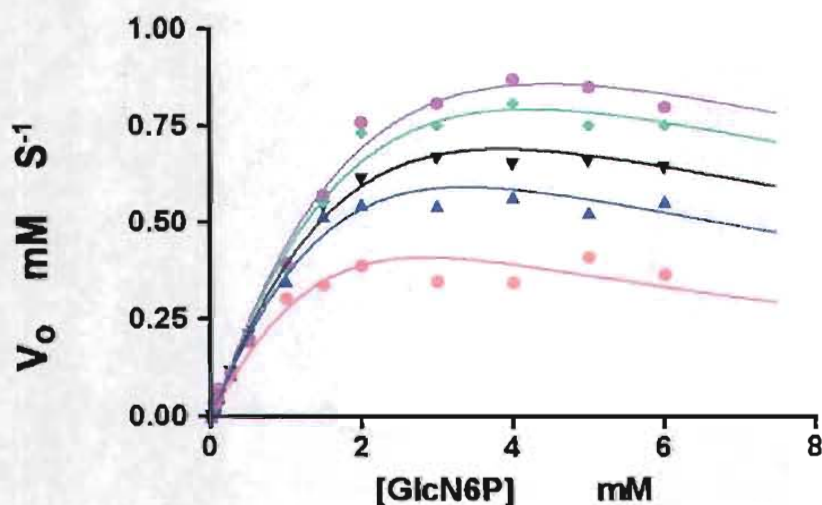


Figura 22. Velocidades iniciales graficadas contra la concentración de sustrato a diferentes concentraciones de GlcNac6P. Las concentraciones (mmoles  $L^{-1}$ ) de activador fueron: ●, 0.1; ▲, 0.15; ▼, 0.2; ◆, 0.3 y ●, 0.5.

Tabla 2. Parámetros tomados del ajuste individual.

$K_a$	0.25 Mm
$K_m$	0.6 Mm
$V$	7.8

Tabla 3. Parámetros ajustados por regresión no lineal global.

$K_i$ : $0.05 \pm 0.07$
$\alpha$ : 2 (ajustado a mano de 0.5 en 0.5)
$h$ : $2.1 \pm 0.8$
$L \times K_i$ : 10 (ajustado a mano, de 1 en 1)

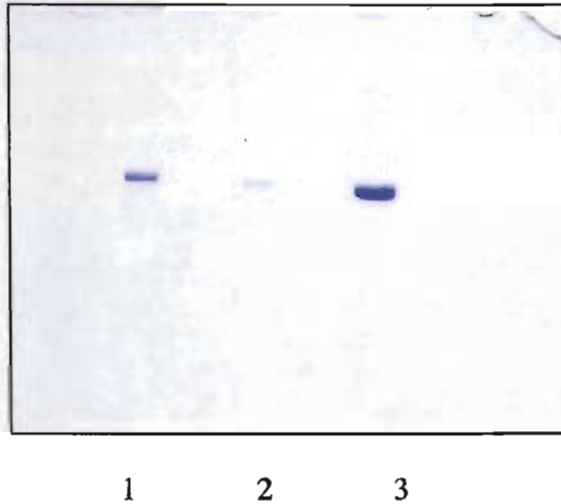
La simulación de la ecuación 2 revela que esta propuesta da cuenta de las características atípicas de esta enzima, enumeradas en las páginas 40 y 41. La expresión tiene demasiados parámetros lo que complica el cálculo numérico para el ajuste, aún con la estrategia de desparametrización empleada. Este punto, sin duda, requiere más trabajo, tanto experimental como teórico.

## RESULTADOS MUTANTES TRUNCADAS EN EL C-TERMINAL

Exploramos el posible significado funcional de la extensión C-terminal no homóloga, la cual está ausente en las desaminasas de bacterias, hongos e invertebrados. Las mutantes 268 fin y 275 fin fueron estudiadas desde el punto de vista de su estabilidad y de su cinética alostérica.

### *Mutante 268 fin*

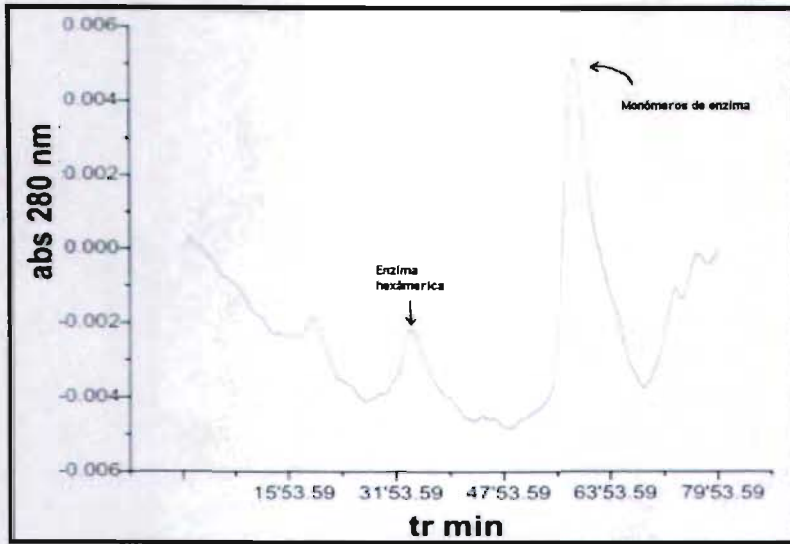
#### *Pureza de la enzima*



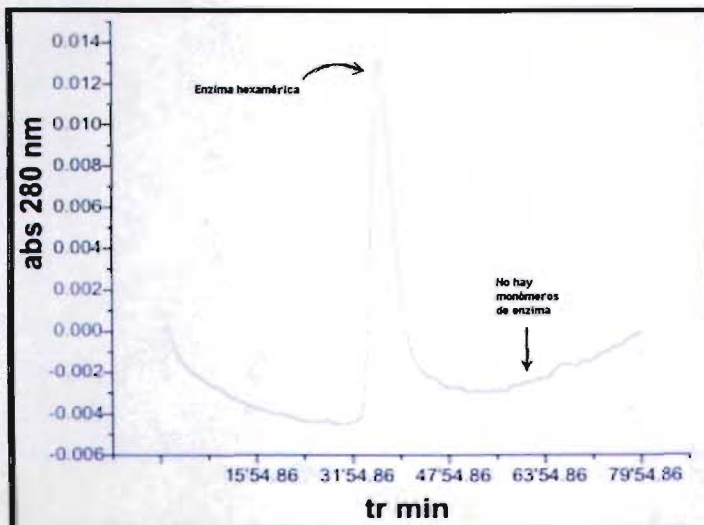
**Figura 23. Gel PAGE-SDS de la enzima hGNPD-1 pura, en el carril 1 se observa la enzima hGNPD-1, en el 2 la mutante truncada 268 fin y en el 3 la Ec GNPD.**

#### *Estabilidad de la enzima.*

El último paso del procedimiento de purificación de la mutante 268 fin utiliza la cromatografía de afinidad en N-6 aminohexanoil GlcN6P agarosa y la elución con una solución 10 Mm. de GlcNAc6P. Esta mutante no es estable cuando se conserva en glicerol al 50% pues en las preparaciones desaladas en una columna HR 10/10 Shephadex G-25 (Pharmacia Biotech) (Figuras 24 y 25) se observa disociada, predominando la forma monómerica .



**Figura 24. Cromatografía de exclusión molecular de la enzima 268 fin conservada en glicerol. Se observa a los 32 minutos la fracción del hexámero, y a los 60 minutos la fracción del monómero.**



**Figura 25. Cromatografía de exclusión molecular de la enzima 268 fin conservada en sulfato de amonio. Se observa un solo pico correspondiente a la enzima en su forma hexamérica.**

A partir de éstos resultados se descartó el uso del glicerol para conservar la enzima y se decidió almacenarla precipitada en sulfato de amonio. En estas condiciones la enzima conserva su forma hexamérica, lo que permitió la realización de los estudios cinéticos que se describen a continuación. Cabe tener en cuenta que el ion sulfato es un ligando inhibidor de la enzima (Arreola-Alemón y col. 2003).

### *Ensayo cinético*

La mutante truncada 268 fin expresada en *E. coli* presenta el mismo comportamiento que la enzima silvestre (hGNPD-1) respecto a la forma de activación alostérica por la GlcNA6P, (Figura 26), ambas se activan porque incrementa la  $k_{cat}$ , mientras que en ausencia del activador la mutante exhibe una actividad catalítica muy baja. En presencia de activador la enzima aumenta notablemente su  $k_{cat}$ .

Cabe mencionar que los datos de velocidad de reacción en función de la concentración de GlcN6P, a diferentes concentraciones del activador alostérico, GlcNAc6P, fueron ajustados separadamente a la expresión **1b** y presentan un mínimo de cooperatividad positiva, que no parece modificarse con la concentración creciente de GlcNAc6P.

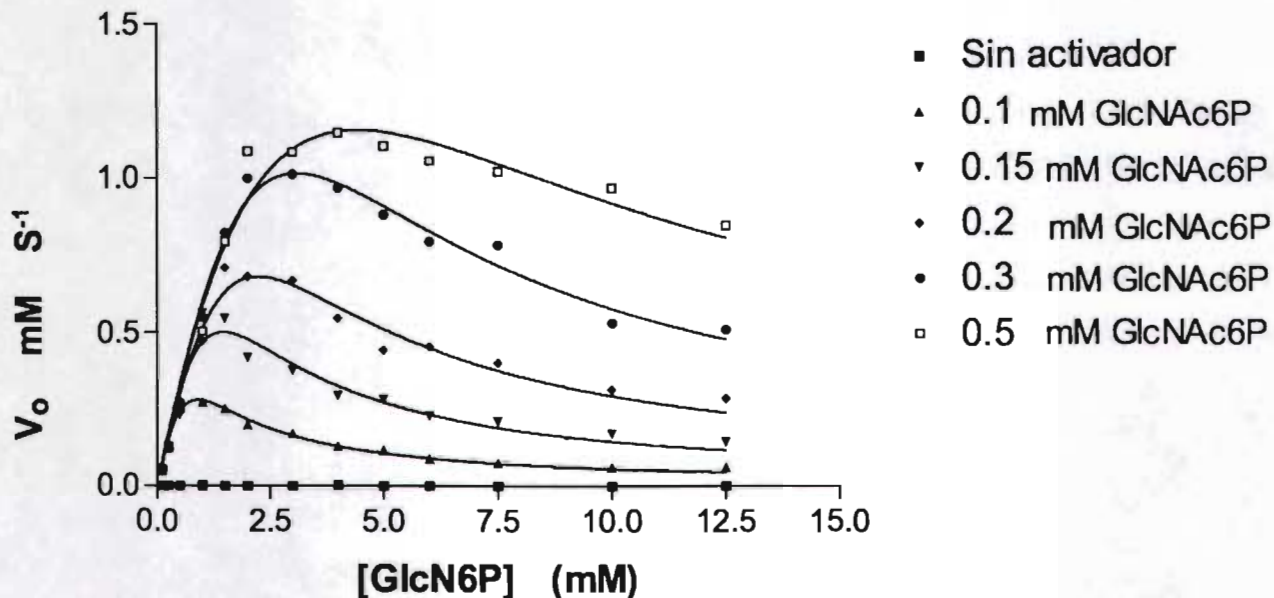


Figura 26. Patrones de velocidad inicial vs concentración de sustrato para la mutante truncada 268 fin. Se obtuvieron curvas a diferentes concentraciones de activador alostérico y en ausencia de éste.

Tabla 4.- Parámetros cinéticos de la mutante 268 fin

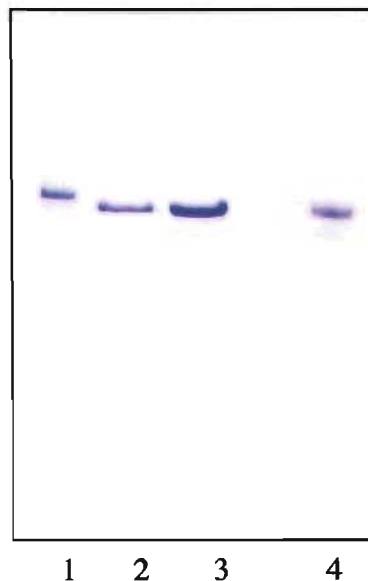
$k_{cat}$ 39.2 s <sup>-1</sup>
$h = 2.1$
$K_a$ 0.21 mM

Como ya se mencionó, la mutante 268 fin presenta una cinética semejante a la hGNPD-1 silvestre, observándose ciertas diferencias en algunos parámetros cinéticos como por ejemplo una disminución en la  $k_{cat}$ , que en la enzima silvestre es de 46.8 s<sup>-1</sup>, la cooperatividad con respecto a la concentración de GlcNAc6P es también menor pues en la enzima silvestre es de ( $h = 2.35$ ) y la afinidad por el activador es semejante presentando un valor de ( $K_a$  0.21 mM).

Mientras que en la hGNPD-1 silvestre es de 0.15 mM.

***Mutante 275 fin***

***Pureza de la enzima***



**Figura 27. Gel PAGE-SDS de la mutante truncada en la posición 275. En el carril 1 se observa la enzima hGNPD-1, en el 2 y 3 la mutante truncada 275 fin y en el 4 la EcGNPD.**

***Estudio Cinético.***

La mutante truncada 275 fin se comporta en forma semejante a la enzima silvestre, excepto en que manifiesta un incremento de su afinidad por el activador alostérico, como se puede observar en la Figura 28, el patrón de activación alostérica es el mismo que el de la hGNPD-1 silvestre. Las curvas se ajustaron a la ecuación 1b, la misma empleada para el ajuste de los datos de la enzima hGNPD-1 silvestre y los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 5.

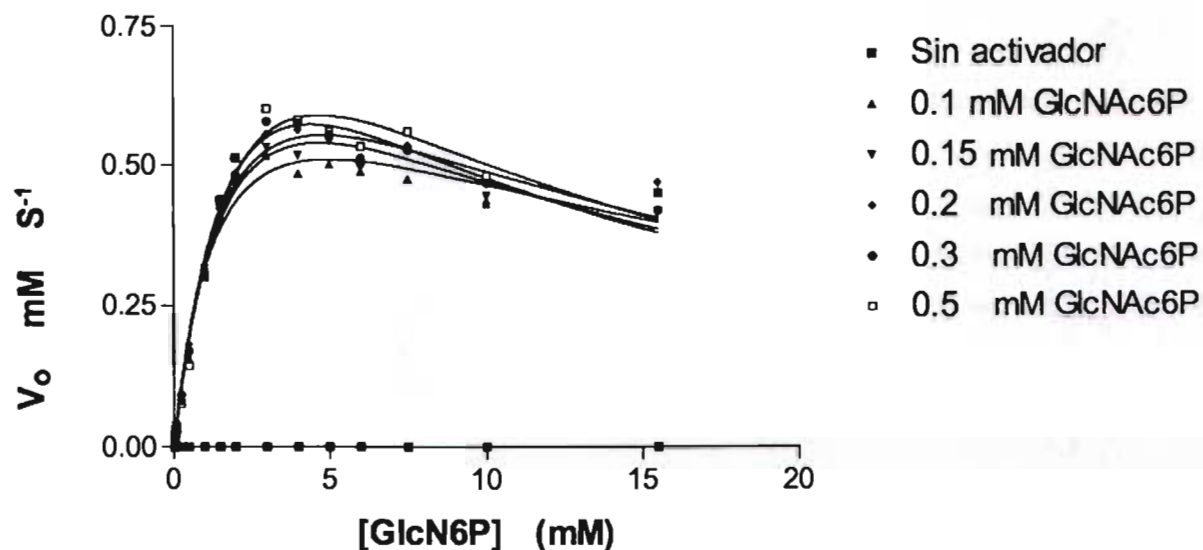


Figura 28. Curvas de velocidades iniciales graficadas contra la concentración de sustrato de la mutante truncada 275 fin medidas a diferente concentración de GlcNAc6P.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la mutante 275 fin.

$k_{cat}$	$40.5s^{-1}$
$K_a$	$0.058 \text{ mM}$
$K_i$	$6.5 \text{ mM}$

En esta mutante desaparece la cooperatividad en el efecto activador  $V$  de la GlcNAc6P, la que une hiperbólicamente, tampoco hay efecto  $K$  negativo apreciable (activación alostérica de tipo  $V$  clásico) y existe inhibición por sustrato que no se modifica por GlcNAc6P.

## DISCUSION.

Como ya se mencionó, la identidad entre las secuencias de aminoácidos de los segmentos homólogos de las desaminasas hGNPD-1 y EcGNPD es alta y la alineación estructural (superposición de los modelos estructurales derivados de los datos cristalográficos) revela una estructura prácticamente igual, excepto en pequeños detalles.

A pesar de esta gran semejanza estructural, la enzima humana presenta una cinética alostérica completamente diferente a la de la enzima bacteriana, como recordaremos, la hGNPD-1 muestra un patrón atípico de activación  $V$  que contrasta con la cinética alostérica simple y de tipo  $K$  de la EcGNPD. El estudio comparado de ambas estructuras revela que en la enzima humana existe un largo segmento no homólogo en el extremo C-terminal. Una característica importante de la hGNPD-1 es la presencia de una serie de interacciones en este segmento C-terminal, entre los residuos 268 y 275, que contactan con la hélice 1 y el giro que une la hélice 2 con la hija beta 3, en el módulo externo de la molécula (Figura 12). Estas interacciones, que no existen en la enzima EcGNPD, podrían ser fundamentales en el mecanismo de transmisión de los cambios conformacionales entre las subunidades, en el proceso de activación alostérica.

En este trabajo exploramos específicamente el significado funcional de la extensión C-terminal no homóloga mediante la construcción de las mutantes 268 fin y 275 fin, las cuales se estudiaron desde el punto de vista de su estabilidad y de su cinética alostérica. Tomando en cuenta los resultados mostrados se descarta que las propiedades alostéricas características de la hGNPD-1 se expliquen por la existencia del segmento C-terminal 268-289, debido a que ambas mutantes del extremo C-terminal se comportan en forma semejante a la enzima silvestre, apreciándose además un inesperado incremento de la afinidad por el activador alostérico en la mutante 275 fin.



La desaminasa humana truncada en la posición 268 es inestable en ausencia de sulfato de amonio, la observación de las coordenadas cristalográficas de la hGNPD-1, revela un puente salino inexistente en *E. coli*, entre la Lys 273 y el Asp 60 (distancia de 4.02 Å); esta interacción parece ser crítica para la estabilidad del plegamiento de la enzima cuando el sitio alostérico y el activo se encuentran libres. Hay que tener en cuenta que un sulfato (isomórfico del grupo  $-OPO_3^{2-}$ ) se une a los sitios ligantes de la GlcN-ol-6P y la GlcNAc6P.

Los residuos en el sitio activo de estas dos enzimas están altamente conservados, con excepción de la Ser 43 que es Gly en *E. coli*. La cadena lateral de ésta está colocada en posición adecuada para construir un puente de hidrógeno con el fosfato del inhibidor (o el ion sulfato) en la enzima humana. Además la Ser 43 está localizada en el asa de unión al fosfato (residuos 41-44) que es una de las pocas regiones donde aparecen diferencias entre la enzima humana y la bacteriana. En éstas dos enzimas se encuentran también algunas diferencias en los residuos de contacto del grupo fosfo ( $-OPO_3^{2-}$ ) del sustrato y del ion amonio. No sabemos si estas diferencias afecten las propiedades ligantes y puedan determinar que la enzima siga un mecanismo cinético diferente al de la desaminasa bacteriana, que es de tipo de equilibrio rápido al azar.

El cambio en éste residuo de Ser podría ser responsable en parte de las diferencias en la cinética alostérica observadas entre éstas dos enzimas. Cabe mencionar que los intentos llevados a cabo cambiando el residuo Ser 43 por Gly no han tenido resultados satisfactorios; en las fracciones de la purificación no se detectó la enzima a pesar de detectar una banda de sobreexpresión en la bacteria entera.

Es posible suponer que la proteína es inestable y forma cuerpos de inclusión. Estos resultados nos llevan a pensar que efectivamente el residuo Ser 43 es de suma importancia para el plegamiento; hay que recordar que es un residuo altamente conservado en las desaminasas de mamíferos (Figura 4).

## CONCLUSIONES

A diferencia de la EcGNPD, la hGNPD-1 recombinante presenta una cinética alostérica compleja. No hay evidencias directas de una transición alostérica entre dos estados, aunque la unión cooperativa de la GlcNAc6P lo sugiere. La transición deberá de sustentarse en experimentos espectrométricos y de unión de ligandos marcados. Se descarta que las propiedades alostéricas características de hGNPD-1 se expliquen por la existencia del segmento C-terminal 268-289.

El sulfato de amonio resultó ser un excelente estabilizador y protege a la enzima 268 fin de su disociación en subunidades, de tal forma que fue posible estudiarla y caracterizarla cinéticamente. Asimismo, las pruebas de estabilidad realizadas con la hGNPD-1 silvestre y la hGNPD-1 268 fin demuestran que no existe una diferencia significativa en la actividad de éstas dos enzimas por lo que se descarta que el segmento C-terminal 268-289 tenga un papel relevante en su función.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

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

J. A. Plumbridge, O. Cochet, J. M. Souza, M.M. Altamirano, M. L. Calcagno, B. Badet.1993. Coordinated regulation of aminosugar-synthesizing and degrading enzymes in *Escherichia coli* k-12. *J. Bacteriol.* **175** : 4951-4956.

Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.

Vincent F, Davies G J, Brannigan J. A. (2005)Structure and Kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the Nag B Superfamily *J Biol Chem.***280**: 19649-55

Benson, R. L. y Friedman, S. (1970) Allosteric control of glucosamine phosphate isomerase from the adult housefly and its role in the synthesis of glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem* **245**: 2219-2228.

Enghofer, E. y Kress, H. (1980) Glucosamine metabolism in *Drosophila virilis* salivary glands: ontogenetic changes of enzyme activities and metabolite synthesis. *Dev Biol (N Y)* **1985** **78**: 63-75.

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

Pattabiraman, T. N. (1961) Purification of glucosamine-6-phosphate deaminase from human brain. *Biochim. Biophys. Acta*: 273-283.

Shevchenko, V., Hogben, M., Ekong, R., Parrington, J. y Lai, F. A. (1998) The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* **216**: 31-38.

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

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

Rudiño-Piñera, E; Morales-Arrieta, S; Rojas-Trejo, S. and Horjales, E. (2002). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Cryst.* **D58**,10-20.

Altamirano, M.M; Mulliert, G; and Calcagno M. (1987) Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **258**, 95-100.

Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 266-272.

Altamirano, M.M., Hernández-Arana, A., Tello-Solis, S., and Calcagno, M.L. (1994). Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **220**, 409-13.

Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E. y Calcagno, M. L. (1995) Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* **34**: 6074-6082.

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

Montero Morán, G. M. (2001). Estudio del mecanismo catalítico de la enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química. UNAM.

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

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

Bustos-Jaimes, I. and Calcagno M. L. (2001) Allosteric Transition and Substrate binding Are Entropy Driven in Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **394**, 156-160.

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.

Cisneros, A. D; Montero-Morán, G; Lara-González, S and Calcagno, M. L. (2004). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **421**, 77-84.

Lucumí A. and Calcagno M. L. (2005). On the functional role of Arg 172 in substrate binding and allosteric transition in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, en prensa (a publicarse en octubre de 2005).

Drickamer, K. (1991). Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* **67**, 1029-32.

Fermini, B and Nathan, R.D. (1991). Removal of sialic acid alters both T – and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* **260**, H735-43.

Glick, G.D., Toogood, P.L., Wiley, D. C., Skehel, J. J., and Knowles, J.R. (1991). Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. *Journal of biological Chemistry* **266**, 23660-9.

Álvarez-Añorve L.I; Calcagno M. L. y Plumbridge J. (2005) .Why Does *Escherichia coli* Grow More Slowly on Glucosamine than on *N*-Acetylglucosamine? Effects of Enzyme Levels and Allosteric Activation of GlcN6P Deaminase (Nag B) on Growth Rates. *Journal of Bacteriology* **187**: 2974-2982.

Plumbridge, J. A. (1991) Repression and induction of the nag regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* **5**: 2053-2062.

Plumbridge, J. A. (1998) Expression of *ptsG*, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. *Mol Microbiol* **29**: 1053-1063.

Postma, P. W; J. W. Lengeler and G. R. Jacobson. (1996 ) Phosphoenolpyruvate; carbohydrate phosphotransferase systems, *Cellular and Molecular Biology*. 1149-1174.

Curtis, S. J; and W. Epstein.(1975). Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutans defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J. Bacteriol.* **122**:1189-1199.

Jones-Mortimer, M. C; and H. L. Kornberg (1980). Amino-sugar transport systems in *Escherichia coli* k12. *J. Gen.Microbiol.* **117**: 369-376

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

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

Mengin- Lecreulx, D and van Heijenoort, J. (1996) Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32-9.

Comb, D. G. y. R., S. (1958) Glucosamine metabolism. IV: Glucosamine 6 phosphate deaminase. *J. Biol.Chem*: 807-827.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



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

R. Lara-Lemus, M. L. Calcagno. (1998). Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1388:

L. M. Hebert, J. Daniels, E. Zhou, R. Crook, S. Turner. J. Simmond, J. Neidigh, S. Zhu, A. Baron, D. McClain. 1996. Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **98**: 930-936

Wolosker, H., Kline, D., Bian, Y., Blackshaw, S., Cameron, A. M., Fralich, T. J., Schnaar, R. L. y Snyder, S. H. (1998) Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J* **12**: 91-98.

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

Arreola, R.; Valderrama, B; L.Morante, M; y Horjales, E. (2003) Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Letters* **551**: 63-70.

Cayli, A., Hirschmann, F., Wirth, M., Hauser, H. y Wagner, R. (1999) Cell lines with reduced UDP-N-acetylhexosamine pool in the presence of ammonium. *Biotechnol Bioeng* **65**: 192-200.

Zhang J, Zhang W, Zou D, Chen G, Wan T, Li N, Cao X. (2003) Cloning and functional characterization of GNPI2, a novel human homolog of glucosamine-6-phosphate isomerase/oscillin. *J Cell Biochem.* **88**: 932-40.

Amireault, P. y Dube, F. (2000) Cloning, sequencing, and expression analysis of mouse glucosamine-6-phosphate deaminase (GNPDA/oscillin). *Mol Reprod Dev* **56**: 424-435.

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

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

Wolny, Y. M., Fissore, R. A., Wu, H., Reis, M. M., Colombero, L. T., Ergun, B., Rosenwaks, Z. y Palermo, G. D. (1999) Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca<sup>2+</sup> release in mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* **52**: 277-287.

Uversky N. V. (2002). What does it mean to be natively unfolded ?. *Eur. J. Biochem.* **269** : 2-12.

Z. S. Derewenda (1995). A twist in the tale of lipolytic enzymes *Nature Struct. Biol.* **2**: 347-349.

U. K. Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Roe, H. J.(1934). A Colorimetric Method for The Determination of Fructose in Blood and Urine.J. Biol.Chem **107**: 15-20.

Acerenza L. and Mizraji E.(1996). Cooperativity. Biochimistry et Biophysics Acta. **1339**: 155-166.