



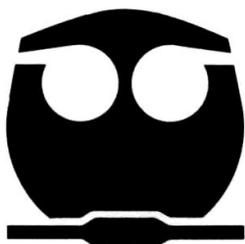
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

INTRODUCCIÓN DE SONDAS FLUORESCENTES EN PROTEÍNAS:
APLICADA A LA TRANSICIÓN ALOSTÉRICA DE LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO
DESAMINASA DE *ESCHERICHIA COLI*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
VERÓNICA CORTÉS AVILÉS



MÉXICO, D.F.

2011.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA.

VOCAL: Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI.

SECRETARIO: Profesor: ALEJANDRO SOSA PEINADO.

1er. SUPLENTE: Profesora: MARÍA DE LA PAZ ORTA PÉREZ.

2° SUPLENTE: Profesora: LAURA CARMONA SALAZAR.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO

SUSTENTANTE:

VERÓNICA CORTÉS AVILÉS

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a DIOS por darme la vida y por permitirme cerrar este ciclo.

Infinitas gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formarme como Química de Alimentos en las aulas y laboratorios de mi entrañable Facultad de Química así como a todos mis profesores que me formaron durante la carrera.

Infinitas gracias a mi asesor de tesis el Dr. Alejandro Sosa Peinado por apoyarme y darme la oportunidad de cerrar este ciclo de mi vida, así como al Dr. Martín González Andrade por su apoyo incondicional durante la realización de esta tesis.

Infinitas gracias a los miembros del jurado por sus valiosos comentarios, sugerencias y tiempo para mejorar este trabajo:

al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

al Dr. José Pedraza Chaverri

al Dr. Alejandro Sosa Peinado

a la M. en C. María de la Paz Orta Pérez

a la M. en C. Laura Carmona Salazar

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

ESTA TESIS LA DEDICO A:

Mis padres Perfecto Saúl Cortés Girón y Teófila Avilés Flores, quienes desde que nací, en mi ingreso a la UNAM y hasta el día de hoy me han brindado amor, cuidados, paciencia, consejos, apoyo incondicional y más.

Mis tres hermanos menores: Nadia, Saúl y Daisy. En especial a Nadia, quien ha sido un pilar y ejemplo en mi vida, gracias por todo hermana.

Mi bisabuela Ignacia Morales Bonilla†, a mis abuelas Felipa Flores Morales y Tomasa Girón Herrera por sus cuidados, sabios consejos e interesantes pláticas de sus tiempos. Así como a mi bisabuelo Demetrio Flores López† y a mis abuelos Natalio Cortés Ramírez† (¿Recuerdas los globos aerostáticos que hicimos en casa? inolvidable recuerdo abuelo) y Catalino Avilés Hernández† (recuerda abuelo que me dijiste que ibas a hacer una gran barbacoa el día en que me recibiera).

Mis abuelos adoptivos Don Samuel† y Doña Rosa, por todas esas aventuras en el campo cuando de niña y por enseñarme el amor y el cuidado a las plantas.

Mis tíos y primos por ayudarme a recargar las pilas cada vez que voy a nuestra “Tierra del Sol”, en especial a mi primo César Cortés López y a mis tíos Octavio Cortés Girón y Rosa María Cortés Girón.

Mis amigos de toda la vida de Huajuapán de León, Oaxaca, siempre y para siempre en las buenas y en las malas: Araceli, Ana, Naschelly, Gricela, Florencia, Adriana†, Edith†, Tony, Ricardo Martínez., Nancy, Ricardo Sánchez., Obed, Alba, Yanet, Floriela, Laura, Graciela, Enrique y Marcos.

Mis mejores amigas de la Facultad de Química: Anel Olvera Montiel y Anel Verónica Garduño García (amiga desde el primer día de clases en la Facultad), Sandra, Karla, Marbella, Noemí, Tony, Erika, Araceli Ruiz, Araceli Zapata, Talía, Juanita, Flor, Maribel, Nieves, Alia y Amada.

Mi gran amigo Erick Sierra Campos, a mi gran amiga Laura Álvarez Añorve, así como a mis amigos: Martín, Isabel, Armando, Juan, Yesica, Nelly, Sandra, Yanet, Teresita, Rodrigo, Pablo, Gayle, Vicky, Yolotl†, Roberto y Joel.

Las familias Flores Flores, Pazos Hernández y Vázquez Rojas.

Los profesionistas del área de la salud quienes me han ayudado desde que inicié la búsqueda por una respuesta a mi “fortaleza”. Gracias a todos ellos he logrado entenderme, quererme, admirarme y valorarme cada vez más, así como a aceptar, entender, trabajar y controlar mi “fortaleza”. El taller TOC es y será siempre un parte aguas en mi vida, que me ha ayudado a mejorarla en todos los aspectos, infinitas gracias a la Dra. Cristina Lóyzaga Mendoza y a la Lic. Teresa López así como a todos mis compañeros del taller.

A todos los mencionados de corazón infinitas gracias por ser parte del tren de mi vida, por su amistad, apoyo, consejos, alegrías, sorpresas, sonrisas, tristezas, lágrimas, cafés, comidas, reuniones, viajes, por compartir sus sentimientos, conocimientos, experiencias personales, tiempo y demás que haya pasado por alto. Gracias por creer en mí, por ayudarme a cerrar este ciclo, por el apoyo incondicional, por escucharme y entenderme, por todos los momentos, días, semanas, meses y años compartidos.

Q.A. Verónica Cortés Avilés

“DIOS NUNCA MUERE”

Dios Nunca Muere es un vals mexicano escrito por el compositor y violinista Oaxaqueño *Macedonio Alcalá* en 1868. Es el *Himno del Estado de Oaxaca*. En él, al igual que en la *Canción Mixteca*, se refleja el dolor del pueblo oaxaqueño, obligado a migrar a otras tierras en busca de mejores oportunidades. Se cuenta que este vals fue compuesto cuando Macedonio Alcalá y su esposa pasaban por una situación económica precaria y además el compositor estaba en riesgo de morir. Una versión de la historia señala que su benefactor y amigo Roberto Maqueo, viéndolo en esta situación difícil, le dejó discretamente 12 pesos en plata. Otra versión señala que le visitaron indígenas de un pueblo cercano para encargarle un vals para la patrona de su pueblo, dejándole 12 pesos en plata como paga. En todo caso, se afirma que en cuanto Alcalá recibió el dinero, se incorporó en su cama y trazó en una pared los primeros compases del vals, los cuales transcribió después en un papel para música. Llamó a este vals “*Dios Nunca Muere*” en gratitud a que había recibido auxilio cuando más lo necesitaba. A esta composición se le han asignado varias letras de las cuales la más conocida y que se reproduce seguidamente, fue escrita por Cipriano José Cruz.

“CANCIÓN MIXTECA”

La *Canción Mixteca* fue escrita en 1915 por el compositor Oaxaqueño *José López Alavez*. Ésta le ha dado un gran prestigio a nivel nacional al estado de Oaxaca, específicamente a la región Mixteca Oaxaqueña. En sus letras se refleja la nostalgia de partir y dejar el lugar de origen, como resultado del fenómeno de migración del cual el autor fue parte y muchos miles de mixtecos oaxaqueños que lo han sido y siguen siendo.

La *Canción Mixteca* se compuso bajo la arboleda de la Alameda Hidalgo de la ciudad de Querétaro donde López Alavez recordaba con tristeza a su entrañable Tierra del Sol (sobrenombre de la región Mixteca). En el año de 1918, la *Canción Mixteca* triunfó en el Primer Concurso de Canciones Mexicanas, convocado por el periódico *El Universal*; ese mismo año, en el Festival de la Música Mexicana efectuado en la Alameda Central de la Ciudad de México, se presentó al público al compositor *huajuapeño* como triunfador del Primer Concurso de Canciones Mexicanas. La instrumentalización de la *Canción Mixteca* se lleva a cabo por bandas municipales, que están compuestas básicamente por instrumentos de viento y de metal.

Se ha utilizado como introducción para la ejecución del *Jarabe Mixteco*, y últimamente a raíz del fenómeno de rescate cultural de la mixteca (promovido por la propia ciudadanía), se emplea para eventos oficiales y de gran magnitud, dado que el *Jarabe Mixteco* y la *Canción Mixteca* representan el patrimonio cultural de la *Heroica Ciudad Huajuapán de León, Oaxaca*.

“DIOS NUNCA MUERE”

Himno estatal de Oaxaca

Música: Macedonio Alcalá

Letra: Cipriano José Cruz

Muere el sol en los montes
Con la luz que agoniza,
Pues la vida en su prisa,
Nos conduce a morir.

Pero no importa saber
Que voy a tener el mismo final,
Porque me queda el consuelo
Que Dios nunca morirá.

Voy a dejar las cosas que amé
La tierra ideal que me vio nacer,
Sé que después habré de gozar
La dicha y la paz,
Que en Dios hallaré.

Sé que la vida empieza
En donde se piensa
Que la realidad termina
Sé que Dios nunca muere
Y que se conmueve
Del que busca su beatitud.

Sé que una nueva luz
Habrá de alcanzar nuestra soledad
Y que todo aquel que llega a morir
Empieza a vivir una eternidad.

Muere el sol en los montes
Con la luz que agoniza,
Pues la vida en su prisa,
Nos conduce a morir.

“CANCIÓN MIXTECA”

Autor: José López Alavez.

¡Qué lejos estoy del suelo donde he nacido!
inmensa nostalgia invade mi pensamiento;
y al verme tan solo y triste cual hoja al viento,
quisiera llorar, quisiera morir de sentimiento.

¡Oh Tierra del Sol! suspiro por verte
ahora que lejos yo vivo sin luz, sin amor;
y al verme tan solo y triste cual hoja al viento,
quisiera llorar, quisiera morir de sentimiento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 Proteínas.....	4
1.2 Unión reversible de una proteína a un ligando.....	6
1.3 Enzimas.....	6
1.4 Cambios conformacionales y flexibilidad.....	7
1.5 Alostерismo.....	9
1.6 La regulación alostérica.....	10
1.7 Modelo de estudio: glucosamina-6-fosfato desaminasa de <i>Escherichia coli</i>	10
1.7.1 Metabolismo de aminoazúcares en bacterias y animales.....	11
1.7.2 La D-glucosamina (GlcN) y la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc).....	12
1.8 Relación estructura-función para el diseño de proteínas.....	16
1.8.1 La identificación de residuos funcionalmente importantes en proteínas.....	17
1.8.2 Mutación de residuos identificados de información estructural.....	17
1.8.3 ¿Qué residuos deberían ser sustituidos?, ¿Qué residuos deberían ser introducidos?....	18
1.9 Ingeniería de proteínas: una herramienta en el estudio estructural y funcional de las enzimas.....	18
1.10 Espectroscopia de fluorescencia.....	19
1.11 Introducción de sondas fluorescentes.....	21
2. OBJETIVO	23
3. HIPÓTESIS	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Reactivos.....	25
4.2 Cepa bacteriana.....	26
4.3 Plásmidos.....	26
4.4 Mutagénesis.....	27
4.5 Expresión de la enzima silvestre y las mutantes.....	28
4.6 Purificación de la enzima silvestre y las mutantes.....	28
4.7 Concentración de proteína.....	29
4.8 Ensayos enzimáticos.....	30
4.9 Modificaciones químicas con dansil-amidoetil-MTS en las cisteínas reactivas de la GlcN6P desaminasa.....	32
4.10 Determinaciones por fluorescencia en estado estacionario.....	32
4.11 Determinación de la dependencia de la polaridad relativa del disolvente con las propiedades fluorescentes del dansil-amidoetil-MTS-cisteína.....	33
4.12 Rendimiento cuántico (ϕ).....	33
4.13 Modelaje y visualización molecular de los conformeros T y R de la GlcN6P desaminasa.....	34

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento cinético de la glucosamina-6-fosfato desaminasa silvestre.....	35
5.2 Comportamiento cinético de la triple mutante C118S/C228S/C239S.....	36
5.3 Comportamiento cinético de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> modificada químicamente en las posiciones 164 y 206 con dansil-amidoetil-MTS.....	38
5.4 Propiedades espectrales del fluoróforo dansil-amidoetil-MTS unido a cisteína.....	40
5.5 Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca relacionados al cambio en el microambiente de las posiciones 164 y 206 modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS, al adicionarles los ligandos del sitio activo y del sitio alostérico a concentraciones saturantes.....	42
5.6 Correlación de los cambios en la señal de fluorescencia con los cambios conformacionales en la estructura de la GlcN6P desaminasa.....	44
5.7 Titulación con los ligandos del sitio activo y alostérico, midiendo los cambios de la λ_{\max} de emisión de fluorescencia en las enzimas modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS.....	46
5.8 Diferencias en el microambiente detectadas a través de las sondas fluorescentes; indican diferencias estructurales en el confórmero R cuando éste es inducido a partir del ligando del sitio activo o del ligando del sitio alostérico.....	48
6. CONCLUSIONES.....	50
7. ANEXOS	
7.1 Medio Luria-Bertani (LB).....	51
7.2 Gel de la GlcN6P desaminasa silvestre.....	51
7.2 Gel de la Triple Mutante C118S/C228S/C239S.....	52
8. BIBLIOGRAFÍA.....	53

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASA: Área superficial accesible al solvente

CB: Carbono beta

Dansil-amidoetil-MTS: Dansilamidoetil-metanotiosulfonato(2,5-dimetilamidoaftil-1-sulfonamido-etil-metanotiosulfonato)

Dansil-H164-GlcN6P desaminasa: Mutante C118S/C228S/C239S/H164C de glucosamina-6-fosfato desaminasa modificada químicamente con dansil-amidoetil-MTS

Dansil-S206-GlcN6P desaminasa: Mutante C118S/C228S/C239S/S206C de glucosamina-6-fosfato desaminasa modificada químicamente con dansil-amidoetil-MTS

DM: Dinámica molecular

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Desoxiribonucleótidos trifosfatados

DTNB: 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPR: Resonancia paramagnética del electrón

FRET: Transferencia de energía por fluorescencia en resonancia

Fru6P: Fructosa-6-fosfato

GlcN: D-glucosamina

GlcNAc: *N*-acetil-D-glucosamina

GlcNAc6P: *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato

GlcN-ol-6P: 2-amino-2-desoxi-glucitol-6-fosfato

GlcN6P: D-glucosamina-6-fosfato

GlcN6P desaminasa: Glucosamina-6-fosfato desaminasa

H164C-GlcN6P desaminasa: Mutante C118S/C228S/C239S/H164C de glucosamina-6-fosfato desaminasa

IF: Intensidad de emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

k_{cat} : Constante catalítica

K_i : Constante de inhibición

KNF: Koshland-Nemety-Filmer

ManNAc: *N*-acetilmanosina

MWC: Monod-Wyman-Changeux

NANA: ácido *N*-acetilneurámico

PCR: Reacción en cadena de polimerasas

PDB: Banco de datos estructurales de proteínas

RMN: Resonancia magnética nuclear

Rpm: Revoluciones por minuto

S206C-GlcN6P desaminasa: Mutante C118S/C228S/C239S/S206C de glucosamina-6-fosfato desaminasa

SDL: Marcaje sitio específico

TNB: 2-nitrobenzoato

UF: Emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias

V_{\max} : Velocidad máxima

V_0 : Velocidad inicial

WT: Enzima silvestre

ϵ : Polaridad relativa

ϵ : Coeficiente de absorción molar

Φ : Rendimiento cuántico

λ : Longitud de onda

λ_{exc} : Longitud de excitación

λ_{em} : Longitud de emisión

λ_{max} : Longitud máxima de absorción

RESUMEN

La flexibilidad conformacional en proteínas alostéricas juega un papel fundamental para entender los cambios en la afinidad a sus ligandos. Los métodos de marcaje sitio específico (SDL) con sondas fluorescentes o señales tipo nitroxilo para resonancia magnética nuclear (RMN) se han utilizado para obtener información estructural de proteínas en solución. Un buen modelo para estudiar los cambios conformacionales de proteínas en solución es el problema dinámico de la transición alostérica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (GlcN6P desaminasa). Por ello, se crearon por mutagénesis sitio dirigida dos mutantes de esta enzima, la primera con reactividad exclusiva a cisteínas en la posición 164 y la segunda en la posición 206, después, se realizó un marcaje sitio específico con el fluoróforo dansil-amidoetil-MTS en dichas posiciones para monitorear la transición alostérica en solución por la emisión de fluorescencia del grupo dansil unido a los residuos indicados. Ambas posiciones se eligieron para monitorear los cambios conformacionales entre los estados T y R de la proteína. En el conformero T ambos residuos sólo presentan contactos intrasubunidades pero en el R se establecieron nuevos contactos intersubunidades. Al igual que la enzima silvestre, las mutantes marcadas con la sonda fluorescente (dansil-H164C y dansil-S206C) presentaron una activación alostérica del sistema tipo K. Con estas dos mutantes se monitorearon los cambios conformacionales por el espectro de emisión de fluorescencia en el estado estacionario titulando con el ligando del sitio activo o bien con el del sitio alostérico. Los datos de fluorescencia sugieren cambios estructurales en la conformación del estado R cuando éste es inducido por el ligando del sitio activo o bien por el ligando del sitio alostérico.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Proteínas

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que ejecutan la mayor parte de las funciones vitales de las células: el reconocimiento molecular, el transporte de moléculas, la función estructural, la catálisis de las reacciones químicas, inclusive la regulación de la expresión de los genes está determinada por proteínas que interactúan con el ácido desoxirribonucleico (ADN) (González et al., 2005).

La estructura de las proteínas se clasifica en varios niveles, el primero es una secuencia específica de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El enlace peptídico es un enlace covalente formado entre el grupo α -amino de un aminoácido y el grupo α -carboxilo de otro. Cuando dos aminoácidos están unidos por un enlace peptídico forman un dipéptido y la adición de más aminoácidos resulta en largas cadenas llamadas oligopéptidos y polipéptidos (Hames y Hooper, 2009). Esta secuencia también llamada *estructura primaria* contiene la información necesaria para que estas biomoléculas se plieguen o adquieran una estructura tridimensional específica para desarrollar una función (González et al., 2005).

Además de los enlaces peptídicos, la estructura tridimensional de una proteína es mantenida por una combinación de interacciones no covalentes (fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas) e interacciones covalentes (Hames y Hooper, 2009).

Los sucesivos niveles estructurales de las proteínas únicamente se obtienen si la secuencia de aminoácidos, se dobla sobre sí misma para obtener una estructura tridimensional específica (González et al., 2005).

La estructura tridimensional de las proteínas está formada por un arreglo de estructuras repetitivas en forma de hélices α y hojas β (figura 1A y 1B respectivamente) que forman la *estructura secundaria*; estos elementos están unidos por regiones no repetitivas que se denominan asas (estructuras marcadas con flechas en la figura 1C). El empaquetamiento de la estructura secundaria se conoce como la *estructura terciaria* (figura 1C). Algunas proteínas sólo funcionan cuando dos o más cadenas de aminoácidos independientes se unen para formar un dímero, trímero, tetrámero, etc. (figura 1D), estas proteínas poseen *estructura cuaternaria* (González et al., 2005, Nelson, 2009).

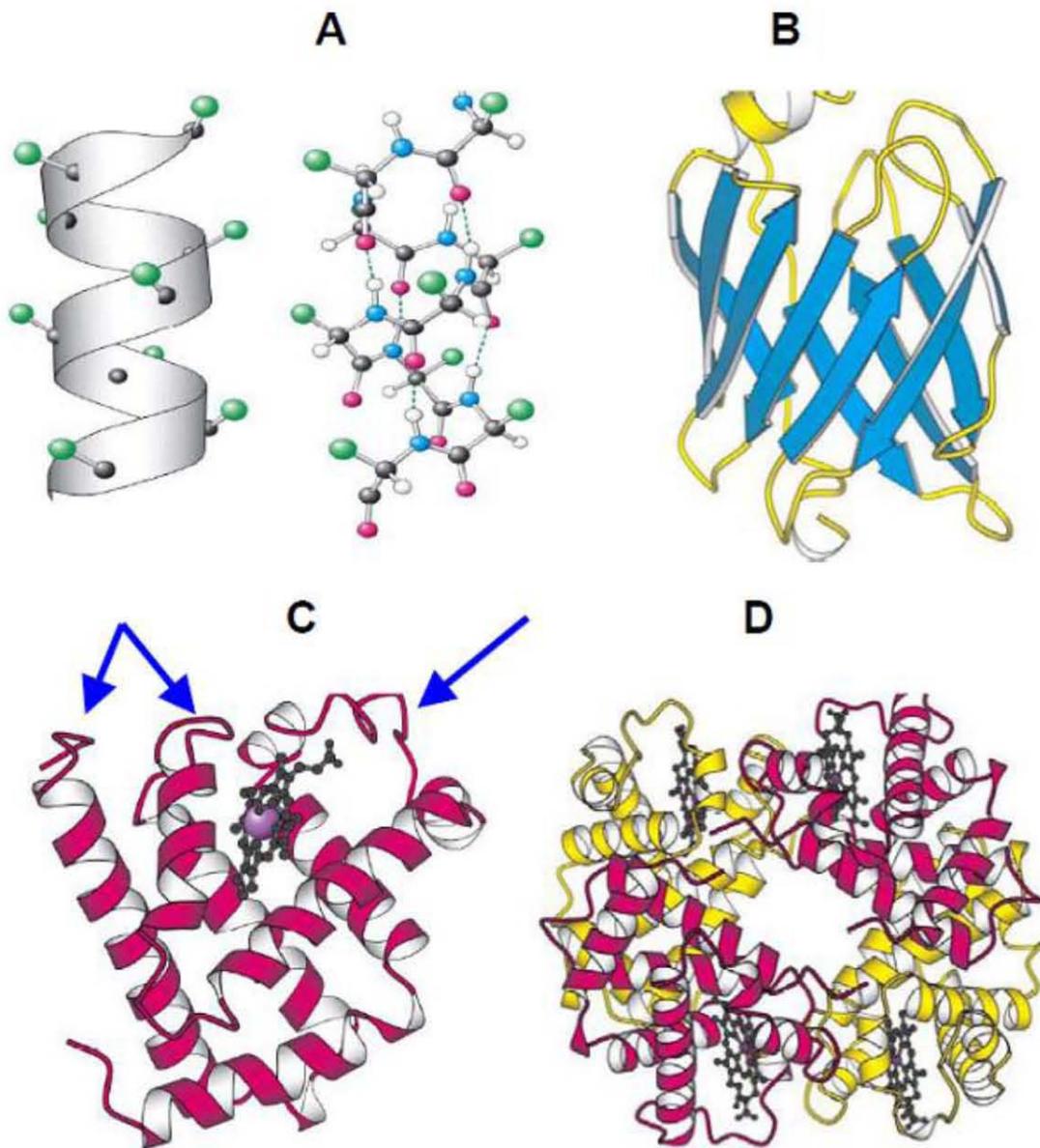


Figura 1. Representación de los diferentes niveles estructurales de las proteínas. A) hélice α , B) lámina β , C) estructura terciaria y D) estructura cuaternaria.

1.2 Unión reversible de una proteína a un ligando

Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de otras moléculas llamadas *ligandos*. Un ligando puede ser cualquier tipo de molécula, que interactúa con otra molécula (Nelson, 2009). Este término incluye macromoléculas (péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos o especies moleculares formadas por mezclas de estas moléculas) como también moléculas de pequeña masa molecular (Chowdhry, 2001).

El ligando se une a un lugar de la proteína llamado sitio de fijación, que es afín al ligando en tamaño, forma, carga y carácter hidrofóbico o hidrofílico, además, la interacción es específica. Una proteína puede tener diferentes sitios de fijación para diferentes ligandos (Nelson, 2009).

La unión de una proteína con un ligando está asociada con un cambio conformacional que hace que el *sitio de fijación* sea más afín al ligando, lo que permite una unión más fuerte. La adaptación estructural que se produce entre la proteína y el ligando se llama ajuste inducido. Las proteínas son flexibles por lo que los cambios en su conformación pueden clasificarse desde extremadamente sutiles es decir, una reorganización estructural insignificante a cambios a gran escala en ambas propiedades conformacionales locales y globales. La lista de cambios no solamente incluye cambios en estructura, conformación, tamaño, forma geométrica y topología sino también en la distribución de carga, en el estado de hidratación y protonación y en el volumen parcial molar también como aquellos en la superficie del área accesible (ASA), polaridad y factores de entropía intra e intermoleculares (Chowdhry, 2001).

Las interacciones entre ligandos y proteínas pueden ser reguladas, habitualmente mediante interacciones específicas con uno o más ligandos adicionales. Estos otros ligandos pueden provocar cambios conformacionales que afecten a la unión del primer ligando (Nelson, 2009).

1.3 Enzimas

Existen dos condiciones fundamentales para la vida. En primer lugar, la entidad viva ha de poder autorreplicarse, en segundo, ha de poder catalizar reacciones químicas eficiente y selectivamente. Sin catálisis, las reacciones químicas no podrían darse en una escala útil de tiempo (Nelson, 2009).

Los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos: las *enzimas*, las proteínas más estables y de mayor especialización tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos, son capaces de aumentar las velocidades de reacción en un factor de entre 10^5 y 10^{17} . Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran espectacularmente las reacciones químicas específicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación proteica

nativa. Si una enzima se desnaturaliza o se disocia en sus subunidades, la actividad catalítica suele desaparecer. Algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus residuos de aminoácidos. Otras requieren un componente químico adicional llamado *cofactor*. El cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} o una molécula orgánica o metaloorgánica compleja denominada *coenzima*. Las coenzimas actúan como transportadores transitorios de grupos funcionales específicos (Nelson, 2009).

El rasgo distintivo de una reacción catalizada enzimáticamente es que tiene lugar dentro de una bolsa de la enzima denominada *sitio activo* o *sitio catalítico*. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa la enzima se denomina *sustrato*. La superficie del sitio activo de la enzima está revestida con residuos de aminoácidos con grupos sustituyentes que se unen al sustrato y catalizan su transformación química. A menudo, el sitio activo recubre el sustrato y lo secuestra completamente de la disolución (Nelson, 2009).

1.4 Cambios conformacionales y flexibilidad

La disposición espacial de los átomos de una proteína se denomina *conformación*. Las posibles conformaciones de una proteína incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. Un cambio de conformación puede ser, por ejemplo, el resultado de la rotación alrededor de enlaces sencillos. De entre las numerosas conformaciones teóricamente posibles de una proteína que contiene cientos de enlaces sencillos, generalmente hay una o unas pocas que predominan en condiciones biológicas. La conformación que existe en unas condiciones determinadas es la termodinámicamente más estable y que posee la menor energía libre de Gibbs (G) (Nelson, 2009).

Durante su ciclo catalítico, las enzimas sufren cambios conformacionales que son críticos para su función. La formación del complejo *enzima-sustrato* es acompañado por un cambio estructural local que separa a los sustratos unidos y a los intermediarios de la reacción de la mayor parte del solvente. Los sustratos llegan a ser rodeados por la proteína, de este modo estabiliza intermediarios o estados de transición para una catálisis eficiente. En muchas enzimas este ataque inducido depende de segmentos flexibles específicos, puntos esenciales o tapas, comprimiendo y encerrando el sitio activo. Estas estructuras son particularmente interesantes en el caso de las enzimas alostéricas, cuyos residuos del sitio activo despliegan interacciones que son relevantes a los cambios conformacionales asociados con su función (Bustos-Jaimes et al., 2002).

Una proteína alostérica es aquella en la cual la unión de un ligando afecta a las propiedades de unión de otro sitio de la misma proteína. El término “alostérico” proviene del griego *allos* “otro”, y *stereos*, “sólido” o “forma”. Las proteínas alostéricas son aquellas que tienen “otras formas” o conformaciones inducidas por la unión de ligandos conocidos como *moduladores*, los cuales pueden ser tanto *inhibidores*

como *activadores*. Cuando el ligando normal y el modulador son idénticos la interacción se denomina *homotrópica* y cuando el modulador es una molécula diferente del ligando normal la interacción es *heterotrópica*. Algunas proteínas tienen dos o más moduladores y por lo tanto pueden tener interacciones homotrópicas y heterotrópicas (Nelson, 2009).

Los procesos dinámicos son parte de la función catalítica de todas las enzimas. Esta dinámica está implicada en eventos como la unión de sustratos o cofactores, la liberación de productos y los cambios alostéricos. El propio proceso catalítico requiere de una flexibilidad inherente ya que las posiciones de los átomos, del sitio activo, del sustrato, de los intermediarios y del producto, cambian conforme avanza el proceso catalítico. Existe abundante evidencia experimental y teórica sobre la naturaleza flexible de muchas enzimas. Sin embargo, poco sabemos de cómo esta flexibilidad está acoplada a los procesos catalíticos. Se sabe que el estado nativo de una enzima es en realidad un conjunto estadístico de estados conformacionales cuyas energías libres son equivalentes. La facilidad de cruzar entre un estado y otro dependerá de la flexibilidad de la proteína o bien de las interacciones de ésta con un ligando específico. Esto quiere decir que las proteínas pueden existir como entidades con un cierto grado de desestructuración y que adquieren una estructura más definida cuando se unen a un ligando. La propagación de estos cambios estructurales está dada por interacciones cooperativas, que son el puente que une el comportamiento de distintos aminoácidos dentro de una molécula de proteína. Como resultado de estas interacciones, las perturbaciones físicas o químicas en cualquier residuo se propagan por toda la molécula. De este modo, los aminoácidos perciben los efectos de perturbaciones que ocurren en lugares lejanos de la molécula proteica (Bustos-Jaimes, 2005).

Para llevar a cabo la catálisis, las enzimas frecuentemente modifican su conformación estructural, incluyendo cambios en asas superficiales que poseen importancia funcional. Estas asas pueden adoptar conformaciones “abiertas”, que permiten la entrada del sustrato y la liberación de producto del sitio catalítico, y conformaciones “cerradas”, que aíslan al sustrato del disolvente y facilitan las interacciones enzima-sustrato que hacen posible la catálisis. Las enzimas en las reacciones químicas catalizadas, proveen a los reactivos un ambiente estructural y electrónico preorganizado para ser complementario con los estados de transición del sustrato. Es posible que los movimientos de la proteína estén acoplados a la formación de estructuras muy similares a los estados de transición y, en consecuencia, eleven la probabilidad de que ocurra la reacción (Bustos-Jaimes, 2005).

1.5 Alostерismo

Existen principalmente tres formas mediante las cuales se pueden controlar las reacciones catalíticas en la célula. *Primero*, la catálisis se puede controlar por la concentración de la enzima, que es determinada por la cantidad de enzima sintetizada y la cantidad de enzima desechada. Este tipo de control se llama “regulación metabólica a largo plazo” debido a que el proceso toma varios minutos para que la concentración de la enzima cambie significativamente. *Segundo*, la actividad de la enzima puede ser controlada por medio de modificaciones covalentes. Estas modificaciones pueden fijar a la enzima en una condición estable de actividad o inactividad. *Tercero*, la velocidad o rapidez de una reacción puede ser controlada por medio de moléculas pequeñas llamadas *moduladores* o *efectores*. Un cambio en la concentración de los moduladores puede, de un momento a otro, modificar la velocidad de una reacción metabólica. Un ejemplo de este último tipo de control es la modulación de la actividad en las enzimas alostéricas (Rudiño, 2001).

Existen dos clases principales de enzimas reguladoras en las rutas metabólicas, las *enzimas alostéricas* que funcionan a través de la unión reversible, no covalente, de compuestos reguladores denominados *moduladores alostéricos* (generalmente metabolitos pequeños o cofactores) y que son las enzimas que presentan “otras formas” o conformaciones inducidas por la unión de los moduladores. En la segunda clase se encuentran las enzimas reguladas por modificación covalente reversible. Ambas clases de enzimas reguladoras tienden a tener varias subunidades y, en algunos casos, el (los) sitio(s) regulador(es) y el sitio activo se encuentran en subunidades separadas (Rudiño, 2001).

Las enzimas alostéricas se descubrieron cuando se intentaba dilucidar los mecanismos de control por retroalimentación en las rutas metabólicas. Se encontró que la enzima que cataliza la primera reacción en algunas rutas metabólicas puede ser inhibida específicamente por el producto final de la misma ruta. Como el producto final de la ruta y el sustrato de la primera enzima no son iso-estéricos (de la misma forma) sino alo-estéricos (de forma distinta), Monod et al (1965) propusieron el concepto de *efector alostérico*. Este efector requiere de un sitio regulatorio (*alostérico*) distinto al sitio donde se lleva a cabo la función catalítica (*activo*). Las interacciones alostéricas ocurren cuando la unión de una molécula pequeña a un sitio específico de la proteína es afectada por la unión de otra molécula pequeña en un sitio diferente (Rudiño, 2001).

Después del descubrimiento de las enzimas alostéricas, Monod, Wyman y Changeux (MWC) y Koshland, Nemethy y Filmer (KNF) propusieron sus modelos cinéticos para explicar las interacciones alostéricas (Rudiño, 2001).

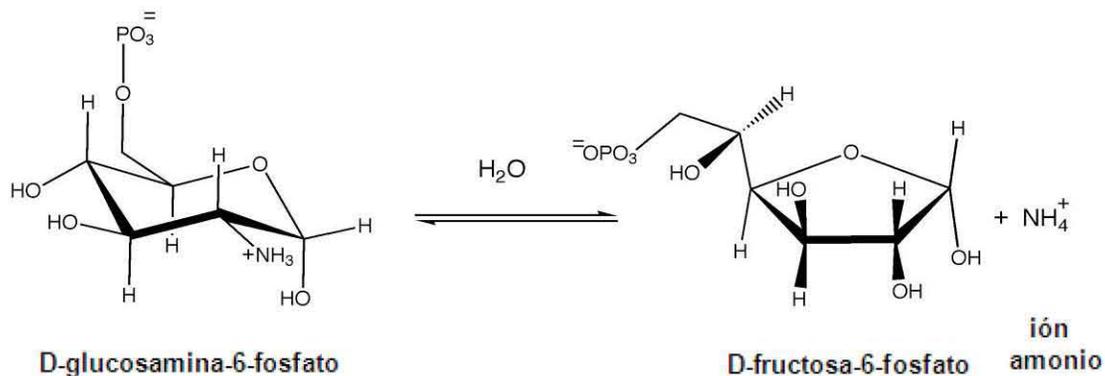
1.6 La regulación alostérica

Los cambios funcionales que son la base estructural de la regulación alostérica se deben a la existencia de confórmeros con propiedades ligantes o catalíticas diferentes y que están en equilibrio entre sí. Las enzimas alostéricas controlan muchos procesos mediados por proteínas que son esenciales para la función celular. Ellas juegan un papel importante en diferentes procesos, tales como la regulación metabólica, la respuesta de receptores, la expresión de genes, el plegamiento de proteínas asistido por chaperonas y la comunicación intercelular. La regulación de las propiedades de unión de una proteína alostérica puede ser descrita como un equilibrio entre dos diferentes estados conformacionales, uno con baja o nula afinidad por el sustrato definido como *estado T* y otro con alta afinidad por el sustrato y activadores llamado *estado R*. La transición de un confórmero a otro involucra cambios estructurales a nivel cuaternario, lo cual promueve modificaciones locales en la estructura terciaria de los monómeros, dando como resultado que se alteren las propiedades de unión del ligando (Perutz, 1990).

La transición alostérica implica la comunicación entre regiones distantes en la molécula de la enzima, lo que requiere la transmisión de señales conformacionales dentro de cada subunidad y entre las Perutz, 1990).

1.7 Modelo de estudio: glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*

Un buen modelo para estudiar los cambios conformacionales de las proteínas en solución es la transición alostérica de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6 antes EC 5.3.1.10). Esta enzima cataliza la isomerización y desaminación reversible de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) e ión amonio (esquema 1) (Comb y Roseman, 1958, Midelfort y Rose, 1977, Calcagno et al., 1984).



Esquema 1. Reacción de desaminación e isomerización catalizada por la glucosamina-6-fosfato desaminasa.

La GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* (*E. coli*) es una enzima alostérica activada por *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). Esta enzima cataliza un paso en el *catabolismo de aminoazúcares* (esquema 2) que permite a *E. coli* la utilización de D-glucosamina (GlcN) y de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) como fuentes de carbono.

1.7.1 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 (Álvarez, 2005).

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 β 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*-acetil-D-glucosamina 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 (Álvarez, 2005).

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 muertas: 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 (Álvarez, 2005).

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, 3) controlar la permeabilidad de la membrana, 4)

regular el metabolismo y la división celular y 5) presentar un papel en el reconocimiento celular (Álvarez, 2005).

1.7.2 La D-glucosamina (GlcN) y la N-acetil-D-glucosamina (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 et al, 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 2). 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 gene *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, 1991).

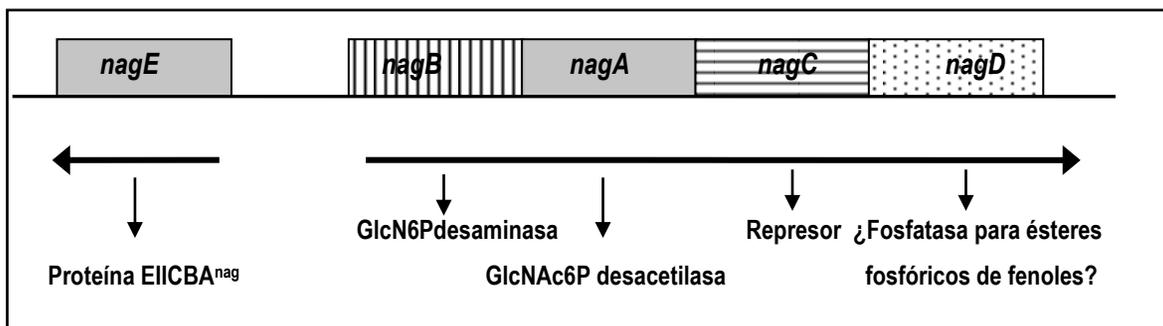
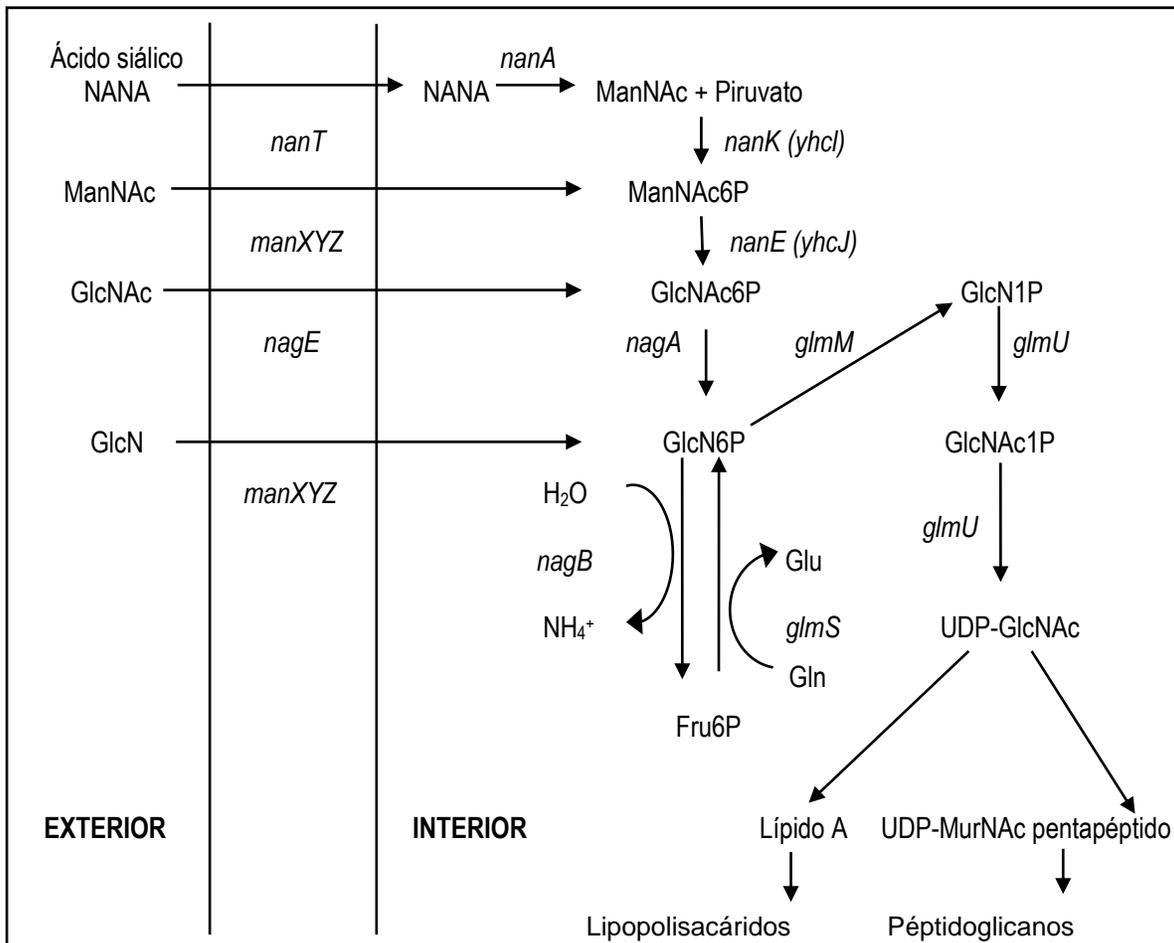


Figura 2. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (tomado de Plumbridge, 1992).

El metabolismo de la GlcN y la GlcNAc (esquema 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 et al., 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 gene *glmS* es esencial ya que se encarga de la generación de GlcN6P. El gene *glmM* codifica para la enzima responsable de la conversión de GlcN6P en glucosamina 1-fosfato (GlcN1P) mientras que el gene *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 y Epstein S, 1975, Jones-Mortimer et al., 1980, Postma et al., 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, Plumbridge, 1989).



Esquema 2. Metabolismo de los aminoazúcares (D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina) en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) y la vía biosintética (genes *glm*). (Tomado de Plumbridge y Vimr, 1999, Mengin-Lecreux y Heijenoort, 1996).

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) es una proteína homohexamérica (Calcagno et al., 1984), su estructura primaria es conocida por la secuencia de nucleótidos del gene *nagB* (Rogers et al., 1988). Las estructuras cristalográficas de la enzima resueltas a nivel atómico para las formas T y R presentan un arreglo hexamérico definido como un dímero de trímeros con un eje cristalográfico de simetría de orden 3 (figuras 3A y 3B). La estructura presenta un dominio α/β abierto, con siete hebras β en la cavidad central rodeadas por ocho hélices α .

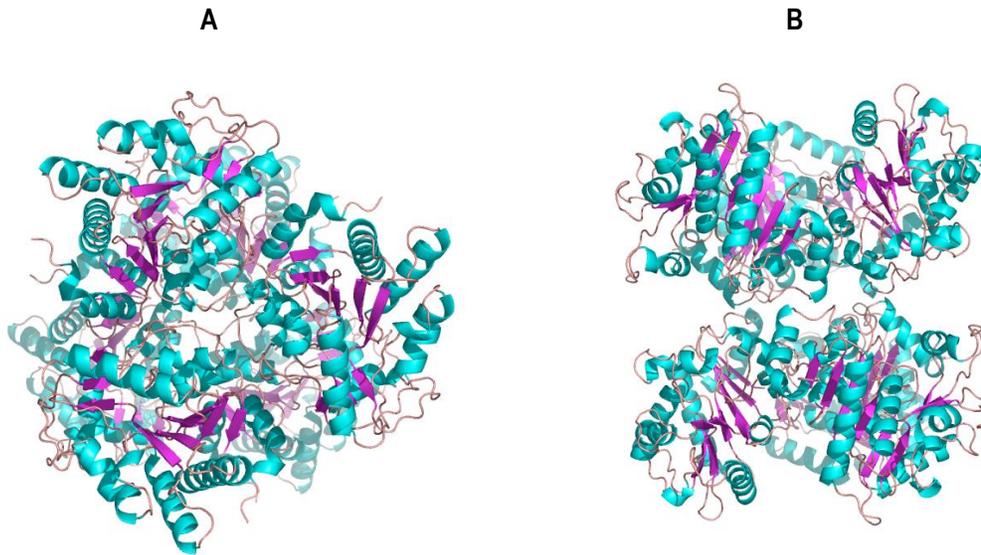


Figura 3. En A se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* observándose desde el eje de simetría de orden tres, en B se muestra un hexámero en vista lateral mostrando un arreglo de dímero de trímeros (Bustos-Jaimes, 2005).

Esta enzima presenta dos estados cuaternarios, T y R elucidados cristalográficamente (figura 4). La transición entre ambos estados se desencadena por la unión de ligandos, tanto del sitio activo como del sitio alostérico de la enzima; ésta se activa alostéricamente por *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P), que es el ligando del sitio activo (figura 5) (Calcagno et al., 1984, Altamirano et al., 1995, Montero et al., 1998).

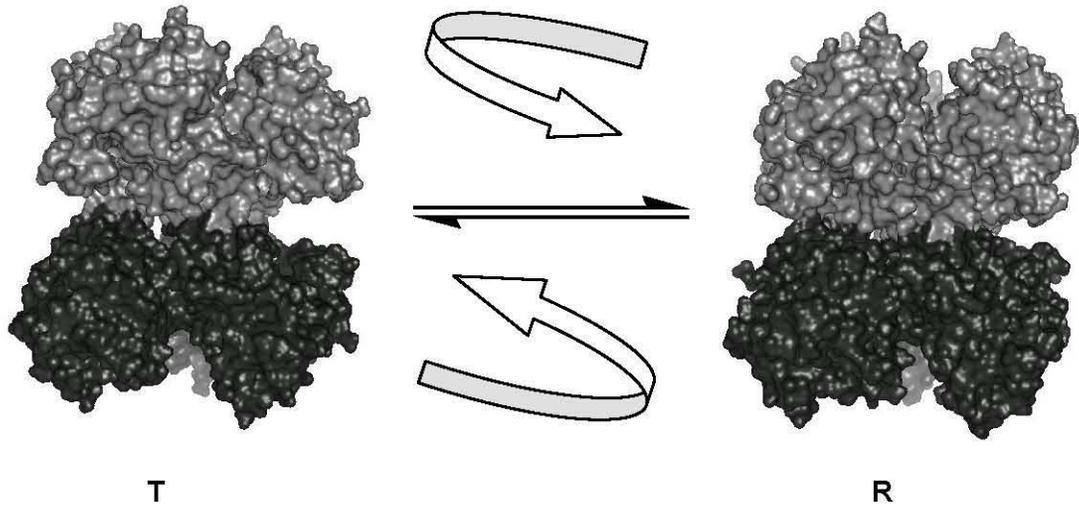


Figura 4. Modelo de la representación superficial de la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* en los confómeros T (izquierda) y R (derecha). Los dos trímeros de la estructura hexamérica están indicados con color gris y negro, las flechas indican la rotación entre los dos trímeros (13.1°) durante la transición alostérica según las diferencias estructurales observadas de los datos cristalográficos. El marcaje sitio específico se realizó alrededor de la interfase entre los dos trímeros. Los modelos se hicieron con los archivos del banco de datos estructurales de proteínas (PDB) 1fs6 (confómero T) y 1frz (confómero R) con el programa PYMOL (22) por el Dr. González Andrade Martín.

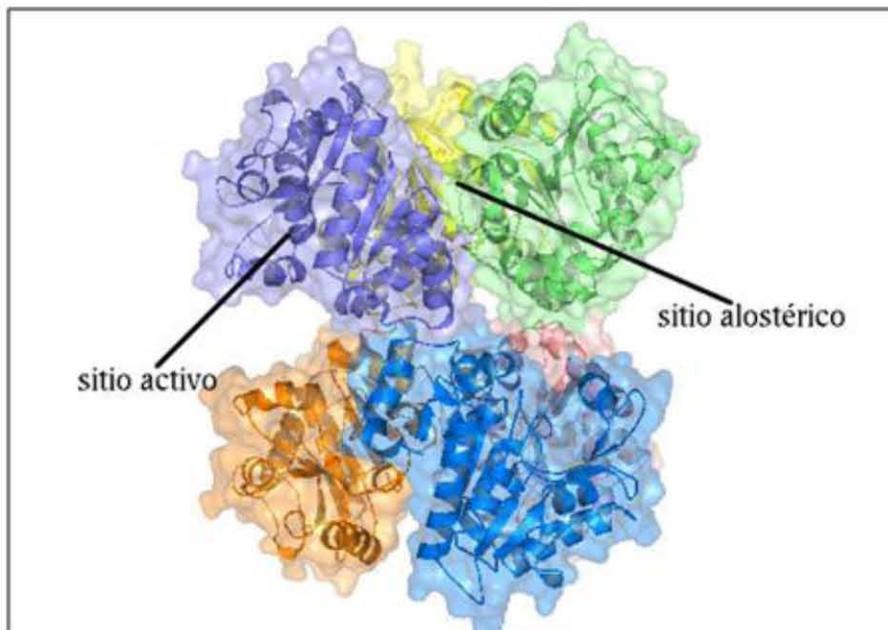


Figura 5. Vista lateral del hexámero de la enzima silvestre glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Se indican su sitio activo y su sitio alostérico.

Sus propiedades alostéricas y sus constantes cinéticas se describen satisfactoriamente por el modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC), (Monod et al., 1965, Calcagno et al., 1984). A concentraciones saturantes de activador la GlcN6P desaminasa tiene una cinética de saturación tipo hiperbólica. También cuenta con un ligando del sitio activo, éste es un inhibidor competitivo, el 2-amino-2-desoxi-glucitol-6-fosfato (GlcN-ol-6P). La GlcN6P desaminasa se comporta como un sistema típico K, en donde el activador alostérico se une al conformero R (figura 4) (Calcagno et al., 1984, Altamirano et al., 1995). El estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa utilizando el marcaje sitio específico de sondas fluorescentes podrá proporcionar información detallada sobre cómo se transmite la transición alostérica en solución.

El mecanismo químico de la reacción catalizada por la glucosamina-6-fosfato desaminasa lo describió inicialmente Midelford y Rose (Midelford y Rose, 1977), y lo analizaron en términos estructurales Oliva y col. (Oliva et al., 1995), Montero (Montero, 2001), utilizando herramientas de mutagénesis dirigida y modificaciones químicas.

1.8 Relación estructura-función para el diseño de proteínas

El entendimiento de la relación estructura-función en proteínas es un prerrequisito para pruebas en ingeniería de proteínas y el diseño racional de fármacos. Este proceso comienza con la identificación de los residuos funcionalmente importantes en proteínas y la definición de las interacciones que ellos realizan con otras moléculas. La sustitución de residuos de aminoácidos individuales en proteínas por mutagénesis sitio dirigida es una herramienta para analizar el papel funcional de residuos específicos, y hay una variedad de estrategias de mutagénesis que pueden ser aplicadas al análisis estructura-función de proteínas. La mayoría de la información es generada cuando hay una base estructural para la selección de los residuos mutados; sin embargo, esta aproximación está limitada a las proteínas cuya estructura terciaria se haya resuelto por técnicas biofísicas. El análisis funcional por mutagénesis puede proceder en la ausencia de información estructural, con la incertidumbre de que los efectos de mutar un residuo funcional genuino no pueden ser distinguidos de los efectos de la disrupción no específica de la conformación de la proteína. Los residuos pueden ser seleccionados por mutación en la base de la secuencia homóloga o previa evidencia bioquímica. Alternativamente, las técnicas de escaneo al azar pueden ser utilizadas para identificar las regiones funcionalmente importantes las cuales pueden ser subsecuentemente analizadas más intensivamente. Las interacciones moleculares hechas por estos residuos funcionales pueden ser probadas por varias técnicas de ingeniería de proteínas (Cleland y Craik, 1996).

1.8.1 La identificación de residuos funcionalmente importantes en proteínas

El uso de mutagénesis sitio dirigida para introducir sustituciones de un aminoácido específico en proteínas y demostrar una concomitante pérdida de función es una poderosa herramienta en la identificación de los residuos funcionalmente importantes. Similarmente, la mutagénesis sitio dirigida puede ser usada para probar el mecanismo de acción de residuos cuya importancia funcional ya se haya establecido en previos análisis estructurales o bioquímicos. En este caso, la identificación de residuos funcionalmente importantes da la base para entender la naturaleza de las interacciones proteína-proteína y el mecanismo de catálisis enzimática (Cleland y Craik, 1996).

Esencialmente, es posible construir tres tipos de mutaciones: a) la inserción de uno o más residuos de aminoácidos, b) la eliminación de residuos de aminoácidos y c) el reemplazamiento o sustitución de un residuo con otro (Cleland y Craik, 1996).

1.8.2 Mutación de residuos identificados de información estructural

Los residuos de aminoácidos que pueden formar enlaces de hidrógeno, pares de iones o interacciones hidrofóbicas con el ligando, pueden ser identificados en base a su distancia y orientación con respecto al aceptor de grupos en el ligando. La sustitución de tales residuos por mutagénesis dirigida puede confirmar la participación de los residuos identificados en unión y permitir la contribución energética de interacciones individuales a la energía de unión del complejo para ser estimado. Tales estudios contribuyen a la comprensión de las bases para especificidad y catálisis enzimática (Cleland y Craik, 1996).

El conocimiento de la estructura terciaria de la proteína puede ser también de mucha ayuda en el diseño de la estrategia de mutagénesis. Por ejemplo, en lugar de usar la estructura para identificar un residuo específico por mutagénesis, la estructura podría ser utilizada para identificar los residuos más expuestos sobre la superficie de la proteína para determinar el acceso al solvente de cada residuo. Los residuos más expuestos al solvente podrían ser buenos candidatos para mutagénesis para mapear los residuos implicados en la unión del ligando porque estos residuos son viables para interacciones moleculares. Además, los residuos que se localizan en la superficie son más tolerantes a la variación de la secuencia y así la sustitución de estos residuos es menos probable para causar disrupciones estructurales no específicas. El conocimiento de la estructura también puede ser utilizada para estimar si una mutación específica tiene el potencial para ser estructuralmente disruptiva (Cleland y Craik, 1996).

1.8.3 ¿Qué residuos deberían ser sustituidos?, ¿qué residuos deberían de ser introducidos?

El gran número de aminoácidos dentro de una proteína complica el análisis de la función de dicha proteína a través de mutagénesis dirigida. Es imposible reemplazar cada residuo de una proteína por alguno de los 19 aminoácidos restantes y estudiar el resultado de cada una de las variantes. Dada la información de la estructura tridimensional, la selección de la sustitución no es usualmente difícil (Hogue, 1998).

Una pérdida de función de una proteína mutante, sugiere que el residuo alterado fue importante para alguna actividad y merece un estudio más a fondo. Pero si la sustitución no genera un cambio significativo en la función de la proteína mutante, el residuo original probablemente no es crítico para la actividad de la proteína silvestre. La mayoría de los residuos cae dentro de esta categoría. Se está más interesado en residuos que son funcionalmente importantes. Su reemplazo causará un cambio medible en la estructura o función de la proteína. Tales cambios no indican que el residuo estaba directamente involucrado en una interacción funcional importante, porque las alteraciones pueden disminuir la actividad disminuyendo la expresión de la proteína o previniendo el propio plegamiento (Hogue, 1998).

1.9 Ingeniería de proteínas: una herramienta en el estudio estructural y funcional de las enzimas

A partir de la década de los 80's, la ingeniería de proteínas surgió como una herramienta para el estudio y comprensión en la relación estructura-función de las proteínas. Deriva de la conjunción de varias disciplinas tales como: genética molecular, biología, bioquímica, computación y cristalografía, que combinan sus conocimientos en un propósito común: la obtención de nuevas moléculas de proteínas por modificación de las ya existentes en la naturaleza. En su nivel más avanzado, esto se denomina diseño de proteínas. El diseño de proteínas tiene dos aspectos, el diseño de la estructura y el de la función. En general, el diseño y la construcción de nuevas proteínas se logran a través de la manipulación de sus genes. Las investigaciones sobre modelos de enzimas aportan mucha información para la interpretación de sus mecanismos catalíticos. Es posible, por ejemplo, analizar de una manera completamente nueva las interacciones proteína-ligando y la estabilidad de las proteínas, disecando la participación individual de los aminoácidos y su contribución a la función, y su importancia estructural (Montero, 1995).

En la actualidad es posible introducir mutaciones en posiciones precisas en los genes usando técnicas *in vitro*, adelantándose a los mecanismos naturales de evolución y acelerando y gobernando el proceso (Montero, 1995).

Esta herramienta constituye una estrategia fundamental de los bioquímicos en el estudio de la estructura y actividad de las proteínas así como el diseño de *novos* de proteínas, ya que incluye la

construcción, el análisis y el uso de proteínas modificadas, lo que puede incluir cambios en la especificidad de los sustratos de una enzima o incrementar la estabilidad de la proteína para usos industriales (Montero, 1995).

La metodología ideal para confirmar en una proteína, el papel de un residuo en particular previamente identificado por otros métodos (químicos, genéticos, predicción, cristalográficos) ya sea en la estructura o en la función es la mutagénesis dirigida, que se realiza mediante la técnica conocida como mutagénesis por oligonucleótido, desarrollada inicialmente por Hutchinson y colaboradores, en la que un oligonucleótido sintético se emplea como mutágeno altamente específico (esquema 3). Con esta técnica se tiene la posibilidad de introducir, cambiar o quitar un aminoácido deseado dentro de la secuencia de una proteína, una vez que el gen ha sido clonado y secuenciado, representa una gran oportunidad para estudiar y comprobar los mecanismos moleculares propuestos (Montero, 1995).

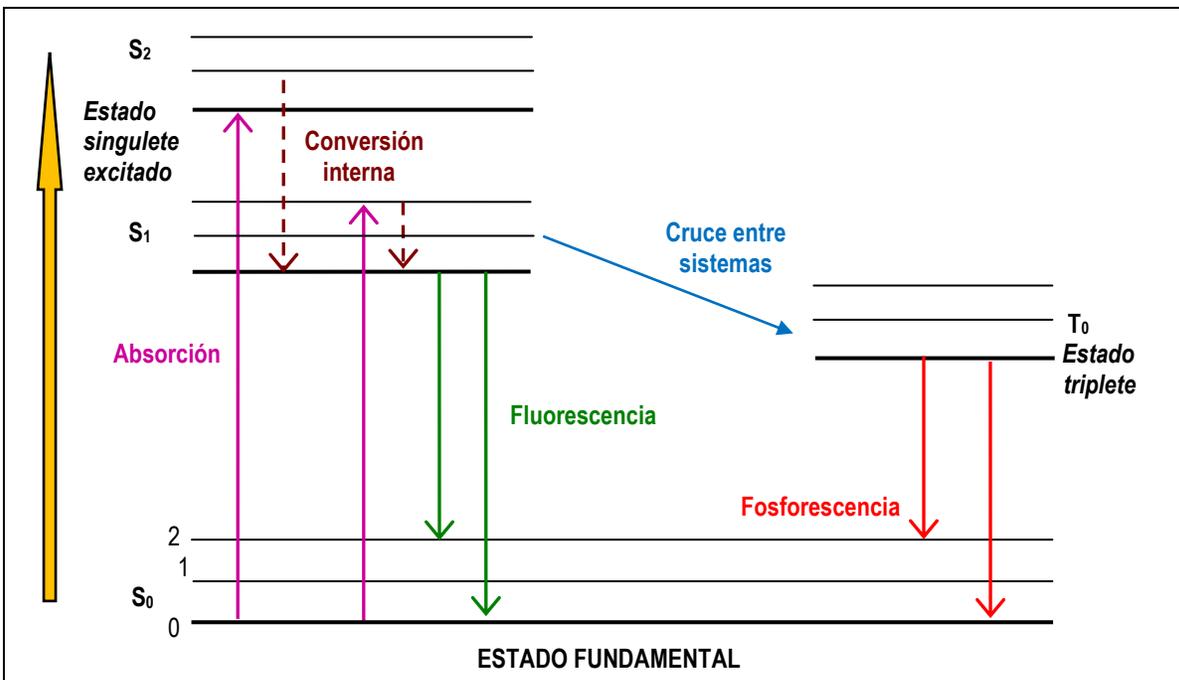
Una de las más excitantes aplicaciones de la manipulación de genes se encuentra en el campo de la ingeniería de proteínas. Esto implica alterar la estructura de proteínas *vía* alteraciones de la secuencia del gen, y ha sido posible debido a la técnica de mutagénesis *in vitro*. El efecto deseado puede ser la alteración de la actividad catalítica de una enzima por modificación de residuos alrededor del sitio activo, un mejoramiento en el estado nutricional de una proteína almacenada o un mejoramiento en la estabilidad de una proteína usada en la industria o en la medicina (Montero, 1995).

1.10 Espectroscopia de fluorescencia

Luminiscencia es el término aplicado a la reemisión de radiación que ha sido absorbida previamente. En la *fotoluminiscencia molecular*, los fotones de radiación son absorbidos por moléculas, elevándolas a algún estado de excitación para que al regresar a su estado basal, emitan radiación, es decir, se convierten en luminiscentes. La *fotoluminiscencia* se divide en *fluorescencia* y *fosforescencia*, dependiendo de la naturaleza del estado excitado (Lakowicz, 2004, Willard, 1991).

La fluorescencia se diferencia de la fosforescencia en que las transiciones electrónicas responsables de la fluorescencia no conllevan un cambio en el espín del electrón. Las velocidades de emisión de fluorescencia están generalmente en 10^8 s^{-1} , por lo que un típico tiempo de vida de fluorescencia está cerca de 10 nanosegundos (ns) igual a $10 \times 10^{-9} \text{ s}$. Como consecuencia, la fluorescencia presenta una vida corta, cesando la luminiscencia casi inmediatamente. En la mayoría de los casos, la *emisión* fotoluminiscente es de mayor longitud de onda que la radiación utilizada para su *excitación* (Lakowicz, 2004, Skoog, 2001).

Los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de luz son ilustrados generalmente con un *diagrama de Jabłoński* (esquema 3) (Lakowicz, 2004).



Esquema 3. Una forma de un diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2004).

La línea gruesa horizontal que se encuentra en la parte inferior de la figura, representa la *energía del estado fundamental de la molécula* (S_0), que normalmente es un estado *singulete*. A temperatura ambiente, este estado representa prácticamente la energía de todas las moléculas en una disolución (Lakowicz, 2004, Skoog, 2001).

Las líneas gruesas superiores son los niveles de energía de los *estados vibracionales fundamentales* de los tres estados electrónicos excitados. Las dos líneas finas horizontales situadas en la parte izquierda superior representan los estados electrónicos *singulete primero* (S_1) y *singulete segundo* (S_2). En cada uno de estos niveles electrónicos de energía los fluoróforos pueden existir en numerosos niveles de energía vibracionales, representados por 0, 1, 2, 3, etc (Lakowicz, 2004, Skoog, 2001).

Las transiciones entre los estados son representadas con las líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la *absorción* de luz. Las transiciones ocurren cerca de 10^{-15} s (Lakowicz, 2004).

La línea de la derecha (T_0) representa la energía del primer estado electrónico *triplete*. Normalmente la energía del primer estado triplete excitado es menor que la energía del correspondiente singulete (Lakowicz, 2004; Skoog, 2001).

Desde el punto de vista analítico, la espectroscopia de fluorescencia es ideal para estudiar la estructura, función, ambiente local y la dinámica de proteínas. Desafortunadamente, de manera frecuente, moléculas no fluorescentes están presentes en la región de interés. La mutagénesis sitio dirigida combinada con la modificación química específica ha resuelto este problema, permitiendo la introducción de una sonda

fluorescente a través de modificación química en una región definida de la estructura que la proteína plegada tolere, obteniendo información local que permite determinar cambios conformacionales en las proteínas e inferir propiedades de las mismas (González, 2005).

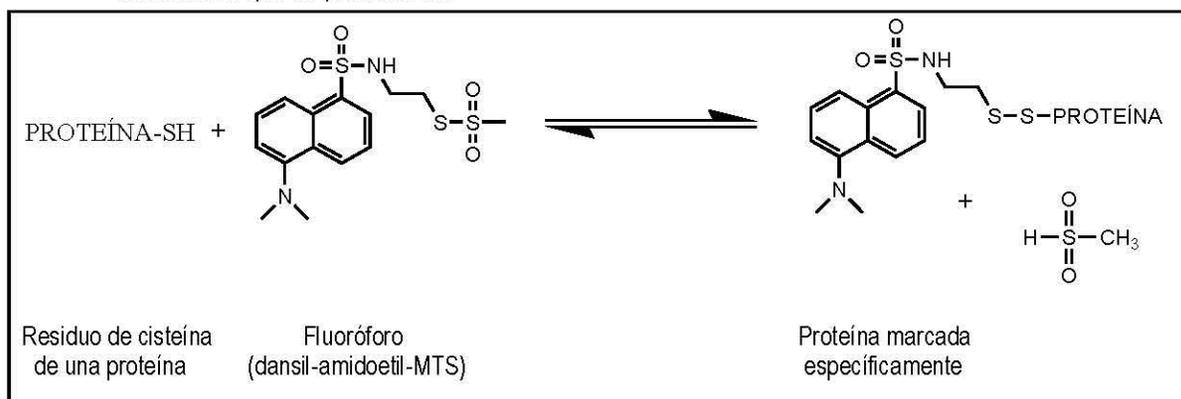
Los requerimientos básicos para que este sistema de marcaje de sitios específicos funcione óptimamente son que las zonas donde se muten las cisteínas se encuentren expuestas y accesibles para que sean altamente reactivas, además de que la mutación no sea crítica en su microambiente (contactos entre los aminoácidos a su alrededor); sin embargo, si existen cisteínas en zonas internas de la proteína, éstas no interfieren en la modificación química y si son muy importantes en términos de estabilidad de la misma. La glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* mantiene sus propiedades cinéticas después de la mutación de tres de sus cuatro cisteínas nativas y de la modificación química por lo que es posible medir los cambios conformacionales que se llevan a cabo con la adición de sus ligandos (activador e inhibidor) con técnicas fluorescentes. Los datos fluorescentes en general nos proporcionan una gran información de lo que está ocurriendo en la posición específica a medir, de manera general se puede describir una forma característica de los espectros (González, 2003).

1.11 Introducción de sondas fluorescentes

Los fluoróforos son sustancias fluorescentes que se clasifican en intrínsecos y extrínsecos. Los *fluoróforos intrínsecos* son aquellos que se encuentran de manera natural en la molécula, estos incluyen aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina), Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), flavinas y derivados de piridoxal y clorofila. Los *fluoróforos extrínsecos* son aquellos que son agregados a la molécula de interés cuando ésta no es fluorescente, o cuando su fluorescencia intrínseca no es adecuada para el experimento deseado, ejemplos: fluoresceína, rodamina y otras numerosas sustancias (Lakowicz, 2004).

La empresa Toronto Research Chemical Inc., comercializa 15 diferentes sondas fluorescentes con derivados de los grupos dansilo, cumarina, rodamina, etc., unidas a un grupo tiosulfonato. Estos derivados presentan en su estructura un grupo tiosulfonato por lo que son específicos y altamente reactivos a los grupos sulfhidrilo de las cisteínas con respecto a los demás grupos funcionales de los aminoácidos. Por lo que la introducción de un residuo de cisteína con técnicas de biología molecular o bien usando a las cisteínas presentes en la proteína hace posible introducir estas sondas de manera selectiva (Bergström et al., 1999).

La reacción que se produce es:



Esquema 4. Reacción del fluoróforo dansil-amidoetil-MTS con un residuo de cisteína de una proteína, para obtener una proteína marcada específicamente.

Si el grupo SH de un residuo de cisteína de una proteína está expuesto al disolvente, es tremendamente reactivo con la sonda fluorescente que termina unida covalentemente a la proteína (Bergström et al., 1999).

La ventaja experimental de incorporar fluoróforos extrínsecos a la proteína como el dansil-amidoetil-metanotiosulfonato (dansil-amidoetil-MTS), es que comparándolo con los fluoróforos intrínsecos, éste posee una mayor sensibilidad debido a su gran rendimiento cuántico (Φ), además de que su longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 341$ nm) no interfiere con los fluoróforos intrínsecos de la proteína, por lo que la señal producida será exclusiva del fluoróforo extrínseco como de su posición en la proteína. El dansil-amidoetil-MTS es muy sensible a los cambios de polaridad del medio, lo que hace que sea ideal para el estudio de los cambios conformacionales que presenta la proteína, midiendo principalmente en regiones donde se exponen u ocultan de manera considerable de un conformero a otro como la posición 164 y la 206 de la glucosamina-6-fostato desaminasa. Este fluoróforo posee una longitud máxima de absorción (λ_{abs}) a 341 nm y dos longitudes de emisión (λ_{emi}) una a 498 nm y otra a 532 nm excitando a una longitud de onda (λ_{exc}) de 341 nm. Además, es más estable unido a la proteína que cuando está libre, con esto se asegura de que en efecto se encuentra unido a los residuos de cisteínas (Hubell et al., 2000).

La combinación de técnicas de mutagénesis sitio dirigida y marcaje químico (con reactivos fluorescentes) son necesarias para llevar a cabo el marcaje sitio específico de proteínas. Para ello, se realiza un diseño de las zonas a ser modificadas químicamente a partir de un análisis estructural detallado porque se requiere la introducción de residuos de cisteínas en las zonas elegidas que no perturben al sistema original. El propósito es monitorear sistemáticamente regiones específicas de una proteína, siguiendo los cambios conformacionales asociados a la unión de diferentes ligandos en solución, para establecer así correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de las sondas fluorescentes y los cambios conformacionales que presentan las proteínas.

2. OBJETIVO

General

- Combinar las técnicas de mutagénesis sitio dirigida, marcaje sitio específico con fluoróforos y espectroscopia de fluorescencia para poder monitorear los cambios conformacionales que se llevan a cabo durante la transición alostérica de la glucosamina 6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) de *Escherichia coli*, cuando ésta interactúa con el ligando de su sitio activo: 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-fosfato (GlcN-ol-6P) o con el ligando de su sitio alostérico: N-acetil-D-glucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P).

Particular

- Realizar un marcaje sitio específico con el fluoróforo dansil-amidoetil-MTS en las mutantes C118/C228S/C239S/H164C y C118/C228S/C239S/S206C de glucosamina-6-fosfato desaminasa para monitorear los cambios conformacionales en solución por la emisión de fluorescencia del grupo dansil unido al residuo 164 ó al residuo 206, titulando con el ligando del sitio activo o con el ligando del sitio alostérico.

3. HIPÓTESIS

La flexibilidad conformacional en proteínas tiene un papel fundamental en los procesos catalíticos de las enzimas, en particular en las de tipo alostérico, como es el caso de la glucosamina-6-fosfato desaminasa, por lo tanto, al introducirle señales fluorescentes sitio específicas (dansil-amidoetil-MTS) se podrá revelar información sobre la transición alostérica en solución, cuando es inducida del sitio activo o del sitio alostérico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Se utilizaron reactivos grado analítico de la marca Sigma-Aldrich y agua desionizada. El marcador fluorescente dansil-amidoetil metano-tiosulfonato (dansil-amidoetil-MTS) se obtuvo de la compañía Toronto Chemical Research (Toronto, Canada).

Síntesis de la matriz de afinidad. La matriz de afinidad de *N*-6-amino-*n*-hexanoil-D-glucosamina-6-fosfato agarosa se preparó por la unión de GlcN6P con agarosa-ácido 6-amino-*n*-hexanoico (2 µeq de grupos aminohexanoato por mL de gel), de acuerdo a Calcagno et al (1984). A la suspensión de agarosa en agua desionizada, se le agregó GlcN6P (forma ácida) con una concentración final de 0.1 M y el pH se ajustó a 4.5 con NaOH, con un potenciómetro de la marca Brinnkmann. La reacción se realizó a temperatura ambiente adicionando 0.2 mM de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodimida hidrociorada por cada mL de suspensión, agitándolo suavemente por 12 horas. El gel se lavó con amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.25 y NaCl 0.1 M.

Síntesis de GlcNAc6P. La *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P) se sintetizó a partir de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P), de acuerdo a los trabajos de Rogers y col (1988). Se pesaron 2 gramos de ésta y se resuspendieron en 18 mL de agua desionizada, se le adicionaron 400 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) manteniendo la reacción en frío, agitada y a un pH entre 6 y 7, posteriormente se le adicionaron 640 µL de anhídrido acético (CH₃CO)₂O, controlando el pH entre 6 y 7 con hidróxido de potasio (KOH) 1 N con un potenciómetro de la marca Brinnkmann, hasta estabilizarlo, se dejó reaccionar durante 12 horas aproximadamente, después se acidificó y se pasó por la columna Dowex 50WX4-200 la cual se eluyó con agua desionizada, la elución se siguió colorimétricamente con el siguiente procedimiento: se colocaron 100 µL de una solución de borato de potasio (realizada a partir de ácido bórico e hidróxido de potasio) y 2.5 µL de las fracciones recolectadas se calentaron a punto de ebullición por 3 minutos, se dejaron enfriar y se les agregó 1 mL de una solución que contiene 1 % p/v paradimetilamino benzaldehído, 1 % v/v de ácido clorhídrico 12 M en ácido acético, se agitó y se incubó a 37 °C por 15 minutos, los tubos positivos que contenían la GlcNAc6P desarrollan un color morado el cual es medido a una longitud de onda (λ) de 544 nm, posteriormente se eliminó el exceso de ácido acético con ayuda de una liofilizadora y se resuspendió con agua desionizada en una cantidad proporcional al volumen obtenido, se neutralizó con KOH 10 N a un pH de 7.7 y por último se liofilizó.

Síntesis de GlcN-ol-6P. El 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-P (GlcN-ol-6P) se sintetizó a partir de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P), sal de sodio y borohidruro de sodio (NaBH₄) como agente reductor, de acuerdo a Rogers y col (1988). Se disolvieron 250 mg de D-glucosamina-6-fosfato en 10 mL de agua desionizada y se le agregaron 75 mg de NaBH₄ de forma lenta durante 2 horas manteniendo la reacción en frío, agitando y en un intervalo de pH de 8 a 9 (con ácido acético 1 N), manteniéndose durante aproximadamente 15 horas a temperatura ambiente o en frío, se ajustó el pH a 3 con ácido acético 6 N y con ácido clorhídrico 10 N al final, después de que se ajustó se pasó por una columna de Dowex 50 eluyendo con agua desionizada la elución es seguida por actividad enzimática, las fracciones que contienen el GlcN-ol-6P son neutralizadas con hidróxido de sodio (NaOH) 19 N hasta un pH final de 7.5 y por último se liofilizó con una liofilizadora y centrifuga de vacío del tipo Speed Vac., Savant SC10.

4.2 Cepa bacteriana

La cepa de la bacteria *Escherichia coli* empleada para la expresión de proteína fue IBPC590, obsequiada por la Dra. Jacqueline Plumbridge del Instituto de Biología Físicoquímica de París, Francia. Esta cepa fue derivada de la JM101, en donde se eliminó el gene *nagB* (gene de la glucosamina-6-fosfato desaminasa) por inserción de un cassette de resistencia a la kanamicina (Altamirano et al., 1991). Otra característica importante es que esta cepa presenta un genotipo Δlac (gene lac, genera la proteína inhibidora que se une a la región promotora) por lo que la expresión de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* es constitutiva.

Para los ensayos de mutagénesis sitio dirigida, transformación bacteriana y purificación de ADN (ácido desoxirribonucleico) así como la secuenciación del ADN se utilizaron las cepas de *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, California, EUA) y JM101, respectivamente.

4.7 Plásmidos

Se utilizó el vector pTZ18R en donde se insertó un fragmento de ADN que contiene una copia del gene *nag B* (descrito en el inciso anterior). El fragmento se subclonó por digestión con EcoR I e Hindi III a partir del plásmido descrito por Altamirano et al. (1991). Con este plásmido se llevó a cabo la mutagénesis sitio dirigida por reacción en cadena de polimerasas (PCR) utilizando oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el método comercial de "QuickChange" de la compañía Stratagene (California, EUA). En este método se utilizó un par de oligonucleótidos mutagénicos para sintetizar copias del vector de expresión (conteniendo la mutante), y se utilizó la cepa de *E. coli*. XL1 - Blue para transformar el ADN mutagénico obtenido por PCR. Previo a la transformación se digirió el producto de PCR con la enzima Dpn I que reconoce ADN metilado.

4.14 Mutagénesis

La mutagénesis sitio dirigida para el cambio de tres cisteínas por serinas se realizó por sucesivas mutagénesis individuales a partir del plásmido silvestre en el siguiente orden: C118S, C228S y C239S. Las mutantes con una única cisteína reactiva se construyeron a partir del plásmido que contiene la triple mutante C118S/C228S/C239S. La mutagénesis sitio dirigida se realizó con el Quick Change Kit (Stratagene, La Jolla, CA. EUA) usando la enzima Pfu polimerasa; siguiendo las especificaciones del vendedor. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: la cantidad de plásmido pTZ18R *nagB* fue de 50 ng y la de los oligonucleótidos fue de 125 ng. Se hicieron los siguientes ciclos:

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

El orden de las mutagénesis individuales sucesivas a partir del plásmido silvestre fueron:

Orden	Mutante	Oligonucleótidos utilizados
1	C118S	5'-GAC GCC GAG AGC CGC CAG TAT-3' y 5'-ATA CTG GCG GCT CTC GGC GTC-3'
2	C118S/C228S	5'-ACC ATC AGC AGT CTG CAA CTG C-3' y 5'-G CAG TTG CAG ACT GCT GAT GGT-3'
3	C118S/C228S/C239S	5'-ATC ATG GTG AGC GAT GAA CCT TC-3' y 5'-GA AGG TTC ATC GCT CAC CAT GAT-3'
4	C118S/C228S/C239S/H164C	5'-TAT CAA AAC CCT GAC TTG CGA CAC TC-3' y 5'-AGT GTC GCA AGT CAG GGT TTT GAT AC-3'
5	C118S/C228S/C239S/S206C	5'-CGC TGG GTT GCC AGA AAG CAC-3' y 5'-GTG CTT TCT GGC AAC CCA GC-3'

Después de los experimentos de mutagénesis, el producto de amplificación de la PCR se digirió con la enzima Dpn I y se usó para transformar células competentes tipo XL1-Blue, siguiendo las indicaciones del vendedor. Las mutaciones deseadas se confirmaron por la secuenciación del vector con un Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

El vector que lleva la enzima mutante se utilizó para la transformación de una cepa de *E. coli* IBPC590 por electroporación utilizando el electroporador *gen pulser II* (BIORAD). La muestra se sometió a un pulso eléctrico de 2.5 KV, con una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 W. Estas condiciones generan un campo eléctrico de 12.5 KVcm⁻¹ que duran aproximadamente 4 microsegundos. Para permitir la expresión del gene de resistencia se incubó durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se sembró en placas de agar que contienen ampicilina a una concentración final de 50 μ g mL⁻¹.

4.15 Expresión de la enzima silvestre y las mutantes

Se inocularon tubos de 10 mL de medio Luria-Bertani (LB, anexo 7.1) conteniendo ampicilina (50 μ g mL⁻¹) y se incubaron a 37 °C en una agitadora orbital a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 12 horas. Posteriormente se utilizó este cultivo para inocular matraces erlenmeyer con 200 mL del mismo medio y se cultivó en las mismas condiciones durante 4 horas. Este cultivo se utilizó para inocular matraces erlenmeyer de 2 L conteniendo 1 L del mismo medio (LB) y se cultivó a 30 °C durante 8 horas a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica mayor a 1, a una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro de la marca DU 7500 de la marca Beckman Coulter.

4.16 Purificación de la enzima silvestre y las mutantes

Las células se centrifugaron a 25,000 g durante 10 minutos a 4 °C y se lavaron con 250 mL de KCl 0.15 M en frío y se centrifugaron en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante. El precipitado celular se lavó y resuspendió en un amortiguador Tris 50 mM, pH 7.5, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM a 4 °C, las células se rompieron por sonicación a 4 °C, utilizando un sonicador (Ultrasonic Homogenizer) con pulsos de 20 segundos con una amplitud de 40% a intervalos de descanso de 2.5 minutos (para evitar calentamiento que podría implicar desnaturalización de proteínas). La muestra se centrifugó a 27,000 g (4 °C) durante 45 minutos para eliminar restos celulares en una centrifuga Beckman Avanti J-251 rotor Beckman JA 25.50. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] hasta obtener una solución saturada del 40 % (p/v); nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones anteriores excepto que fue durante 30 minutos, se eliminó el precipitado que no contenía la enzima de interés. Posteriormente se

saturó el sobrenadante al 55 % con sulfato de amonio (p/v) para precipitar la glucosamina 6-fosfato desaminasa, la cual se centrifugó bajo las mismas condiciones.

El siguiente paso de purificación se llevó a cabo a través de un método de cromatografía de afinidad, es decir, se hace pasar la proteína por una columna de cromatografía, la cual contiene un material (agarosa-ácido 6-amino-*n*-hexanoico) que tiene unidas moléculas de GlcN6P (D-glucosamina-6-fosfato) por el grupo amino, de manera que se asemejan al activador alostérico (GlcNAc6P ligando del sitio alostérico) y esto hace que la glucosamina-6-fosfato desaminasa se una al ligando inmovilizándola de manera específica. Las proteínas que no interactúan con el ligando se eluyen con el amortiguador Tris 50 mM, pH 7.5. La GlcN6P desaminasa es eluída, separándola de la matriz por la adición del activador alostérico (GlcNAc6P) a una concentración de 10 mM, las fracciones que presentan actividad se recolectaron y se dializaron con un amortiguador de Tris 50 mM, pH 7.5 durante 12 horas y se conservaron a 4 °C por una semana, o bien se conservan en 50 % de glicerol (v/v) a -20 °C por un mayor tiempo.

La purificación de la enzima silvestre y de la triple mutante se siguió y verificó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % bajo condiciones desnaturalizantes (anexo, 7.2 y 7.3).

4.17 Concentración de proteína

La concentración de la enzima silvestre y de las diferentes mutantes (antes de ser modificadas químicamente) se calculó utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Cary 400 Varian, Australia, a partir de la absorbancia de la GlcN6P desaminasa silvestre que es de 279 nm en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, usando su absorptividad molar conocida, $\epsilon_{280} = 20.20 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Calcagno et al., 1984, Altamirano et al., 1995). Los datos de concentración empleados se refieren siempre a la proteína en su forma hexámerica. La concentración de las mutantes modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS se determinó por el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), utilizando a la enzima silvestre como estándar.

4.18 Ensayos enzimáticos

La determinación de la actividad en velocidades iniciales (V_0) de la enzima GlcN6P desaminasa se realizó en la dirección de la formación de fructosa 6-fosfato (Fru6P) en una mezcla de reacción de 200 μL que contenía amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 25 mM, con concentraciones variables de activador y de sustrato, a tiempos fijos mediante un método colorimétrico. La reacción se inició por la adición de la enzima y la mezcla se incubó a 30 °C. La reacción se interrumpió a los 10 minutos mediante la adición de 2 mL de HCl 10 M. La concentración de fructosa se determinó adicionando 0.5 mL de resorcinol e incubando

por 10 minutos a 70 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se tomaron las lecturas correspondientes a 512 nm comparadas con una curva patrón de Fru6P; método de resorcinol (Midelfort et al., 1976).

Los datos cinéticos se analizaron utilizando una regresión no lineal con el programa Origin 7 (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). Los datos que se obtuvieron sin activador se ajustaron a la ecuación de Hill, los que se obtuvieron con activador con la ecuación de Michaelis-Menten y cuando se reunieron todas las gráficas con la ecuación de Monod-Wyman-Changeux (Monod et al., 1965, Montero, 2001) y con la ecuación de un modelo alostérico: Modelo de Ajuste de Groel, que contempla la presencia de dos tipos de unión en la proteína alostérica (Yifrach & Horovitz, 1998).

Ecuación de Hill:

$$y = V_{max} \frac{x^n}{K^n + x^n}$$

Donde:

y = velocidad inicial (V_0)

V_{max} = velocidad máxima

x = concentración inicial de sustrato

K = constante de Hill

n = coeficiente de Hill

Ecuación de Michaelis-Menten:

$$y = V_{max} \frac{x}{K_m + x}$$

Donde:

y = velocidad inicial (V_0)

V_{max} = velocidad máxima

x = concentración inicial de sustrato

K_m = constante de Michaelis

Ecuación de Monod-Wyman-Changeux (MWC):

$$v_0 = \frac{k_{cat} n E_t L c \alpha 1 + c \alpha^{n-1} + \alpha 1 + \alpha^{n-1}}{L 1 + c \alpha^n + 1 + c \alpha^n}$$

Donde:

α = concentración de sustrato normalizada [$\text{GlcN6P}/k_m^R$]

L = relación entre los dos confórmers T/R

c = relación de la constante de disociación para los estados R y T
(k_R/k_T)

E_t = concentración total de la proteína

Modelo de Ajuste de Groel:

$$v_0 = \frac{V_{\max 1} + V_{\max 2} \frac{S}{K_1} + V_{\max 3} \frac{S}{K_1} \frac{S}{K_2}}{1 + \frac{S}{K_1} + \frac{S}{K_1} + \frac{S}{K_2}}$$

Donde:

$V_{\max 1}$, $V_{\max 2}$ y $V_{\max 3}$ = velocidades iniciales máximas

S = concentración del sustrato

K_1 y K_2 = constantes de disociación aparentes

n y m = coeficientes de Hill

4.9 Modificaciones químicas con dansil-amidoetil-MTS en las cisteínas reactivas de la GlcN6P desaminasa

La modificación química de las mutantes de la GlcN6P desaminasa en las posiciones 164 y 206 se realizaron con un exceso molar de 10 veces del fluoróforo, disuelto en una solución acuosa al 20 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO), con una concentración final del solvente orgánico mayor al 5 % (v/v), para evitar la desnaturalización de la proteína. Después de realizar la modificación química, las muestras se incubaron en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 4 °C por 12 horas protegidas de la luz. La concentración de proteína usada varió entre 5 y 10 mg/mL. Previamente al marcaje, las muestras de proteína fueron reducidas con ditioneitol (DTT) 1 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, por una hora a 4 °C, seguido de una filtración en una columna HR-100 (Pharmacia, Biotech), para eliminar el exceso de DTT. Después de la modificación química, el exceso del marcador se eliminó realizando una serie de lavados (concentración y dilución de la proteína) en filtros Amicon Ultra-4 con un corte de 10 kDa de la compañía MILLIPORE, hasta alcanzar un factor de dilución de 10, 000 veces para completar la remoción del exceso del marcador. La eficiencia del marcaje se determinó por la reactividad de los grupos tioles de las cisteínas de la proteína al cromogénico 5-5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico (DTNB), que forma el 2-nitrobenzoato (TNB) al reaccionar, el cual es cuantificado por su absorptividad molar $\epsilon_M = 14250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a una longitud de onda (λ) de 409 nm, temperatura de 25 °C y un pH de 7.4 (Eyer et al., 2003).

4.10 Determinaciones por fluorescencia en estado estacionario

La fluorescencia en estado estacionario se determinó en un espectrofluorómetro ISS PCI (ISS Inc., Champine, IL USA), bajo las siguientes condiciones experimentales: temperatura de 30 °C, concentración final de enzima de 1 µM en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. La longitud de excitación (λ_{exc}) para la sonda fluorescente dansil-amidoetil-MTS fue de 341 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia en los experimentos de titulaciones con los ligandos de la GlcN6P desaminasa (GlcNAc6P y GlcN-ol-6P) se colectaron en los intervalos de 450 a 500 nm, con un paso de luz de 0.5 nm. Las rejillas de paso de luz para la excitación y la emisión fueron de 4 y 8 nm respectivamente. La proteína modificada con dansil-amidoetil-MTS requirió aproximadamente de 20 minutos para estabilizarse en la emisión de fluorescencia basal antes de la adición de los ligandos. Los datos se procesaron con el programa Origin 7 a partir de archivos en formato tipo ASCII obtenidos directamente del espectrofluorómetro.

4.11 Determinación de la dependencia de la polaridad relativa del disolvente con las propiedades fluorescentes del dansil-amidoetil-MTS-cisteína

La relación de las curvas para los fluoróforos unidos a cisteína con la polaridad relativa del disolvente se obtuvo haciendo reaccionar al dansil-amidoetil-MTS (30 µM) con L-cisteína (150 µM) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 y posteriormente midiendo los espectros de emisión fluorescente en mezclas de agua/dioxano, en un intervalo de 0 a 100 % (v/v), a 30 °C. La concentración final de los fluoróforos unidos a cisteína fue de 1 µM.

4.12 Rendimiento cuántico (ϕ)

El rendimiento cuántico del dansil-amidoetil-MTS tanto en forma libre como unido a la proteína, así como también el de los fluoróforos intrínsecos de la enzima silvestre, se determinó utilizando la siguiente relación (Chen, 1965):

$$\phi_x = \phi_{est} \frac{F_x DO_{est}}{F_{est} DO_x}$$

Donde:

ϕ = rendimiento cuántico

x = solución problema

est = solución estándar

F = intensidad de fluorescencia relativa

DO = densidad óptica a la longitud de excitación (λ_{exc})

Como estándar se usó sulfato de quinina, el cual tiene un rendimiento cuántico (ϕ) de 0.55 en H₂SO₄ 1 N. Los espectros de emisión de fluorescencia del fluoróforo se colectaron a diferentes intervalos; para el sulfato de quinina fue de 370 nm a 700 nm (excitando a una λ de 360 nm), para la enzima silvestre fue de 305 nm a 450 nm (con una λ_{exc} de 295 nm), para las enzimas modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS fue de 350 nm a 700 nm (con una λ_{exc} de 341 nm). La fluorescencia del amortiguador fue sustraída de cada muestra antes de determinar el rendimiento cuántico en todos los casos.

4.13 Modelaje y visualización molecular de los conformeros T y R de la GlcN6P desaminasa

Las estructuras cristalográficas y los modelos estructurales generados fueron visualizados con el programa PYMOL (DeLano, 2004). El análisis teórico de los efectos de la introducción de los triptófanos en la posición 164 ó 206 (mutaciones “in silico”) se realizó con el programa PYMOL buscando el rotámero del triptófano con menor energía a partir de la librería de rotámeros del mismo programa. Los archivos de PDB de los conformeros T y R fueron 1fs6 y 1frz, respectivamente. Después de reemplazar los triptófanos dentro de los archivos de PDB de cada conformero, se les realizó una minimización molecular con el programa CHARMM Beta Release Versión 28b1 (Mainhart et al., 1984, Patel et al., 2004), en una computadora con sistema operativo Linux-2.4.20-8 (i686), con un CPU Athlon a 1.5 GHz, 2.0 GB de RAM, utilizando el método ABNR (adopted basis Newton-Raphson) y 500 pasos de minimización. Los cálculos del área superficial accesible al solvente (ASA) se realizaron a partir de los archivos PDB correspondientes a los conformeros T y R, con el programa NACCESS, el cual usa el algoritmo de Richard (Hubbard et al., 1992), considerando un radio estándar del solvente de 1.4 Å.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento cinético de la glucosamina-6-fosfato desaminasa silvestre

La determinación de la actividad cinética de la enzima se realizó en condiciones de velocidades iniciales (V_0), en donde no más del 10 % del sustrato se transformó en producto. Para la reacción de desaminación, la glucosamina 6-fosfato desaminasa silvestre de *Escherichia coli* presenta un comportamiento cinético tipo K, su gráfica de velocidad a diferentes concentraciones de sustrato (GlcN6P) y en ausencia de activador alostérico (GlcNAc6P) adquirió una forma sigmoidea que indicó cooperatividad y un comportamiento homotrópico positivo con respecto al sustrato; sin embargo, al adicionarle el activador (1 mM) la gráfica adquirió una forma hiperbólica rectangular, que indicó un comportamiento heterotrópico positivo con respecto al activador alostérico (figura 6).

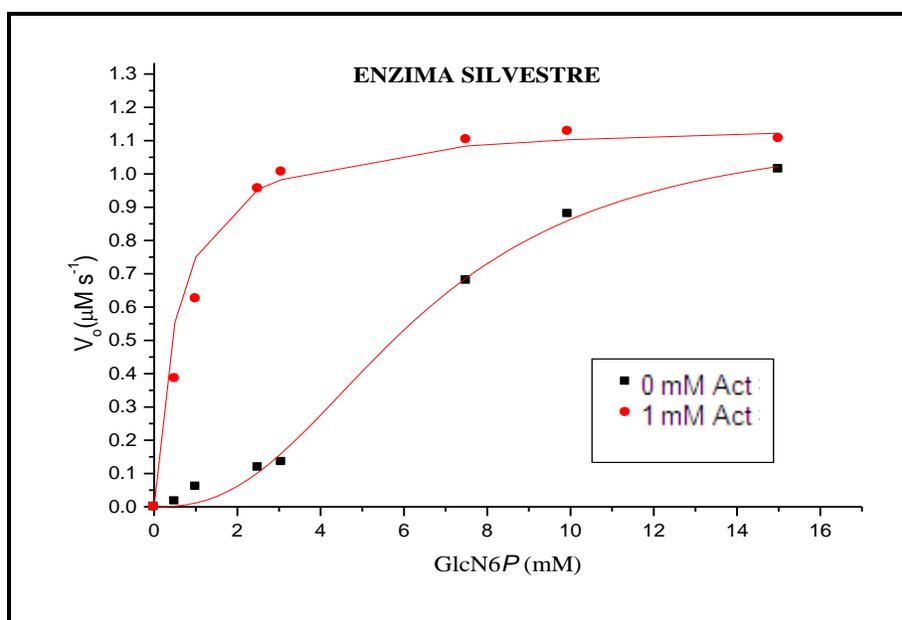


Figura 6. Comportamiento cinético de la glucosamina-6-fosfato desaminasa silvestre.

El efecto cooperativo se explica de la siguiente manera: la enzima presenta dos conformémeros, uno T (de baja afinidad por el sustrato) y uno R (de alta afinidad por el sustrato), la adición de concentraciones crecientes del sustrato lleva a la forma R, lo que quiere decir que existe una diferente afinidad por el sustrato entre los dos conformémeros y dependiendo de la fracción de la población entre T y R, se observa el comportamiento sigmoideal de actividad en ausencia del activador alostérico. Estos datos se ajustan a la ecuación de Hill (Materiales y Métodos, sección 4.8). En cambio, cuando se determinó la actividad de la

enzima silvestre bajo las mismas condiciones y adicionando además al activador GlcNAc6P (ligando del sitio alostérico) la enzima pasó a su forma R y por ello presentó un comportamiento hiperbólico que es ajustable a la ecuación de Michaelis-Menten (Materiales y Métodos, sección 4.8).

5.2 Comportamiento cinético de la triple mutante C118S/C228S/C239S

La GlcN6P desaminasa silvestre tiene cuatro residuos de cisteínas por monómero (118, 228, 219 y 239), dos de las cuales (118 y 239) son altamente reactivas a compuestos de tipo 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico (DTNB) en el conformero T, esto significa que son sensibles al ataque nucleofílico en su grupo sulfhidrilo, mientras que en el conformero R, la reactividad para los tioles está completamente protegida (Altamirano et al., 1992), por lo que para llevar a cabo el marcaje sitio específico en las posiciones 164 y 206 y eliminar la reactividad no deseada de los grupos tiol durante el marcaje fluorescente con dansil-amidoetil-MTS, se reemplazaron los residuos de cisteínas 118, 228 y 239 por serinas C118S/C228S/C239S (de acuerdo a Altamirano et al., 1992, esto no modifica la activación alostérica tipo K de la enzima). En cuanto al residuo de cisteína 219, ésta no es reactiva porque estudios cristalográficos revelan que se localiza en la parte interna de la enzima formando un enlace disulfuro (Oliva et al., 1995). Finalmente se obtuvo la triple mutante C118S/C228S/C239S que no fue reactiva al DTNB en estado nativo.

La determinación de la actividad cinética de la triple mutante también se realizó en condiciones de velocidades iniciales, en donde no más del 10 % del sustrato se transformó en producto. Para la reacción de desaminación, la triple mutante también presentó un comportamiento cinético tipo K, su gráfica de velocidad a diferentes concentraciones de sustrato (GlcN6P) y en ausencia de activador alostérico (GlcNAc6P) adquirió una forma sigmoidea que indicó cooperatividad y un comportamiento homotrópico positivo con respecto al sustrato; sin embargo, al adicionarle el activador (1 mM) la gráfica adquirió una forma hiperbólica rectangular, que indicó un comportamiento heterotrópico positivo con respecto al activador alostérico (figura 7).

La tabla 1 contiene los parámetros cinéticos de la enzima GlcN6P desaminasa silvestre y de la triple mutante (C118S/C228S/C239S). La triple mutante es activa y muestra un comportamiento cinético similar al de la enzima silvestre para la reacción de desaminación. La $K_{0.5}$ para el sustrato disminuye a concentraciones altas de activador alostérico, de la misma forma que en la enzima silvestre. Sin embargo, la k_{cat} disminuyó de 153 s^{-1} (enzima silvestre) a 96 s^{-1} (triple mutante), es decir disminuyó en un 37 % y mantuvo el 63 % de la enzima silvestre; los parámetros L y c del modelo MWC (Monod, Wyman y Changeux) fueron similares a los de la enzima silvestre.

En conclusión, las propiedades cinéticas de la enzima triple mutante se mantienen similares a las de la enzima silvestre, por lo que se le considera como un adecuado sistema de inicio para realizar el marcaje sitio específico.

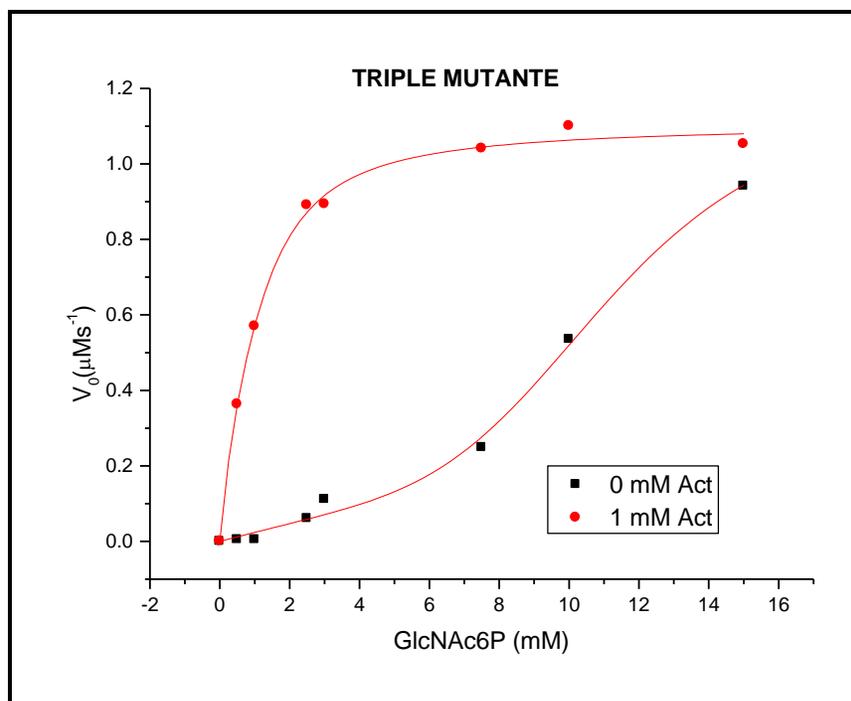


Figura 7. Comportamiento cinético de la triple mutante (C118S, C228S, C239S).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*; enzima silvestre y triple mutante C118S/C228S/C239S.

	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_M (mM) ^b	$K_{0.5 \text{ GlcN6P}}$ (mM) ^c	k_{cat} / K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	L^d (x 10 ⁶)	c^e
GlcN6P desaminasa silvestre	153 ± 0.08	0.5 ± 0.04	5.2 ± 0.04	3.06 x 10 ⁵	1.0 ± 0.04	0.02 ± 0.002
GlcN6P desaminasa triple mutante	96 ± 0.06	0.46 ± 0.07	5.1 ± 0.06	2.08 x 10 ⁵	0.8 ± 0.05	0.022 ± 0.005

^aParámetros estimados a partir del ajuste con el modelo MWC (Monod et al., 1965) por regresión no lineal. ^bParámetros estimados a partir del ajuste con la ecuación de Michaelis-Menten en concentraciones saturantes del activador alostérico. ^cParámetros estimados a partir del ajuste con la ecuación de Hill en ausencia del activador alostérico. ^{d,e}Parámetros estimados a partir del ajuste con la ecuación de MWC en ausencia del activador alostérico.

5.3 Comportamiento cinético de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* modificada químicamente en las posiciones 164 y 206 con dansil-amidoetil-MTS

Para obtener un sistema con cisteínas reactivas en una posición específica se construyeron por mutagénesis sitio dirigida mutantes con cisteínas reactivas en las posiciones 164 y 206 a partir de la triple mutante C118S/C228S/C239S, obteniéndose las mutantes H164C/C118S/C228S/C239S y S206C/C118S/C228S/C239S, nombradas H164C-GlcN6P desaminasa y S206C-GlcN6P desaminasa, respectivamente. Estas mutantes se modificaron químicamente con el fluoróforo dansil-amidoetil-MTS, por lo que se nombraron dansil-H164C y dansil-S206C, respectivamente (figura 8). La eficiencia del marcaje de estas enzimas mutantes fue del 98 %, determinado por la reactividad residual frente al DTNB (Materiales y Métodos, sección 4.9). Las mutantes modificadas químicamente con el fluoróforo no mostraron cambios en cuanto a su activación alostérica de tipo K, como en la enzima silvestre, sólo la k_{cat} se redujo aproximadamente en un 27 % con respecto a la enzima de inicio (triple mutante). No obstante, se obtuvieron activaciones homotrópica y heterotrópica positiva con comportamiento tipo K en ambos casos (tabla 2 y figura 9). Los datos cinéticos ajustados al modelo de MWC indicaron lo siguiente:

- a) La k_{cat} de ambas mutantes modificadas químicamente fue prácticamente la misma, sus valores estuvieron alrededor de 70 s^{-1} . Comparando estas k_{cat} 's con la k_{cat} de la enzima silvestre, éstas disminuyeron en un 64 % y comparándolas con la k_{cat} de la triple mutante C118S/C228S/C239S, éstas disminuyeron en un 27 %.
- b) La k_M (presencia de activador alostérico) de ambas mutantes continúa manteniéndose alrededor de 0.5 mM al igual que en la enzima silvestre y en la triple mutante C118S/C228S/C239S.
- c) La $k_{0.5}$ (ausencia de activador alostérico) en ambas mutantes continúa manteniéndose alrededor de 5.1 mM al igual que en la enzima silvestre y en la triple mutante C118S/C228S/C239S.
- d) La relación k_{cat}/k_M fue de $1.38 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la dansil-H164C y de $1.44 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la dansil-S206C, por lo que en ambas prácticamente no cambió este valor, pero si disminuyeron aproximadamente en un 53 % con respecto al de la enzima silvestre y aproximadamente en un 30 % con respecto al de la triple mutante C118S/C228S/C239S.
- e) El parámetro L que denota la relación de los dos cónfómeros varió de 0.8×10^6 a 0.9×10^6 , valores que fueron muy similares al de la enzima silvestre (1×10^6) y al de la triple mutante C118S/C228S/C239S (0.8×10^6).
- f) El parámetro c que denota la relación de las constantes de disociación para los estados T y R (K_R/K_T) se encuentra entre 0.02 y 0.03, esto indicó que el equilibrio entre los cónfómeros T y R se encuentra desplazado hacia el cónfómero T en ausencia de ligandos como en la enzima silvestre

($c = 0.02$). Por lo tanto, el ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P) y el ligando del sitio activo (inhibidor competitivo: GlcN-ol-6P) fueron utilizados para inducir la transición alostérica. El ligando del sitio activo fue utilizado en lugar del sustrato, ya que de acuerdo a los datos cinéticos y evidencias cristalográficas, éste induce la transición alostérica de T a R (Oliva, 1995, Horjales, 1999).

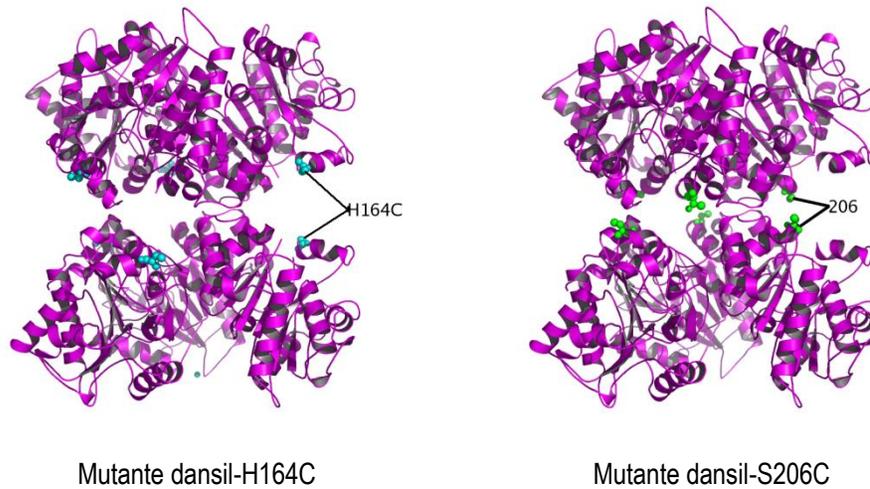


Figura 8. Mutante dansil-H164C (se indica la posición en color azul) y la mutante dansil-S206C (se indica la posición en color verde).

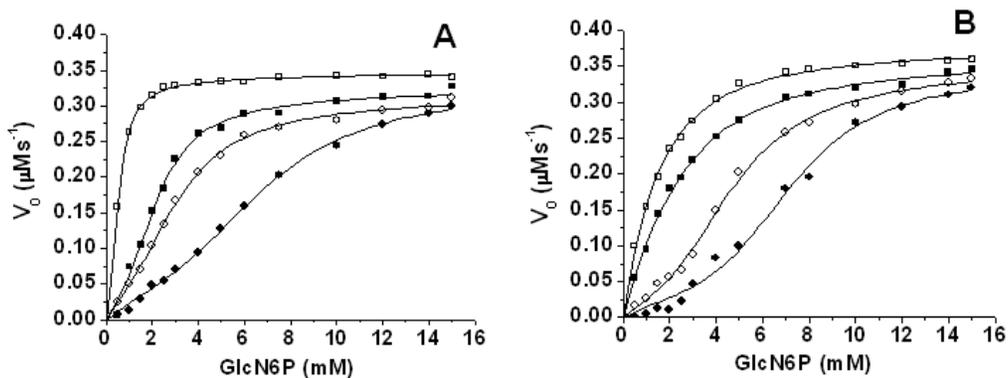


Figura 9. Curvas de saturación con sustrato para la reacción de desaminación de las mutantes dansil-H164C (A) y dansil-S206C (B) a diferentes concentraciones del activador alostérico (GlcNAc6P) 0 mM (●), 0.05 mM (○), 0.5 mM (■) y 1 mM (□). Las velocidades iniciales (V_0) se expresaron en μM de fructosa producida por segundo y por molécula de enzima (hexámero), medidas a 30°C en 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5. Las curvas corresponden al ajuste de los datos utilizando el modelo de MWC.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las mutantes H164C y S206C modificadas químicamente con el fluoróforo dansil-amidoetil-MTS.

	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_M (mM) ^b	$K_{0.5 \text{ GlcN6P}}$ (mM) ^c	k_{cat} / K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	L^d	c^e
GlcN6P desaminasa Silvestre	153 ± 0.08	0.5 ± 0.04	5.2 ± 0.04	3.06 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶	0.02 ± 0.002
Dansil-H164C	70.6 ± 0.11	0.51 ± 0.021	5.2 ± 0.023	1.38 x 10 ⁵	0.8 x 10 ⁶	0.020 ± 0.002
Dansil-S206C	70.9 ± 0.11	0.49 ± 0.023	5.1 ± 0.043	1.44 x 10 ⁵	0.9 x 10 ⁶	0.033 ± 0.002

^aParámetros cinéticos a partir del ajuste con el modelo MWC (Monod et al., 1965) por regresión no lineal.

^bParámetros cinéticos a partir del ajuste con la ecuación de Michaelis-Menten en concentraciones saturantes de activador alostérico. ^cParámetros cinéticos a partir del ajuste con la ecuación de Hill en ausencia del activador alostérico.

^{d,e}Parámetros cinéticos a partir del ajuste con la ecuación de MWC en ausencia del activador alostérico.

5.4 Propiedades espectrales del fluoróforo dansil-amidoetil-MTS unido a cisteína

Las propiedades espectroscópicas del dansil-amidoetil-MTS unido a la cisteína se analizaron con respecto a la polaridad relativa del disolvente (ϵ). Para este fluoróforo no existe en la literatura una caracterización espectroscópica, por lo que se realizó su caracterización. El dansil-amidoetil-MTS posee una longitud máxima de absorción (λ_{max}) a 341 nm y dos longitudes máximas de emisión (λ_{emi}), la primera a 498 nm y la segunda a 532 nm excitando a una longitud (λ) de 341 nm. Para estudiar el cambio que muestran los espectros de emisión en fluorescencia con respecto a la polaridad del disolvente (figuras 10A y 10B), se hicieron mezclas de agua y dioxano, la constante dieléctrica (ϵ) del agua es de $\epsilon = 79.5$ y la del dioxano es de $\epsilon = 2.2$. Los espectros de fluorescencia del dansil-amidoetil-MTS unido a cisteína mostraron dos λ_{max} en el espectro de emisión de fluorescencia: una λ_{max1} que cambió de ~ 490 nm a 505 nm y la otra, λ_{max2} que cambió de ~ 530 nm a 560 nm ($\lambda_{exc} = 341$ nm) cuando la polaridad del disolvente se incrementó. Para el primer máximo (λ_{max1}) se observaron dos intervalos lineales, mientras que para el segundo máximo (λ_{max2}) se observó sólo una correlación lineal (figura 10A). Así mismo, la relación entre la intensidad de fluorescencia (IF) y la polaridad del disolvente (ϵ) también presenta dos zonas lineales para la λ_{max1} y una para la λ_{max2} (figura 10B). Por lo que, el fluoróforo dansil-amidoetil-MTS es un excelente marcador para correlacionar la polaridad del disolvente con los cambios en los espectros de fluorescencia.

Para el dansil-amidoetil-MTS-cisteína, las relaciones lineales fueron ajustadas por regresión lineal:

$$\lambda_{max1} = 0.185 (\text{nm} / \epsilon) X + 494.2 \text{ nm}$$

Para una ϵ con valores de ~ 2 a 56, con una $r^2 = 0.998$.

$$\lambda_{\max 2} = 0.419 \text{ (nm/ } \epsilon) X + 527 \text{ nm}$$

Para una ϵ con valores de ~ 2 a 80 , con una $r^2 = 0.991$.

Y las relaciones de intensidad de fluorescencia con la constante dieléctrica fueron:

$$\text{IF } (\lambda_{\max 1}) = -0.233 \text{ (U.A./}\epsilon) X + 15.74 \text{ U.A.}$$

Para una ϵ entre ~ 25 y 56 , con una $r^2 = 0.992$.

$$\text{IF } (\lambda_{\max 2}) = -0.236 \text{ (U.A./}\epsilon) X + 13.61 \text{ U.A.}$$

Para una ϵ entre ~ 2 y 56 , con una $r^2 = 0.994$.

Una de las razones por las que se utilizó esta sonda fluorescente, es la gran sensibilidad que posee debido a su alto rendimiento cuántico (Φ) en comparación con él de los fluoróforos intrínsecos de las proteínas (tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento cuántico (Φ) del dansil-amidoetil-MTS, solo y unido a cisteína o a la proteína.

Compuesto	Φ
Quinina ^a	0.55
Dansil-amidoetil-MTS	0.0451 ¹ / 0.0254 ²
Dansil-amidoetil-MTS-cisteína	0.0555 ¹ / 0.0412 ²
Dansil-amidoetil-MTS-proteína	0.0936 ¹ / 0.0735 ²
Trp (GlcN6P desaminasa)	0.0007

^aSulfato de quinina, utilizado como estándar.

¹ $\lambda_{\max 1}$ comprendida en el intervalo de 490 nm a 505 nm .

² $\lambda_{\max 2}$ comprendida en el intervalo de 530 nm a 560 nm .

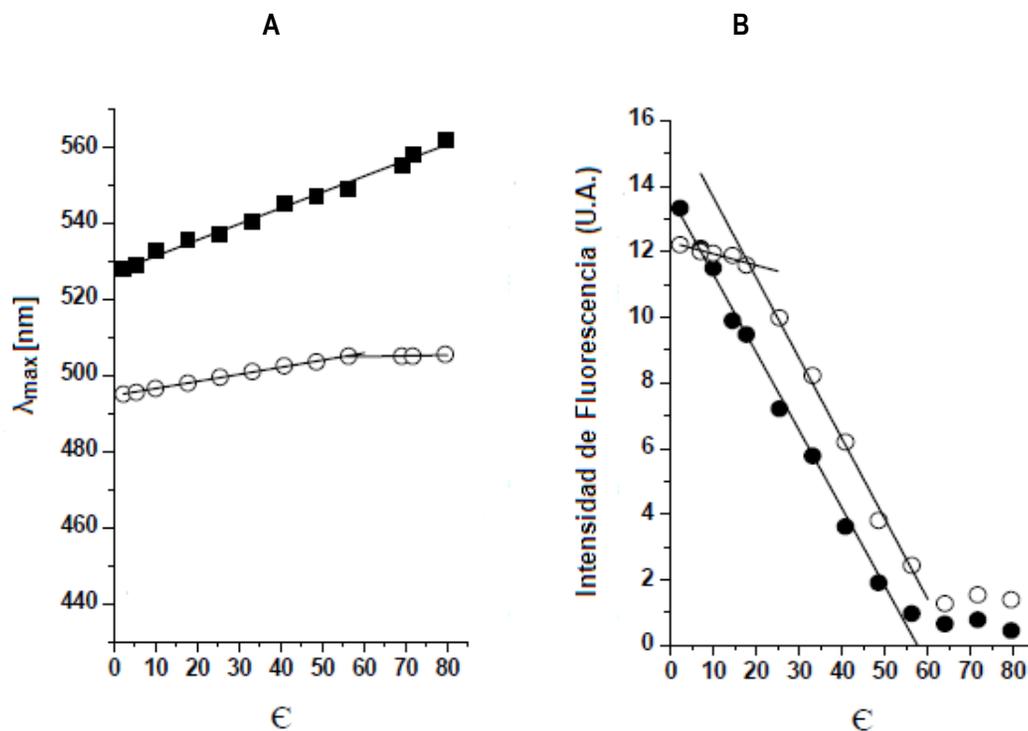


Figura 10. Efectos de la polaridad del solvente en los espectros de emisión de fluorescencia del dansil-amidoetil-MTS-cisteína. Los espectros de emisión de fluorescencia se determinaron a 30 °C en mezclas de agua:dioxano para generar las diferentes polaridades del solvente. A) Relaciones lineales entre las λ_{max} de los espectros de emisión de fluorescencia y la constante dieléctrica del disolvente (ϵ) para dansil-amidoetil-MTS-cisteína (λ_{max1} ○ y λ_{max2} ■). B) Relaciones lineales entre los cambios en la intensidad de fluorescencia de los espectros de emisión y la constante dieléctrica (ϵ) del medio para las longitudes máximas del dansil-amidoetil-MTS-cisteína, λ_{max1} (○) y λ_{max2} (●).

5.5 Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca relacionados al cambio en el microambiente de las posiciones 164 y 206 modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS, al adicionarles los ligandos del sitio activo y del sitio alostérico a concentraciones saturantes

Otra de las ventajas experimentales de la incorporación de fluoróforos extrínsecos a la proteína como el dansil-amidoetil-MTS ($\lambda_{exc} = 341$ nm), además de su alta eficiencia cuántica (Φ), es que se trabaja a una longitud de onda (λ) que no interfiere con los fluoróforos intrínsecos de las proteínas, por lo que la señal producida dependerá exclusivamente del fluoróforo extrínseco y de su posición en la proteína.

Se tituló el dansil-amidoetil-MTS con el activador alostérico (GlcNA6P) hasta 1 mM y con el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) hasta 5 mM, observándose que los ligandos no producen cambios en los espectros de emisión de fluorescencia (datos no mostrados). Por lo tanto, los cambios en los espectros de fluorescencia de los fluoróforos extrínsecos observados al realizar las titulaciones de la enzima modificada químicamente con estos dos ligandos se deben exclusivamente a los cambios conformacionales producidos

por los ligandos. Por lo cual, se pueden relacionar los cambios en el microambiente con los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la mutante dansil-H164C mostraron dos máximos uno a $\lambda_{\max 1} = 493$ nm y otro a $\lambda_{\max 2} = 530$ nm en ausencia de ligandos. Al adicionarle el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) a concentraciones saturantes, las dos λ_{\max} cambiaron, la primera a $\lambda_{\max 1} = 496$ nm y la segunda a $\lambda_{\max 2} = 536$ nm y se presentó un incremento en la intensidad de fluorescencia. Y la adición del ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P) a concentraciones saturantes también cambiaron las dos λ_{\max} , la $\lambda_{\max 1} = 498$ nm y la $\lambda_{\max 2} = 538$ nm e incrementó la intensidad de fluorescencia (tabla 4 y figura 11A).

Por otra parte, los espectros de emisión de fluorescencia de la mutante dansil-S206C mostraron sus dos máximos a $\lambda_{\max 1} = 500$ nm y a $\lambda_{\max 2} = 538$ nm en ausencia de ligandos. Al adicionarle el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) a concentraciones saturantes, las dos λ_{\max} cambiaron, la primera a $\lambda_{\max 1} = 494$ nm y la segunda a $\lambda_{\max 2} = 529$ nm y se presentó un incremento en la intensidad de fluorescencia. Y la adición del ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P) a concentraciones saturantes también cambió las dos λ_{\max} , la $\lambda_{\max 1} = 492$ nm y la $\lambda_{\max 2} = 528$ nm además de observarse también un incremento la intensidad de fluorescencia (tabla 4 y figura 11B).

Por lo tanto, en la posición 164 (mutante dansil-H164C) se detectó un aumento en la polaridad del microambiente y una disminución en la intensidad de fluorescencia, pero en la posición 206 (mutante dansil-S206C) se detectó una disminución de la polaridad del microambiente y un gran incremento en la intensidad de fluorescencia, estos resultados se obtuvieron cuando en ambas posiciones se produce la transición al conformero R con cualquiera de los dos ligandos.

Además, los cambios en las λ_{\max} en los espectros de emisión de fluorescencia producidos por la adición del activador alostérico no fueron modificados por la adición del inhibidor competitivo. Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia producidos por el ligando del sitio activo sí fueron modificados por la adición del activador alostérico a la enzima saturada con el ligando del sitio activo, llegando a los valores que se habían obtenido solamente con la adición del ligando del sitio alostérico. Estos resultados sugieren diferencias en la polaridad del microambiente detectadas por los marcadores fluorescentes en presencia de cada ligando.

Tabla 4. Cambios en las λ_{\max} de los espectros de fluorescencia de la GlcN6P desaminasa modificada químicamente al adicionarles los ligandos del sitio alostérico y del sitio activo a concentraciones saturantes.

	Ausencia de ligandos (nm)	Ligando del sitio alostérico GlcNAc6P 1 mM (nm)	Ligando del sitio activo GlcN-ol-6P 5 mM (nm)
Dansil-H164C	$\lambda_{\max 1} = 493$ $\lambda_{\max 2} = 530$	$\lambda_{\max 1} = 498$ $\lambda_{\max 2} = 538$	$\lambda_{\max 1} = 496$ $\lambda_{\max 2} = 536$
Dansil-H206C	$\lambda_{\max 1} = 500$ $\lambda_{\max 2} = 538$	$\lambda_{\max 1} = 492$ $\lambda_{\max 2} = 528$	$\lambda_{\max 1} = 494$ $\lambda_{\max 2} = 529$

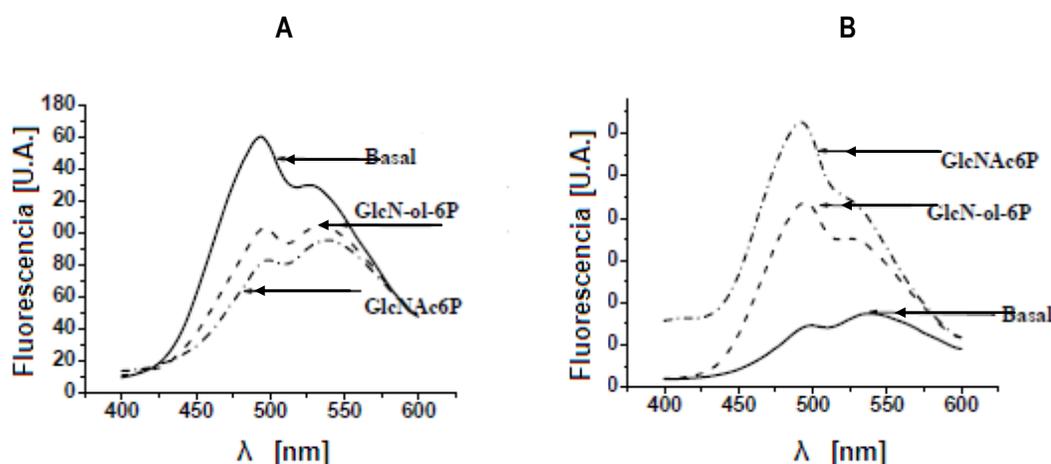


Figura 11. Espectros de emisión fluorescencia en estado estacionario de la GlcN6P desaminasa modificada químicamente con dansil-amidoetil-MTS, en presencia de los ligandos del sitio activo y del sitio alostérico. Los espectros fluorescentes se registraron a 30 °C en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. A) Dansil-H164C y B) Dansil-S206C.

5.6 Correlación de los cambios en la señal de fluorescencia con los cambios conformacionales en la estructura de la GlcN6P desaminasa

El área superficial accesible al disolvente (ASA) se determinó a partir de las estructuras cristalográficas de la enzima, tanto en la conformación T como en la R, construyendo previamente las mutantes “in silico”, substituyendo tanto a la histidina 164 como a la serina 206 por triptófanos. El ASA fue calculada con el programa NACCESS (Hubbard y Thornton, 1993), tomando un radio de esfera del solvente de 1.4 Å. Para la posición 164 el ASA se reduce en 79.5 Å² pasando del confórmero T (191.2 Å²) al confórmero R (111.7 Å²) y para la posición 206 el ASA se reduce en 27.93 Å² a partir del confórmero T (99.85 Å²) al confórmero R (71.92 Å²). La reducción del ASA para ambas posiciones, indica una disminución en la polaridad del microambiente de cada posición (164 y 206), que concuerda con los resultados obtenidos en

fluorescencia, excepto para la posición 164 (mutante dansil-H164C) en donde la polaridad relativa medida por fluorescencia se incrementa con la adición de los ligandos. Este comportamiento contrastante puede explicarse en términos estructurales a nivel atómico, ya que al llevarse a cabo la transición de T a R, se produce una interacción entre la Histidina 164 y la Arginina 253, esta última pasa de una distancia de 15.23 Å (confórmero T) hasta una de 4.22 Å (confórmero R), considerando la distancia entre el carbono beta (CB) del residuo His 164 y el NH₂ de la arginina 253 como referencia (figura 12A), y al darse esta interacción, la Arg 253 puede ser probablemente la responsable de mostrar un apagamiento en la fluorescencia de la sonda a través de un efecto de transferencia de energía resonante (Eisinger, 1969, Lakowicz, 2004) que afecta las propiedades espectroscópicas de la sonda fluorescente en el residuo 164.

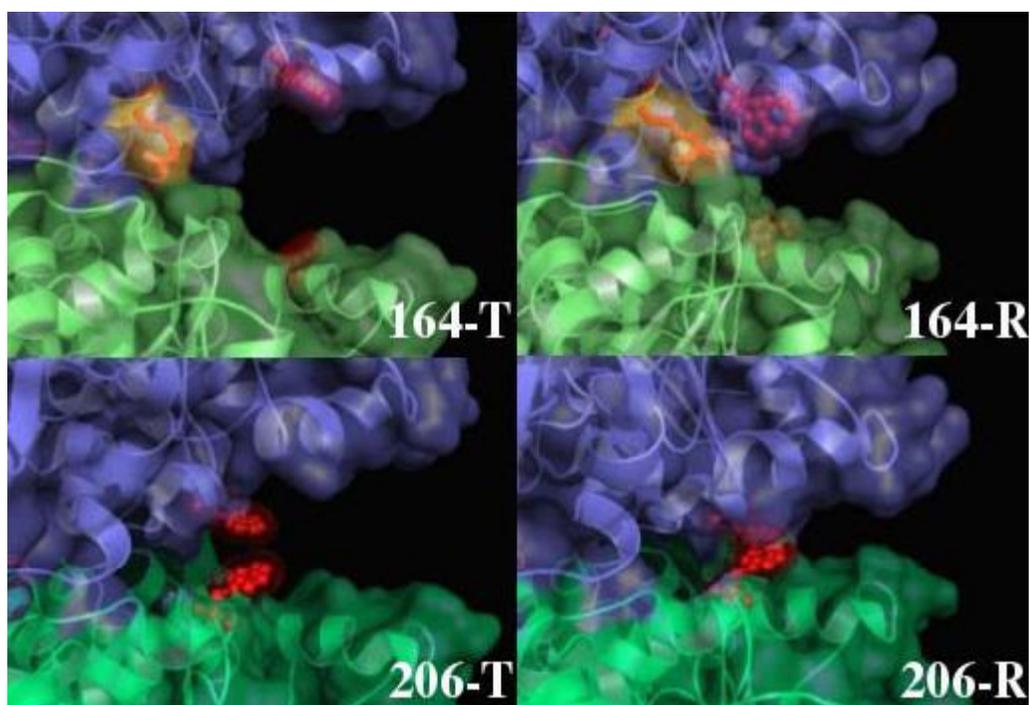


Figura 12. Modelo de la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa en el cual se representan las diferentes interacciones entre los residuos en la interfase de los dos trómeros en los confórmeros T y R. En los paneles superiores, se presenta el residuo 164 en color rosa y el residuo de Arg 253 en color naranja, ambos en el estado T (izquierda) y en el estado R (derecha). En los paneles inferiores, se presenta el residuo 206 en color rojo y el residuo de Arg 253 en color naranja, ambos en el estado T (izquierda) y en el estado R (derecha). Los residuos His164 y Ser 206 fueron mutados “in silico” por residuos de triptófano (Materiales y Métodos, sección 4.13). La figura fue realizada con el programa PYMOL por el Dr. González Andrade Martín.

5.7 Titulación con los ligandos del sitio activo y alostérico, midiendo los cambios de la λ_{\max} de emisión de fluorescencia en las enzimas modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS

La tabla 4 y la figura 13 muestran los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS al ser tituladas con los ligandos del sitio activo y del alostérico. Los cambios de la λ_{\max} (valores absolutos $\Delta\lambda_{\max}$) se utilizaron como parámetros de correlación para la titulación con los ligandos para evitar valores negativos. Para ambas enzimas modificadas químicamente (dansil-H164C y dansil-S206C), los valores de $K_{0.5}$ para el activador alostérico (GlcNAc6P) se encuentran en un intervalo de ~ 198 mM a 0.192 mM (tabla 4 y figura 13), estos valores son semejantes a los reportados anteriormente ($K_{0.5} = 0.180$ mM) para el GlcNAc6P (Montero et al., 2001, Bustos Jaimes et al., 2005). La incorporación de los fluoróforos en la interfase de la proteína podría estar perturbando la transición alostérica, originando una reducción en la afinidad del sitio alostérico por su ligando. La $K_{0.5}$ para GlcN-ol-6P en ambas mutantes modificadas químicamente fue de ~ 0.03 mM (tabla 4), mientras que la $K_{0.5}$ reportada es de 0.001 mM, es decir 30 veces menor. El número de Hill es mayor para el ligando del sitio alostérico ($\sim 2 \mu\text{M}$) con valores de 2.15 (dansil-H164C) y 2.09 (dansil-S206C), mientras que para el ligando del sitio activo ($\sim 1.4 \mu\text{M}$) refleja menor cooperatividad con un valor de 1.3. A pesar de las perturbaciones creadas por la introducción de los fluoróforos, se mantiene una activación alostérica tipo K semejante a la de la enzima silvestre.

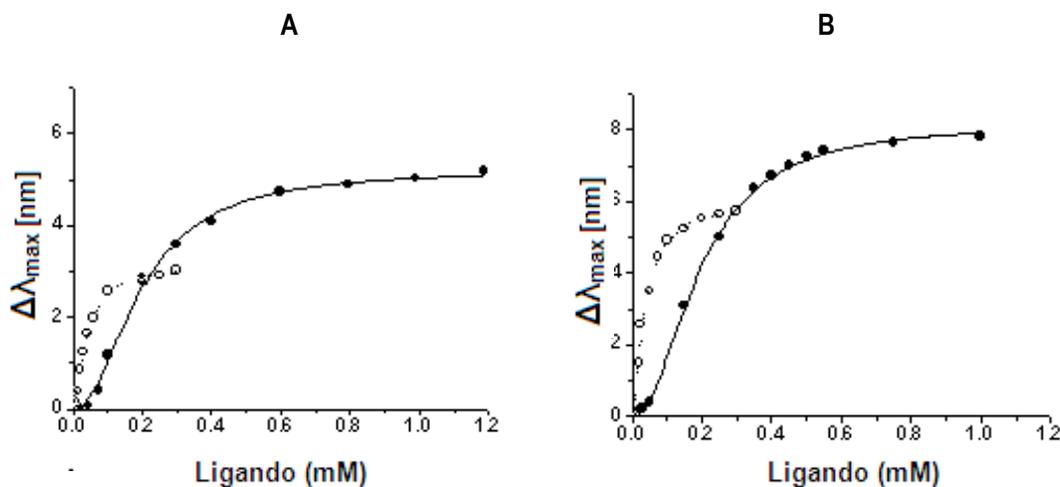


Figura 13. Titulación del sitio alostérico y del sitio activo de las mutantes de la GlcN6P desaminasa modificadas químicamente con dansil-amidoetil-MTS. Las titulaciones se midieron por los cambios (valor absoluto), de la diferencia en los máximos de los espectros de emisión fluorescente ($\Delta\lambda_{\max}$). Las titulaciones se hicieron con el ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P, ●) y con el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P, ○), a 30°C en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. A) Cambios de $\Delta\lambda_{\max}$ en dansil-H164C. B) Cambios de $\Delta\lambda_{\max}$ en dansil-S206C. Las curvas corresponden a los datos ajustados a la ecuación de Hill.

Tabla 4. Titulación de las mutantes de la GlcN6P desaminasa (modificadas químicamente) con los ligandos del sitio alostérico y del sitio activo. Cambios en el valor absoluto de la diferencia de las λ_{\max} de los espectros de emisión de fluorescencia en ausencia y presencia de ligandos ($\Delta\lambda_{\max}$).

	Ligando del sitio alostérico GlcNAc6P			Ligando del sitio activo GlcN-ol-6P		
	$\Delta\lambda_{\max}$ (nm) ^{a,b}	$K_{0.5}$ GlcNAc6P (mM) ^c	Número de Hill (<i>h</i>) ^d	$\Delta\lambda_{\max}$ ^{a,b} (nm)	$K_{0.5}$ GlcNol6P (mM) ^c	Número de Hill (<i>h</i>) ^d
GlcN6P desaminasa silvestre	-	0.180 ± 0.050	2.41 ± 0.05	-	0.001 ± 0.0001	2.40 ± 0.13
Dansil-H164C	5.03	0.198 ± 0.009	2.15 ± 0.12	3.01	0.038 ± 0.004	1.36 ± 0.07
Dansil-S206C	8.30	0.192 ± 0.015	2.09 ± 0.016	6.00	0.035 ± 0.004	1.39 ± 0.014

^aParámetros estimados a partir de la ecuación de Hill ($\lambda_{\max} x^n / (K_d + x^n)$), donde x es la longitud de onda en nm.
^bValores absolutos de las diferencias de λ_{\max} de los espectros de emisión de fluorescencia; de los espectros en ausencia y presencia de los ligandos. ^{c,d}Parámetros estimados utilizando la ecuación de Hill.

Por lo tanto, el proceso que se lleva a cabo durante la transición alostérica, evidenciado por los cambios espectrales (λ_{\max}) de los fluoróforos (posiciones 164 y 206) cuando se indujo el conformero R por el ligando del sitio activo o del sitio alostérico, refleja alteraciones a nivel cuaternario asociados con los rearrreglos en la interfase de los dos trímeros que forman la enzima. Al realizar este tipo de modificación química existen perturbaciones que se reflejaron en la actividad catalítica de la enzima (disminuyó aproximadamente un 50 % con respecto a la enzima silvestre). Sin embargo, la disminución en la actividad catalítica no se debe exclusivamente a la modificación química con los fluoróforos, ya que la introducción de cisteínas reactivas en las posiciones que fueron modificadas y la eliminación de las cisteínas reactivas originales de la enzima resultaron en una disminución aproximada del 33 % de la actividad catalítica de la enzima y, en un menor grado la modificación química con los fluoróforos (tablas 1 y 2). Uno de los criterios para la elección de las posiciones para introducir el fluoróforo, es que estas posiciones se encuentran con una $ASA \geq 40 \text{ \AA}^2$; condición que cumplen ambas posiciones modificadas (164 y 206).

Para la GlcN6P desaminasa, las modificaciones químicas en posiciones donde el ASA era menor a 40 \AA^2 afectaban severamente tanto la actividad catalítica como la estabilidad.

5.8 Diferencias en el microambiente detectadas a través de las sondas fluorescentes; indican diferencias estructurales en el conformero R cuando éste es inducido a partir del ligando del sitio activo o del ligando del sitio alostérico

Los datos obtenidos con las 2 combinaciones posición fluoróforo muestran un comportamiento consistente con la transición alostérica; esto es, los cambios producidos por cualquiera de los dos ligandos llevan a una sola dirección (figura 14) y los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia producidos con el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) fueron siempre enmascarados por el ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P) hasta alcanzar el nivel producido únicamente por este último, pero no al contrario. Una de las ventajas de introducir este tipo de fluoróforos es que permite detectar con gran sensibilidad pequeños cambios en la polaridad relativa local, gracias a su gran eficiencia cuántica comparada con la de los fluoróforos intrínsecos (tabla 3). El microambiente que se produce cuando se induce la transición alostérica a través del ligando del sitio activo es diferente al inducido por el ligando del sitio alostérico: por lo tanto, existe una diferencia estructural que permite mostrar un conformero intermedio al cual podemos llamar R', éste es inducido por el ligando del sitio activo y un conformero R inducido por el ligando del sitio alostérico (figura 14).

La comparación de las estructuras cristalográficas entre los conformeros T y R lleva a cabo una rotación de 131° entre los trímeros de la estructura hexámera, que posiblemente se asocie a la transición alostérica. Por lo que una hipótesis sería que el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) no sea capaz de inducir toda la rotación requerida mientras que el ligando del sitio alostérico sí pudiera inducir esta rotación completa. Un dato adicional que apoya esta hipótesis es que los cristales de la GlcN6P desaminasa en el conformero T son fácilmente desintegrados por la adición del ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P), pero la adición del ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) no modifica el cristal de la enzima en el conformero T, lo que fue atribuido a los contactos cristalinos que pueden formarse o romperse con cada uno de los ligandos (Olivia et al., 1995, Horjales et al., 1999). La inducción del conformero R por el ligando del sitio activo podría no ser suficiente para estabilizar las cargas positivas del sitio alostérico, a menos que se adicione fosfato. Esta idea es congruente con los datos obtenidos en este trabajo: mayores $\Delta\lambda_{\max}$ y efectos cooperativos observados en los espectros de emisión de fluorescencia en presencia del ligando del sitio activo (tabla 4 y figura 13).

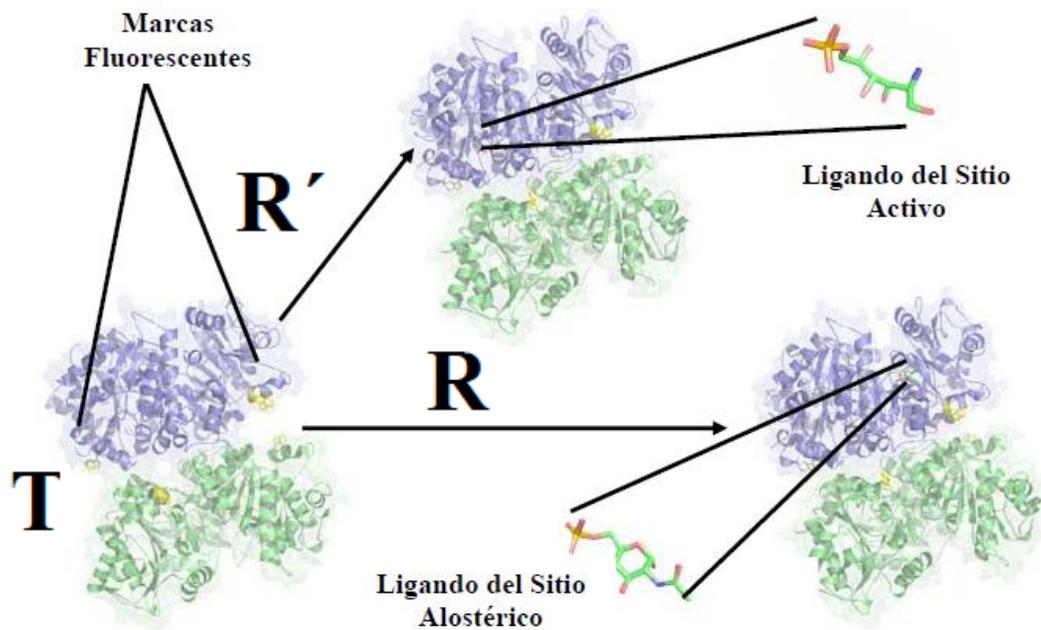


Figura 14. Representación esquemática de las diferencias estructurales del conformero R inducido por el ligando del sitio activo (R') y por el ligando del sitio alostérico (R) de la GlcN6P desaminasa marcada con dansil-amidoetil-MTS en la interfase de los trímeros. La figura fue realizada con el programa PYMOL por el Dr. González Andrade Martín.

6. CONCLUSIONES

Tomando como base a las estructuras cristalográficas del conformero R en presencia de cualquiera de los dos ligandos, se esperaba obtener los mismos parámetros del espectro de fluorescencia después de la titulación con uno u otro ligando, pero los datos obtenidos indican que la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa inducida del sitio activo es diferente a la inducida del sitio alostérico, como lo sugirieron las diferencias en el microambiente de la interfase de los dos trímeros de esta enzima hexamérica estudiada por SDL.

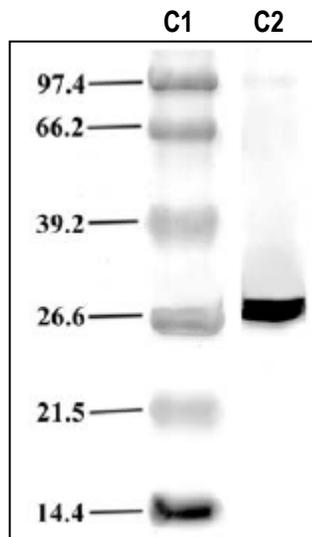
Esta información contrasta con el modelo de dos estados propuesto a partir de dichas estructuras. No obstante, no fue sorprendente tener una contribución diferente de cada ligando a la conformación del estado R, cuando fueron aplicadas técnicas fluorescentes en solución, debido a la incapacidad de las técnicas cristalográficas para revelar o estabilizar la diversidad de conformeros en solución.

Estos datos están acordes con recientes trabajos que hacen evidente la complejidad de la dinámica de las enzimas alostéricas (Kern y Zuiderweg, 2003, Viappiani, 2004) como la aspartato transcaramilasa (Stieglitz, 2004) para la cual se describieron nuevas estructuras cristalográficas intermediarias entre los estados T y R, a partir de una mutante que desestabiliza el estado nativo R. También un estudio reciente que combina técnicas cinéticas y de fluorescencia de triptófanos para la GlcN6P desaminasa, indicó que la ruta de propagación de los cambios cuaternarios del sitio activo es diferente a la ruta de propagación del sitio alostérico (Bustos-Jaimes, 2005).

Los rearrreglos estructurales cuaternarios inducidos por ligandos en las enzimas alostéricas es una tarea importante que debería ser emprendida con una combinación de técnicas en solución, para refinar y complementar la información obtenida con aproximaciones cristalográficas para el avance en la dinámica de las proteínas alostéricas.

7.3 Gel de la triple mutante C118S/C228S/C239S

Separación electroforética en SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de la triple mutante C118S/C228S/C239S. Ésta se analizó mediante electroforesis en condiciones oxidantes. El carril 1 (C1) muestra las bandas correspondientes a los marcadores de peso molecular (en kD) y el carril 2 (C2) muestra la banda correspondiente al monómero de la enzima libre de cisteínas reactivas (triple mutante C118S/C228S/C239S), el cual corresponde a 30 kD aproximadamente.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano MM, Plumbridge AJ, Calcagno ML. 1992. Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their functional role by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31:1153-1158.
- Altamirano MM, Plumbridge AJ, Hernández AA, Calcagno ML. 1991. Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1076:266-272.
- Altamirano MM, Plumbridge AJ, Horjales E, Calcagno ML. 1995. Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* 34(18):6074-6082.
- Álvarez Añorve Laura Iliana. 2005. Estudio comparativo de las enzimas GlcN6P desaminasa bacteriana y humana desde el punto de vista de su mecanismo y regulación. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. p.p. 5-8.
- Álvarez-Añorve LI, Calcagno ML, 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.
- Bergström F, Hägglöf Karolin JNyT, Johansson BAL. 1999. The use of site-directed fluorophore labeling and donor-donor energy migration to investigate solution structure and dynamics in proteins. *Proc Natl Acad. Sci.* 96:12477-12481.
- Bustos-Jaimes I. 2005. Estudio de la flexibilidad en el motivo ASA β B'/hélice 5/ASA/ β C1 (158-187) en la regulación alostérica de la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM.
- Bustos-Jaimes I, Sosa PA, Rudiño PE, Horjales E, Calcagno ML. 2002. On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase. *Journal Molecular Biology* 319:183-189.
- Bustos-Jaimes I, Ramírez-Costa M, De-Anda-Aguilar L, Hinojosa Ocaña P, Calcagno ML. 2005. Evidence for Two Different Mechanisms Triggering the Change in Quaternary Structure of the Allosteric Enzyme, Glucosamine-6-phosphate Deaminase. *Biochemistry* 44:1127-1135.
- Calcagno M, Campos JP, Mulliert G, Suástegui J. 1984. Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 787:165-173.
- Chen RF. 1965. Fluorescence quantum yield measurements: vitamin B6 compounds. *Science* 150:1593-1595.

- Chowdhry ZB, Stephen EH. 2001. Protein-ligand interactions, structure and spectroscopy: a practical approach. Oxford University. p.p. 1-6.
- Cleland JL, Craik SC. 1996. Protein Engineering. Edit. Wiley-Liss. E.U.A.
- Comb DG, Roseman S. 1958. Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase. *Journal Biology Chemistry*. 1958. 232(2): 807-827.
- Curtis SJ, Epstein W. 1975. Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutans defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *Journal of Bacteriology* 122:1189-1199.
- DeLano WL. 2004. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 228: U313-U314.
- Eisinger J. 1969. Intramolecular energy transfer in adrenocorticotropin. *Biochemistry* 8:3902-3908.
- Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. 2003. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochemistry* 312:224-227.
- González Andrade M. 2003. Marcaje Sitios Específicos de Proteínas a través del uso de Sondas Fluorescentes para Monitorear Cambios Conformacionales. Tesis Licenciatura, FESZ, UNAM. p.p.19-21.
- González Andrade M. 2005. Marcaje Sitio Específico de Proteínas para Estudiar Cambios Conformacionales en Solución: Bases Bioquímicas para el Desarrollo de Biosensores. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- González-Andrade M, Adriano Silva Manzano Daniel, Hernández Ruz Israel, Vázquez Contreras Edgar, Sosa Peinado Alejandro. 2005. La estructura y la visualización molecular de proteínas. *Mensaje Bioquímico*, XXIX: 158-160.
- Hames BD, Hooper MN. 2009. Instant notes in biochemistry. New York Springer. p.p. 27-35.
- Hogue AR. 1998. Proteins. Academic Press, U. S. A.
- Hubbard SJ, Thornton JM, Campbell SF. 1992. Substrate recognition by proteinases. *Faraday Discuss*:13-23.
- Hubbell WL, Gross A, Langen R, Lietzow MA. 1998. Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:649-656.
- Hubbell WL, Cafiso DS, Altenbach C. 2000. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nature Structural Biology* 7: 735-739.
- Jones-Mortimer MC, Kornberg HL. 1980. Amino-sugar transport systems in *Escherichia coli* k12. *J. General Microbiology* 117: 369-376.

- Lakowicz JR. 2004. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Edit. Springer. U. S. A. cap. 1, 2 y 3.
- Mainhart CR, Potter M, Feldmann RJ. 1984. A refined model for the variable domains (Fv) of the J539 beta-(1,6)-D-galactan-binding immunoglobulin. *Molecular Immunology* 21:469-478.
- Mengin-Lecreux D, van Heijenoort J. 1996. Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 271:32-39.
- Midelfort FC, Rose AI. 1977. Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* 16(8):1590-1596.
- Midelfort FC, Gupta RK, Rose AI. 1976. Fructose 1,6-biphosphate: isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases. *Biochemistry* 15(10): 2178-2185.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal Molecular Biology* 12: 88-118.
- Montero MGG. 1995. Purificación y caracterización fisicoquímica de tres mutantes sitio específicas Y254W, Y254F y Y254UGA de la enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. p.p. 10 y 11.
- Montero MGM. 2001. Estudio del mecanismo catalítico de la enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. p.p. 22-35.
- Montero GM, Horjales E, Calcagno ML, Altamirano MM. 1998. Tyr254hydroxyl 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.
- Nelson LD, Cox MM. 2009. 5ª ed. Edit. Omega. Lehninger Principios de Bioquímica. Barcelona, España. Cap. 5-6.
- Oliva G, Fontes M, Garrat RC, Altamirano MM, Calcagno ML, Horjales, E. 1995. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* 3: 1323-1332.
- Patel S, Mackerell AD, Brooks CL, 3rd. 2004. CHARMM fluctuating charge force field for proteins: II protein/solvent properties from molecular dynamics simulations using a nonadditive electrostatic model. *Journal Computational Chemistry* 25:1504-1514.
- Perutz MF. 1990. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Cambridge University Press.
- Plumbridge JA. 1991. Represion and induction of the nag regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Molecular Microbiology* 5:2053-2062.

- Plumbridge JA. 1992. A dominant mutation in the gene for the Nag repressor of *Escherichia coli* that renders the nag regulon uninducible. *Journal General of Microbiology* 138:1011-1017.
- Plumbridge JA, 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 JA. 1989. Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon. *Molecular Microbiology* 3:506-515.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. 1996. Phosphoenolpyruvate; carbohydrate phosphotransferase systems. *Cellular and Molecular Biology*:1149-1174.
- Rogers MJ, Ohgi T, Plumbridge JA, Söll D. 1988. Nucleotide sequences of the *E. coli*. nag E and nag B genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* 62:197-207.
- Rudiño Piñera Enrique. 2001. Estudios estructurales sobre el mecanismo de activación alostérica de la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado. IBT. UNAM. p.p.11 y 30.
- Skoog, DA. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Edit. McGraw-Hill. España. p.p. 381-392.
- Smith PK. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochemistry* 150(1):76-85.
- Soberón Mainero X. 2002. La ingeniería genética y un campo de aplicación: la biocatálisis y la industria química limpia. *Mensaje Bioquímico*. 26:1-18.
- Sosa-Peinado A, González-Andrade M. Site directed fluorescence labeling reveals differences on the R-conformer of glucosamine 6-phosphate deaminase of *Escherichia coli* induced by active or allosteric site ligands at steady state. 2005. *Biochemistry* 44(46):15083-15092.
- Stieglitz K, Stec B, Baker DP, Kantrowitz ER. 2004. Monitoring the transition from the T to the R state in *E. coli* aspartate transcarbamoylase by X-ray crystallography: crystal structures of the E50A mutant enzyme in four distinct allosteric states. *Journal Molecular Biology* 341:853-868.
- Viappiani C, Bettati S, Bruno S, Ronda L, Abbruzzetti S, Mozzarelli A, Eaton WA. 2004. New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14414-14419.
- Willard, Hobart H. 1991. Métodos Instrumentales de Análisis. Edit. Iberoamericana. México. p.p. 193-195.
- Yifrach O, Horovitz A. 1998. Transient kinetic analysis of adenosine 5'-triphosphate binding-induced conformational changes in the allosteric chaperonin GroEL. *Biochemistry* 37:7083-7088.