

107
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

FALLA DE ORIGEN

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA
DE TRES MUTANTES SITIO ESPECIFICAS: Y254W,
Y254F Y Y254UGA DE LA ENZIMA GLUCOSAMINA
6-FOSFATO DESAMINASA DE Escherichia coli.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

GABRIELA M. ^{Ascarita} MONTERO MORAN



1995
FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARIA DE INVESTIGACION



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: PURIFICACION Y CARACTERIZACION FISICOQUIMICA, DE TRES MUTANTES SITIO ESPECIFICAS: Y254W, Y254F Y Y254UGA DE LA ENZIMA GLUCOSAMINA 6-FOSFATO DESAMINASA DE Escherichia coli.

realizado por Gabriela Margarita Montero Morán.

con número de cuenta 8736576-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. MYRIAM M. ALTAMIRANO BUSTAMANTE

M. Altamirano Bustamante

Propietario

M. en C. LAILA GUTIERREZ KOBEH

Laila Gutierrez Kobe

Propietario

M. en C. SERGIO CORONA GARCIA

Sergio Corona Garcia

Suplente

BIOL. CARLOS ALBERTO CASTILLO POMPEYO

Suplente

M. en C. GISELE ROSAS SOLARES

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
COORDINACION DE BILOGIA
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

Dedicó este trabajo a mi madre, Margarita Morán Martínez, en el cual se ve reflejado su apoyo y su cariño.

A mis hermanos, en especial a Víctor, Enrique, Erika y Verónica.

A toda mi gran familia por compartir conmigo días de alegría y de tristeza. Rosi, Mónica, Marco, Car, Dan, Lalo, Ceci, Dany, Armando, Tirso, Lili, Cesar, Chelo, Luis, Emma y por supuesto a la juventud sin frenos: Enrique, Carlitos, Arturo, Lalito, Roxana, Moniquita y Morocho.

A mis abuelitos Anastacia y Tirso que aunque ya no están conmigo seguramente compartirían mi alegría.

Un espacio muy especial dedicado a Maria Magdalena Gonzalez, gracias por sus atenciones y por su ejemplo de lucha.

A mi segunda familia donde siempre me recibieron con agrado : Rafa, Lolita, Lulu, Edith, Violeta, Moi, Marcos, Toño, Uli, Enrique, Martita, Debora y Dalia.

A Myriam y al Dr. Calcagno, por enseñarme el amplio y divertido mundo de la bioquímica y fácil que resulta aprender sobre todo si es de naturaleza proteica. Gracias por permitirme conocer y aprender de su conocimiento.

Un enorme "Gracias" a todos aquellos que compartieron el laboratorio conmigo sin quejarse demasiado y que con su constante "ya mero" me apuraban a seguir: Lupita, Hugo, Laura, Carlos, Sara, Margarita, y aunque no quiera Roberto.

A todos mis compañeros de generación quienes comparten esa intensa curiosidad que nos caracteriza y tan necesaria en nuestra carrera: Juan, Adriana, Miguel, Salvador, Aquiles, Agustin, Claudia, Nelida, Jesús.

A Larisa, Tony, Xochitl, Socorro, Clara, Iliana, Samuel y Javier por que algun día los sueños de estudiante se vuelvan los sueños de una realidad.

A Silvia y a Claudia que componen un mundo aparte de amistad, gracias por que se que siempre estarán en momentos bonitos y en los no tan bonitos.

Al cuarteto especial que surgió de tiempos muy atrás en las aulas de la preparatoria: Tsuki, Judith, Lety y Alma (incluyendo a Vero y su mamá). Luzma, Mónica y Michelle (R1234).

Indice	
I Resumen	1
II Introducción	5
2.1 Metabolismo de los aminoazúcares	5
III Antecedentes	8
3.1 Acerca de la enzima silvestre	8
3.1.1 Propiedades cinéticas y moleculares	9
3.2 Ingeniería de Proteínas como herramienta en el estudio funcional y estructural	10
3.3 Predicción y análisis de estructura secundaria	11
IV Objetivos	13
V Material y métodos	14
5.1 Obtención de la biomasa de cepas de <i>Escherichia coli</i> sobreproductoras de las formas mutantes de la enzima (Y254W, Y254F, Y254UGA).	14
5.1.1 Construcción de mutantes	14
5.1.2 Producción de biomasa	14
5.2 Estrategias de purificación	15
5.2.1 Cromatografía de afinidad alostérica para la mutante Y254W	16
5.2.2 Cálculo de la concentración de enzima pura	17
5.2.3 Titulación de grupos SH con DTNB	17
5.2.4 Purificación de la mutante Y254F por cromatografía de interacción hidrofóbica.	18
5.2.5 Purificación de la mutante Y254UGA	18
5.3 Caracterización cinética y estructural de las proteínas	19
5.3.1 Análisis de los datos cinéticos	19
5.3.2 Espectrometría de dicroísmo circular	20
5.4 Caracterización fisicoquímica de las mutantes	20
5.4.1 Determinación del punto isoelectrico	21
5.4.2 Determinación electroforética del peso molecular de la proteína nativa mediante geles de gradiente de poro	22

VI Resultados	23
6.1 Purificación de la mutante Y254W	23
6.2 Caracterización fisicoquímica de la mutante Y254W	23
6.3 Caracterización cinética	24
6.3.1 Estudio cinético de la inhibición por sustrato	26
6.3.2 Efecto de la GlcNAc6P en la inhibición por sustrato	26
6.3.3 Efecto del ion amonio en la inhibición por sustrato	28
6.3.4 Efecto del inhibidor sin salida GlcN-ol-6 en la inhibición por sustrato	29
6.3.5 Efecto de fosfatos en la inhibición	30
6.3.6 Efecto de la dRib-5-P	30
6.3.7 Efecto de la Fru6P	31
6.3.8 Termodinámica de unión del activador alostérico mediante dicroísmo circular	31
6.4 Caracterización fisicoquímica de la mutante Y254F	32
6.5 Caracterización cinética de la mutante Y254F	32
6.6 Dicroísmo circular	34
6.7 Caracterización fisicoquímica de la mutante Y254UGA	35
6.8 Caracterización cinética de la mutante Y254UGA	35
VII Discusión	36
VIII Conclusiones y perspectivas	40
IX Apéndice	43
9.1 Abreviaturas	43
9.2 Electroforesis, soluciones	43
9.3 Medios de cultivo	45
X Bibliografía	48

I RESUMEN

La glucosamina 6 fosfato isomerasa, también llamada desaminasa, (2-amino-2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato ceto isomerasa (desaminasa), EC 5.3.1.10) es un homopolímero hexamérico (Calcagno y col., 1984) que cataliza la conversión reversible de la glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y amonio. Es la enzima clave en la vía del catabolismo de los aminoazúcares en la bacteria *Escherichia coli* la cual está regulada tanto a nivel de la transcripción como de las proteínas.

Anteriormente por técnicas espectrofotométricas se demostró la presencia de residuos de tirosina (TYR) que participan en la unión de ligandos homotrópicos y heterotrópicos (Altamirano y col, 1994). Estos residuos corresponden a la TYR 121 y la TYR 254 que son relevantes en la función de la enzima y se encuentran asociados a los cambios estructurales y funcionales producidos por la unión del sustrato (GlcN6P).

Basados en las observaciones anteriores se procedió a la realización de mutantes sitio específicas en la posición 254 de la secuencia lineal de aminoácidos, por diferentes residuos aminoácidos. El presente trabajo describe la purificación y caracterización cinética de las mutantes Y254W, Y254F y Y254UGA.

A partir de biomasa sobreproductora de la bacteria *E. coli* K12 de la cepa 590 transformada con el plásmido pTZ18R, portadores del gen *nagB* que codifica para la glucosamina 6-fosfato desaminasa, se purificaron las enzimas modificadas genéticamente en la posición 254. Tales mutantes fueron: TYR254-TRY254 (Y254W), TYR254-UGA (Y254UGA O Y254STOP) y TYR254-PHE254 (Y254F). Dos de estas mutantes consisten en una sustitución de un aminoácido por otro y en otra, la 254STOP, se produjo una delección de doce residuos en el extremo C-terminal. Las enzimas mutadas se purificaron por medio de cromatografía en columna. Se utilizó cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna de fenil-sefárosa, para purificar la desaminasa Y254F, cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Sephacel para el caso de la mutante Y254UGA y cromatografía de afinidad alostérica para Y254W.

En los estudios cinéticos de la mutante Y254W, se observa una cooperatividad homotrópica con un coeficiente de Hill máximo (h_{max}) de 1.74 en comparación con la enzima silvestre que presenta

un coeficiente de Hill de 3.02 ± 0.09 . Al mismo tiempo se observa una intensa inhibición por sustrato, con una constante de inhibición de 109 mM en ausencia del activador alostérico (GlcNAc6P) y de 3.90 mM en presencia del activador. Cabe mencionar que este valor es del mismo orden de magnitud que la constante de Michaelis para el sustrato, que es de 2.21 ± 0.09 mM. Esta inhibición sugiere la posibilidad de que el sitio activo permite la entrada de dos sustratos al mismo tiempo. Estudiando esta posibilidad con diferentes sustratos: GlcN-ol-6P (inhibidor sin salida), ion amonio, fosfato inorgánico, D-ribosa-5-P y Fru6P, se determinó que el sitio para el amonio no se encuentra alterado ya que la presencia de éste a diferentes concentraciones no altera las constantes de inhibición para la enzima, sin embargo, la región de reconocimiento del fosfato está alterada puesto que los sustratos fosforilados aumentan la constante de inhibición (K_i).

El cálculo por titulación de los grupos tioles con DTNB de la absorptividad molar para la enzima es de $\epsilon_{\text{mM Y254W}} = 21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm, el punto isoeléctrico calculado mediante geles en gradiente de poro para la mutante Y254W es de 6.40 y la constante catalítica por monómero es de $k_{\text{cat}} = 232 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ en ausencia del activador y de $223 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ en presencia de éste. Los estudios cinéticos de la mutante Y254F presentan un efecto de tipo mixto donde la velocidad máxima y el $S_{0.5}$, se ven modificados por la mutación, el valor del coeficiente de Hill máximo es de 1.74 ± 0.11 mientras que la k_{cat} es de $36 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ en ausencia y de $57.6 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ en presencia del activador alostérico. La absorptividad molar es de $\epsilon_{\text{mM Y254F}} = 24 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm, el $\text{pI} = 6.50$ y el PM en geles de gradiente de poro es de 179.5 KDa.

En cuanto a la mutante Tyr254UGA se ha encontrado que es inestable y no ha sido posible obtenerla como proteína pura. Los estudios realizados con una fracción de sulfato de amonio parcialmente purificada, revelan que la enzima sigue siendo cooperativa y presenta un coeficiente de Hill máximo de 2.04 ± 0.19 , la k_{cat} para esta mutante es de 64.1 ± 5 en ausencia y de 50 ± 0.4 en presencia del activador. El valor para la constante de Michaelis es de 34.40 ± 5 . El peso molecular experimental en geles de gradiente de poro es de 172 kDa y el $\text{pI} = 6.9$.

II INTRODUCCION

2.1 Metabolismo de los aminoazúcares, GlcN y GlcNAc

Los genes del regulón *nag* de *E. coli*

Los genes que codifican a las proteínas relacionadas con el catabolismo de los aminoazúcares están agrupados en el regulón *nag* que se localiza a 15.5 min sobre el mapa cromosómico de *E. coli* y está formado por dos operones divergentes *nagE* y *nagBACD* (Fig. 1), que en conjunto poseen cinco genes, en una dirección se transcribe el gen *nagE*, que codifica para la proteína transportadora específica (EII^{Man}) de GlcNAc del sistema de transporte de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) y produce GlcNAc6P intracelular (Plumbridge, 1989). En la dirección opuesta se expresan los genes *nagB*, *nagA*, *nagC*, *nagD*. El gen *nagA* codifica para la enzima N-acetil glucosamina 6-fosfato (GlcNA6P) desacetilasa, que hidroliza a la GlcNAc6P dando GlcN6P y acetato. El gen *nagB* codifica a la enzima GlcN6P desaminasa que degrada a la GlcN6P en Fru6P y ion amonio. El tercer gen, *nagC*, codifica para una proteína represora del regulón que tiene su sitio operador en la región intergénica entre *nagE-nagB*. En esta región intergénica hay dos sitios de unión para la proteína *nagC* y también tiene un sitio de unión corriente arriba del gen *manX* (región promotora que se localiza corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción) (Plumbridge, 1991). Vogler y Lengekler han demostrado que en mutantes *nagC* menos la GlcN6P desaminasa puede cumplir una función biosintética debido a su reacción reversa. En cuanto al gen *nagD* se ignora su función. La proteína que codifica tiene identidad estructural con la familia de las fosfatasas, en especial con la *p*-nitrofenil fosfatasa de *E. coli*. Por otro lado, en las mutantes *nagD* no se ve alterado su crecimiento. (Plumbridge, 1989). Los aminoazúcares GlcNAc y GlcN son transportados al interior de la bacteria (fig. 1) por una proteína acarreadora del sistema PTS que a su vez fosforila a los azúcares formando intracelularmente GlcNAc6P y GlcN6P. La GlcN se transporta al interior de la célula y se fosforila por medio de un acarreador de hexosas específico del sistema PTS denominado EIIIM;P/III^{Man} que es codificado por los genes del operón de la manosa, *manXYZ*.

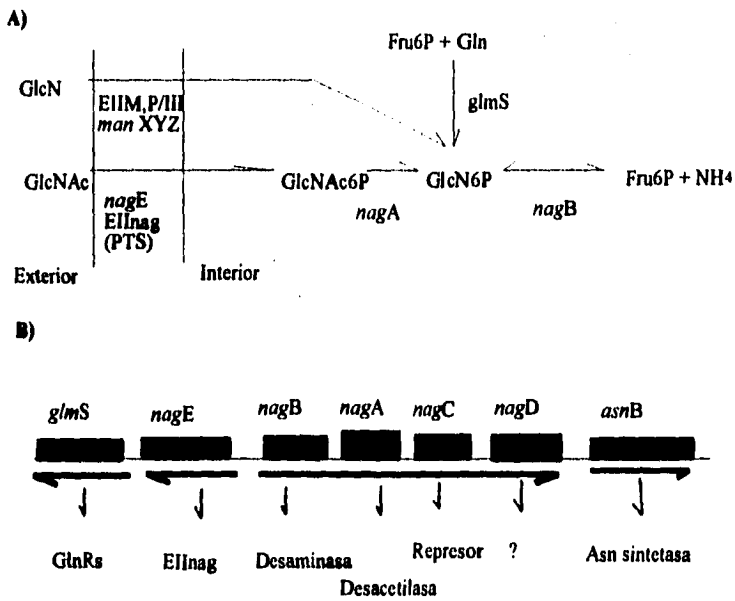


Figura 1. A) Vías metabólicas y biosintéticas de los aminoazúcares. B) Representación esquemática de los genes del regulón *nag* y las proteínas que codifican (Plumbridge, 1989).

La GlcNAc es transportada y fosforilada por medio del acarreador específico del sistema PTS denominado **EII^{man}** que es codificado por el gen *nagE* del regulón de los aminoazúcares. En 1968 White al estudiar las propiedades de la desacetilasa y de la desaminasa, observó que la adición de N-acetil-glucosamina-6-P (GlcNAc6P) causa una marcada estimulación en la actividad de la desaminasa y sugiere que la concentración de glucosamina-6-P es el modulador en el control del metabolismo de los aminoazúcares, por lo que el inductor natural del regulón es la GlcNAc6P ya que puede desplazar a la proteína represora de su unión con el sitio operador, lo cual induce la transcripción de los genes *nag*. (Plumbridge, 1991).

Estos aminoazúcares son también fuentes de carbono y nitrógeno para la bacteria; pero particularmente la GlcNAc, con la que se pueden obtener curvas de crecimiento semejantes a

las que se alcanzan con glucosa. Las proteínas codificadas por los genes *nagA* y *nagB*, GlcNAc6P desacetilasa y GlcN6P desaminasa, respectivamente son necesarias para el crecimiento de *E. coli* en N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) pero solo el gen *nagB* es necesario para que la bacteria pueda crecer en glucosamina (GlcN) como única fuente de carbono y de nitrógeno. Las enzimas involucradas en estos procesos anabólicos y catabólicos son reguladas cuidadosamente, por lo que la vía se regula tanto a nivel de la síntesis enzimática por inducción de los genes degradativos durante la producción de aminoazúcares y la represión de los genes biosintéticos y por otro lado a nivel de la actividad de las enzimas degradativas.

El esqueleto de carbonos de los aminoazúcares se incorpora a la vía de la glucólisis a nivel de la Fru6P, gracias a la reacción de la desaminasa.

El gen *glmS* está localizado a 84 min en el cromosoma de *E. coli* (Wu, H. y Wu, T., 1971) y codifica para la enzima glucosamina-6-fosfato sintetasa (Glutamina-D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa) que se encarga de sintetizar GlcN6P a partir de Fru6P y L-glutamina cuando no hay aminoazúcares en el medio. Los niveles de esta enzima disminuyen en presencia de los aminoazúcares GlcN y GlcNAc, pero este fenómeno depende principalmente de la presencia de la proteína represora *nagC* activa (Plumbridge, 1993).

Los aminoazúcares son precursores de diversos polímeros estructurales como los proteoglicanos en los animales, la quitina en animales y hongos y la mureína en las bacterias; también aparecen en el componente glucídico de las glicoproteínas, en los lipopolisacáridos bacterianos e inclusive en vegetales superiores como cadenas de oligosacáridos de los glucolípidos. Así mismo, los aminoazúcares que participan en la composición de sustancias importantes como la mielina en el sistema nervioso, son precursores del ácido siálico y constituyentes de la heparina.

En la bacteria *Escherichia coli* así como en otras bacterias gram negativas, los aminoazúcares GlcNAc y GlcN son componentes esenciales de la pared celular y de los lipopolisacáridos de la membrana externa. El origen de estos aminoazúcares, que son indispensables para el crecimiento de la bacteria, puede estar en la biosíntesis celular o bien del medio de cultivo. Cuando al menos uno de estos precursores (GlcNAc y GlcN) está presente en el medio, éste se incorpora activamente a la célula y puede utilizarse en los procesos de biosíntesis (mureína, lipopolisacáridos) o como fuente de carbono y nitrógeno.

III ANTECEDENTES

3.1 ACERCA DE LA ENZIMA SILVESTRE

Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*

La enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa es una proteína oligomérica compuesta por seis subunidades idénticas de 29.7 kDa (Calcagno y col. 1984); su estructura primaria se conoce a partir de la secuencia de DNA del gen *nagB* (Rogers y col., 1988). La enzima consiste en un trímero de dímeros cuyas subunidades se unen por puentes disulfuro donde cada una de las subunidades tiene cuatro cisteínas localizadas en las posiciones; 118, 219, 228 y 239. Se ha observado que la Cys-118 y la Cys 239 forman un par de tioles vecinos y su reactividad es modificada con la transición alostérica (Altamirano y col., 1993). Estos tioles reactivos no son esenciales para la actividad o para la activación alostérica ya que si son bloqueados químicamente, la enzima presenta una cooperatividad reducida en un 50% en comparación con la enzima silvestre (Altamirano y col., 1989). Las subunidades del hexámero están arregladas como dímeros con un eje de simetría del tipo 32, centrado en un eje triaxial (Altamirano y col., 1992; Horjales y col., 1992). Esta estructura también es consistente con los resultados obtenidos con la desaminasa por calorimetría diferencial a pH neutro, que sugieren que la desaminasa se disocia en dímeros en dos pasos consecutivos. (Hernández-Arana y col., 1993). El peso molecular de la enzima es de 179.870 kDa con un coeficiente de sedimentación de 9.0S y un volumen parcial específico de 0.737 cm³/g, el punto isoelectrico de la enzima es de 6.1 y la absorptividad molar calculada es de ϵ_{278} (pH 8) de 20 M⁻¹ cm⁻¹, las constantes cinéticas de la enzima son: la k_{cat} en el sentido desaminante es de 1800 s⁻¹ por molécula y de 455 s⁻¹ en el sentido sintético, el coeficiente de Hill es de 3 y la Km para la GlcN6P de 2 mM.

3.1.1 Propiedades cinéticas y moleculares

La enzima GlcN6P desaminasa cataliza la conversión reversible de GlcN6P en Fru6P y amonio.



La constante de equilibrio en el sentido desaminante tiene un valor de $K_{\text{EQ}}=0.22$ en Tris-HCl pH 7.7 a 30°C definida como $[\text{Fru6P}][\text{NH}_4^+]/[\text{GlcN6P}]$, (Calcagno y col., 1984). La desaminasa presenta una intensa cooperatividad homotrópica positiva con respecto al sustrato GlcN6P, mientras que para la reacción inversa cuando el único sustrato que presenta cooperatividad es la Fru6P (fig. 2), esta cooperatividad es menor, tal como se puede apreciar por el valor del coeficiente de Hill máximo que es de 1.4 (Calcagno y col., 1984) y no depende de la concentración del ion amonio, éste no es un ligando alostérico.

La enzima GlcN6P desaminasa es una enzima alostérica activada por la N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P), la transición alostérica es concertada y está descrita por el modelo de Monod, Wyman y Changeux (MWC). El activador alostérico (GlcNAc6P) se comporta como un activador de fijación exclusiva, ya que produce cinética hiperbólica a concentraciones saturantes. Esta enzima se comporta como un sistema K puro en el cual, al incrementarse la concentración del activador los valores de $S_{0.5}$ disminuyen, mientras que los valores de V_{max} no se modifican.

El mecanismo cinético de la enzima corresponde al llamado mecanismo de equilibrio rápido al azar. Esto significa que los productos, Fru6P y NH_4^+ , se liberan al azar en el complejo central de la reacción o se adicionan al azar en la reacción inversa (figura 3).

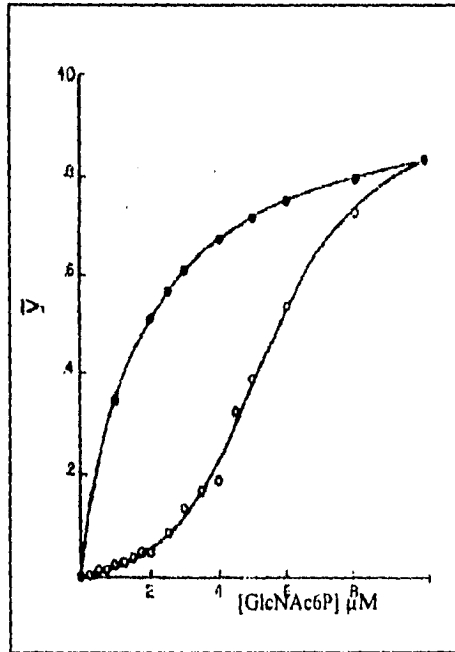


Figura 2. La enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa presenta una intensa cooperatividad homotrópica positiva con respecto al sustrato GlcN6P ($h_{max} = 3$); el activador alostérico se comporta como un ligando de fijación exclusiva ya que produce cinética hiperbólica a concentraciones saturantes. Debido a que al incrementar la concentración del activador, los valores de V_{max} no se modifican, resulta evidente que se trata de un sistema de tipo K puro. (Altamirano y col., 1989).

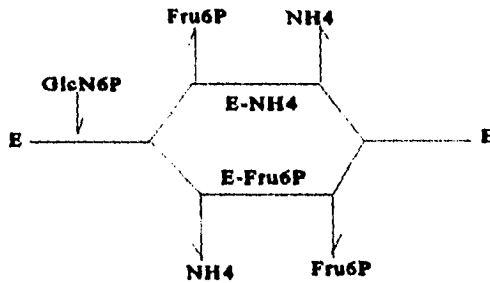


Figura 3. La enzima glucosamina 6- fosfato desaminasa sigue un mecanismo rápido al azar donde los productos, Fru₆P y NH₄⁺, se liberan al azar en el complejo central de la reacción o se adicionan al azar en la reacción inversa.

3.2 Ingeniería de proteínas como herramienta en el estudio funcional y estructural

A partir de la década de los 80 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 logra a través de la manipulación de sus genes (Fersht y col, 1992). Las investigaciones sobre modelos de enzimas aportan mucha información para la interpretación de sus mecanismos catalíticos.

La ingeniería de proteínas tiene como principio fundamental a la evolución molecular ya que

las funciones y propiedades de las proteínas son el resultado de la formación y acumulación de aquellas mutaciones espontáneas en los genes que a lo largo de millones de años dieron finalmente a las proteínas su identidad funcional y estructural.

La ingeniería de proteínas constituye una estrategia fundamental de los bioquímicos en el estudio de la estructura y actividad de las proteínas así como el diseño *de novo* de proteínas, que incluye la construcción, el análisis y el uso de proteínas modificadas.

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.

3.3 Predicción y análisis de estructura secundaria

Se conocen una serie de algoritmos, basados en la secuencia de aminoácidos, que se utilizan como herramientas para la predicción de la estructura secundaria de una proteína como son; hélices α , hojas β y giros.

La predicción de estructuras secundarias pretende determinar la conformación para cada porción de la cadena primaria. Los métodos de predicción de estructuras se fundamentan con base a estructuras tridimensionales conocidas. Algunos de estos métodos son estadísticos (Fasman, 1989), en los cuales se determinan aquellos residuos que son potencialmente formadores de estructuras secundarias, éstos se promedian en cada zona de la secuencia de aminoácidos con el fin de identificar aquellas regiones con mayor tendencia a formar un tipo particular de estructura secundaria. Con base a estudios realizados por Altamirano y col. 1991 a partir del análisis teórico de la estructura primaria y métodos espectroscópicos (dicroísmo circular) se propone que la GlcN6P desaminasa pertenece a la familia de las α/β , donde el 64% de las hélices son anfipáticas y el 90% de las betas son hidrofóbicas.

La hipótesis en la que se ha basado esta tesis fue planteada antes de que se conociera la estructura cristalográfica de la enzima y se basó por completo en los métodos de predicción y

en estudios fisicoquímicos y químicos de la proteína nativa.

Experimentos basados en la interacción de la enzima con el activador alostérico (GlcNAc6P) mediante diferentes métodos espectrofotométricos tales como; dicroísmo circular y titulación de tirosinas sugieren la presencia de residuos de tirosina cercanos al sitio alostérico que están involucrados en la unión del activador. Mediante dicroísmo circular en el ultravioleta cercano, la adición de GlcNAc6P (activador alostérico) o de GlcN-ol-6P (inhibidor sin salida) revelan cambios en el espectro de absorción de las tirosinas, lo que indica que estos residuos están involucrados en la interacción GlcNAc6P/enzima. En los estudios por titulación de tirosinas en presencia y ausencia de ligandos homotrópicos y heterotrópicos sugieren la presencia de una tirosina que presenta un bajo valor en el pK del grupo hidroxilo del fenol, esta tirosina bajo condiciones saturantes del activador alostérico resulta completamente protegida, lo que sugiere que muy probablemente se encuentre cercana al sitio alostérico por lo que es afectada específicamente por la unión del GlcNAc6P.

El análisis teórico de la secuencia sugiere que los residuos involucrados corresponden a las Tyr121 y Tyr254 (Fig 4). Recientemente se han realizado estudios de la posición 121, empleando la estrategia de la mutagénesis dirigida (Altamirano y col.,1995). Como continuación de este estudio y con el fin de realizar un análisis de correlación estructura-función de la posición 254 en la unión de ligandos de la proteína se construyeron las mutantes sitio específicas Tyr254-Trp (Y254W), Tyr254-Phe (Y254F) y Tyr254UGA (Y254UGA).

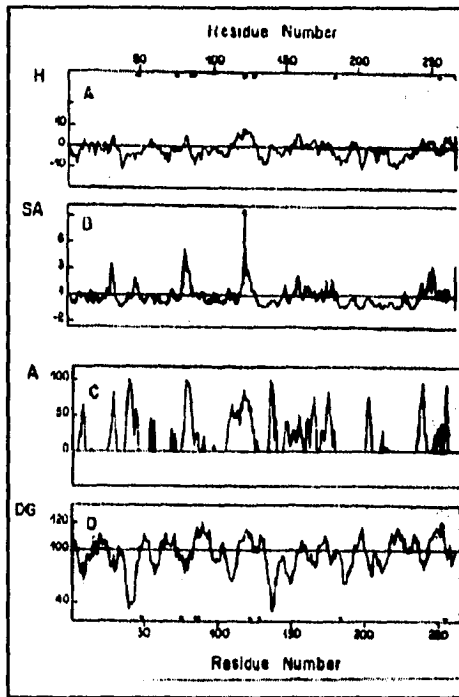


Figura 4. Análisis teórico de secuencia de aminoácidos de la glucosamina 6 fosfato desaminasa. Gráficas de cuatro índices de accesibilidad de superficie. A) Escala de Hidrofilicidad de Hoop y Woods (1981); B) Escala de accesibilidad al solvente de Boger y col. (1986); C) Índice de antigenicidad de Parker y col. (1985); D) Índice de antigenicidad por disimetría contra glicina. Las posiciones de las Tyr121 y Tyr254 están señaladas por (●). Esquema de Altamirano y col., 1994.

OBJETIVOS

Purificación y caracterización de las enzimas modificadas genéticamente en las posiciones Y254W, Y254F, Y254UGA.

Caracterización funcional y estructural de las mutantes por métodos fisicoquímicos.

Estudiar el papel de la secuencia de aminoácidos C-terminal en la función de la enzima, principalmente en relación con la unión de ligandos y en la transición alostérica..

V MATERIAL Y METODOS

PURIFICACION

5.1 Obtención de la biomasa de cepas de *E. coli* sobreproductoras de las formas mutantes de la enzima (Y254W, Y254F Y 254UGA).

5.1.1 Construcción de mutantes

La sustitución de un aminoácido por otro en la posición 254 se realizó por la técnica llamada mutagenésis dirigida de oligonucleótidos usando el método de Kunkel descrito por Sanbrook y col. en 1989. El gen *nagB* de pUC(*nagB*) (Altamirano y col. 1991) se clonó en el fagémido pTZ18R(Pharmacia) dando pTZ18R(*nagB*). El fagémido que contenía la mutación se identificó por secuenciación y a su vez se secuenció por completo el gen *nagB* para verificar que no existieran mutaciones secundarias. El pTZ18R(Pharmacia) es un fagémido multifuncional diseñado especialmente para clonar secuencias de DNA dideoxi, en mutagenesis *in vitro*. Este vector contiene dos orígenes de replicación; *f1* y pBR322, para la generación de una doble cadena de DNA o bien una cadena sencilla de DNA. La célula hospedera del pTZ18R puede ser infectada con el fago M13K07 e iniciarse la replicación en el origen *f1* (Fig. 5).

La cepa 590R de la bacteria de *E. coli* tiene incorporado a su genoma el plásmido pTZ18R(*nagB*) y un fragmento que codifica para la enzima mutada. La cepa 590R es Δnag , es decir, no tiene expresión de los genes del regulón *nag*, ya que tiene una mutante por inserción. Esto es importante ya que la bacteria expresará solamente la desaminasa a partir del genoma del plásmido con que ha sido transformada y no de su propio cromosoma. De esta forma, las enzimas mutantes que se preparan estarán completamente libres de la enzima silvestre. La expresión de la desaminasa en esta construcción es de tipo constitutiva.

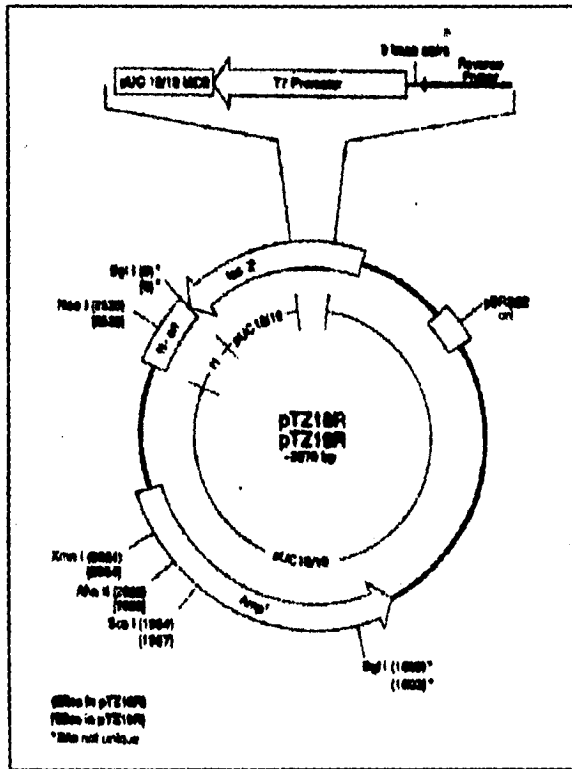


Figura 5. Fagémido multifuncional diseñado especialmente para permitir la clonación de secuencias de DNA dideoxi en mutagénesis *in vivo*.

5.1.2 Producción de biomasa

La producción de biomasa se inició con un precultivo de 250 ml de medio de Luria-Bernstein-ampicilina (ver apéndice), el cual se dejó bajo agitación durante 4 horas; posteriormente éste se empleó para inocular un fermentador de 3 litros con el mismo medio líquido. La ampicilina se usó a una concentración final de 500 µg/ml. En el fermentador se agregaron refuerzos de ampicilina cada 2 horas con el fin de mantener la presión de selección sobre las bacterias portadoras del plásmido. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 15 000 x g por 10 minutos, al final del crecimiento exponencial y se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización. Se obtuvieron del fermentador 3 g de bacterias, peso húmedo.

Se valoró en cada caso la presencia de la sobreexpresión por métodos electroforéticos con el fin de verificar la presencia del plásmido en la bacteria y la expresión de la proteína.

5.2 Estrategias de purificación

El diseño de la ruta de purificación se muestra en la figura 4, en el que se incluyen las modificaciones para cada mutante. En cada una de ellas se monitoreó la actividad y la sobreexpresión de las enzimas modificadas. La purificación se llevó a cabo a la temperatura de 4°C, excepto las cromatografías, que se realizaron a temperatura ambiente.

1.- Las células bacterianas centrifugadas se lavaron tres veces con KCl 150 mM para quitar el medio de cultivo y la cápsula bacteriana.

2.- Las bacterias se resuspendieron en dos volúmenes de amortiguador Tris-HCl 0.1 M, EDTA 50mM, y se desintegraron por sonicación en baño de hielo. Es importante en esta etapa mantener la temperatura baja y trabajar rápidamente, para minimizar el efecto de las proteasas intracelulares. El extracto se centrifugó a 27 000 x g durante 30 min.. El sobrenadante, que contiene a la enzima que nos interesa lo denominamos extracto crudo inicial.

3.- Al extracto crudo inicial se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar el 45% de la saturación. Esta concentración está por debajo del punto de precipitación de las desaminasas mutantes, así fueron eliminadas gran parte de las proteínas del crudo. La solución se centrifugó y en esta fase la desaminasa quedó en el sobrenadante. Posteriormente se agregó más sulfato de amonio hasta alcanzar el 55% de la saturación. En estas condiciones la desaminasa precipita junto con otras proteínas.

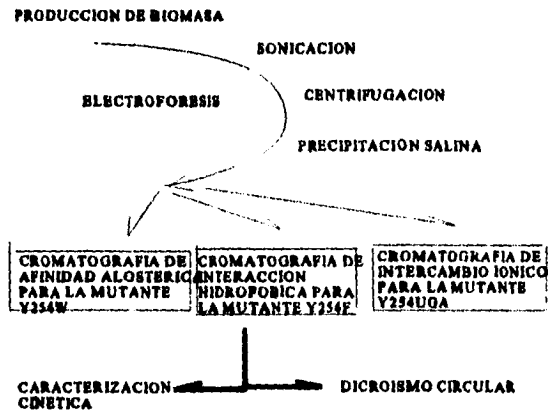


Figura 6. Diagrama de la ruta de purificación para las mutantes Y254W, Y254F, Y254UGA. Se muestran las modificaciones en la última etapa de la ruta de purificación.

5.2.1 Cromatografía de afinidad alostérica para la mutante Y254W

Se utilizó una columna de cromatografía de afinidad alostérica que tiene un análogo del activador alostérico (N-e-amino-n-caproil-D-glucosamina-6-fosfato) inmovilizado en agarosa (Calcagno y col., 1984). La columna es prelavada con KCl 3M y equilibrada con Tris-HCl 0.15M pH 7.5. La fracción de precipitado en sulfato de amonio se disuelve y luego se dializó por 4 h, usando en ambos casos el mismo amortiguador. La preparación se aplicó a una columna de cromatografía alostérica. Se verificó que la enzima fuese retenida por la columna, midiendo actividad enzimática en el efluente de lavado de la columna y registrando la concentración de proteína por medio de la absorbancia a 280 nm.

La columna se lavó con 500 ml de amortiguador, cuando las proteínas no retenidas salieron por completo, la proteína se eluyó por medio de una solución 10 mM del activador alostérico (GlcNAc6P), en un volumen tres veces mayor al de la columna. Una vez localizadas las

fracciones con actividad de desaminasa, se dializó contra un amortiguador de Tris-HCl 40mM pH 7.7 para retirar el activador alostérico. La enzima obtenida se dializó contra glicerol para concentrarla y agregarle glicerol (aproximadamente 50% final). En esta forma se conserva en refrigeración a -4 °C. En esta etapa se comprobó la pureza de la enzima por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se aplicó una muestra de proteína a una columna de filtración molecular SW300 para cromatografía de alto rendimiento (HPLC), para verificar pureza y el peso molecular de la enzima nativa.

5.2.2 Cálculo de la concentración de enzima pura

La concentración de la glucosamina 6-P desaminasa obtenida para cada mutante se calculó por medio de dos métodos: el primero consistió en utilizar el método de Bradford (1976) basado en el cambio de color del extracto ácido del azul de comassie G en presencia de proteínas, empleando la forma silvestre de esta misma enzima como patrón. Este método se basa en que es posible conocer con precisión la concentración de desaminasa silvestre porque conocemos su absorptividad molar a 278 nm (Altamirano y col. 1987). En estas condiciones el método de Bradford puede dar resultados muy precisos.

5.2.3 Titulación de grupos SH con DTNB

Para las enzimas se calculó inicialmente la concentración el método de Bradford y tomando los coeficientes de absorción de los aminoácidos que absorben más en el rango UV del espectro, principalmente a 280 nm. Este valor se ajustó titulando tioles de cisteínas con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico o reactivo de Ellman) tomando en cuenta que el coeficiente de absorptividad molar para el ión es de $\epsilon_{412\text{TNB}} = 1.414 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La GlcNAc6P desaminasa tiene 2 cisteínas reactivas en condiciones nativas (Altamirano y col. 1987) y tomando en cuenta que la enzima es un hexamero, en total hay 12 grupos SH expuestos que en condiciones nativas reaccionan con el DTNB. Esta reacción se estudió por medio de la medida continua de la aparición del anión TNB^- (5-tio-2-nitrobenzoato) a 412 nm. utilizando un espectrofotómetro Cary 4 de doble haz.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en una mezcla que contiene Tris-HCl

100mM pH 7.7, EDTA 10mM, DTNB 2mM. La reacción se lleva a cabo con la adición de la enzima a una concentración final de 1 μ M.

Considerando que en las proteínas mutadas los grupos sulfidrilos no fueron modificados, se empleó este método como una forma de verificar la concentración de proteína obtenida por el método de Bradford; con los resultados anteriores son utilizados en el análisis del espectro de la proteína en el pico máximo a 278 para calcular la absorptividad molar de la mutante.

5.2.4 Purificación de la mutante Y254F por cromatografía de interacción hidrofóbica.

La técnica de purificación de la forma mutante de la desaminasa Y254F sufrió una modificación ya que no se utilizó la cromatografía de afinidad alostérica debido a que la mutante no manifiesta afinidad por ella. Se empleó en su lugar, la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica.

De la misma manera que en el caso de la mutante Y254W, se dializó el precipitado de sulfato de amonio contra un amortiguador 40 mM de Tris-HCl pH 7.24 .

La columna hidrofóbica de fenil-agarosa (Phenyl Sepharose, Pharmacia, Suecia) se equilibró con Tris-HCl 100 mM, pH 7.24 que contiene 1M de $\text{SO}_3(\text{NH}_4)_2$. En estas condiciones se carga la columna con las proteínas y se lava con este mismo amortiguador. Se verificó que la enzima fuese retenida por la columna, midiendo actividad enzimática en el efluente de lavado de la columna y registrando la concentración de proteína por medio de la absorbancia a 280 nm. La elución se desarrolló primero con un gradiente lineal decreciente de $\text{SO}_3(\text{NH}_4)_2$ de 1 M a 0, utilizando el amortiguador anterior. Posteriormente se pasó por la columna un gradiente lineal decreciente de Tris-HCl de 100 a 0 mM. La enzima se eluye al final del gradiente.

Las fracciones con mayor actividad se dializaron contra Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM por 2 h, se concentraron en glicerol por diálisis y se guardaron a -4°C. La elución se monitoreó por medio de la absorbancia a 280 en un espectrofotómetro de doble haz. La pureza de la muestra se estimó por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

5.2.5 Purificación de la mutante Y254UGA por intercambio iónico

La purificación para la mutante Y254UGA se realizó por cromatografía de intercambio

aniónico en una columna de DEAE-Sephacel (farmacia) o en el cromatógrafo de HPLC empleando una columna de DEAE-PROTEIN PAK. En ambos casos las condiciones de la cromatografía fueron iguales. Cuando se empleó el cromatógrafo de HPLC, se utilizó una columna de 26.9 X 1.2 cm. La columna se equilibro con Tris-HCl 50mM, pH 7.4. Se inyectaron en la columna 425 µl de enzima previamente filtrada con filtros de 44 µm de poro. Las condiciones de pegado se realizaron a un flujo de 1 ml/min, la elución se realizó por medio de un gradiente convexo de 0 a 650 mM de acetato de sodio en 40min., con un flujo de 1 ml/min a una concentración constante de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. Las fracciones con mayor actividad se dializaron contra Tris-HCl 40 mM y se concentraron por dialisis en glicerol. La concentración de la proteína se determinó por los métodos antes descritos.

5.3 Caracterización cinética y estructural de las proteínas

El estudio cinético se realizó a la temperatura de 30 °C. La reacción enzimática se realizó en el sentido desaminante, esto es la dirección de la formación de Fru6P y amonio.

1.- La reacción se lleva a cabo en un volumen total de 200 µl que contiene la siguiente mezcla; Tris-HCl 50mM, pH 7.7, EDTA 12.5 mM y concentraciones variables de GlcNAc6P y GlcN6P.

2 - La reacción se desencadena con la enzima diluida a una concentración final de 5 nM para la mutante Y254W, 20 nM para Y254F y 10 nM para Y254UGA. La reacción se lleva a cabo a tiempos fijos, bajo condiciones controladas para obtener velocidades iniciales. Esto se logra manteniendo el grado de avance de la reacción por debajo de 0.05 %.

3.- Al término de la incubación la reacción se detiene con 2 ml de HCl 10 N y 0.5 ml de resorcinol al 1% en etanol, la mezcla se calienta por 10 min a 70°C y se lee en el espectrofotómetro a 512 nm contra un blanco de reactivos.

4 - La Fru6P formada en la reacción se cuantifica con el método de resorcinol descrito por Roe en 1934, con las modificaciones de Davis & Gander, 1967.

5.3.1 Análisis de los Datos cinéticos

Los análisis de los datos cinéticos fueron ajustados utilizando el programa ENZFITTER, por R J Leatherbarrow (Elsevier Biosoft, Cambridge, U.K.). Los modelos de prueba y la simulación de ecuaciones fueron realizadas utilizando el programa GLE 3.2, por C. Pugmire.

Lower Hutt, New Zeland.

La mutante Y254W sigue una cinética de Michaelis-Henri-Menten clásica con inhibición por sustrato en presencia del activador alostérico (ecuación 1) cuando la enzima está activada por completo por la GlcNAc6P. En ausencia del activador alostérico, la cinética es cooperativa. Esta cooperatividad homotrópica positiva se observa al mismo tiempo que la inhibición por sustrato. Una forma de analizar en forma empírica esta cinética, y que permite calcular una V_{max} y un coeficiente de Hill es la ecuación 2.

Mediante el uso de estas ecuaciones y métodos de regresión no lineal se obtuvieron los ajustes de los datos y los valores de las constantes cinéticas K_m para la GlcN6P, k_{cat} , coeficiente de Hill y constante de inhibición por sustrato, K_i .

También se utilizó una ecuación derivada del modelo alostérico de Monod-Wyman y Changeux (MWC) (Monod y col., 1965) en la que se tomó en cuenta la inhibición por sustrato (Ecuación 3).

Los datos cinéticos obtenidos con la mutante Y254F no presentan inhibición por sustrato y se ajustaron a las ecuaciones de Michaelis, de Hill o a una ecuación derivada del modelo de MWC (ecuación 4). Las primeras dos ecuaciones también se utilizaron para la caracterización cinética de Y254UGA.

5.3.2 Espectrometría de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron en un espectropolarímetro Aviv modelo 62DS. Los experimentos fueron realizados en Tris-HCl 40 mM, pH 7.7 usando celdas de 0.5 cm de paso de luz. Se registró la línea de base en presencia de la enzima más amortiguador y posteriormente se fueron agregando concentraciones crecientes de activador alostérico, 0.5, 1, 5, 10, 15 mM.

5.4 Caracterización fisicoquímica de las mutantes

Reactivos Químicos

Los reactivos químicos, las proteínas patrón, y derivados fueron adquiridos a Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

5.4.1 Determinación del punto isoeléctrico

El pH isoeléctrico de las mutantes se determinó por medio de electroenfoque en poliacrilamida, usando anfolitos en el intervalo de pH de 3.5 a 9.5.

La técnica en condiciones nativas según el manual de los fabricantes del aparato (Hoefer INC., XX, EEUU) sigue los pasos siguientes y los reactivos se ilustran en el apéndice.

1.-Ensamblar las placas y empaquetarlas debidamente utilizando separadores de 0.35mm, colocarlas en la cámara, cuidando de que estén bien ajustadas y no se deslicen al voltear la cámara.

2.-Poner las soluciones (apéndice), en un recipiente limpio excepto el TEMED, desgacificar la mezcla.

3.-Adicionar el TEMED cuidando de agitar bien la mezcla, lo más rápido posible vaciar en el empaquetado cuidando de no dejar burbujas. Poner los dientes separadores a los geles.

4.-El gel polimerizará en aproximadamente 30 min.

5.-Preparar los anolitos y anfolitos como se muestra en la sección del apéndice.

La cámara de electroforesis se llena con los Catolitos cuidando de no derramar la parte inferior de la cámara, colocar los anolitos en el piso de la cámara; precorrer el gel por 20 min. a 20 watts o 30 miliampers.

Las muestras se colocan después de precorrido el gel, el gel con las muestras se corre por 2 h o más si es necesario.

Después de correr el gel se coloca en una solución de 100ml de TCA al 20% (40g de TCA en 200 ml de agua) por 10 min. Al término del tiempo adicionar una solución de etanol al 40%, ácido acético al 10% y SDS al 0.25% en un volumen total de 500ml, esto es por 10 min.

Remover la solución, poner el gel en una solución teñidora de etanol al 40%, ácido acético 0.125%, azul de coomassie R-250 en un volumen de 100ml.

Desteñir el gel en la solución de etanol al 40%, ácido acético al 0.125%, en un volumen de 500ml.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: rojo de metilo 4 más LDH (pI 8.3, 8.4, 8.6), Anhidrasa carbónica II (5.9), Anhidrasa carbónica I (6.57), citocromo C (9), mioglobina (7), glutatión reductasa (4.1).

5.4.2 Determinación electrofóretica del peso molecular de la proteína nativa mediante geles de gradiente de poro.

Para la determinación del peso molecular de las mutantes se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de poro del 4 al 30 %. Los patrones utilizados fueron: alcohol deshidrogenasa (PM=150), hemoglobina (60), anhidrasa carbónica (29), Ovoalbumina (45), GLCN6P desaminasa silvestre (180). El gel se precorre 1 h a 30 mAmp.

Procedimiento:

Los amortiguadores y las soluciones utilizadas se detallan en la sección del apéndice.

- las placas de teflón y los vidrios se lavan y se secan con metanol. Se arman junto con los separadores de 0.75 cm y separados con placas de plástico. El empaquetado se coloca en la cámara gelificadora.

- la cámara de dilución es conectada por una manguera a la cámara gelificadora y una bomba peristáltica.

- en la cámara de dilución se coloca el metanol al 20 % y se bombea a la cámara gelificadora hasta que toque la base de las placas de teflón. Se detiene el flujo. Se quita el metanol que quedó de la cámara de dilución.

- se coloca la acrilamida al 8 % en la cámara de dilución y en la cámara de reposición la que está al 30 % manteniendo a ambas cámaras en agitación. Se cuida de que no existan burbujas en las mangueras y en las cámaras.

- se adiciona el TEMED en ambas cámaras y se procede al llenado de la cámara de gelificación con un flujo lento. Al terminar la acrilamida en la cámara de dilución se adiciona la sacarosa al 20 % sin introducir burbujas hasta que la fase de acrilamida llene las placas, se detiene el flujo y se deja gelificar.

- precorrer el gel antes de usar por 1 hr. a 30 mAmp.

- las muestras pueden estar concentradas en glicerol o bien añadir sacarosa para darles densidad.

- el gel se tiñe con azul de comassie o con sales de plata o bien se puede transferir a una membrana de nitrocelulosa para revelado con anticuerpos específicos.

VI RESULTADOS

Mutante Y254W

6.1 Purificación de la mutante Y254W

Se obtuvo el lote de enzima dos a una concentración de 44.8 uM, lo que equivale a 9.0 mg/ml. La pureza de la enzima se determinó por geles en condiciones desnaturizantes de SDS (Fig. 7); en cada una de las etapas de purificación fue confirmada la sobreexpresión de la enzima por este método. La enzima presenta solo una banda en el gel de SDS-poliacrilamida. En la figura 7 se puede observar el enriquecimiento de la enzima a lo largo del proceso de purificación, mediante un gel en condiciones desnaturizantes de SDS.

6.2 Caracterización fisicoquímica de la mutante Y254W

Punto isoelectrico

Los resultados de la enzima se encuentran resumidos en la tabla 8. El punto isoelectrico estimado para la mutante Y254W fue determinado utilizando geles de electroenfoque en poli(acrilamida) (ver material y métodos), posteriormente se midió el pH sobre el gel, el valor estimado fue de $pI=6.40$. El punto isoelectrico teórico para esta mutante fue de 6.44 y se estimó por el programa llamado PC/GENE A. Bairoch Universidad de Ginebra, Suiza. 1990.

Absorividad Molar

Las condiciones del experimento se detallan en el apartado de material y métodos. La absorividad molar de la mutante Y254W presenta un valor de $\epsilon_{Y254W}=21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm en total se titulan 2 SH por cadena en condiciones nativas y con la adición de SDS al 10% se titulan 3 SH por cadena.

Peso molecular

El peso molecular estimado para las mutante Y254W y Y254F es de $PM=180 \text{ Kd}$. (Fig. 8 y 9)

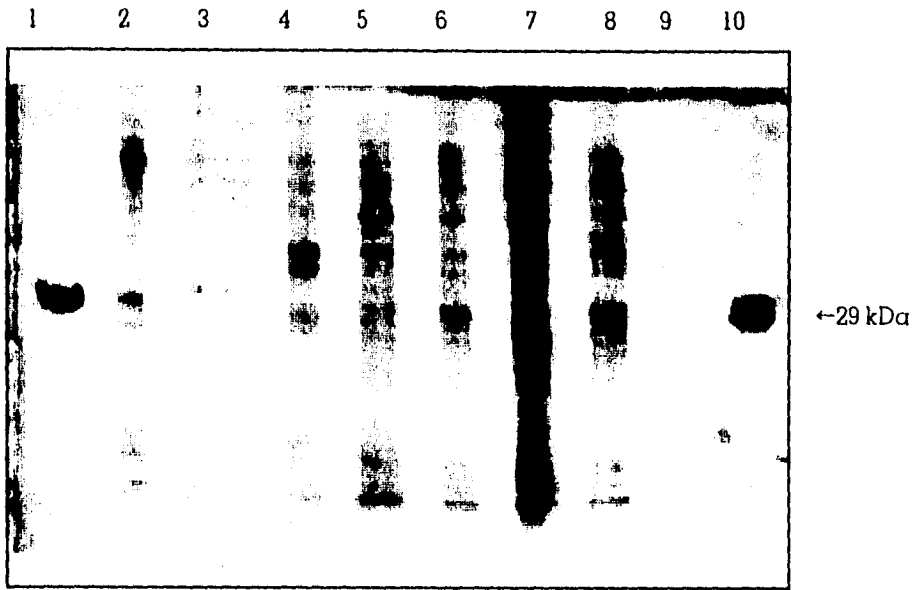


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes en SDS. Patrón electroforético de algunas fracciones en la etapa de purificación de la enzima Y254W. Se muestran los extractos de proteína en las diferentes etapas de la purificación y el enriquecimiento de la mutante. De izquierda a derecha. 1.- Enzima silvestre (marcador de PM) 2.- Biomasa de placa 3 y 4 Extracto de preinoculo 5.-Extracto de fermentador 6.- Extracto del sonicado 7.- Precipitación al 45% 8.-Precipitación al 70% 10.- Enzima pura.

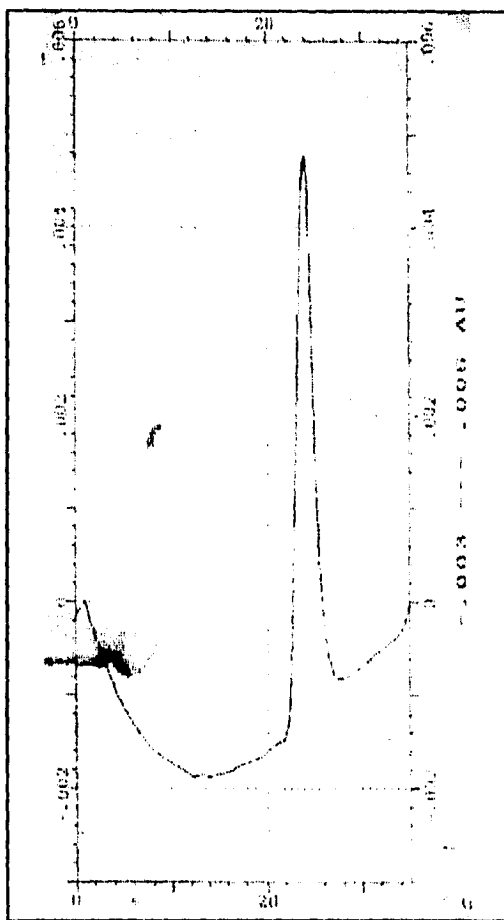


Figura 8. Perfil cromatográfico de la enzima Y254W desaminasa realizado en cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). El peso molecular calculado fue de 180 kD.

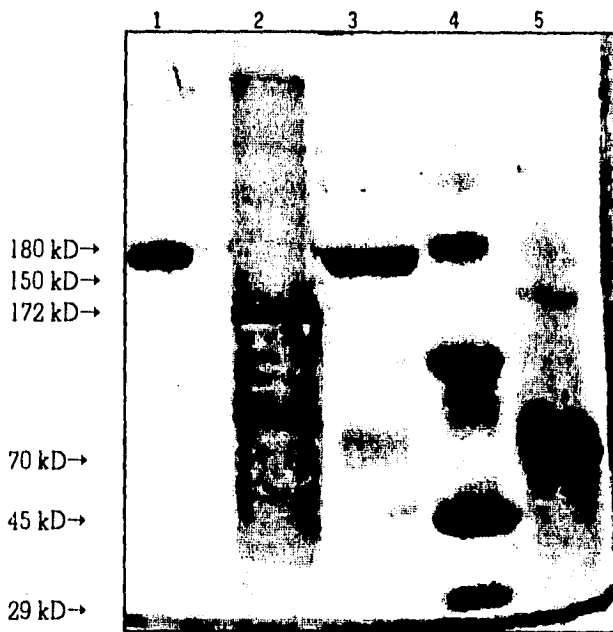


Figura 9. Electroforesis en gradiente de poro del 4 al 30% en condiciones nativas. De izquierda a derecha. 1.- Enzima Y254W desaminasa 2.- Enzima Y254UGA desaminasa 3.- Enzima Y254F desaminasa 4.- Enzima silvestre (180), anhidraza carbonica (29) ovoalbumina (45) 5.- Hemoglobina (70) Alcohol deshidrogenasa (150).

6.3 Caracterización cinética

En la dirección de formación de Fru6P y amonio la enzima es estable y presenta una cooperatividad homotrópica positiva con respecto al sustrato GlcN6P menor que la enzima silvestre, el valor obtenido para el coeficiente de Hill es de $h_{max} = 1.74 \pm 1.1$ mientras que en la enzima silvestre corresponde a un coeficiente de $h_{max} = 3 \pm 0.09$. Lo interesante en esta mutante es la intensa inhibición por sustrato que presenta (Fig. 10). Segel (1989), define a la inhibición por sustrato de la siguiente manera "La mayoría de las inhibiciones por sustrato resultan de la combinación del sustrato con una forma de la enzima equivocada y en general ésta solo aparece con concentraciones elevadas de sustrato o bien cuando la reacción se estudia en condiciones no fisiológicas."

Las cinéticas en presencia del activador alostérico se ajustaron a la ecuación 1 de Michaelis-Henri-Menten clásica con inhibición por sustrato cuando la enzima está activada por completo por la GlcN:Ac6P (Tabla, 1):

Ecuación 1

$$v = \frac{V_{max}(S)}{K_s + S + S^2/K_i(S)}$$

Donde:

K_s = cte de Michaelis-Menten para el sustrato

v = velocidad inicial de la reacción

El valor de K_i que es la constante de inhibición para el sustrato, en ausencia del activador alostérico es de 109.5mM y de 3.9mM en presencia de este. Es importante señalar que éste último valor es del mismo orden de magnitud que la constante de afinidad para el sustrato $K_m = 2.21$. Estos valores sugieren que el sitio activo se encuentra alterado.

Mediante la ecuación 2 y por métodos de regresiones no lineales fueron ajustados los resultados cinéticos en ausencia del activador (Tabla 1 y 8) (ecuación de Hill clásica con inhibición por sustrato. Seagel, 1989):

Ecuación 2

$$v = \frac{V_{max}(S^h)}{K'(1+S^h/Ki+S^h)}$$

donde:

V_{max} = velocidad máxima de la reacción.

h = coeficiente de Hill

S = sustrato

K' = $S_{0.5}$

Ki = Constante de inhibición para el sustrato

La cinéticas también pueden describirse con la siguiente ecuación, derivada de los postulados del modelo alostérico de Monod- Wyman y Changeux (MWC) en la que se toma en cuenta la inhibición por sustrato.

Ecuación 3

$$v/V_{max} = \frac{L\alpha(1+\alpha+d\mu)^{n-1} + \alpha(1+\alpha+\mu)^{n-1}}{L(1+\alpha+d\mu)^n + (1+\alpha+\mu)^n}$$

Donde los parámetros corresponden a la ecuación de MWC, y además d es la constante de fijación no exclusiva del sustrato en su unión como inhibidor, y $\mu = [\text{sustrato}]/K_r K_i$.

Se proponen tres caminos para explicar la inhibición por sustrato:

Primero, la posibilidad de la entrada al sitio activo de dos moléculas de GlcN6P, esta hipótesis la consideramos la más improbable desde el punto de vista estructural, por impedimento estérico, el complejo sería E-GlcN6P-GlcN6P. Segundo, la entrada de dos azúcares fosforilados (GlcN6P) y Fru6P formando el complejo abortivo E-GlcN6P-Fru6P. Tercero, la entrada del azúcar (GlcN6P) y del ión amonio al sitio activo, E-GlcN6P-NH₄⁺. Estas posibilidades involucran la formación de un complejo ternario improductivo que se muestran en la figura 11.

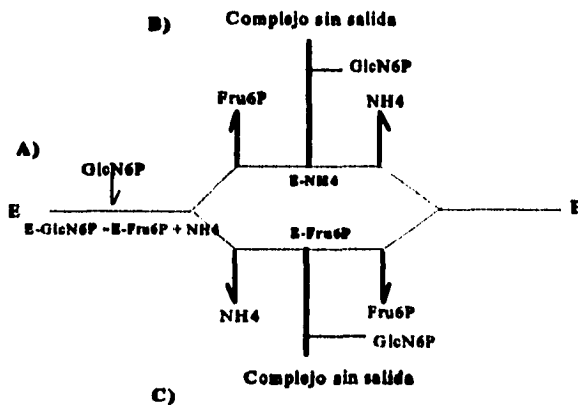


Figura 11. La enzima GlcN6P desaminasa sigue un mecanismo rápido al azar. Hipótesis posibles que explican la inhibición por sustrato. A) formación del complejo ternario abortivo E-GlcN6P-GlcN6P B) Complejo E-Fru6P-GlcN6P C) Complejo E-NH₄-GlcN6P.

6.3.1 Estudio cinético de la inhibición por sustrato.

La posibilidad anterior de que el sitio activo pudiera estar recibiendo más de un sustrato fue estudiada en presencia de diferentes ligandos para reconocer al complejo involucrado en la inhibición; GlcN-ol-6P (glucitolamina 6 fosfato), NH₄⁺, Fosfatos, Fru6P, dR5P (D-ribosa 5 fosfato). A continuación se detallan los resultados cinéticos obtenidos para cada ligando.

6.3.2 Efecto de la GlcNAc6P en la inhibición por sustrato.

Los resultados del estudio enzimático de la mutante Y254W en presencia y ausencia del activador alostérico se muestran en la tabla 1. Las observaciones de los datos experimentales y teóricos evidencian en primer lugar una marcada inhibición por sustrato que varía desde un valor de $K_i=109.46$ mM en ausencia del activador y de $K_i=3.9$ mM en presencia de este, la inhibición se confirma por el coeficiente K/K_m que tiene un valor de 9.16 en ausencia del activador y de 1.76 en presencia de éste; al mismo tiempo los valores para la constante de

afinidad de la enzima por el sustrato van disminuyendo desde un valor de $S_{0.5}=11.95$ hasta $K_m=2.21\pm 0.09$ lo cual partiendo de las ecuaciones corresponden a un incremento en la afinidad de la enzima por el sustrato. El hecho de que los parámetros cinéticos de K_m y K_i se encuentren en el mismo orden de magnitud nos hace suponer que el sitio activo ya no puede discernir entre la entrada de el azúcar en la posición correcta de la incorrecta.

Como se muestra en la figura 10, se comporta como un sistema alostérico K puro activado por GlcNAc6P, presentando una cooperatividad homotrópica positiva menor que la enzima silvestre con un coeficiente de $h_{max}=1.7$. La transición de T a R incrementa la K_i . La constante catalítica k_{cat} permanece constante a lo largo de los experimentos.

Tabla 1. Datos cinéticos de Y254W a diferentes concentraciones del activador alostérico.

GlcNAc6P mM	k_{cat} s ⁻¹	h_{max}	$S_{0.5}$ ó K_m mM	K_i mM	K_i/K_m
0	1396	1.74	11.95	109.46	9.16
.005	1676.2	1.41	9.89	6.41	6.31
.1	1549	1.06	5.34	12.8	2.39
.5	1442	1.01	1.13	17.01	15.0
1	1288	1.01	0.915	8	8.77
2	1600	1.02	1.8	9.9	5.5
7.5	1250.5	1.004	1.33	5.9	4.44
10	1580	.96	1.64	5.5	3.35
16	1335	1.07	2.21	3.9	1.76

6.3.3 Efecto del ion amonio en la inhibición por sustrato a concentraciones fijas de GlcNAc6P.

Estudiando la hipótesis más factible, que es la formación del complejo ternario E-NH₄-GlcN6P, ya que el ion amonio es una molécula pequeña, se varió la concentración de éste manteniendo la concentración del activador alostérico a 2mM; manteniendo la fuerza ionica constante con KCl.

El efecto del amonio sobre la inhibición por sustrato que presenta la mutante Y254W se muestra en la tabla 2 y en la figura 12. La fracción K_i/K_m se mantuvo constante a lo largo de los experimentos en valores de 1.02 a 1.36. Los valores de la constante cinética K_i se mantienen constantes por lo que la inhibición por sustrato no se vió modificada por la presencia del ion amonio.

Tabla 2. Efecto del ion amonio sobre la inhibición por sustrato en presencia del activador alostérico(2mM).

[KCl-NH ₄] mM	k_{cat} s ⁻¹	h_{max}	K_m mM	K_i mM	K_i / K_m
10mM	2198.75	.96	6.236	8.51	1.36
20mM	2710.53	.99	2.748	10.43	3.80
40mM	1213.28	.913	11.136	14.69	1.32
60mM	893.7	1	10.612	13.412	1.26
90mM	1129.16	1.025	14.140	14.46	1.02

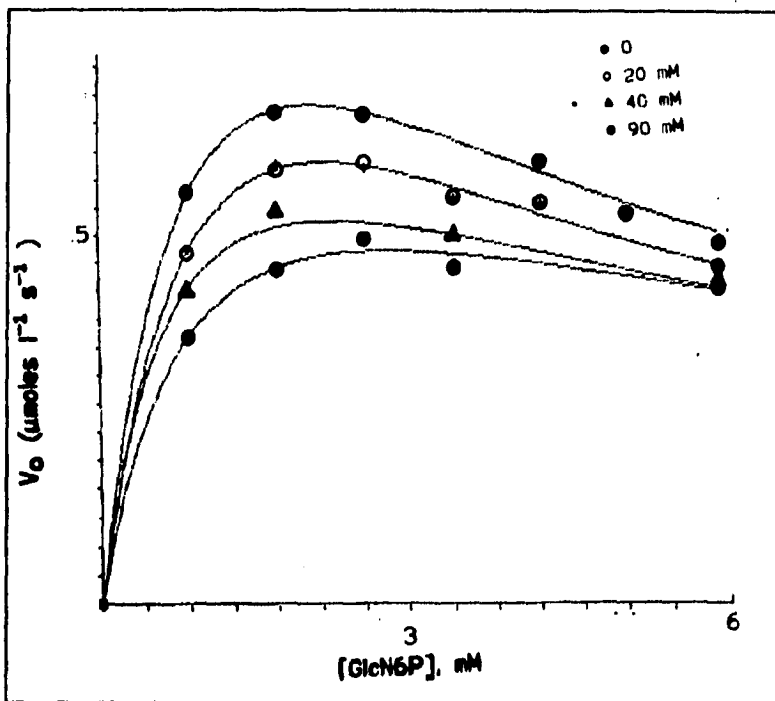


Figura 12. Efecto del ion amonio en la inhibicion por sustrato de la enzima Y254W desaminasa. El amonio no modifico la K_i para la enzima.

6.3.4 Efecto del inhibidor sin salida GlcN-ol-6P (glucitolamina 6 fosfato) en la mutante Y254W en presencia del activador alósterico (16mM).

Para estudiar la posibilidad de inhibición del complejo E-Fru6P-GlcN6P se realizaron experimentos en presencia de análogos de la fructosa-6-P, como lo es la GlcN-ol-6P, dR5-P y con grupos fosforilados (fosfatos). Los datos cinéticos se muestran en las tablas 3, 4 y 5.

Los valores para la fracción de k_i/k_m fueron de 3.45 a una concentración del inhibidor GlcN-ol-6P de 1 μ M y en una concentración final de 20 μ M la fracción k_i/k_m es de 1.33, este valor es más pequeño que aquel donde solo está presente el activador a una concentración de 16mM que es de 1.76. Estos valores muestran un ligero aumento en la inhibición.(Fig.13).

Tabla 3. Efecto del inhibidor sin salida GlcN-ol-6 en la mutante Y254W a una concentración de 2mM de activador alostérico.

[GlcN-ol-6P] μ M	k_{cat} s^{-1}	I_{max}	k_m mM	K_i mM	K_i/k_m
1	1014.5	1.003	2.85	9.843	3.45
5	622.36	1.14	4.67	27.86	5.8
10	711.85	.994	14.396	71.86	4.99
20	1200	1.05	42.94	57.02	1.33

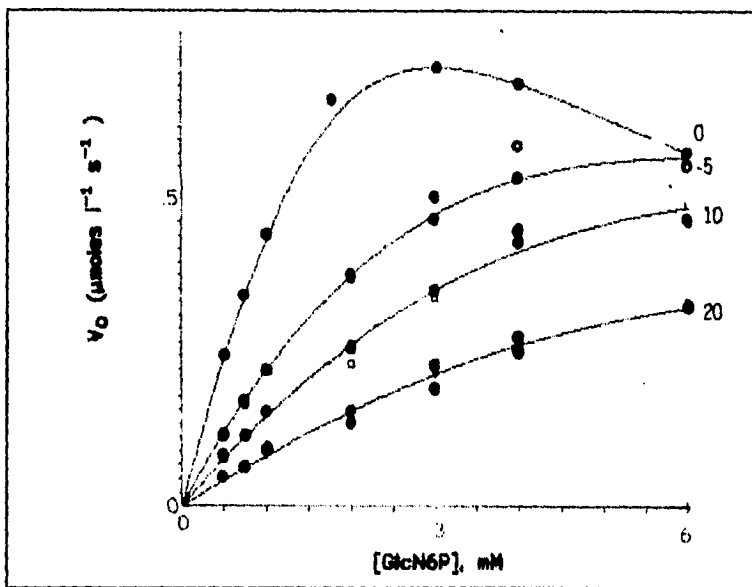


Figura 13. Efecto del inhibidor sin salida GlcN-ol-6P en la inhibición por sustrato de la enzima Y254W desaminasa.

6.3.5 Efecto de la concentración de fosfatos en la inhibición por sustrato de la enzima Y254W en presencia del activador alósterico (2mM)

La presencia de fosfatos en la reacción cinética de la enzima no incrementa en gran magnitud los valores de K_i para la enzima sino que practicamente se mantienen en valores como los obtenidos por el activador (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de fosfatos en la actividad enzimática de la mutante Y254W en presencia del activador alostérico a una concentración de 2mM

[Fosfatos] mM	k_{cat} s ⁻¹	h_{max}	K_m mM	K_i mM	k_i/k_m
10mM	1126	1.04	.9735	14.32	14.76
20mM	1650	1.02	.50962	11.12	21.82
40mM	1100	1.00	.98832	5.899	6.01

6.3.6 Efecto de la dR-5-P en presencia de 2mM de activador sobre la Y254W

Los experimentos realizados variando la concentración de la dR-5-P muestran un comportamiento similar a los experimentos a diferentes concentraciones de GlcNAc6P, en este caso los valores para la constante de inhibición corresponden a un valor de $K_i=5.918$ mM. (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la dR-5-P manteniendo fijo el activador alostérico a una concentración de 2mM.

[dR-5-P] mM	k_{cat} s ⁻¹	h_{max}	K_m mM	K_i mM	K_i/K_m
10mM	807	.831	.61008	5.918	9.676

6.3.7 Efecto de la Fru6P en la inhibición por sustrato de la mutante Y254W

Los experimentos en presencia de Fru6P se realizaron utilizando un pHstato (Radiometer) manteniendo la concentración fija de amonio y GlcNAc6P. Gracias a esta técnica logramos obtener los parámetros cinéticos de la inhibición causados por este ligando. Los resultados se presentan en la figura 14, donde podemos observar los valores para la constante de inhibición K_i , a concentraciones fijas del activador alostérico (2mM) con un valor de 9.9 mM mientras que el valor que se obtiene en presencia de 2mM de Fru6P es de $K_i = 0.7$ mM. Estos resultados apoyan la presencia del complejo ternario sin salida E-Fru6P-GlcN6P, como el causante de la inhibición que presenta la enzima.

Segel describe un modelo de inhibición por sustrato en un sistema alostérico mixto K/V. Los experimentos anteriores no apoyan el modelo que Segel describe como un modelo de inhibición por sustrato en un sistema alostérico mixto K/V. El sistema mixto supone que cada uno de los 2 estados (T y R) presenta afinidades diferentes por el sustrato y además describe que cada uno de estos estados tiene diferente actividad catalítica; pero si suponemos que el estado R presenta una afinidad muy alta por el sustrato pero a su vez tiene una actividad catalítica muy baja el resultado sería una enzima con cooperatividad positiva pero con inhibición por sustrato. y conforme aumentara el activador alostérico la inhibición desaparecería puesto que se esta desplazando el equilibrio hacia el estado R. Lo descrito anteriormente no describe el comportamiento cinético que presenta la mutante Y254W puesto que a concentraciones crecientes del activador alostérico la inhibición no disminuye sino que incrementa la inhibición.

6.3.9 Termodinámica de unión del activador alostérico mediante dicroísmo circular

La unión del GlcNAc6P muestra una unión de tipo sigmoide o cooperativo, la constante de disociación calculada a partir de este experimento es de $K_d = 211 \pm 92$ μ M que en comparación con la enzima silvestre es menos áfn por el activador ya que el valor para la enzima silvestre es de $K_d = 30$ μ M. La curva de saturación de la mutante con el activador alostérico usando el $\Delta[\theta]$ a 278 nM como señal analítica se muestra en la gráfica. La unión de tipo cooperativa que presenta esta mutante indica que aún se trata de un sistema de tipo K puro. (Figura 15).

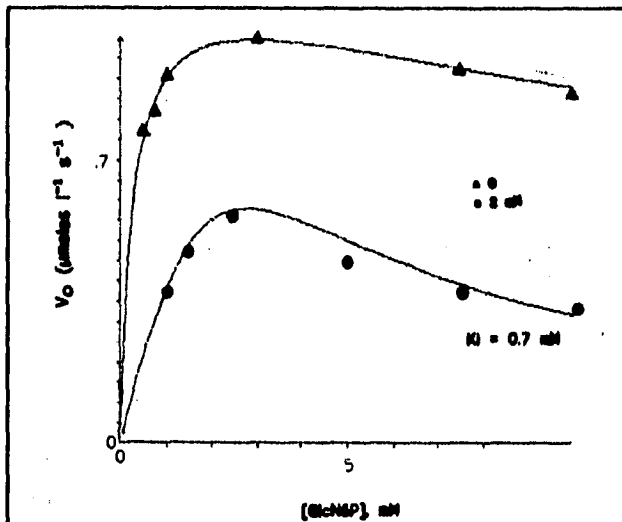


Figura 14. Efecto de la Fru6P en la inhibición por sustrato de la enzima Y254W desaminasa. Este experimento apoya el complejo E-GlcN6P-Fru6P.

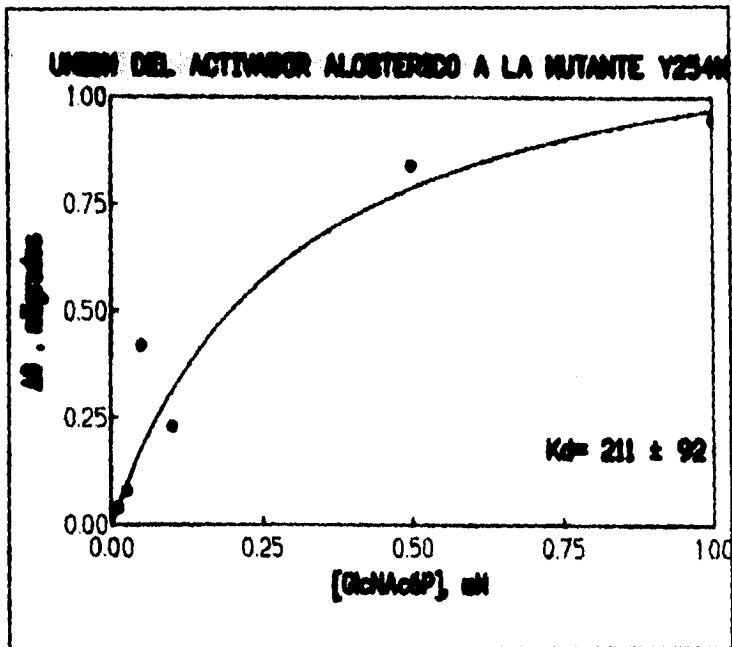


Figura 15. Curva de saturacion de la mutante Y254W con la GlcNAc6P, usando el $\Delta\theta$ a 290 nm como señal analítica.

6.4 Caracterización fisicoquímica de la mutante Y254F

En el proceso de la purificación al igual que las mutantes anteriores, se midió la actividad. La concentración de enzima resultante es de $3.13 \mu\text{M}$ lo que equivale a 0.626 mg/ml . En la figura 16 se muestra el enriquecimiento de la proteína durante la purificación y la pureza de la misma.

Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico estimado para esta mutante es de $\text{pI}=6.3$ que se calculó de la misma manera que para la mutante Y254W (ver material y métodos). El punto isoelectrico calculado por el programa Pc/Gene A. Bairoch Universidad de Ginebra, Suiza 1990, fue de 6.44.

Absortividad molar

La absortividad molar calculada presenta un valor de $\epsilon^{275}_{\text{Y254F}}=24 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, en total se titula 1 SH por cadena en condiciones nativas y 3 SH en condiciones desnaturalizantes.

Peso molecular

El cálculo del PM en geles de gradiente de poro de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, dió como resultado un $\text{PM}=180 \text{ Kd}$. (Fig. 9)

6.5 Caracterización cinética de la mutante Y254F

Los estudios cinéticos de la mutante Y254F muestran una cooperatividad homotrópica positiva con un Hill máximo de 1.75 ± 1.1 . Es una enzima alostérica que se comporta como un sistema de tipo mixto caracterizado por la modificación de la V_{max} y de la constante que describe la afinidad por el sustrato. La mutación no causó inhibición por sustrato en esta mutante. Los datos cinéticos (tabla 6) se ajustaron por regresión no lineal, las ecuaciones para el ajuste de los datos fueron las ecuaciones de Michaelis, de Hill o a una ecuación derivada del modelo de MWC (ecuación 4).

Ecuación 4

a) Michaelis-Henri

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + S}$$

b) Ecuación de Hill

$$v = \frac{[S]^h (V_{max})}{K' + [S]^h}$$

c) Ecuación de MWC

$$v = \frac{V_{max} (S/kr)(1+S/kr)^{n-1} + (L)(c)(S/kr)(1+c(s/kr)^{n-1})}{(1+S/kr)^n + L(1+c(S/kr)^n)}$$

donde

$$c = \frac{[kt]}{[kr]}$$

[kt] = constante de afinidad del conformero T

[kr] = constante de afinidad del conformero R

$$L = \frac{[T]}{[R]}$$

L = es la constante alosterica (la cooperatividad depende de n, L y c)

En la figura 17 se muestra el comportamiento cinético de la enzima Y254F. La enzima presenta una cinética de tipo mixto K y V con predominio del sistema V (ésto se confirma con la unión del activador), lo cual es posible explicar a la luz del modelo de MWC que supone que el estado R y T presentan diferentes afinidades por el sustrato y además la actividad catalítica para cada uno de estos estados es diferente.

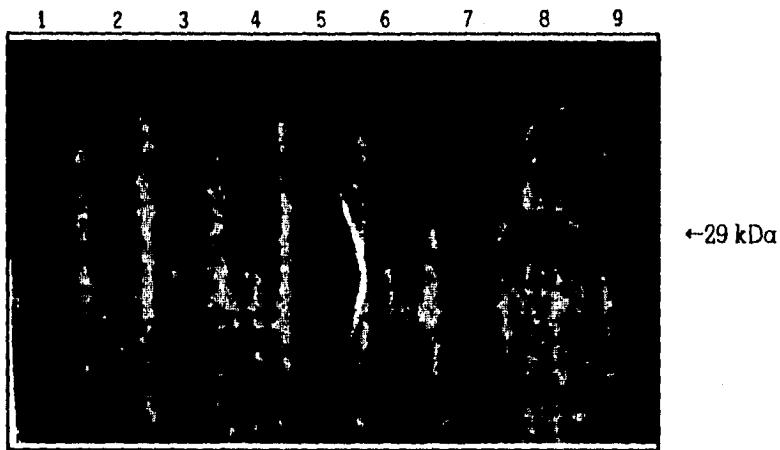


Figura 16. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes con SDS. De izquierda a derecha. 1 y 2 extracto de placas 3 y 4 extracto de preinoculos 5 y 6 extractos del fermentador y 7 extracto del sonicado, 8 enzima Y254F pura 9.- enzima silvestre.

Tabla 6. Datos cinéticos para la mutante Y254F, a diferentes concentraciones de GlcNAc6P.

GlcNAc6P mM	k_{cat} s ⁻¹	h_{max}	Vmax	S _{0.5} ó K_m mM
0	218.33	1.753	.7421	12.815
0.1	534.99	1.93	2.66	19.76
0.3	490.65	1.385	3.62	44.43
0.5	439.08	1.48	2.62	44.42
1	377.32	1.36	1.70	10.46
2	427.68	1.324	.2916	1.832
3	327.24	1.1478	.6797	2.095
5	345.99	1.11	.5396	2.03

6.6 Experimentos por dicroísmo circular

La unión del activador alostérico a la mutante Y254F descrita por la curva de saturación usando el $\Delta[\theta]$ a 292 nM como señal analítica describe una unión de tipo hiperbólica (figura, 18), lo cual es una prueba que apoya el predominio del sistema V que sufre la enzima por la mutación. El valor de la constante de disociación de la enzima dada por el parámetro K_d es de 6.29 μ M, lo cual es 5 veces menor que la K_d para la enzima silvestre que tiene un valor de 30 μ M y lo cual no explica por que la enzima no tiene afinidad por el análogo del activador alostérico en la columna de cromatográfica de afinidad alostérica.

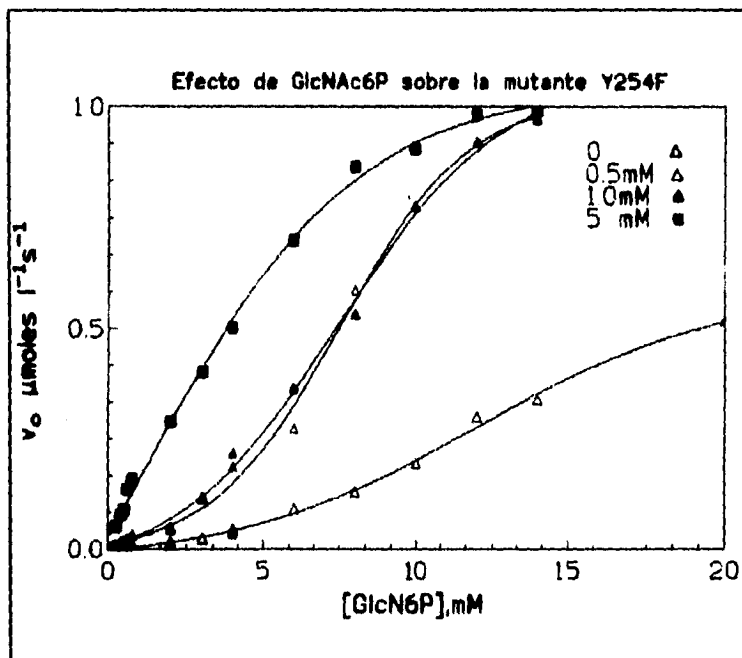


Figura 17. Cinética enzimática de la mutante Y254F. Efecto del activador alostérico. La enzima presenta una cinética de tipo mixto K_y con predominio de V .

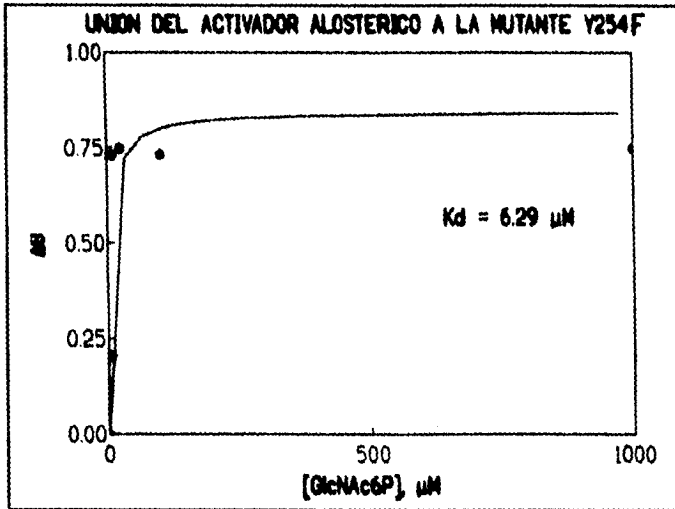


Figura 18. Unión del activador alostérico a la mutante Y254F, usando el $\Delta\theta$ a 292 nm como señal analítica.

6.7 Caracterización fisicoquímica de la mutante Y254UGA

En cuanto a está mutante, se ha encontrado que es inestable y no ha sido posible obtener grandes cantidades de enzima pura. Los estudios de esta mutante se realizaron con fracciones de sulfato de amonio parcialmente purificados (Fig. 19).

El peso molecular estimado es de 172 kDa y su punto isoeléctrico es de 6.9 (Fig.9).

6.8 Caracterización cinética de la mutante Y254UGA

Los resultados experimentales fueron ajustados a las ecuaciones de Michaelis-Menten y Hill utilizando regresiones no lineales (ecuación 4, a y b). La cooperatividad homotrópica positiva evaluda por el coeficiente de Hill es de $h_{max} = 2.04 \pm 0.19$. (Tabla 7, Fig.20).

La importancia del extremo carboxilo terminal en la estabilidad de la enzima se ha podido dilucidar a través de está mutante, ya que la mutación disminuyo grandemente la estabilidad de la enzima, ejemplo de ello fueron los multiples esfuerzos por purificarla por diferentes técnicas en las cuales la enzima perdia su actividad enzimatica.

Tabla 7. Cacterización cinética de la mutante Y254UGA

GlcNAc6P mM	k_{cat} s ⁻¹	h_{max}	S0.5 ó Km mM
0	348.83	2.04	34.40
2	304.47	1.086	0.9298

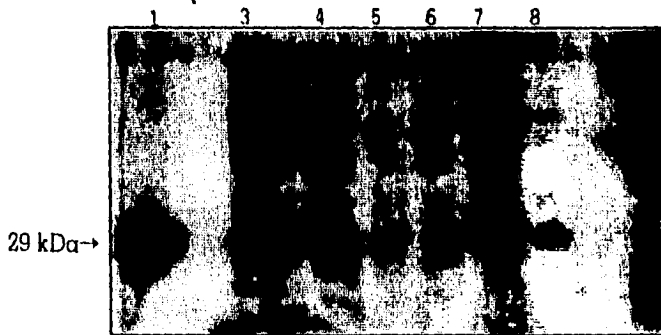


Figura 19. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes SDS. De izquierda a derecha. 1.- enzima silvestre 3.- extracto de placas 4.-extracto de preinoculos 5 y 6 precipitacion salina 7.-sonicado 8.-extracto de Y254UGA puro de HPLC en una columna de intercambio ionico.

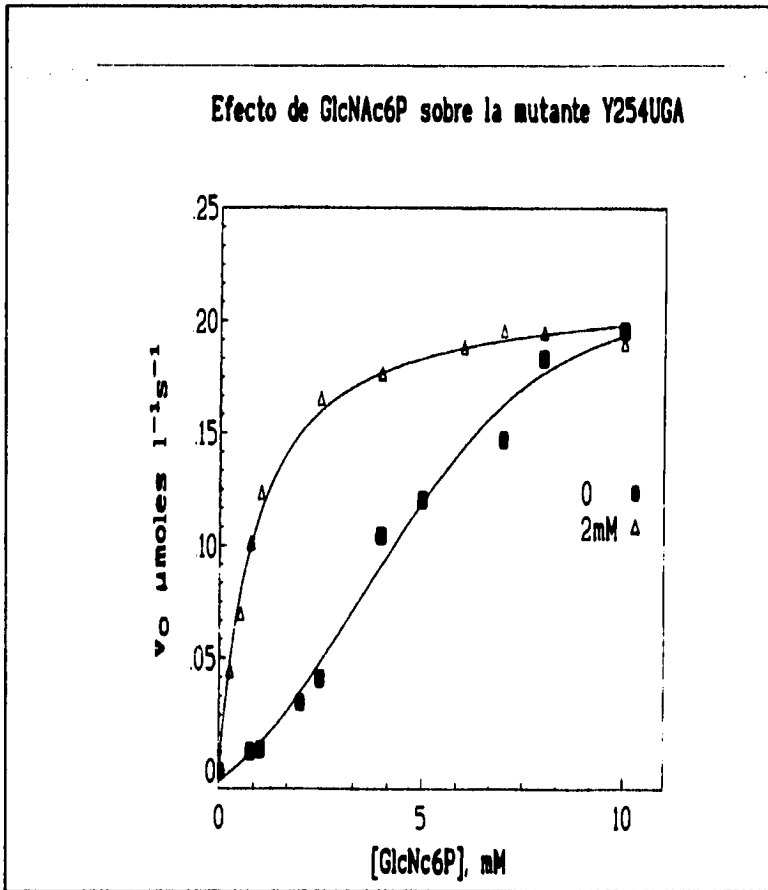


Figura 20. Cinética de la mutante Y254UGA. Efecto del activador alostérico.

VII Discusión

El estudio por técnicas de modificación química puede dar la pauta para la identificación de residuos importantes desde el punto de vista funcional o estructural además de que este tipo de estudios proporciona mucha información sobre el papel de las cadenas laterales de los aminoácidos en la función de una proteína, pero la asignación de un residuo en especial en una función específica, sólo puede ser determinada por estudios de mutagénesis dirigida, aunque debe tomarse en cuenta que un solo residuo probablemente no determine esa función al 100% además de que existe la posibilidad de que una función en particular resulte alterada como consecuencia de cambios conformacionales producidos por la mutación y no por el residuo en sí.

Las mutantes de la enzima GlcN6P desaminasa en la posición 254 son un excelente modelo experimental para analizar el significado de la aparición de un sistema mixto desde el punto de vista estructural.

En la proteína silvestre, que es un sistema alostérico K puro, las evidencias cinéticas y el modelo cristalográfico de la enzima, muestran que las formas T y R tienen un sitio activo diferente. Los modelos de las formas R y T permiten observar un cambio en la forma de unión del fosfato del sustrato por parte de R172 y K205 y T44 principalmente porque cambian ligeramente su posición aproximándose en la forma R. Esto, naturalmente, explica la cooperatividad, observada en la enzima silvestre y que está presente también en estas mutantes. Sin embargo, en la enzima silvestre la afinidad por el sustrato de transición es la misma, tanto para R como para T cosa que no sucede con la enzima mutante Y254F por lo que aparece un efecto V superpuesto a la cooperatividad homotrópica (tabla 6, Fig. 16). Esto ha sido observado en otras enzimas y también en otras mutantes de la GlcN6P desaminasa (Altamirano y col., 1995), como consecuencia de la mutagénesis. La estructura cristalográfica de la desaminasa permite discutir el comportamiento de las mutantes. Por cristalografía (Horjales y col., 1992) este residuo interacciona con la hélice 5 (figuras 21 y 22, parte superior) que es una región importante en el sitio activo de la enzima, produciéndose probablemente, un cambio conformacional en este sitio que puede explicar el comportamiento de las mutantes. Tal vez exista una presión de selección que favorezca la existencia de sistemas K puros en las proteínas

silvestres, pero que se trata de una situación que puede distorsionarse muy fácilmente como consecuencia de cambios conformacionales debidos a la mutación y que pueden propagarse a distancia en la molécula. Llama la atención que los sistemas alostéricos mixtos mejor caracterizados provienen de manipulaciones de la estructura nativa de las proteínas alostéricas. Una posible causa de esta preferencia de los sistemas biológicos por una regulación alostérica de tipo K con respecto a los sistemas V puros o mixtos ha sido planteada por Altamirano y col. (1995). La selección natural favorecería a los sistemas K porque ofrecen una curva de respuestas de la actividad con respecto al modulador alostérico que siempre es sigmoide, lo que permite mejor control metabólico que una respuesta poco cooperativa como se observa en los sistemas mixtos; o completamente hiperbólica, como en los sistemas V puros. En este contexto es interesante mencionar que en nuestro grupo tenemos el primer sistema alostérico de tipo V puro silvestre reportado hasta ahora, es el de la GlcN6P desaminasa de riñón de bovino. La GlcN6P humana recombinante, presenta este tipo de cinética, que es del todo excepcional en proteínas alostéricas.

Será interesante en un futuro obtener la estructura cristalográfica de estas mutantes; libres y en complejo con Fru6P o GlcN-ol-6P, para poder establecer con precisión las causas estructurales de este comportamiento alostérico mixto.

La mutante Y254F al carecer de la posibilidad de interacción con el residuo 151 y 152 de la subunidad vecina, ya que no tiene el hidroxilo fenólico, crea una distorsión permanente en la estructura del sitio alostérico de dicha subunidad vecina, propagada por el motivo cadena beta B' -hélice 5- cadena beta C', a cuya base se une el OH de la Tyr254 en la enzima nativa; Este motivo es la estructura que se cierra sobre el sustrato y los intermediarios subsiguientes en la secuencia del mecanismo de la reacción de la desaminasa. La alteración causada por la pérdida de la interacción del OH genéticamente suprimido, haría que la conformación del sitio ya con el sustrato unido, no sea la óptima para la catálisis (tabla 6, figura 10).

La mutante Y254W presenta una alteración cinética completamente diferente a la anterior. Ya no se observa el efecto K/V o mixto, probablemente por que el nitrógeno indólico del triptofano puede interactuar con el residuo K160 de la subunidad vecina, como lo hace el OH fenólico de la tirosina. Una situación semejante; en la sustitución de la Tyr121 por Trp ha sido descrita por Altamirano y col (1995).

La sustitución por triptofano de la Tyr 254 produce una marcada inhibición por sustrato.

En general, las inhibiciones por sustrato se deben a la formación de diferentes complejos ternarios (figura 11).

El más factible en nuestro caso sería el complejo E-GlcN6P-NH₄⁺, y podría aparecer en la mutante como consecuencia de la distorsión del sitio activo por la presencia de un residuo más voluminoso en posición 254.

La prueba cinética de la existencia de este complejo sería el aumento de la inhibición por sustrato por el ión amonio, el cual a su vez es un inhibidor competitivo (producto inhibidor en un sistema en equilibrio rápido al azar). Los resultados de este trabajo llevan a descartar esta hipótesis: el ión amonio no afecta la inhibición, sin embargo la Fru6P pudo estudiarse mediante una técnica especial, la medida del avance de la reacción a través del cambio de pK entre sustrato y producto.

Los resultados muestran claramente un aumento de la inhibición por sustrato, en presencia de una concentración fija de Fru6P (Fig. 14). Esto puede llevar a plantear que el complejo abortivo que causa la inhibición por sustrato sería el de la E-GlcN6P-Fru6P.

Si bien esto puede ser una conclusión cinética válida, resulta poco sostenible desde el punto de vista estructural donde habría que suponer una distorsión tan grande del sitio activo en el que existan simultáneamente dos moléculas de hexosa-fosfato. Este análisis nos ha llevado a discutir otras posibles interpretaciones de la cinética de la mutante Y254W. Una de ellas, y que resulta muy atractiva es suponer que la Y254W es también un sistema alostérico mixto, pero en el cual la transición de T a R produce una enzima que si bien es más afin por la GlcN6P, tiene una k_{cat} menor (efecto K positivo combinado con efecto V negativo). De hecho, la misma ecuación que permite describir un sistema mixto, ya mencionado arriba. Sin embargo esta explicación unitaria de los cambios cinéticos en Y254F y Y254W considerandolos como sistemas que se han vuelto de tipo mixto como consecuencia de las mutaciones, no es tampoco sostenible de acuerdo a nuestros datos experimentales. Si la inhibición por sustrato se debe a que la k_{cat} para la forma R es menor que el valor correspondiente para la forma T, entonces una concentración saturante del activador alostérico haría desaparecer la inhibición por sustrato y la enzima tendría cinética hiperbólica con la k_{cat} menor (k_{cat} de la forma R). Los resultados experimentales muestran que la k_{cat} no disminuye. Tampoco desaparece la inhibición por

sustrato si no que por el contrario los valores de K_i disminuyen.

Este análisis nos lleva a plantear que tal vez no sea posible analizar estas mutantes con un modelo simple de dos estados. De hecho, un estado alostérico intermediario ha sido detectado en la actividad alostérica de algunas mutantes de la desaminasa (Altamirano, 1995).

En este caso de la mutante Y254W podríamos replantear la hipótesis de que la aparente inhibición por sustrato es de causa alostérica, es decir que los valores de la k_{cat} cambian desfavorablemente para la reacción con la transición de T a R.



Resulta atractivo proponer un modelo que explique al mismo tiempo la inhibición por sustrato de la mutante Y254W y la cinética de tipo mixto con predominio de V, que se presenta en la enzima Y254F. Por otra parte la interpretación de la inhibición por sustrato en términos de un complejo abortivo clásico es insostenible por los datos cinéticos de este trabajo: si el complejo abortivo "clásico" enzima-GlcN6P-NH₄ fuera la causa de la inhibición, esta estaría considerablemente aumentada en presencia del ion amonio, esto último no sucede como puede observarse en la tabla 2, figura 12 .

El efecto de la Fru6P puede observarse como un incremento de la inhibición de acuerdo con el análisis de los valores de K_i que se presentan en este trabajo.

Eso nos llevaría a proponer un complejo abortivo poco probable: E-GlcN6P-Fru6P. De acuerdo con la estructura del sitio activo, conocida a través de estudios cristalográficos (Olivia y col., 1995, en prensa), no parece probable la existencia de un complejo ternario con dos azúcares-

fosfato en el sitio activo.

La interpretación de estos datos cinéticos de Y254W y Y254F como la transformación de la enzima en un sistema alostérico mixto, con distintos valores de k_{cat} (R) y k_{cat} (T), que son iguales en la enzima silvestre, mientras que en Y254W la k_{cat} (R) < k_{cat} (T) y en Y254F k_{cat} (R) > k_{cat} (T).

El efecto de la GlcN6P sobre la inhibición por sustrato debería de ser el de hacer la enzima hiperbólica y producir una inhibición parcial. La V_{max} (y por consiguiente la k_{cat}) a infinita GlcNAc6P tendería al valor de k_{cat} (R) que debería de ser menor, o tal vez cero. Sin embargo, nuestros datos (Fig. 10) revelan que la GlcNAc6P no tiene este efecto. El análisis de K_i , indica que la inhibición disminuye en vez de aumentar. Cabe destacar que este análisis de K_i , se basa en la aplicación del modelo de inhibición por sustrato clásica, a la que en este caso se agrega la cooperatividad homotrópica. La aplicación de los datos obtenidos con este análisis al segundo modelo discutido, no es válida. Sin embargo el simple análisis visual de las curvas, muestra que el efecto de la GlcNAc6P no es el esperado en este segundo modelo.

El estudio de la interacción del extremo carboxilo terminal fue determinado por la mutante Y254UGA que sugiere que esta región de la proteína está involucrada en la estabilidad de la enzima. De las tres sustituciones en la enzima, en especial aquella en que se sustituyo la Tyr por Trp podemos mencionar que fue una mutacion que no modifico grandemente la eficiencia catalítica de la enzima como lo observamos en los valores de K_{cat}/K_m (tabla 8)

Tabla 8. Propiedades cinéticas de las mutantes en la posición 254 de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa.

	h_{max}	K_m mM	k_{cat} a s^{-1}	k_{cat} b s^{-1}	k_{cat} / K_m $M^{-1}s^{-1} \times 10^5$	K_i mM	K_i / K_m
Silvestre	3.02±0.09	2.01±0.05	295±15	290±17	1.45	-	-
Y254W	1.74±1.11	2.21±0.09	232±11	223±0.3	1	109 ^a 3.90 ^b	9.16 ^a 1.76 ^b
Y254F	1.75±0.11	2.03±0.16	36±0.3	57.6±0.1	0.284	-	-
Y254UGA	2.04±0.19	3.440±5	64.1±	50±	0.546	-	-

VIII Conclusiones y perspectivas

Es con base a este análisis, que concluimos en forma aún muy primaria, que no parece ser posible describir este comportamiento cinético de las mutantes en 254 de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, con base a modelos que toman en cuenta solo dos estados conformacionales de la enzima, (T y R).

Como hipótesis de trabajo para futuras investigaciones, proponemos lo siguiente:

Las mutaciones transforman un equilibrio alostérico de dos estados, simple y clásico, en uno más complejo, por ejemplo de tres estados (T, S y R). Está complejidad ya existe, pero algunos de estos estados tienen constantes de disociación o valores de k_{cat} iguales, y no es posible detectarlos por medio de experimentos cinéticos. Cuando una mutante modifica esta situación y los valores de k_{cat} que antes eran iguales, se hacen diferentes. La cinética nos revela esta situación. La complejidad ya existía, pero solo se revela cinéticamente cuando una mutación nos cambia los valores numéricos de las constantes catalíticas, como sería en este caso.

Si esto es correcto, alguna señal fisicoquímica (DC, fluorescencia, propiedades hidrodinámicas en la ultracentrifugación) podrían revelar esta complejidad en la transición alostérica.

La cristalografía de rayos X, cuando permita comparar los complejos E-Fru6P (y análogos) con los complejos ya obtenidos para la forma R, podrían revelar la existencia de una forma de una conformación diferente cuando se ocupa solo el sitio activo (forma R homotrópica) o cuando se ocupa el sitio alostérico (forma R heterotrópica).

El señalar este logro puede ser uno de los principales aportes de este trabajo. Sin embargo es importante destacar otro aporte interesante de este trabajo: hasta ahora no había sido posible medir la velocidad de la reacción catalizada por la desaminasa, en presencia de Fru6P. Utilizando la reacción acoplada de la glutamato deshidrogenasa para medir el amonio, se podrían obtener datos cinéticos en presencia de Fru6P. Sin embargo el elevado Km de la glutamato deshidrogenasa para el amonio, hace que este ensayo no sea el adecuado para obtener datos cinéticos de calidad.

En este trabajo hemos empleado por primera vez un pHstato automático que nos permite medir en forma continua la liberación de iones H⁺ cuando la reacción se desarrolla en el sentido

sintético, o su captación, cuando la reacción se estudia en el sentido desaminante. Este movimiento de protones se debe simplemente a que en la reacción se transforma un grupo de pK 9.8, el ion amonio, en uno mucho más ácido, el grupo amino protonado en posición 2, de la GlcN6P (pK 6.8). Lo que nos permite medir de forma continua la presencia de la Fru6P.



IX APENDICE

9.1 ABREVIATURAS

GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina.

GlcN: D-glucosamina.

GlcN6P: D-glucosamina 6 fosfato.

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

Fru6P: D-fructosa 6 fosfato.

PTS: sistema de transferencia de fosfatos.

GlcN-ol-6P: sorbitolamina 6 fosfato.

EDTA: Acido Etilen-diamin-tetra-acético

SDS: Lauril sulfato de sodio.

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletil-enediamina

Tris HCl: Trizma base acidificado con HCl

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio debásico

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico o reactivo de Ellman)

TNB: ácido tionitrobenzoico

UV: ultravioleta

DEAE: dietilaminoetil

9.2 .ELECTROFORESIS, SOLUCIONES

Geles para electroforesis en pedacitos al 12%

Gel de separación

Acrilamida bis T30 c 0.5	8.85ml
Glicerol 87%	3.45ml
Tris HCl 1M pH 8.8	8.75ml
SDS 10%	220ul
Peroxodisulfato 10mg/ml	300ul
desgasificar al vacio	
TEMED	30ul

Gel de concentración o empaque

Acrilamida bis T30 c3	440ul
Tris 1M pH 6.8	325ul
SDS 10%	25ul
Agua	2.65ml
Glicerol 87%	460ul
Peroxodisulfato	90ul
desgasificar al vacio	
TEMED	25ul

Preparación de acrilamida 30%T 2.7%Cbis

Acrilamida	58.4g
Bis	1.6g
agua	200ml

guardar a 4 C en recipiente cerrado

Mezcla mágica 2X

Tris pH 6.8	2.5ml
SDS 10%	4ml
glicerol	2.0ml
β -mercaptoetanol	1ml
agua destilada	hasta completar 10ml

(0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-Mercaptoetanol, pH 6.8)

Solución amortiguadora para la camara (sistema discontinuo de Laemmly)

(0.025 M Tris, 0.0192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3)

Tris	2g
Glicina	57.6g
SDS 10%	40ml
agua	4 litros

Esta solución ira en la camara de electroforesis.

Geles para determinación del punto isoelectrico

Para 12ml y un gel de 0.35 mm:

H₂O 7.87ml
glicerol 1.2 ml
Acrilamida stock 2.20ml
anfolitos 3.5/10 0.72ul
TEMED 23.0ul
persulfato de amonio al 10% 50 ul

ANOLITOS

(ácido acético 0.02 M)

Acido acético glacial 4.6ml
agua 4 litros

CATOLITOS

(NaOH 0.02 M)

NaOH 40 ml de una sol. 1M
Agua 2 litros

Geles de gradiente de poro

Amortiguador de Tris-borato

Tris base 0.07 M
ac. bórico 0.08 M
EDTA 2.5 mM

se ajusta el pH a 8.5

Preparar además un poco de amortiguador Tris-borato al doble de concentración (2x),

Etanol 20% coloreado con azul de Bromofenol y sacarosa al 20 % coloreada con rojo de metilo.

Acrilamida concentrada al 60 %

acrilamida 57.6 g
metilen bis A 2.4 g
agua hasta 100 ml

Para preparar 4 geles:

Cámara de dilución

Acrilamida al 8 %

acrilamida 7.68 g
metilen bis a 0.32 g
agua hasta 100 ml

cámara de reposición

solución al 4 %

acrilamida 8 % 4 ml

amortiguador 2x 3.9 ml

persulfato de amonio 10 mg/ml 102 µl

TEMED 14 µl colocarlos en la cámara

solución al 30 %

acrilamida 60 % 4 ml

amortiguador 2x 3.9 ml

persulfato de amonio 80 µl

TEMED 9 µl (en la cámara)

9.3 MEDIOS DE CULTIVO

Medio líquido Luria-Bernstein

Para 1000ml:

Caseína 10g

Extracto de levadura 5g

NaCl 9g

Na₂HPO₄ 1g

Agua hasta completar 1000ml

Agregar ampicilina al medio

Medio sólido Luria-Bernstein

Para 1000ml:

Bactotripton 10g

Extracto de levadura 5g

NaCl 9g

Bactoagar 15g

Na₂HPO₄ dibásico 1g

Agua hasta completar 1000ml

Método de Bradford y Malik para determinación de proteína

Pesar 100mg de azul de Coomassie G-250, disolverlos en 50ml de etanol al 95%, mezclar con 100ml de H₃PO₄, una vez disuelto se afora a 1000ml con agua, se filtra.

Mezcla magica 4X para las muestras de geles en SDS.

SDS al 10 % 10 ml

β-mercapto etanol 1 ml

EDTA 0.25 M 0.8 ml

Glicerol 10 ml

Tris- HCl pH 6.8, 1M 1.25 ml

Azul de bromofenol agregar un poco
agua hasta 25 ml

X Bibliografía

- 1.-Altamirano, M.M., Mulliert, G. y Calcagno, M.L.(1987) Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from . *Arch. Biochim. Biophys.* 258:95-100.
- 2.-Altamirano, M.M., Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C.A. y Calcagno, M.L. (1989) Evidence for vicinal thiols and their funcional role in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 269:555-561.
- 3.-Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M. L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1076:266-272.
- 4.-Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A. Barba, H.A. y Calcagno, M.L.(1993). glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* has a trimer of dimers structure with three intersubunit disulphides. *Biochem. J.* 295:645-648
- 5.-Altamirano, M.M.,Plumbridge, J.A. y Calcagno, M.L.(1993) Allosteric regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Eur. chitin Enz.* 155-160.
- 6.-Altamirano, M.M., Hernández-Arana, A., Tello-Solís, S. y Calcagno, M.L. (1994) *Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli.* *Eur. J. Biochem.* 220:409-413.
- 7.-Altamirano, M.M.,Plumbridge, J.A. Horjales E. y Calcagno, M.L (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochem.*34:6074-6082.
- 8.-Bradford M.M., (1976) *Anal Biochem* 72, 248-254

ESTA TESIS NO DEBE
VALIR DE LA BIBLIOTECA

- 9.-Branden, C. y Tooze, J. (1991) *Introduction to protein structure*. Garland Publishing. N.Y.
- 10.-Calcagno, M., Campos, P.J., Mulliert, G., y Suástegui, J.(1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 787:165-173.
- 11.-Davis, J.S. y Gander, J.E.(1967) *Anal. Biochem.* 19:72-79.
- 12.-Fasman,G.D. (1989) *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*. Plenum Press. N. Y.
- 13.-Fersht, A. y Winter, G.(1992) *Protein engineering*. Trends in Biochemical Sci. 17:292-294.
- 14.-Hernández-Arana, A., Rojo-Domínguez, A., Altamirano, M.M y Calcagno M.L.1993. Differential scanning calorimetry of the irreversible denaturation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochem.* 32:3644-3648.
- 15.-Horjales E., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L., Dauter, Z., Wilson, K., Garratt,R.C. y Oliva, G. (1992). Crystallization and preliminary crystallographic studies of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 226:1283-1286.
- 16.-Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J.P. (1965) On the nature of the allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 2:88-118.
- 17.-Olivia, G., Fontes M., Garratt R., Altamirano M., Calcagno M. L. y Horjales E. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-fosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution (en prensa).
- 18-Plumbridge, J.A.(1989). Sequence of the *nagBACD* operon in *Escherichia coli* K12. and pattern of transcription within the *nag* regulon. *Mol. Microbiol.* 138:1011-1017.

- 19.-Plumbridge, J.A.(1991).Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K12; the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the induced state. *Mol. Microbiol.* 5:2053-2062.
- 20.-Roe J.H., *J. Biol. Chem.* (1934) 107: 15-20
- 21.-Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J. y Soll, D. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* *nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* 62,197-207.
- 22.- Sanbrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, 2nd. ed., cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, N Y.
- 23.-Vogler, A.P., y Lengeler, J.W. (1989).Analysis of the *nag* regulon from *Escherichia coli* K12 and *Klebsiella pneumoniae* and of its regulation. *Mol. Gen. Genet.* 219:97-105.
- 24.-Vogler, A.P.,S. Trentmann, y Lengeler, J.W. (1989)J. Alternative route for biosynthesis of amino sugars in *Escherichia coli* K12 mutants by means of a catabolic isomerase. *J. Bacteriol.* 171:6582-6592.
- 25.-White, R.J. (1968). *Control of aminoasugar metabolism in Escherichia coli and isolation of mutants unable to degrade amino sugars.* *Biochem. J.* 106:847-885.
- 26.-Wu, H.C. & T.C. Wu (1971). Isolation and characterization of a glucosamine-requiring mutant of *Escherichia coli* K12 defective in glucosamine-6-phosphate synthetase. *J.Bacteriol.* 105:455-466.