

11281  
17  
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO CINETICO Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ENZIMA  
GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA DE CORTEZA RENAL DE BOVINO.

T E S I S

Que para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS (Bioquímica)

P r e s e n t a

ANTONIO ROBERTO DE JESUS LARA LEMUS

MEXICO, D.F.

1999

TESIS  
FALLA DE ORIGEN

275809



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

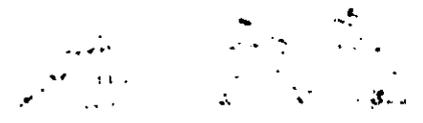


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



## **Presentación.**

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 6 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM, bajo la dirección del Dr. Mario Calcagno. Es importante mencionar que algunos experimentos los llevé a cabo en el laboratorio del Dr. Mario Rippa, en el Istituto di Chimica Biologica, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara Italia, durante una estancia que realicé en ese laboratorio en la fase inicial del doctorado. Así mismo, la subclonación del gen de la desaminasa humana y su expresión en *Escherichia coli*, fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Jacqueline Plumbridge, IBPC, París, Francia.

La parte de la tesis que comprende los estudios de inmunohistoquímica en tejido renal, se realizó en colaboración con el Dr. Armando Pérez, del Dpto. de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

## Agradecimientos

A los miembros del jurado: Dr. Andrés Hernández, Dra. Marina Gavilanes, Dr. Juan Pablo Pardo, Dr. Alejandro Fernández, Dr. Rogelio Rodríguez, Dra. Georgina Garza-Ramos y Dr. Rafael Moreno, cuyos comentarios y sugerencias contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

A la Dra. Rosario Muñoz y al Dr. Guillermo Mendoza quienes junto con el Dr. Mario Calcagno integraron el comité tutorial, por su valiosa dirección, sugerencias y apoyo, particularmente al Dr. Mario Calcagno por su impulso para la terminación de esta tesis.

A los Dres. Mario Rippa, Franco Dallochio y Stefania Hanau por su apoyo y amistad, desde mi estancia en Ferrara.

A los Dres. Enrique Piña y Juan Díaz-Zagoya, y a todas aquellas personas que, como ellos, me ayudaron desinteresadamente en algún momento de mi carrera.

A los Biólogos Hugo Alberto Barba y Laura Alvarez quienes contribuyeron en su momento con un excelente apoyo técnico para este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a la DGAPA-UNAM y al SNI por el apoyo económico que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

Y a Quien todo se debe.

Esta tesis esta dedicada a Margarita e Ivan.

Y a toda persona con la suficiente fe para ver su nombre escrito en esta página.

*“El viaje comenzó en un día que nadie recuerda; y terminará, en un día que nadie verá”*

*Luis Cabero.*

## Contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Planteamiento del problema y Justificación	13
Objetivos	16
Material y Métodos	17
Resultados	26
Discusión	56
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Bibliografía	67
Anexos	77

### Abreviaturas usadas.

GlcN	Glucosamina
GlcN6P	Glucosamina-6-fosfato
GlcNAc6P	N-acetil-glucosamina-6-fosfato
Fru6P	Fructosa-6-fosfato
GTP	Trifosfato de guanosina
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoico
DTE	Ditioeritritol
<i>Mr</i>	Masa molecular relativa
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
ASB	Albúmina sérica bovina
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
$k_{cat}$	Constante catalítica

## Resumen.

En el presente trabajo realizamos la caracterización cinética y molecular de las enzimas glucosamina-6-fosfato isomerasa desaminasa (GlcN6P desaminasa) de riñón de bovino y humana recombinante. La desaminasa renal de bovino fue purificada hasta homogeneidad, empleando una cromatografía de afinidad por el sitio alostérico. Posteriormente obtuvimos su composición de aminoácidos y la secuencia del extremo amino terminal (1-42). Comparando este segmento con secuencias de proteínas almacenadas en el Banco de Proteínas (PDB) y en el Gene Bank, pudimos detectar la secuencia completa de la GlcN6P desaminasa clonada a partir de células de mieloma humano. Más tarde, determinamos que esta región también es prácticamente idéntica al segmento correspondiente de la GlcN6P desaminasa de hámster.

Esto nos llevó a obtener el gen de la desaminasa humana, el cual fue donado por el Dr. Nobuky Miyahima, y clonarlo en una cepa de *Escherichia coli*, la cual es incapaz de expresar el gen de esta enzima. Logramos la expresión de la desaminasa humana recombinante, la cual purificamos con un método similar al empleado con la enzima renal de bovino. La desaminasa de bovino y la desaminasa humana recombinante son hexámeros, con subunidades de 32.5 kDa; esto es 2.5 kDa más alto que la masa molecular de la enzima homóloga de *E. coli*. Estas dos desaminasas de mamífero se activan alostéricamente por *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato. Este metabolito, el cual también es el activador de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*, activa a las desaminasas humana y de bovino incrementando sus  $k_{cat}$ , sin ningún cambio significativo en los valores de  $K_m$  para la glucosamina-6-fosfato, dentro de un amplio intervalo de concentraciones del activador. Estas observaciones permiten clasificar tanto a la desaminasa de riñón de bovino como a la humana dentro de los sistemas alostéricos tipo V. Este trabajo también describe el comportamiento cinético de una mutante de la desaminasa humana truncada en el residuo 268 (21 aminoácidos menos que la silvestre), así como la caracterización fisicoquímica de las GlcN6P desaminasas de bovino, humana recombinante y la mutante antes mencionada.

Finalmente, determinamos la distribución tisular de esta enzima, en cortes de riñón de bovino.

## Abstract.

In this work, we describe the molecular and kinetic characterization of the enzymes glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase, (GlcN6P deaminase) from beef kidney and human expressed in *E. coli*. GlcN6P deaminase from beef kidney has been purified to homogeneity by allosteric-site affinity chromatography. Its amino acid composition and the N-terminal sequence (1-42), were obtained. The amino acid sequence of this segment is essentially identical to the corresponding regions of the human and hamster GlcN6P deaminases. In order to study the human deaminase, we obtained the human gene, and then it was cloned and expressed in a *E. coli* strain which is defective in the expression of its own GlcN6P deaminase gene. We have also purified the recombinant protein using a similar method employed with de bovine deaminase. Both human and beef enzymes are hexamers of 35.5 kDa subunits; this is nearly 2.5 kDa higher than the molecular mass of the homologous enzyme from *E. coli*. Beef and human enzymes exhibit a notable difference from the bacterial enzyme in their allosteric activation by *N*-acetylglucosamine-6-phosphate. This metabolite, which is also the allosteric activator of the bacterial glucosamine-6-phosphate deaminase, activates the mammal enzymes by increasing their  $k_{cat}$  without any change in the  $K_m$  values for glucosamine-6-phosphate, over a wide range of activator concentration. This observation places both beef kidney and human deaminases in the class of V-type systems.

This work also describes the kinetic behaviour of a mutant human deaminase which is composed of the first 268 amino acid residues, together with the physico-chemical characterization of human and beef and truncated deaminases. Finally, we have determined the distribution of this enzyme in renal tissue.

## Introducción.

La glucosamina (GlcN), al igual que otros aminoazúcares, es una molécula ampliamente distribuída en la naturaleza. Esto se debe a que son precursores de componentes celulares y extracelulares cuyas funciones son de gran importancia para los diferentes organismos. Entre estas macromoléculas, tenemos a los lipopolisacáridos bacterianos, las glucoproteínas y glucolípidos presentes en plantas y animales y cuyas actividades biológicas son diversas, aunque algunas no bien entendidas actualmente. En el caso de los animales, encontramos aminoazúcares en el ácido siálico, en proteínas glicosiladas como la colágena y otras que también tienen funciones estructurales, en la heparina y en algunas hormonas proteicas, por mencionar algunos ejemplos. Por otra parte, es importante recordar que algunas proteínas son modificadas postraduccionalmente con residuos de carbohidratos y que esta adición está ligada a su tránsito a través de los diferentes compartimentos intracelulares y con su destino final y su función propiamente dicha.

Estos antecedentes nos indican que prácticamente todos los organismos deben tener disponibilidad de aminoazúcares para la biosíntesis de estas macromoléculas, así como vías catabólicas para la utilización de los átomos de carbono y mecanismos para evitar el efecto tóxico del  $\text{NH}_4^+$  proveniente de los aminoazúcares. Tales vías metabólicas, así como su regulación, son actualmente mejor conocidas en bacterias ( 1 ), en *C. albicans* ( 2 ) y en *Giardia intestinalis* ( 3 ).

Como se puede observar en la figura 1, al igual que en otras vías metabólicas de carbohidratos, éstos deben fosforilarse; en el caso de *E. coli*, el producto del gen *nag E* puede fosforilar a la GlcNAc y el producto del gen *man E* fosforila a la manosa y a la GlcN; sin embargo, aparentemente en ambos casos al igual que la actividad de la hexocinasa sobre la GlcN, sólo tienen significado fisiológico bajo ciertas situaciones metabólicas. Para la síntesis de glucosamina esta bacteria utiliza fructosa 6-fosfato (Fru6P) y un grupo amino, que puede ser donado por la glutamina, en la reacción catalizada por la glucosamina-6-fosfato sintasa (EC 5.3.1.19), o bien, por el ion amonio

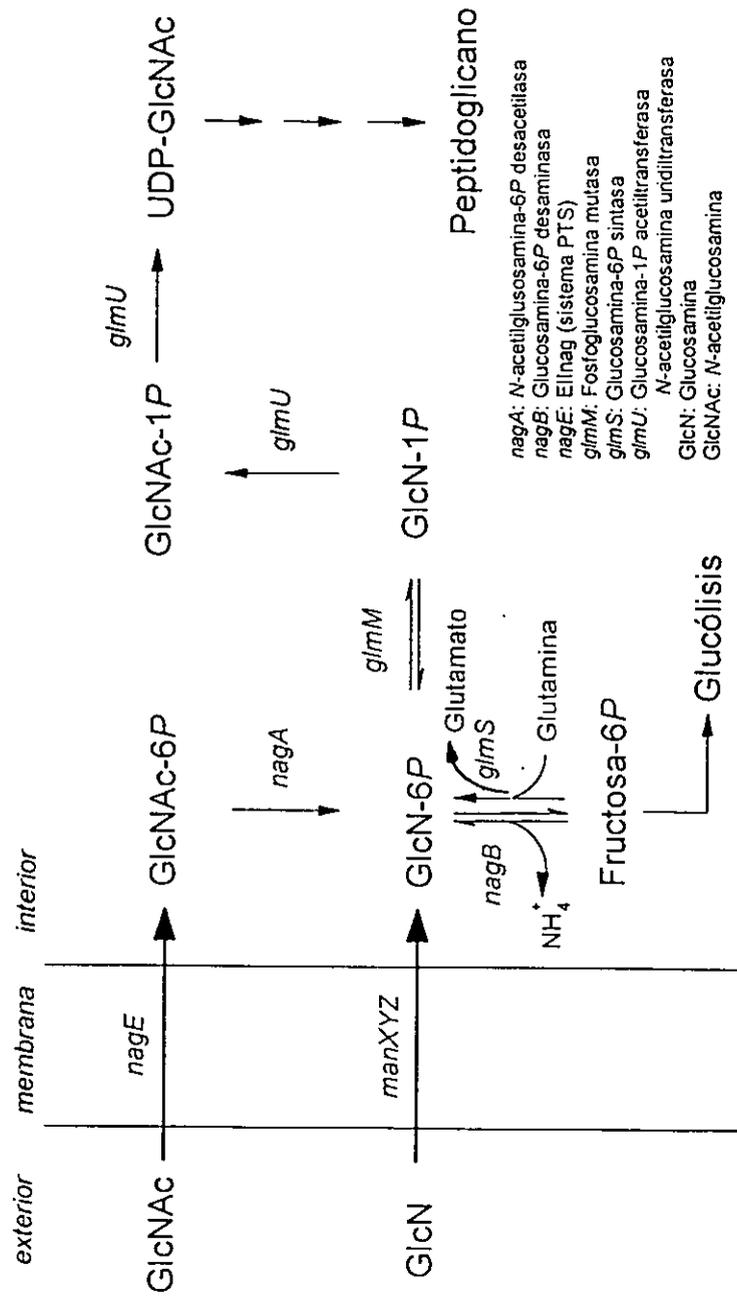


Figura 1. Representación esquemática del metabolismo de la N-acetilglucosamina en *E. coli*.

directamente ( 4 ) en la reacción reversa catalizada por la glucosamina-6-fosfato isomerasa desaminasa (EC 5.3.1.10). La constante de equilibrio de la reacción es de 0.18 M ( 5 ), por lo que el sentido catabólico se favorece; sin embargo, la reacción es fácilmente reversible, sobre todo si la siguiente reacción de la vía es exergónica.

Estas dos enzimas se encuentran en una encrucijada metabólica con la glicólisis y el control preciso de las actividades de ambas enzimas es fundamental para evitar un ciclo improductivo en la síntesis de la GlcN6P y su reconversión inmediata a Fru6P. En *E.coli* esta regulación se lleva a cabo tanto a nivel de la expresión de los genes de ambas enzimas ( 1, 6 ), como por regulación alostérica de la desaminasa ( 5, 7, 8 ). Cuando la bacteria crece en un medio con GlcN se reprime la expresión del gen de la sintetasa, *glm S* y simultáneamente, se expresan los genes catabólicos, los cuales constituyen un regulón divergente llamado *nag E-BACD*. De estos genes *nag A* codifica para la *N*-acetil-glucosamina-6-fosfato desacetilasa, que produce acetato y glucosamina-6-fosfato (GlcN6P); *nag B* codifica para la glucosamina-6-fosfato isomerasa desaminasa; *nag C* codifica para una proteína que actúa como represor de los operones al unirse a los operadores ( 9, 10 ), en tanto que la proteína Nag E es un transportador para *N*-acetil-glucosamina, que además tiene la capacidad de fosforilarla simultáneamente a partir del fosfo-enol-piruvato. El gen *nag D*, no es funcional, probablemente se trate de un pseudogen y estrictamente se considera como un marco de lectura abierta solamente.

La *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P) es el activador alostérico de la desaminasa ( 5, 7, 11 ); así mismo es el inductor de los operones *nag* al unirse a Nag C e impedir que ésta pueda fijarse en los operadores ( 9, 10 ). De esta manera, la GlcNAc6P juega un papel preponderante en la regulación del catabolismo de los aminoazúcares en bacterias.

El estudio de la GlcN6P desaminasa es importante para entender la regulación de las vías metabólicas de los aminoazúcares; sin embargo, esta enzima no es vital para el funcionamiento de todos los organismos, ya que de los 6 genomas de organismos secuenciados completamente hasta la fecha, el gen de la desaminasa no está presente

en *Saccharomices cereviceae*, ni en *Helicobacter pylori*. En esta bacteria, el gen *ure C* (homólogo al gen *glm M* de *E. coli*.), codifica para la fosfogluocosamina mutasa la cual convierte la GlcN6P en GlcN1P, la cual se acetila en la siguiente reacción de la vía y sigue su ruta hasta UDP-N-acetil glucosamina ( 12,13 ). Esta vía es similar a la descrita en mamíferos ( 14 ). Es claro que para los organismos que expresan la desaminasa, incluyendo al ser humano, esta enzima ofrece otras posibilidades regulatorias importantes para esta vía metabólica.

El conocimiento de la regulación del metabolismo de los aminoazúcares en animales, es todavía menor a lo que se sabe a este respecto en microorganismos. Algunos estudios de ciertas enzimas de esta vía en eucariotes y particularmente en animales son bastante antiguos ( 11, 15, 16 ). Recientemente, se han logrado avances importantes, en particular en el conocimiento de la GlcN6P desaminasa y de la GlcN6P sintasa, debido a que se han clonado sus genes a partir de células humanas, transformadas y normales, así como de espermatozoides de hamster ( 17-22 ). En los mamíferos la actividad de la GlcN6P desaminasa puede ser detectada principalmente en riñón, cerebro, sobre todo durante la mielinización de las fibras nerviosas, y en espermatozoides ( 11, 15, 19, 23 ). En la mayoría de los casos su función ha sido relacionada con el catabolismo de la GlcN. Por ejemplo, se ha postulado que la actividad de esta enzima en el riñón está asociada con el catabolismo de los aminoazúcares provenientes de las glicoproteínas plasmáticas que tiene lugar en ese órgano ( 24 ). Sin embargo, en cerebro y otros tejidos esta enzima podría estar implicada en la detoxificación del ion amonio producido en otras reacciones de desaminación ( 25 ). En insectos como las moscas, la desaminasa tiene claramente funciones biosintéticas para la producción de quitina, ya que no existe la actividad de la glucosamina-6-fosfato sintasa ( 26, 27 ).

Por otra parte, se ha demostrado que los adipocitos humanos y otras células, son capaces de incorporar GlcN por medio del transportador de glucosa ( 28, 29 ). Así mismo, en estos trabajos se ha implicado a la GlcN como la molécula responsable de la desensibilización de ciertas células a la incorporación de glucosa mediada por la insulina

( particularmente en adipocitos y células mesangiales renales; 30-32 ). Los resultados mostrados por estos autores indican que el bloqueo de la síntesis de GlcN6P por medio de la inhibición de la GlcN6P sintasa produce una reducción significativa de este proceso, lo cual puede tener importancia clínica al relacionarse con patologías como la diabetes mellitus y las lesiones que ocurren en esta enfermedad, a nivel de la microcirculación.

Estos antecedentes nos muestran que el panorama en cuanto al metabolismo de la GlcN en células eucariotes es complejo y poco claro todavía.

#### *Alosterismo y enzimas alostéricas.*

Las proteínas alostéricas controlan muchos procesos esenciales para el funcionamiento celular: participan de una manera importante en la regulación del metabolismo, en la expresión génica, en el plegamiento asistido de proteínas y en la comunicación intercelular. Se caracterizan por tener una estructura oligomérica y por poseer sitios de unión para diferentes ligandos, cuyas afinidades aumentan o disminuyen como consecuencia de efectos indirectos entre dichos sitios. Estos se conocen como efectos heterotrópicos y están mediados a través de cambios conformacionales de la molécula protéica completa. La regulación de la interacción proteína alostérica-ligando puede describirse en términos del modelo propuesto por Monod y cols. hace ya más de 30 años ( 33 ). Este modelo constituye una valiosa herramienta teórica para la interpretación del fenómeno del alosterismo.

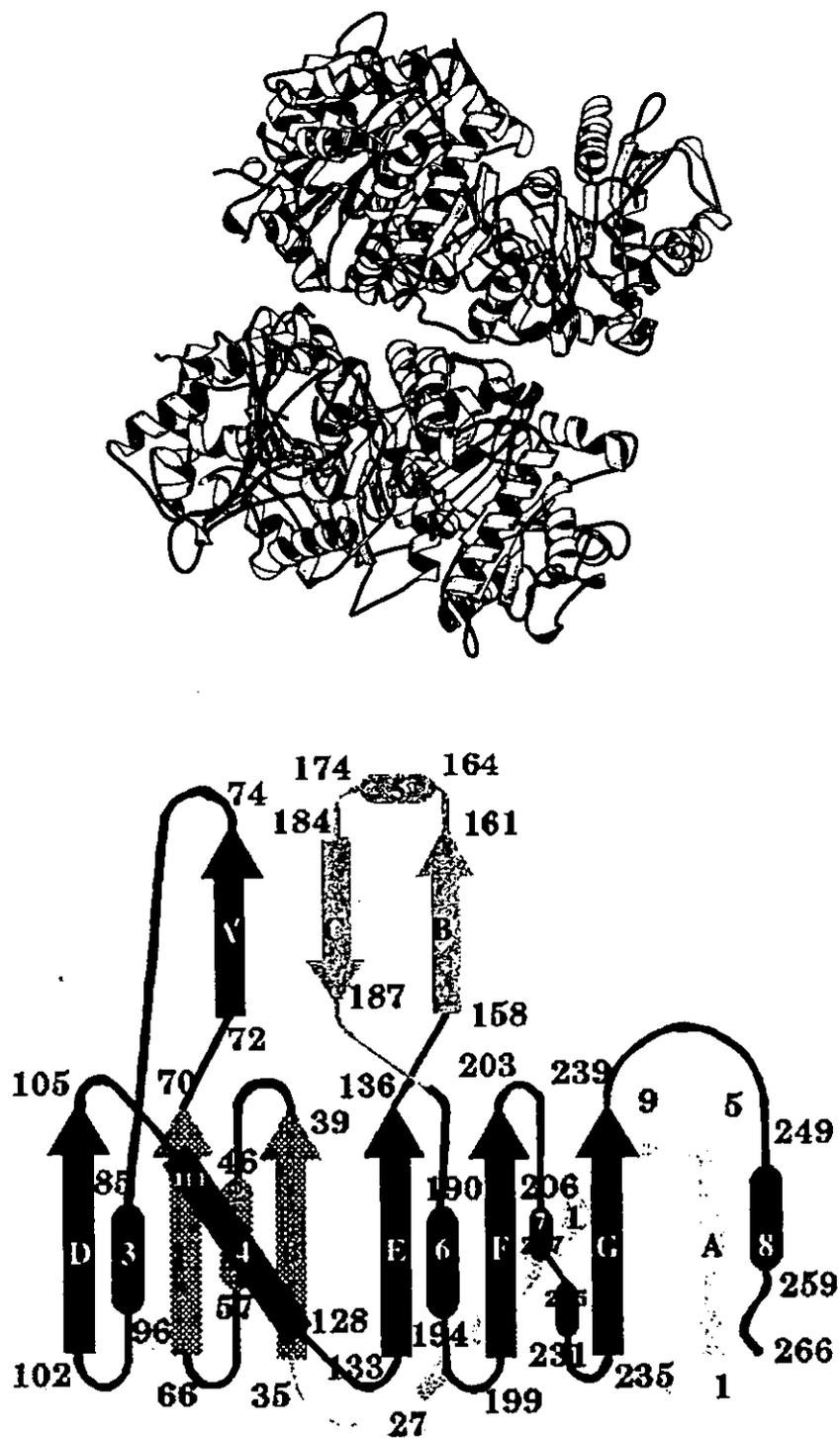
A pesar de que es esencialmente un modelo de equilibrio, puede ser aplicado a datos cinéticos haciendo la suposición de que la enzima sigue una cinética de equilibrio rápido. El equilibrio se establece entre dos estados conformacionales: el estado T, de baja afinidad y el estado R con alta afinidad para sustratos y activador, con una constante alostérica  $L=T_0/R_0$ . La transición de un conformero al otro produce un cambio en la estructura cuaternaria de la proteína, afectando las interacciones entre las subunidades, pero también produce un cambio a nivel de la estructura terciaria, lo cual afecta la unión de los ligandos; es decir, el modelo no excluye los cambios en la

estructura terciaria debidos a la unión de los ligandos (induced-fit). Estas interacciones explican la forma sigmoideal de la curva de unión de los ligandos (cooperatividad homotrópica positiva), así como los efectos heterotrópicos inducidos por la unión de moléculas a sitios distintos al sitio catalítico. Aquellos sistemas en los cuales los conformeros R y T tienen la misma afinidad por el sustrato, pero la actividad catalítica intrínseca del estado R es mayor que la del estado T ( $k_{pR} > k_{pT}$ ), se conocen como sistemas V, debido a que las  $V_{max}$  de los dos estados son diferentes ( 34, 35 ), siendo el efecto observable en presencia de un activador alostérico un incremento de la  $V_{max}$ .

#### *La GlcN6P desaminasa de E.coli.*

En el contexto del modelo alostérico de Monod, la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* representa un sistema muy adecuado para el estudio de las bases estructurales de la regulación alostérica, ya que su mecanismo cinético es del tipo conocido como equilibrio rápido al azar y estructuralmente está constituida por seis cadenas peptídicas idénticas. La enzima silvestre se comporta como un sistema K en el cual el activador alostérico se une exclusivamente al conformero R (fijación exclusiva). Por otra parte, los sustratos para ambas direcciones de la reacción, GlcN6P y Fru6P son ligandos de fijación no exclusiva, con más alta afinidad para la conformación R de la enzima. De este modo, la activación alostérica de la enzima es resultado del cambio en la afinidad aparente de la proteína por sus sustratos. Así mismo, el valor de la  $k_{cat}$  permanece sin cambios, como corresponde a un sistema K típico.

La estructura de esta enzima (en el estado R) se ha obtenido mediante estudios cristalográficos a 2.1 Å de resolución ( 8 ) (fig. 2 ). El plegamiento de la desaminasa puede describirse como un dominio para unión de  $NAD^+$  (dos unidades de estructura suprasecundaria  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  o plegamiento de Rossmann) modificado, constituido por 7 hojas beta paralelas centrales, rodeadas por ambos lados por 8 hélices  $\alpha$  y una hélice  $3_{10}$  de dos giros. Las hélices se numeran sucesivamente de la 1 a la 8, mientras que las láminas se denominan de la A a la G. El monómero une dos compuestos fosfatados (sustrato y activador alostérico). En el sitio activo el fosfato establece dos enlaces



**Figura 2.** Modelo obtenido mediante cristalografía de la GlcN6P desaminasa de *E.coli* (8). En la parte superior se muestra un dímero. En la parte inferior se muestra una representación esquemática de un monómero.

salinos, uno con la Lys<sup>208</sup> y otro con la Arg<sup>172</sup>, así como puentes de hidrógeno con los nitrógenos de la cadena principal de los residuos 40 a 44. Otros contactos importantes en este sitio son: el átomo de oxígeno 5 del inhibidor, con el Ne2 de la His<sup>143</sup>, que a su vez hace contacto con el Asp<sup>141</sup> y el Glu<sup>148</sup>. El segundo grupo fosfato (que corresponde al activador alostérico) se encuentra en la interfase entre dos monómeros y se une mediante puentes salinos con la Arg<sup>158</sup>, Lys<sup>160</sup> y el grupo amino terminal del monómero vecino y mediante puentes de hidrógeno al nitrógeno del residuo 152 y al oxígeno de la Ser<sup>151</sup>. La estructura del hexámero puede describirse como un dímero de trímeros, con una simetría interna 32. Esto quiere decir que un trímero rota en tres ejes cristalográficos (de 120 grados cada uno) y el otro lo hace en dos ejes de 180 grados, por lo que no hay una superposición precisa de ambos trímeros. Además la molécula tiene una cavidad central que se comunica con el solvente circundante, lo cual puede explicar en parte el mayor peso molecular determinado para estas enzimas (bacteriana y de bovino) mediante técnicas de cromatografía líquida.

#### *Mecanismo químico.*

El mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por la enzima de *E. coli* a partir de los datos cristalográficos obtenidos con la enzima en presencia del inhibidor competitivo GlcN-ol-6P, se muestra en la figura 3, y puede resumirse de la siguiente manera ( 8 ):

El primer paso consiste en la apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P. El Asp<sup>72</sup> estabiliza mediante un enlace salino, al grupo amino protonado del sustrato, en tanto que el oxígeno 5 del azúcar queda en contacto con la His<sup>143</sup>, la cual cede un hidrógeno para romper el enlace hemiacetal, quedando abierta la cadena del azúcar. El siguiente paso consiste en la incorporación del átomo de hidrógeno, del carbono 2 al Asp<sup>72</sup>. Se forma de esta manera un *cis*-enol-amonio como intermediario. Ahora el hidrógeno tomado por el Asp<sup>72</sup> es transferido al carbono 1 del intermediario, formándose el enol-amonio. En este punto, el mecanismo puede completarse por dos vías, en una de ellas, un protón del amonio podría ser transferido nuevamente al Asp<sup>72</sup>, entonces la *cis*-enol-amina



resultante coloca el protón del aspartato a la posición C1 pro-R del intermediario, el cual se rearregla para formar fructosamina- 6P. El grupo imino generado reacciona con una molécula de agua produciendo un carbinol-amonio inestable. Alternativamente, el enlace  $\pi$  entre el carbono 1 y el carbono 2 del *cis*-enol-amonio podría ser atacado por una molécula de agua entrando por la cara *re* del intermediario, es decir del mismo lado que el Asp<sup>72</sup>. El intermediario así formado tiene una estructura que se asemeja al inhibidor competitivo, GlcN-ol-6P, el cual debe ser inestable y se descompone en Fru6P y amonio. En el último paso ocurre la transferencia de un protón al Asp<sup>72</sup>, por lo que es probable que el amonio se libere de ese residuo como ion amonio. No existe evidencia experimental de que la enzima catalice el cierre del anillo de la Fru6P en este paso, por lo que se requiere más trabajo experimental antes de comprender totalmente el mecanismo catalítico de la desaminasa.

#### **Planteamiento del problema y justificación.**

Nuestro grupo ha trabajado principalmente en el estudio de la desaminasa y recientemente de la desacetilasa de *E. coli* ( 36 ). Desde hace algunos años iniciamos el estudio de la GlcN6P desaminasa de origen animal, llevándonos a la purificación de esta enzima a partir de corteza renal de perro ( 37 ). Sin embargo, debido a las dificultades para obtener la biomasa, así como para la purificación de la proteína, se decidió buscar una fuente más accesible que nos permitiera obtener un mejor rendimiento para poder realizar estudios estructurales de la enzima. Encontramos que la corteza de riñón de bovino es una fuente adecuada para la obtención de GlcN6P desaminasa. Interesantemente, la desaminasa de corteza renal de bovino presentó dos características importantes, que la distinguen de las enzimas estudiadas en *E. coli* y en riñón de perro: la primera diferencia es estructural, ya que la enzima de tejido renal bovino tiene un peso molecular del monómero alrededor de 2 500 Da más alto que la desaminasa de *E. coli*, y de aproximadamente 2 000 Da más que la desaminasa de riñón de perro. La segunda diferencia es de tipo cinético: el ligando alostérico, la GlcNAc6P activa a la desaminasa

resultante coloca el protón del aspartato a la posición C1 pro-R del intermediario, el cual se rearregla para formar fructosamina- 6P. El grupo imino generado reacciona con una molécula de agua produciendo un carbinol-amonio inestable. Alternativamente, el enlace  $\pi$  entre el carbono 1 y el carbono 2 del *cis*-enol-amonio podría ser atacado por una molécula de agua entrando por la cara *re* del intermediario, es decir del mismo lado que el Asp<sup>72</sup>. El intermediario así formado tiene una estructura que se asemeja al inhibidor competitivo, GlcN-ol-6P, el cual debe ser inestable y se descompone en Fru6P y amonio. En el último paso ocurre la transferencia de un protón al Asp<sup>72</sup>, por lo que es probable que el amonio se libere de ese residuo como ion amonio. No existe evidencia experimental de que la enzima catalice el cierre del anillo de la Fru6P en este paso, por lo que se requiere más trabajo experimental antes de comprender totalmente el mecanismo catalítico de la desaminasa.

#### **Planteamiento del problema y justificación.**

Nuestro grupo ha trabajado principalmente en el estudio de la desaminasa y recientemente de la desacetilasa de *E. coli* ( 36 ). Desde hace algunos años iniciamos el estudio de la GlcN6P desaminasa de origen animal, llevándonos a la purificación de esta enzima a partir de corteza renal de perro ( 37 ). Sin embargo, debido a las dificultades para obtener la biomasa, así como para la purificación de la proteína, se decidió buscar una fuente más accesible que nos permitiera obtener un mejor rendimiento para poder realizar estudios estructurales de la enzima. Encontramos que la corteza de riñón de bovino es una fuente adecuada para la obtención de GlcN6P desaminasa. Interesantemente, la desaminasa de corteza renal de bovino presentó dos características importantes, que la distinguen de las enzimas estudiadas en *E. coli* y en riñón de perro: la primera diferencia es estructural, ya que la enzima de tejido renal bovino tiene un peso molecular del monómero alrededor de 2 500 Da más alto que la desaminasa de *E. coli*, y de aproximadamente 2 000 Da más que la desaminasa de riñón de perro. La segunda diferencia es de tipo cinético: el ligando alostérico, la GlcNAc6P activa a la desaminasa

de *E.coli* y a la de riñón de perro, aumentando su afinidad por el sustrato (GlcN6P), sin modificar la  $k_{cat}$ ; es decir, son ejemplos de sistemas  $K$  ( 33 ). Sin embargo, en ausencia de su activador alostérico ( GlcNAc6P) la enzima de corteza renal de bovino tiene una actividad catalítica muy baja, en tanto que en presencia de este ligando, la enzima aumenta notablemente su actividad. Un estudio inicial nos permitió determinar que el efecto de activación sobre la desaminasa bovina se ejerce a través del incremento de la  $k_{cat}$  de la enzima, sin que se modifique significativamente su  $K_m$ . Este comportamiento podría describirse entonces como un sistema alostérico tipo  $V$  positivo de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Monod. Estas diferencias mostradas por la GlcN6P desaminasa de riñón de bovino en relación con las otras desaminasas conocidas hasta la fecha nos motivó a estudiar con mayor profundidad la activación alostérica de la desaminasa bovina. Los ejemplos de otras enzimas con este tipo de comportamiento alostérico no son muy abundantes, ya que en la naturaleza existe un claro predominio de los sistemas  $K$  sobre los  $V$  y mixtos ( 38 ).

En la actualidad se han estudiado con mayor detalle dos enzimas que tienen un comportamiento alostérico tipo  $V$ , a saber, la glicerol fosfato cinasa III de *E.coli* ( 39 ) y la 3-fosfo-glicerato deshidrogenasa de *E.coli* ( 40, 41, 42 ). En ambos casos, el efector alostérico produce la disminución de la constante catalítica de la enzima, es decir, que dicha molécula se une preferentemente al estado  $T$ , desplazado el equilibrio hacia la forma menos activa y como consecuencia son sistemas  $V$  negativos ( 43, 44, 45 ). Existen además algunos otros casos de enzimas clasificadas como sistemas mixtos o  $M$ , en los que se modifican tanto la constante catalítica como la  $K_m$  ( 46, 47 ). En esta situación se encuentra la uracil-fosforribosil transferasa de *Sulfolobus shibatae*, la cual es activada alostéricamente por el GTP; sin embargo, las  $K_m$  para el uracilo y el fosforribosil pirofosfato sufren cierto grado de modificación ( 48 ). Otros casos interesantes de este tipo son la fosfatasa de fosfoazúcares asociada a membrana de *Lactococcus lactis* ( 49 ), la pefenato deshidratasa de *Amycolaptosis methanolica* ( 50 ) y la ATPasa de calcio de membrana plasmática de *Leishmania donovani*, la cual es modulada por los niveles de calmodulina ( 51 ). Por otro lado, también existen algunos

ejemplos de sistemas *K* puros, que mediante mutagénesis dirigida de uno o más residuos importantes, cambian su comportamiento a sistemas mixtos. Un ejemplo lo constituye la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, en la que al sustituir un residuo del sitio alostérico, la Tyr<sup>254</sup> por fenilalanina se produce un cambio en el comportamiento alostérico de la enzima, la cual pasa de ser un sistema *K* puro a un sistema mixto( 52 ).

En resumen, hemos encontrado una enzima que se aproxima a un sistema *V* y sobre la cual el efecto del modulador alostérico es la activación y no la inhibición, como en los otros casos bien caracterizados hasta ahora. Además, podríamos considerar que la desaminasa de bovino es una enzima “modificada naturalmente”, en la cual la Naturaleza hizo los cambios necesarios para transformar las propiedades alostéricas de la GlcN6P desaminasa de un sistema *K* a uno *V* y este hecho debe tener sin duda implicaciones en la regulación de la actividad de la enzima y de las vías metabólicas en las cuales participa.

En el presente trabajo describimos las propiedades cinéticas y moleculares de la glucosamina 6-fosfato isomerasa desaminasa de corteza renal de bovino, una enzima que se aproxima a un sistema *V*-positivo puro, así como el análisis de la secuencia de aminoácidos y las propiedades cinéticas de la GlcN6P humana recombinante, expresada en *E. coli* y de una mutante construida por mutagénesis dirigida, en la cual se eliminaron 21 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína.

## **Objetivos.**

Con base en los hallazgos anteriormente mencionados, nos propusimos:

- 1) Caracterizar la activación alostérica de la desaminasa renal de bovino y de la desaminasa humana recombinante.
- 2) Determinar las principales propiedades fisicoquímicas de ambas enzimas.
- 3) Determinar la secuencia de aminoácidos de la desaminasa de bovino y establecer si la diferencia de masa molecular entre las desaminasas de mamífero y la de *E.coli* se debía a inserciones de segmentos aislados de aminoácidos dispersos en la secuencia o a la adición de un solo segmento en alguna región de la cadena peptídica.
- 4) Utilizando anticuerpos policlonales contra la desaminasa, determinar su localización celular en el riñón de bovino.

## **Material y Métodos.**

En esta sección incluí los métodos que considero más relevantes para el desarrollo y discusión general de la tesis, los demás se encuentran descritos en el artículo en el anexo 2.

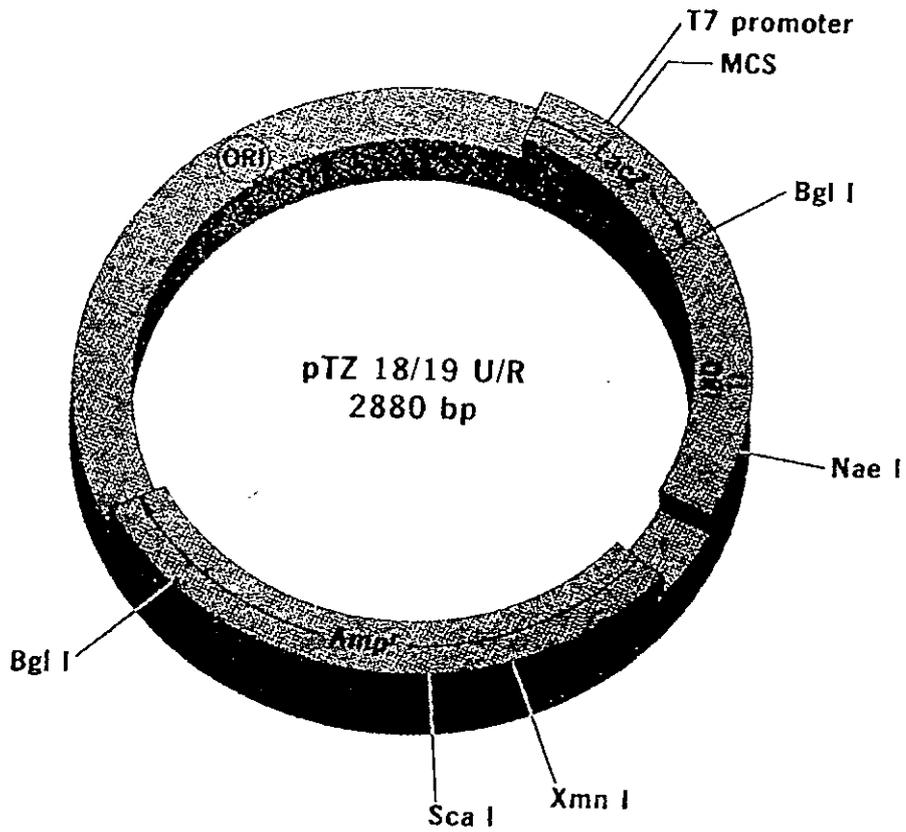
### *Purificación de las desaminasas de bovino y humanas recombinantes.*

La estrategia de purificación utilizada se basó en el método reportado anteriormente para purificar la desaminasa de corteza renal de perro (37). En la versión actual del procedimiento, el sobrenadante del homogenado de corteza renal de bovino se cromatografió en una columna de celulosa fosfato equilibrada con amortiguador de acetato de potasio 20 mM pH 5.9, EDTA 1mM. La desaminasa se eluyó con un amortiguador de fosfato de potasio 0.2 M, pH 7.4, EDTA 1mM; Con esta modificación se redujo el tiempo de exposición de la enzima a un pH ácido. El pico de actividad de la enzima aparece justo antes del pico de elución de la hemoglobina. Posteriormente, las fracciones con actividad de la enzima se reunieron y se colocaron en una columna empacada con N-ε-aminohexanoil-D-glucosamina-6-fosfato-agarosa, una resina de cromatografía de afinidad por el sitio alostérico para la desaminasa ( 5 ), equilibrada con amortiguador de tris-HCl 50 mM pH 8.2. La elución se realizó con una solución de GlcNAc6P 10 mM en el mismo amortiguador. En algunas ocasiones, el análisis electroforético en geles desnaturalizantes de la enzima obtenida por el método antes descrito, mostró cierto grado de heterogeneidad, representado por una pequeña banda de proteína con un peso molecular ligeramente inferior al correspondiente a la desaminasa; este problema lo solucionamos usando una columna ( volumen total de 5 ml) empacada con celulosa fosfato, equilibrada en las mismas condiciones que la empleada inicialmente, pero la elución se realizó con Fru6P 10 mM en amortiguador de acetato de potasio 20 mM, pH 5.9 ( 37, 54, 55 ). La enzima eluida en estas condiciones se obtiene precipitada (probablemente por encontrarse en su punto isoeléctrico) y el análisis electroforético de esta fracción mostró a la proteína homogénea. En el caso de la

desaminasa humana recombinante y de la desaminasa mutante (268 S), las bacterias lavadas con PBS se sonicaron en un amortiguador de tris-HCl 50 mM pH 8.2, y el sobrenadante de esta fracción se aplicó directamente a la cromatografía de afinidad alostérica en las mismas condiciones descritas anteriormente para la desaminasa de bovino. Esto permitió realizar el procedimiento de purificación en un menor tiempo. En todos los casos la enzima se obtuvo en un solo pico de actividad y de proteína. Las enzimas se guardaron con glicerol al 50% a -20° C y en estas condiciones conservaron su actividad durante varios meses, a excepción de la mutante 268 S, la cual fue estable solamente durante un mes de almacenamiento. Para efectuar los ensayos cinéticos se tomó una alícuota de la desaminasa y se dializó exhaustivamente para eliminar el ligando alostérico, ya que este interfiere con este tipo de estudios. La pureza de las enzimas, se verificó mediante electroforesis desnaturizante y no desnaturizante en geles de poliacrilamida.

#### *Clonación y expresión de la desaminasa humana en E.coli.*

El gen de la desaminasa humana fue gentilmente donado por el Dr. Nobuky Miyahima. El RNA mensajero de dicho gen había sido clonado mediante un cDNA, a partir de células de mieloma humano (HA1541) y posteriormente secuenciado. Nosotros recibimos el gen insertado en el vector Bluescript SK+. Sin embargo, debido a que en nuestro laboratorio tenemos amplia experiencia e infraestructura para el cultivo de *E. coli*, decidimos reclonar el gen en el vector pTZ19R (fig. 4) el cual ya manejábamos y es adecuado para transformar a esta bacteria. Para lograr la expresión de la desaminasa humana recombinante se usó una cepa de *E. coli* (JM101  $\Delta$ ag) cuyo gen de la desaminasa fue inactivado mediante una inserción para evitar su expresión. Para iniciar la reclonación, la construcción original fue cortada con HindIII y Apal resultando un fragmento de 1918 pb (abarcando la totalidad del gen). Este fragmento se clonó en el plásmido pTZ19R digerido con HindII y SmaI y en dicha construcción el gen fue insertado río abajo del promotor lac. El plásmido fue inestable y no se obtuvo ninguna



**Figura 4.** Esquema del plásmido pTZ R19.

Éste se usó como vector para la expresión en *E.coli* del gen de la GlcN6P desaminasa humana.

sobreexpresión visible en geles de poliacrilamida, cuando se expresó en la cepa JM101  $\Delta$ nag; además, la actividad de la enzima detectada en el sonicado de la bacteria fue muy baja. Para solucionar este problema decidimos eliminar una mayor cantidad de DNA extragénico. Tomamos como referencia el tamaño del gen *nag B*, el cual tiene alrededor de 1000 pb de longitud; por tal motivo el inserto se cortó nuevamente, ahora, desde un sitio PstI, localizado 12 nucleótidos río arriba del codón de inicio, hasta un sitio BstXI localizado 110 nucleótidos río abajo del codón de terminación, resultando en un fragmento de 992 pb. Este segmento fue clonado nuevamente en el vector pTZ19R digerido con PstI y SmaI. El extremo BstXI fue previamente tratado con DNA polimerasa T4 para producir un extremo ligante. La cepa de *E. coli* fue transfectada con el vector por electroporación, y la selección de las bacterias que tenían el plásmido se hizo utilizando ampicilina. Esta estrategia nos permitió purificar una cantidad adecuada de desaminasa humana recombinante. Como se mencionó anteriormente, la desaminasa de *E. coli* posee un peso molecular del monómero aproximadamente 2500 Da menor en relación al de las desaminasas humana y de bovino, y presenta además, un tipo de activación alostérica (sistema *K*) distinto al mostrado por estas últimas (sistemas *V*); por ello, decidimos producir una enzima humana recombinante mutada, la cual tuviera un número similar de aminoácidos al de la enzima bacteriana, para observar si el tipo de activación alostérica de esta mutante se asemejaba al de la desaminasa de *E. coli*. Para tal efecto se construyó una enzima humana truncada en el aminoácido 268, mediante mutagénesis dirigida, convirtiendo el codón de prolina en un codón de terminación (UAA).

#### *Determinación del coeficiente de absortividad molar de la desaminasa de bovino.*

Para determinarlo, calculamos inicialmente el coeficiente de absorción molar teórico para la desaminasa humana. De acuerdo a la ecuación descrita por Edelhoch ( 57 ), la absortividad molar de una proteína en cloruro de guanidinio 6 M a pH 6.5 se puede obtener sumando los productos del número de triptofanos y tirosinas, (despreciando cisteínas) y sus respectivas absortividades en esas condiciones. En

nuestro caso utilizamos el número de tirosinas y triptofanos obtenidos a partir de la secuencia de la desaminasa humana. El valor obtenido se usó para calcular el coeficiente de absorción molar de la desaminasa de bovino, de acuerdo al procedimiento descrito por Gill y von Hippel ( 58 ). Para ello obtuvimos el espectro de absorción de la enzima de bovino en la región ultra violeta, en condiciones "nativas" ( pH 7.4 en amortiguador tris) y en cloruro de guanidinio 6 M pH 6.5 usando fosfato de potasio como amortiguador. Determinamos la absorbencia a 278 nm en cada caso. Posteriormente sustituimos los valores obtenidos en la ecuación descrita por Gill y von Hippel:

$$\epsilon_{\text{nativo}} = \frac{(N) (\epsilon_{\text{guanidinio}})}{G}$$

En dónde N representa la absorbencia de la enzima de bovino a pH 7.4 a 278 nm; G es la absorbencia de la enzima de bovino pero en cloruro de guanidinio 6 M pH 6.5 a la misma longitud de onda, y  $\epsilon_{\text{guanidinio}}$  es la absorción molar determinada para la desaminasa humana en guanidinio 6 M pH 6.5 como describimos anteriormente. El resultado final fue refinado a partir de los datos de titulación de sulfhidrilos realizada en la enzima de bovino, de acuerdo a un procedimiento desarrollado por nuestro laboratorio ( 52, 53, 59 ). Este dato ( $18.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 278 nm y pH 7.7) fue utilizado para determinar la concentración de la desaminasa de bovino pura y en otros cálculos.

### *Análisis de aminoácidos y secuencia amino terminal de la GlcN6P desaminasa de bovino.*

El análisis de aminoácidos de la GlcN6P de bovino se realizó en la W.M.Keck Foundation Biotech. Resource Lab. (Yale University, New Haven, CT,USA), usando un analizador Beckman 7300. Una muestra de 100 µg de enzima se dializó contra agua bidestilada y se liofilizó en una centrífuga con vacío. Las hidrólisis se realizaron a 150° C durante 6 h en HCl 6 M. Las cisteínas se determinaron como grupos tioles titulados con DTNB. La mezcla de reacción contenía tris-HCl 100 mM, 2.5 mM de EDTA y 3 mM de DTNB a pH 7.15 a 20° C. La reacción se desencadenó con la adición de la enzima a una concentración final de 0.3 µM, y para determinar el número total de grupos tioles, se agregó SDS a una concentración final de 0.25% para desnaturalizar a la enzima. El número de residuos de triptofano se obtuvo por el método descrito por Edelhoch ( 57 ), tomando el número de tirosinas y cisteínas a partir de la composición de aminoácidos de la desaminasa de bovino, y la absortividad molar obtenido como se detalló antes. La secuencia de los primeros 42 aminonácidos del extremo amino de la desaminasa de bovino se realizó en W.M.Keck Foundation Biotech. Resource Lab. (Yale University, New Haven, CT,USA), por medio de un analizador automático.

### *Ensayos de la Actividad enzimática.*

La actividad de las desaminasas de bovino y humana recombinante, se ensayó rutinariamente en el sentido desaminante de la reacción, utilizando un método colorimétrico a tiempos fijos, el cual ya hemos usado ampliamente ( 5 ). La reacción reversa, es decir la formación de GlcN6P a partir de Fru6P y amonio, se midió por medio de la determinación colorimétrica de la GlcNAc6P por la reacción de Elson y Morgan ( 60 ), de acuerdo con el procedimiento de Levy y Mac Allan ( 61 ). Como resulta evidente el activador alostérico interfiere con este ensayo, debido a que el procedimiento se basa en la acetilación de la GlcN6P formada y la detección colorimétrica de la misma a 544 nm.

Sin embargo, usamos blancos conteniendo la concentración de activador usada en cada experimento y lo restamos a la absorbencia de cada tubo experimental correspondiente. De esta forma nos fue posible explorar la cinética en este sentido de la reacción en presencia de una concentración de GlcNAc6P de 0.5 mM, la cual es saturante y permite activar a la desaminasa de bovino completamente. Las velocidades de reacción se midieron a 30° C en amortiguador de tris-HCl 50 mM pH 7.7.

#### *Unión de GlcNAc6P marcada con <sup>14</sup>C.*

La curva de unión del activador alostérico radioactivo a la enzima se determinó por ultracentrifugación, por el método descrito por Howlett ( 62 ) con las modificaciones descritas recientemente ( 52 ). Se centrifugaron muestras de 200  $\mu$ l, conteniendo la enzima y el ligando durante 4 h a 30° C y 195 000 x g en una ultracentrífuga Beckman Optima XL-100K, utilizando un rotor de ángulo fijo 42.2 Ti ( $r_m$  10.85 cm). El rotor se desaceleró sin freno y, adicionalmente las muestras contenían 2.5 mg ml<sup>-1</sup> de dextran ( $M_r$  promedio 81600), para minimizar la mezcla por convección de la proteína sedimentada. Se tomaron alícuotas de 70  $\mu$ l para determinar las emisión radioactiva mediante un contador de centelleo líquido.

#### *Espectroscopía de dicroísmo circular.*

El espectro de dicroísmo circular de la desaminasa renal de bovino se realizó en un espectropolarímetro Aviv 62 DS, con la finalidad de compararlo con el espectro mostrado por la desaminasa de *E. coli*, y observar si existía alguna diferencia importante entre las dos proteínas. Para obtenerlo, usamos una concentración de enzima de 0.1 mg ml<sup>-1</sup> en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.5 en una celda con paso de luz de 0.1 cm. Las elipticidades medias por residuo ( $\theta_{mwr}$ ) se calcularon tomando en cuenta una masa molecular por residuo de 112 y los coeficientes estructurales se calcularon por el método

de Yang ( 63 ).

#### *Inmunotransferencias.*

Otro elemento importante que nos podría indicar la similitud estructural entre las desaminasas bacteriana y de bovino, es la conservación de epítopes. Para analizar este punto, realizamos la inmunodetección de la desaminasa de bovino, por anticuerpos desarrollados contra la desaminasa de *E. coli*, mediante la electrotransferencia de la desaminasa de bovino a partir de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes ( 64 ) a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos policlonales (desarrollados en conejos) contra la desaminasa de *E.coli*. La detección de los anticuerpos unidos a la desaminasa bovina inmovilizada en la nitrocelulosa, se realizó mediante el segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina ( 65, 66 ).

#### *Inmunolocalización de la GlcN6P desaminasa en riñón de bovino.*

Se obtuvieron diferentes muestras de riñón de bovino de 1cm<sup>3</sup> aproximadamente; fueron incluidas en OCT compound (Optimum Cutting Temperature, TissueTek, Miles Inc. Elkhart IN, USA) y congeladas a -70° C, hasta la realización de los cortes. Los cortes de un grosor de 8 µm del tejido congelado fueron adheridos a portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina al 0.1%, y se dejaron secar al aire durante 1 hora. Posteriormente, se rehidrataron y se lavaron tres veces con PBS a temperatura ambiente para eliminar el OCT y se fijaron en acetona absoluta durante 30 minutos, también a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un doble bloqueo de sitios de unión inespecífica incubando los cortes en PBS-ASB al 1% y tritón X-100 al 0.01%, durante una hora a temperatura ambiente y luego en suero normal de cabra o caballo al 2, 5 o 10% durante 45 minutos y se realizaron pruebas para probar el bloqueo. La solución de

bloqueo se dejó escurrir, sin lavar y se incubó con los anticuerpos policlonales de conejo contra la desaminasa (anticuerpo primario) con diluciones 1:100, 1:500 o 1:1000 en PBS-ASB 0.1%, tritón 0.01% durante 18 horas a 4°C. Inmediatamente después, se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS a temperatura ambiente, y se agregó el segundo anticuerpo, anti IgG de conejo fluoresceinado, diluido 1:100 en el mismo medio usado con el primario y se incubó durante 1 hora. Después de lavar con PBS, los cortes se montaron con polivinil alcohol y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Olimpus BH2-RFCA). Como controles utilizamos cortes de riñón de bovino, los cuales fueron procesados de la misma manera antes descrita, pero omitiendo el anticuerpo primario.

#### *Análisis de los datos.*

Los datos cinéticos y de unión del ligando radioactivo se ajustaron a distintas ecuaciones usando el programa ENZFITTER ( R.J. Leatherbarrow, 1987), así como los programas desarrollados por W.W.Cleland ( 67 ) obtenidos directamente del laboratorio del autor. Los alineamientos de secuencias se hicieron mediante el programa CLUSTAL V, a partir de los datos obtenidos del Gene Bank y Protein Data Bank.

## Resultados.

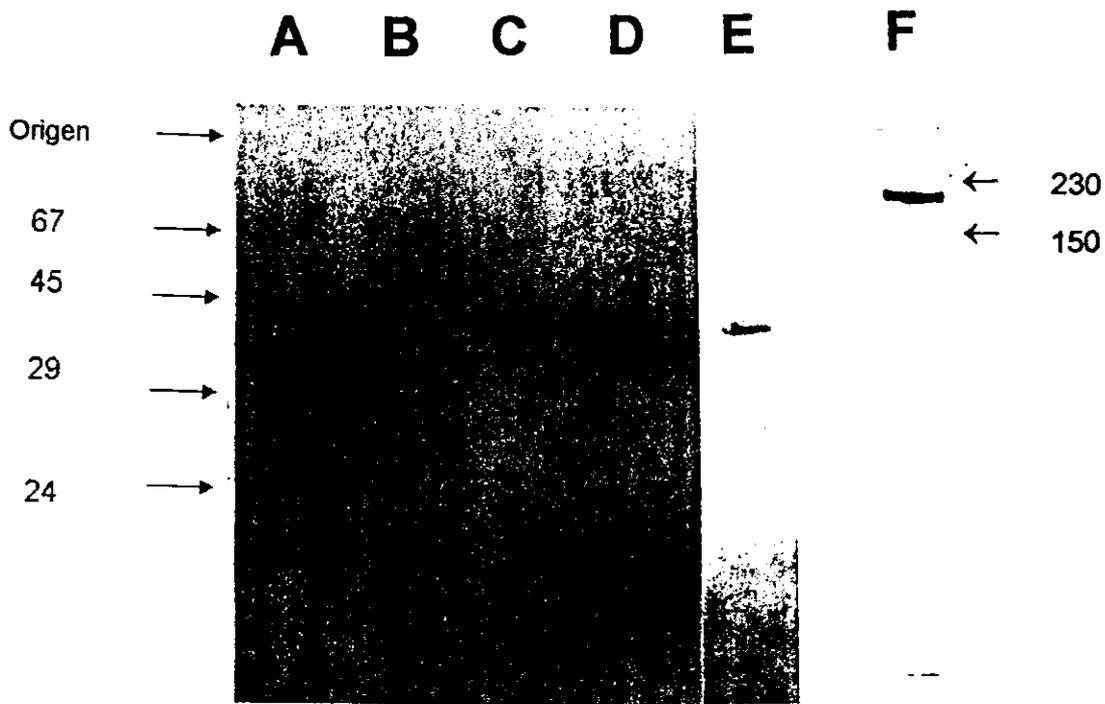
A) En cuanto a la estructura y propiedades fisicoquímicas.

### *Peso molecular y punto isoeléctrico.*

De acuerdo a los datos obtenidos de su migración en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, el monómero de la desaminasa de corteza renal de bovino tiene una masa molecular relativa de 32 500 Da, ( figura 5). Por otro lado, la masa molecular relativa de la enzima en condiciones no desnaturalizantes, determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración es de 210 000 Da ( figura 5). Se obtuvo el mismo resultado por cromatografía de filtración molecular en gel en HPLC ( figura 6). Este resultado sugiere que la proteína es un hexámero al igual que las desaminasas de *E.coli* y de riñón de perro. La diferencia entre el peso molecular determinado experimentalmente y el esperado ( 195 kDa), también se observa en el caso de la desaminasa de *E. coli* y puede explicarse por la cavidad que presenta el hexámero en su interior, y que ha sido descrita cristalográficamente ( 8 ). La desaminasa humana recombinante, presentó el mismo peso molecular que su homóloga de bovino. Por otro lado, el peso molecular determinado para el monómero de la desaminasa humana truncada, fue de 31 000 Da, (figura 5). El punto isoeléctrico de la enzima de bovino determinado el gel de poliacrilamida es de 5.9.

### *Composición de aminoácidos de la desaminasa de bovino.*

La composición de aminoácidos de la enzima se muestra en la tabla 1. Es importante mencionar que la determinación de cisteínas y triptofanos se realizó por separado. El número total de cisteínas determinado por titulación con DTNB fue de 3



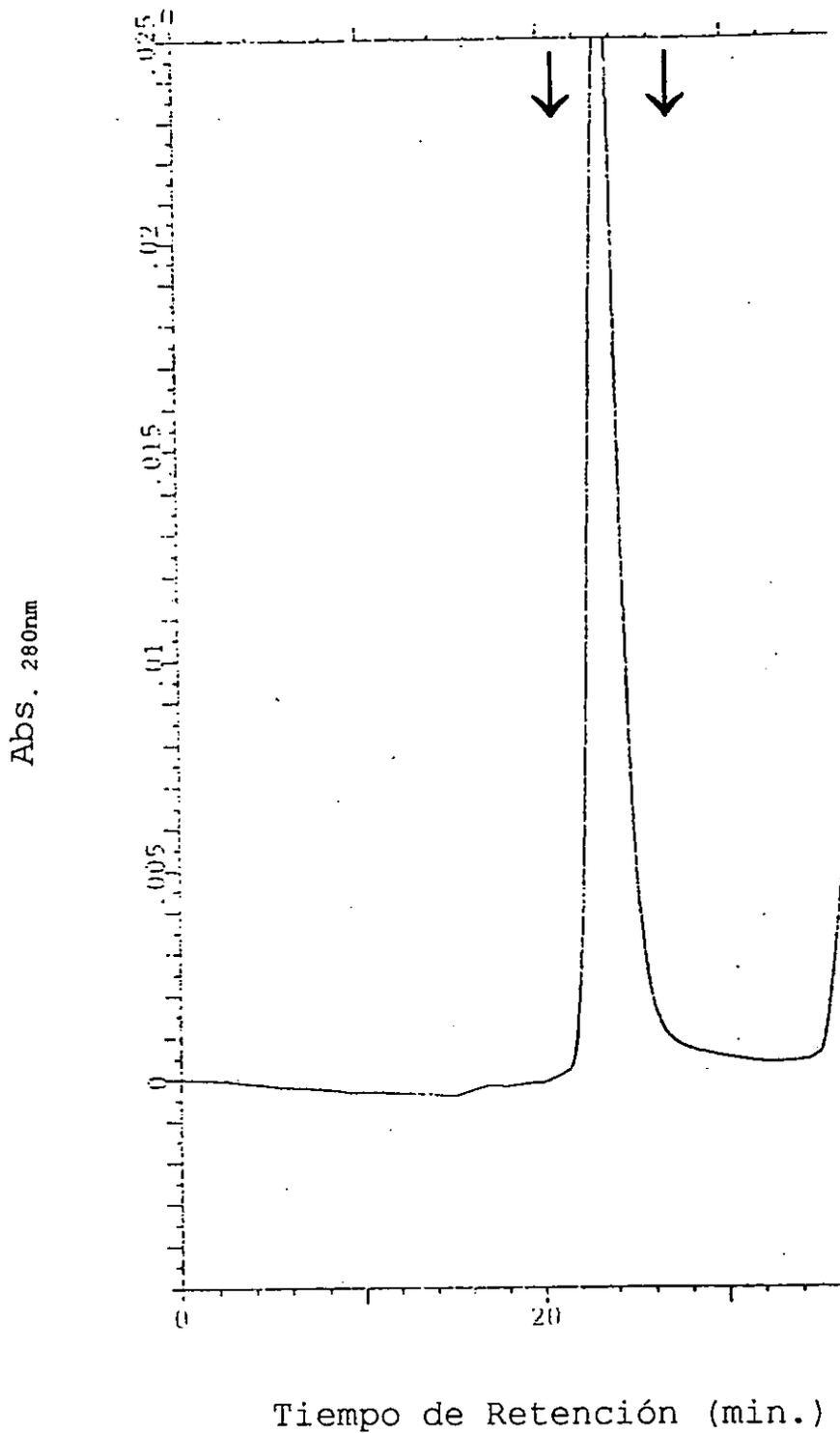
**Figura 5.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. Carriles A, B, C y D en condiciones desnaturizantes de acuerdo al método de Laemli ( 64 ). Carril F en condiciones no desnaturizantes. Carril A: desaminasa humana truncada (268 S); B: desaminasa de *E.coli*; C: desaminasa de riñón de bovino; D: desaminasa humana recombinante. El carril E muestra la inmunotransferencia de la desaminasa de bovino, usando anticuerpos contra la desaminasa de *E.coli*. Carril F: Electroforesis en gradiente de concentración de poliacrilamida (5%-30%) de la desaminasa de bovino. Las flechas indican las masas moleculares relativas de diferentes proteínas de calibración.

Asx	29
Thr	16
Ser	14
Glx	25
Pro	14
Gly	22
Ala	22
Val	19
Met	9
Ile	17
Leu	25
Tyr	14
Phe	17
His	11
Lys	22
Arg	7
Cys <sup>a</sup>	3
Trp <sup>b</sup>	3
Total de residuos.	289

**Tabla 1.** Composición de aminoácidos de la GlcN6P desaminasa de corteza renal de bovino.

<sup>a</sup> Determinados por titulación con DTNB.

<sup>b</sup> Calculados a partir del espectro de absorción de la enzima en UV de acuerdo a la ecuación de Edelhoch.

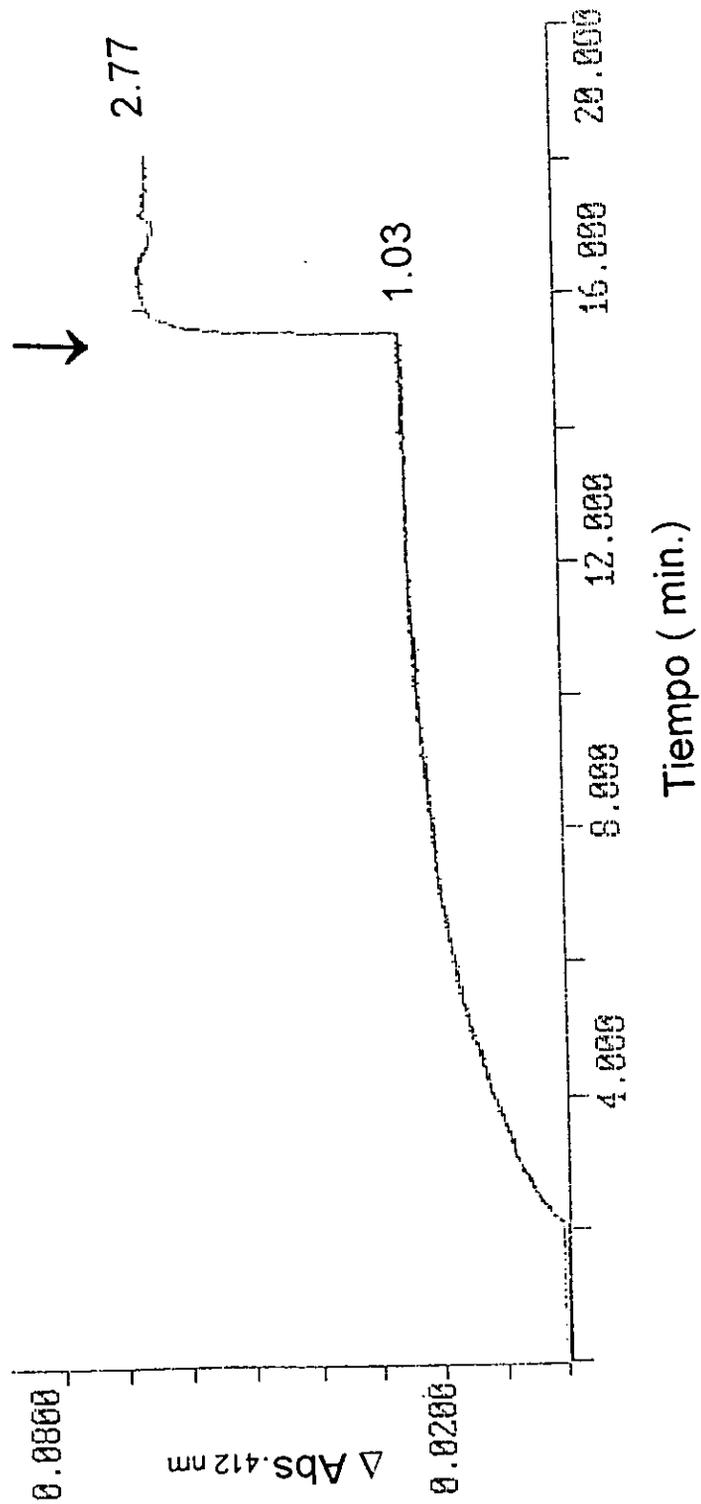


**Figura 6.** Perfil cromatográfico de la GlcN6P desaminasa de riñón bovino en una columna de exclusión molecular ( Protein Pack 300 SW, Waters) utilizando un sistema de HPLC. La muestra consistió en 700 pmoles de desaminasa pura. Las flechas indican los tiempos de retención de la catalasa (20.5 min.) con *Mr* 230 kDa y Alcohol deshidrogenasa (26.5 min.) con *Mr* 150 kDa.

(  $2.80 \pm 0.06$  ) por subunidad; de las cuales una es reactiva en la enzima nativa, y dos más se expusieron en presencia de SDS. La titulación de los grupos tioles se puede observar en la figura 7. También se investigó la posible existencia de enlaces disulfuro utilizando el reactivo NSTB-sulfito (reactivo de Thannhauser, 68 ), el cual reacciona con tioles y disulfuros, y el resultado fue  $3.22 \pm 0.21$  tioles titulados, esto indica que no existen enlaces disulfuro en la proteína nativa. La determinación de triptofanos se realizó espectrofotométricamente, obteniendo un total de 3 (  $3.42 \pm 0.46$  ) residuos de triptofano por monómero. Para el cálculo del número de estos residuos, se utilizó el método de Edelhoich ( 57 ), como se describió en material y métodos.

#### *Los Grupos SH- de la desaminasa bovina.*

Como se mencionó anteriormente, de los tres tioles titulados por subunidad de la enzima, solamente uno (  $1.03 \pm 0.05$  ) es reactivo en la proteína nativa, en tanto que los dos restantes (  $1.77 \pm 0.06$  ) reaccionan con el DTNB en presencia de 0.5% de SDS (fig. 7 ). La modificación con DTNB del sulfhidrilo reactivo en condiciones nativas siguió una cinética de pseudo-primer orden y la enzima al final de la reacción resultó inactiva. La constante se obtuvo directamente de graficar la fracción de SH titulados en función del tiempo de la reacción ajustando a la ecuación para decaimiento exponencial simple. La constante de velocidad de segundo orden del sulfhidrilo expuesto se obtuvo a partir de este dato y de la concentración de enzima y fue  $1.77 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ; un valor muy semejante al obtenido para la reacción de las Cys<sup>118</sup> y Cys<sup>239</sup> de la desaminasa de *E.coli* ( 59, 69 ). El valor de esta constante de la enzima de bovino disminuyó alrededor de 6 veces cuando la reacción se realizó en presencia de una concentración saturante (2 mM) del activador alostérico GlcNAc6P; es decir, este ligando protegió parcialmente al sulfhidrilo de la enzima de la reacción con DTNB. Para determinar si el efecto protector inducido por el activador, se debía al ocultamiento del grupo tiol durante el movimiento de la molécula en la transición alostérica, investigamos si el inhibidor competitivo de la enzima,



**Figura 7.** Titulación de los grupos tioles de la desaminasa renal de bovino con DTNB. La concentración de DTNB usada fue 3 mM, y la de la enzima fue 0.3  $\mu$ M. Los números corresponden al número de tioles titulados, y la flecha indica la adición de SDS a una concentración final de 0.25%.

la glucitolamina 6-P (GlcN-ol-6P) también protegía al sulfhidrilo expuesto. Sin embargo la constante de segundo orden fue  $1.52 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , lo cual indica que este ligando no protege al grupo tiol. Actualmente no contamos con evidencia experimental acerca de cual de los tres sulfhidrilos es reactivo en la enzima nativa. Finalmente, como mencionamos anteriormente, la enzima modificada con DTNB es inactiva. Para descartar que la inhibición de la actividad enzimática pudiera deberse a un impedimento estérico ocasionado por el DTNB en sí, se probó un reactivo menos voluminoso, el metil-metano-tio-sulfonato el cual también inhibió completamente a la enzima (tabla 2). Interesantemente, la reacción con este último compuesto no pudo ser revertida por ningún agente reductor ni aún por el borohidruro de sodio.

#### *Aminoácidos del extremo amino de la desaminasa de bovino y sus alineamientos.*

La secuencia de los primeros 42 aminoácidos de la desaminasa bovina se muestra en la figura 8. En la misma figura se puede observar el alineamiento de este segmento con los correspondientes de seis GlcN6P desaminasas de diferentes organismos. Podemos observar que existe una clara homología entre los 7 segmentos analizados, en particular, entre las desaminasas de bovino, humana y de hamster, en donde encontramos una identidad de residuos de 42/40 y 42/41 respectivamente. Las diferencias en esos casos son menores, ya que se trata de cambios de D por E, que son aminoácidos del mismo grupo y que podríamos considerar equivalentes. La menor identidad de la desaminasa de bovino es con las correspondientes enzimas de *B.burgdoferi* y *C.álbicans*. Es interesante resaltar que los residuos 40-42, los cuales forman parte del sitio activo de la desaminasa de *E. coli* ( 8 ), están completamente conservados en las desaminasas bovina y humana. El grupo fosfato del sustrato se une mediante puentes de hidrógeno al grupo OH de la Thr<sup>41</sup> y a la cadena principal entre los aminoácidos 42 y 44.

Agente modificador de -SH	$V_{\max}$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) después del tratamiento con DTE 1mM por dos horas.
Metil-metano-tio-sulfonato	1.3
DTNB	50
Control	51.7

**Tabla 2.** Reactivación por DTE de la GlcN6P desaminasa de bovino modificada con dos reactivos para grupos sulfhidrilo.

La  $k_{cat}$  se determinó después del tratamiento con DTE 1 mM por dos horas; así mismo, las muestras se dializaron para eliminar los reactivos. La alícuota de enzima usada como control recibió el mismo tratamiento de reactivación.

*Bos taurus*  
 MKLIILDHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PDKYFTLGLP TG

*Homo sapiens*  
 MKLIILEHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PEKYFTLGLP TG

*Mesocricetus auratus*  
 MKLIILEHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PDKYFTMGLP TG

*Escherichia coli*  
 MRLIPLTTAE QVGKWAARHI VNRINAFKPT ADRPFVLGLP TG

*Haemophyllus influenzae*  
 MRFIPLQTEQ QVSCWAAQHI INRINDFKPT AERPFVLGLP TG

*Borrelia burgdoferi*  
 MRLIIRPTYE DISKWAANHV AQKINEFSPT KENPFILGLP TG

*Candida albicans*  
 MRQAIFSNPN DAAEYLANYI IAKINSTP-----RTFVLGLP TG

**Figura 8.** Secuencia de los primeros 42 aminoácidos del extremo amino de la GlcN6P desaminasa de bovino.

También se muestra el alineamiento realizado con el programa CLUSTAL V, con los extremos amino de las GlcN6P desaminasas de diferentes organismos.

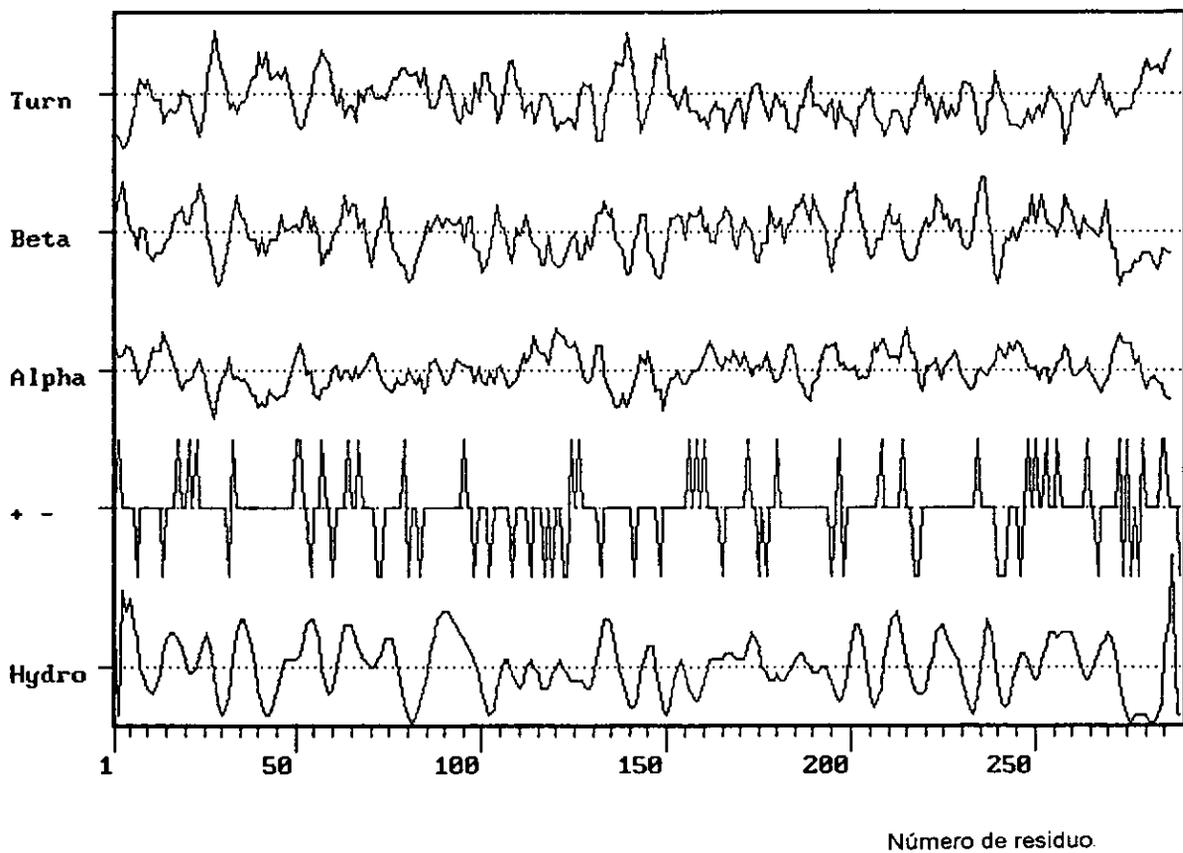
### *Análisis de la secuencia de aminoácidos de la Desaminasa Humana.*

La secuencia aminoacídica completa de la GlcN6P desaminasa humana se muestra en el alineamiento con la enzima homóloga de *E. coli*. en la figura 9. Los residuos que participan en la catálisis, en la conformación del sitio alostérico y aquellos que establecen contactos entre subunidades en la enzima bacteriana, están conservados en la enzima humana. El porcentaje de identidad entre ambas desaminasas fue de 62%. Este alto porcentaje indica que la estructura primaria de esta enzima ha sido muy conservada durante la evolución.

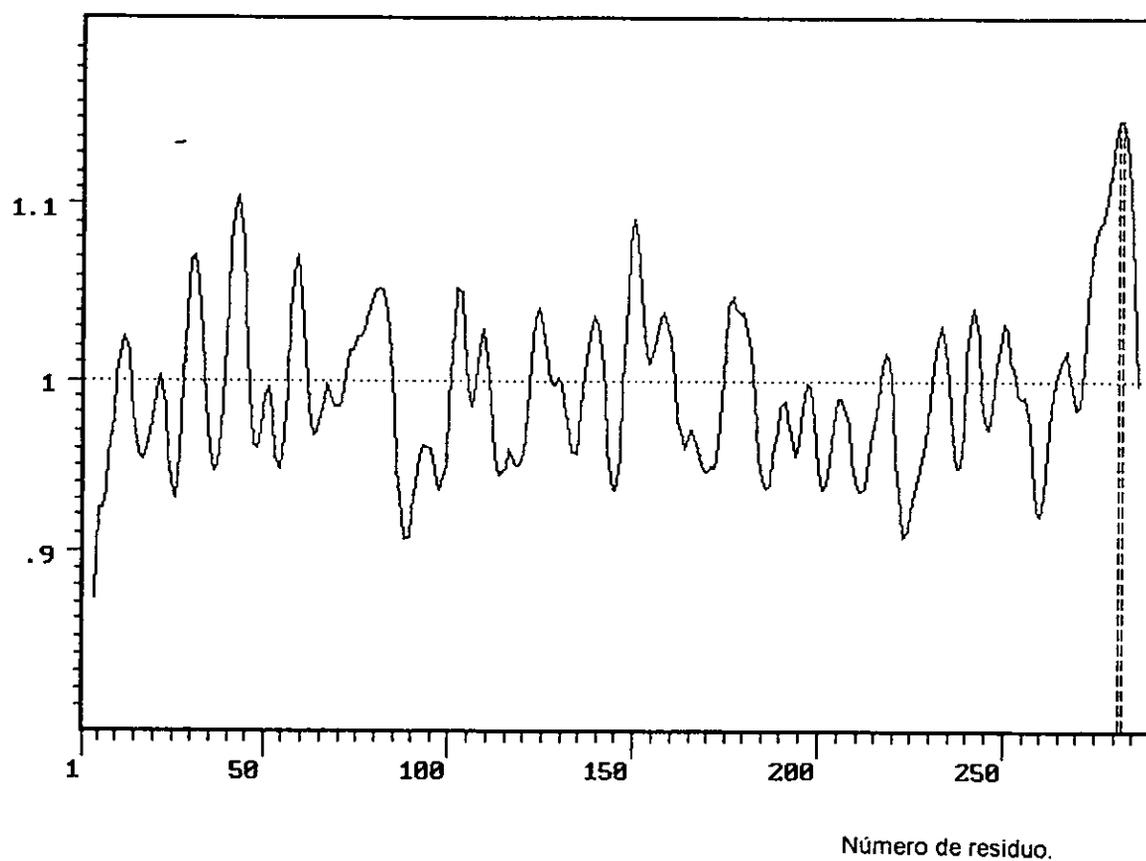
La predicción de la estructura secundaria de la enzima humana se muestra en la figura 10. Los valores obtenidos para las diferentes estructuras son  $\alpha$  hélice 29%, estructuras  $\beta$  16% y 55% de estructuras diferentes a éstas. Es importante notar que el mismo porcentaje de hélices  $\alpha$  se determinó a partir del espectro de dicroísmo circular de la enzima renal de bovino. En cuanto a las predicciones de hidrofiliidad y flexibilidad, que se muestran en las figuras 10 y 11, podemos observar que los últimos 5 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (K,P,Y,S,D) de la secuencia de la desaminasa humana muestran el índice más alto de hidrofiliidad y flexibilidad de toda la secuencia. Este hallazgo es importante porque sugiere que este segmento de la proteína probablemente tiene pocas restricciones de movimiento y esto le permitiría participar en algunas interacciones con otras regiones de la enzima. Por otra parte, es interesante hacer notar que los sitios susceptibles de fosforilación por la proteína cinasa C que se muestran en la figura 12, se encuentran prácticamente concentrados en el segmento carboxilo terminal de la enzima humana y que las desaminasas bacterianas y de levadura no tienen este segmento aminoacídico. Determinar si hay fosforilación de alguno de estos sitios *in vivo* y su significado en la regulación de la desaminasa humana, es un aspecto que se deberá explorar a futuro.

	20		40		60
MKLIILEHYS	QASEWAAKYI	RNRIIQFNPG	PEKYFTLGLP	<b>TGST</b> PLG <del>CYK</del>	KLIEYYKNGD
MRLIPLTTAE	QVGKWAARHI	VNRINAFKPT	ADRPFVLGLP	<b>TGGT</b> PMTTYK	ALVEMHKAGQ
	80		100		120
LSFKYVKTEN	MDEYVGLPRD	HPESYHSEMW	NNFFKHIDIH	PENTHILDGN	AVDLQAECDA
VSFKHVVTFN	MDEYVGLPKE	HPESYSEFMH	RNFFDHVDIP	AENINLLNGN	APDIDAECRQ
	140		160		180
FEEKIKAAGG	IELFVGGIGP	<b>DGHIAFNE</b> PG	SSLVSRTRVK	TLAMDTILAN	ARFFDGELTK
YEEKIRSYGK	IHLFMGGVGN	<b>DGHIAFNE</b> PA	SSLASRTRIK	TLTHDTRVAN	SRFFDNDVNQ
	200		220		240
VPTMALTGVV	GTVM DAREVM	ILITGAHKAF	ALYKAIEEGV	NHMWTVSAFQ	QHPRTV FVCD
VPKYALTVGV	GTL L DAEV M	ILVLGSQKAL	ALQAAVEGCV	NHMWTISCLQ	LHPKAIMVCD
	260		280		
EDATLELKVK	TVKYFKGLML	VHNKLV DPLY	SIKEKET EKS	QSSK KPYSD	
EPSTMELKVK	TLRYFNELEA	ENIKGL			

**Figura 9.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las GlcN6P desaminasas de *E.coli* y humana. La secuencia de la desaminasa bacteriana corresponde a los renglones inferiores. Los residuos importantes para la catálisis se encuentran en negritas, y los del sitio alostérico en itálicas. Éstos se determinaron a partir del análisis cristalográfico de la desaminasa bacteriana ( 8 ). El único residuo diferente del sitio activo encontrado entre ambas secuencias se encuentra subrayado.



**Figura 10.** Predicción de la estructura secundaria y perfiles de hidrofobicidad y de residuos cargados de la GlcN6P desaminasa humana. Los datos se obtuvieron con el programa NOVOTNY.



**Figura 11.** Perfil de flexibilidad de la GlcN6P desaminasa humana. Los datos se obtuvieron con el programa FLEXPPO.

MKLIILEHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PEKYFTLGLP TGSTPLGCYK  
KLEIYYKNGD **LSFKYVKTEN** MDEYVGLPRD HPESYHSEMW NNEFFKHIDIH  
PENTHILDGN AVDLQAECD A FEEKIKAAGG IELFVGGIGP DGHIAFNEPG  
SSLVSRTRVK TLAMDTILAN ARFFDGELTK VPTMALTGVG GTVMDAREVN  
ILITGAHKAF ALYKAIEEGV NHMWTVSAFQ QHPRTVFVCD EDATLELKVK  
**TVKYFKGLML** VH~~N~~KLVDPLY **SIKEKETTEKS** QSSKKPYSD

**Figura 12.** Predicción de los sitios probables de fosforilación por proteína cinasa C de la GlcN6P desaminasa humana. Los sitios se indican en letras negritas.

### *Espectro de dicroísmo circular de la desaminasa renal de bovino.*

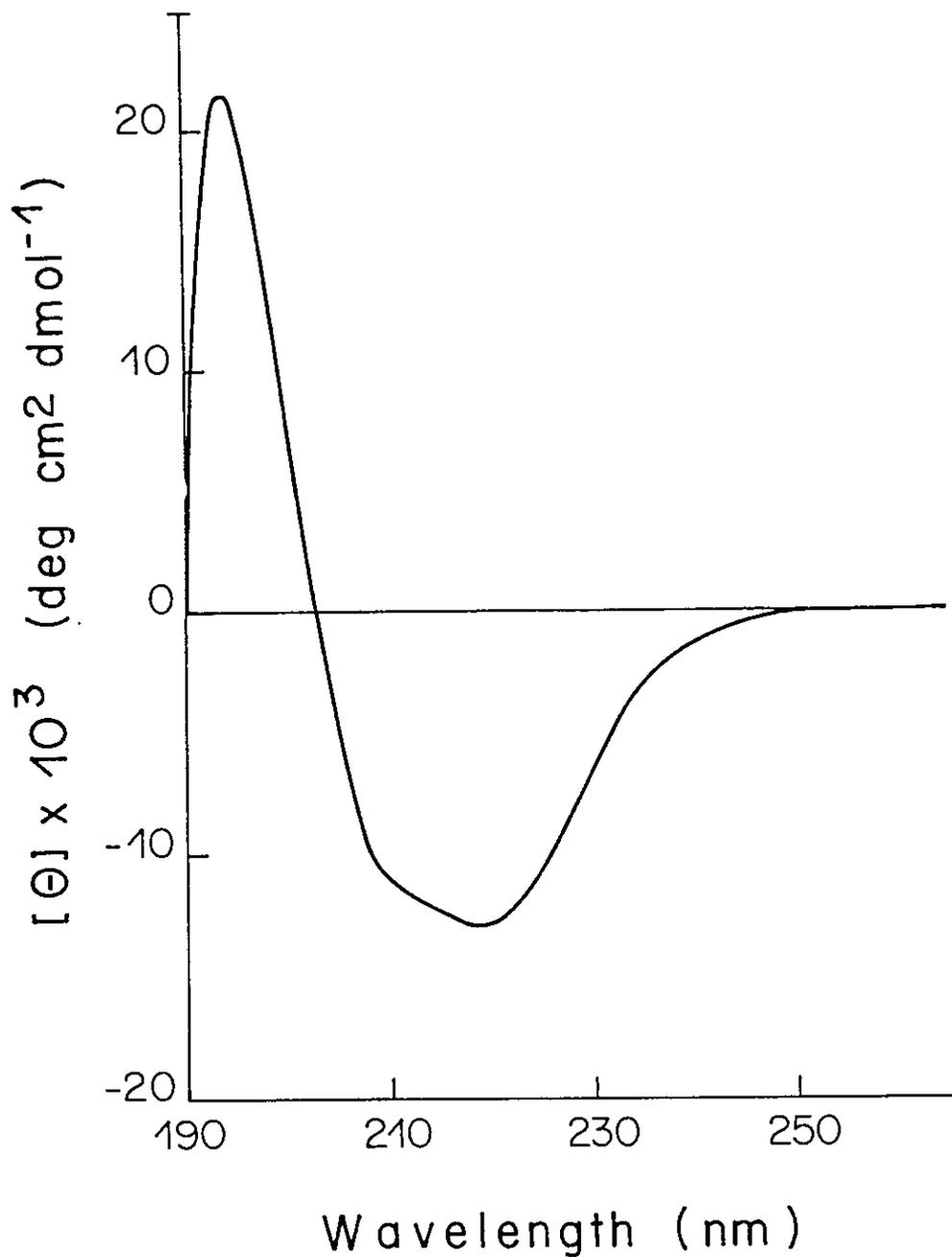
Consideramos que el espectro de dicroísmo circular de la desaminasa de bovino es de utilidad porque aportó información acerca de la estructura secundaria de la desaminasa de bovino, y también nos permitió determinar que existe similitud con el espectro de la desaminasa de *E. coli* ( 59 ) lo cual va a ser considerado en la discusión de la tesis para apoyar la conservación estructural entre estas dos desaminasas. El trazo puede observarse en la figura 13, y podemos mencionar que el espectro es similar al descrito para la familia de proteínas  $\alpha/\beta$ , ( 62 ). Los coeficientes estructurales determinados a partir del espectro para la desaminasa de bovino son: hélice  $\alpha$  29%, estructuras  $\beta$  37%, giros 16% y estructuras no repetitivas 18%.

B) En cuanto a las propiedades cinéticas de las desaminasas de bovino y humana.

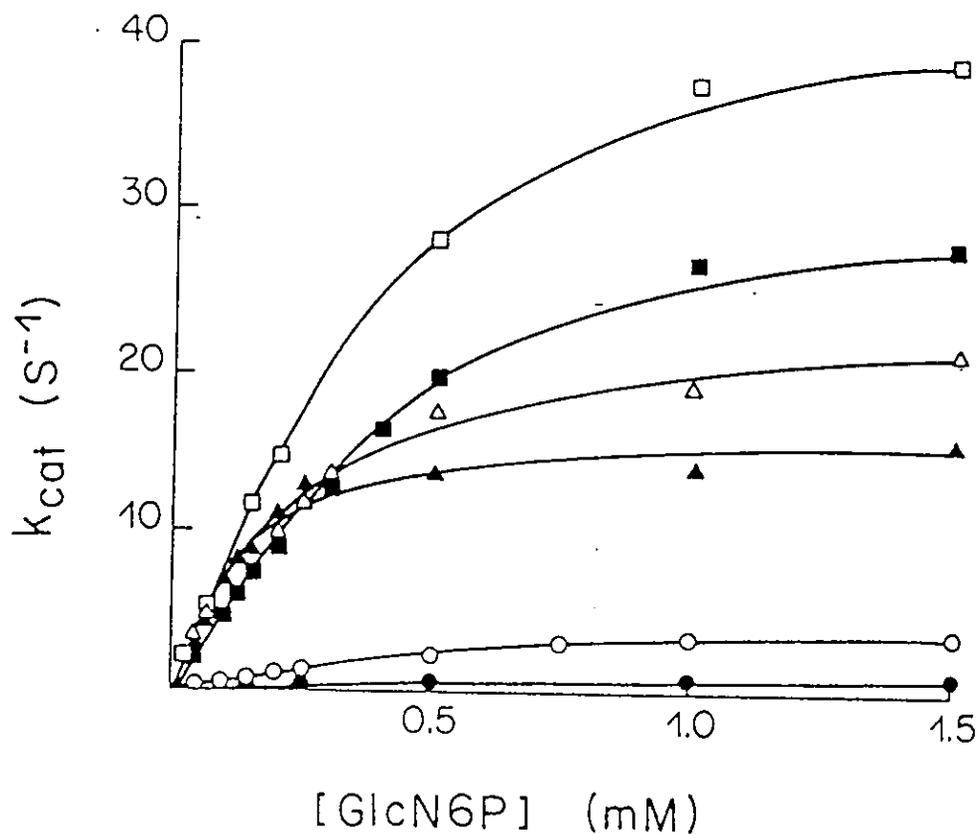
### *Cinética de la GlcN6P desaminasa de riñón de bovino.*

#### 1.- Activación por GlcNAc6P.

La desaminasa renal de bovino muestra muy baja actividad en ausencia de su activador alostérico (GlcNAc6P), sin embargo, presenta cinética hiperbólica (coeficiente de Hill  $1.00 \pm 0.01$ ). La adición de diferentes concentraciones de GlcNAc6P produce un incremento en la actividad de la enzima a expensas de aumentar su  $k_{cat}$  (figura 14). Todas las curvas son hiperbólicas y los coeficientes de Hill de cada una varían entre 1.0 y 1.3. Sin embargo para determinar la existencia o no de cooperatividad, calculamos el valor de la ordenada de Whithead( 70 ), el cual corresponde a una constante de la fracción de sitios ocupados (en estado estacionario), y que es equivalente en el equilibrio solo si  $X=v/V_{max}$ . En la figura 15 A presentamos el gráfico de Whitehead obtenido para una concentración de activador de 20  $\mu$ M. En él podemos observar que la pendiente es cercana a cero, lo cual indica que los datos se ajustan a la ecuación de Michaelis. Para las demás concentraciones del activador se obtuvieron gráficos con la misma tendencia



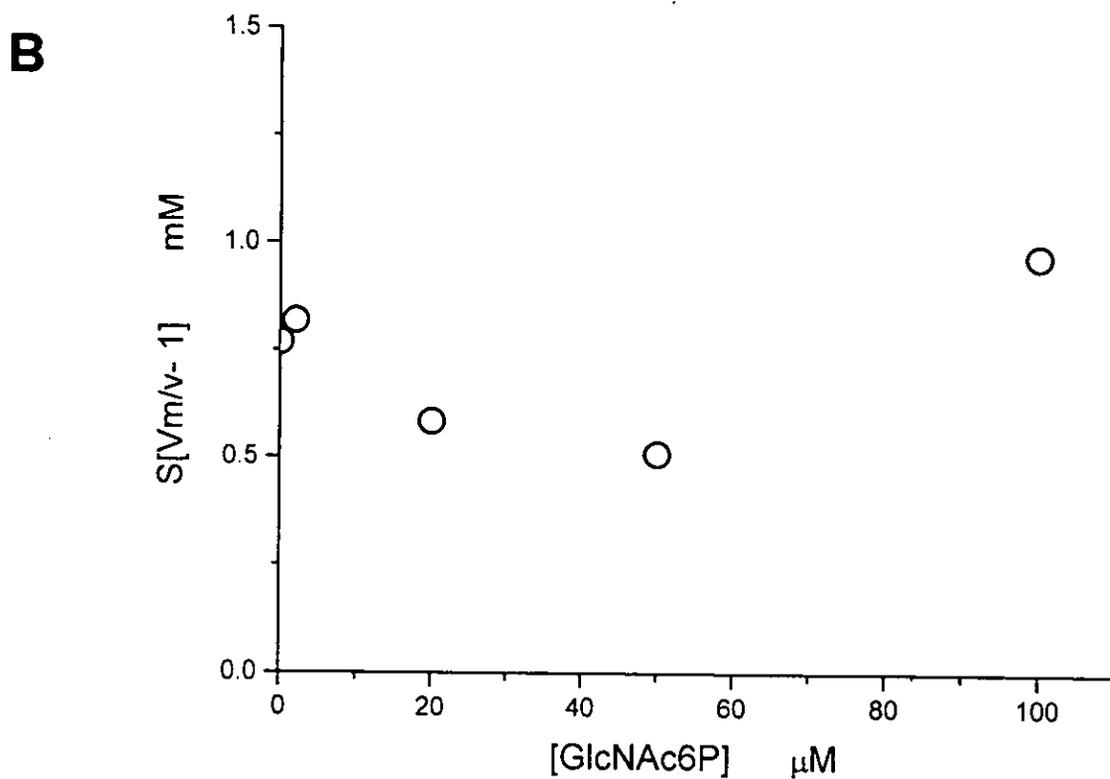
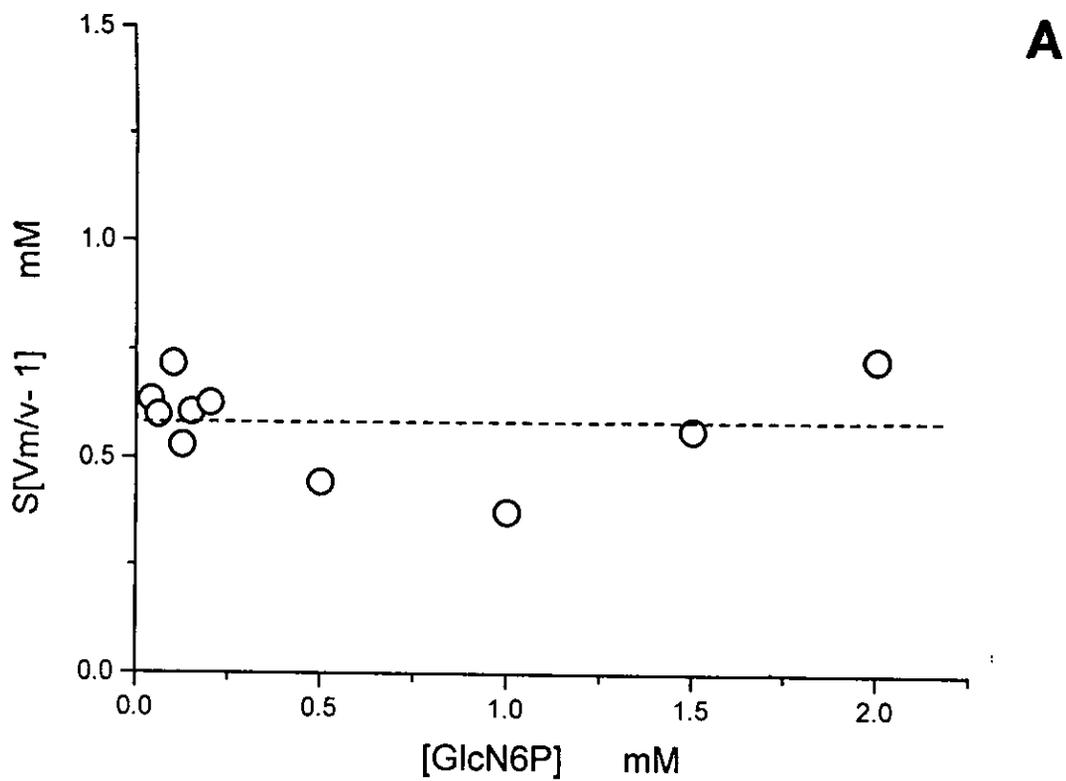
**Figura 13.** Espectro de dicroísmo circular de la desaminasa de corteza renal de bovino. El experimento se realizó en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.5, en una celda con paso de luz de 0.1 cm. La línea de base se obtuvo usando el amortiguador de fosfato.



**Figura 14.** Activación de la GlcN6P desaminasa de bovino.

Se muestran la variación de la  $k_{cat}$  en función de la concentración de sustrato a diferentes concentraciones de GlcNAc6P (activador alostérico).

Las concentraciones son: (●) cero; (○) 2  $\mu M$ ; (▲) 5  $\mu M$ ; (Δ) 10  $\mu M$ ; (□) 20  $\mu M$  y (■) 50  $\mu M$ .



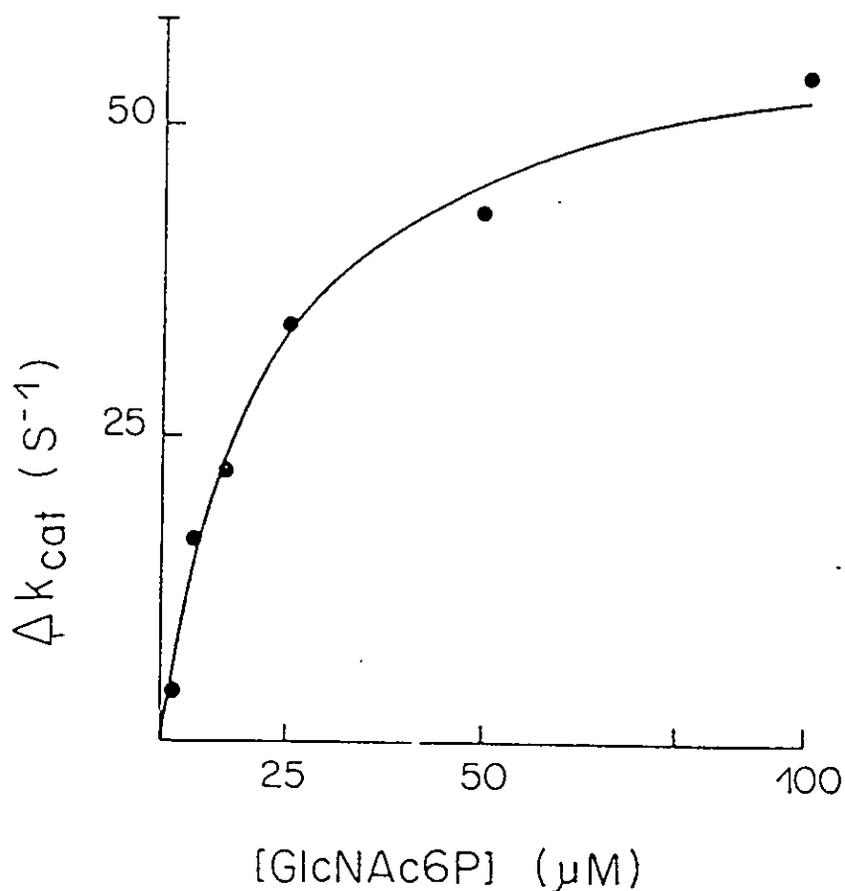
**Figura 15.** A. Gráfico de Witehead correspondiente a una concentración de GlcNAc6P de 20  $\mu M$ , de la desaminasa de bovino. B. Gráfico de la  $K_m$  aparente en función de la concentración de activador alostérico.

de los puntos. En la figura 15 B mostramos la variación de la  $K_m$  aparente en función de la concentración de activador. Es de esperarse que el valor de esta constante no cambie al variar la concentración de activador en un sistema V puro. De igual forma determinamos los cocientes globales de disociación ( 71 ) los cuales representan también el valor de la ordenada descrita por Whitehead, solamente que definidos para el caso de un dímero. Los valores también fueron constantes sobre todo el intervalo de concentraciones de sustrato.

El siguiente paso en el estudio de la activación de esta enzima, consistió en determinar la forma en que varían los valores de las  $k_{cat}$  al aumentar la concentración del activador. Como se puede observar en la figura 16 los valores para la  $k_{cat}$  varían hiperbólicamente en función de la concentración de GlcNAc6P. Sin embargo, de acuerdo al modelo de Monod la forma de la curva de este gráfico correspondiente a un sistema V puro es sigmoide. Esta discrepancia nos obligó a determinar mediante un método más directo, la forma en la que se une el activador a la desaminasa de bovino. Esto lo resolvimos midiendo la unión de la  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc6P a la enzima. La curva de unión de  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc6P obtenida mediante ultracentrifugación, como se describió en material y métodos se muestra en la figura 17. Como observamos, la unión es cooperativa con un coeficiente de Hill máximo de  $1.55 \pm 0.31$  y una  $[\text{GlcNAc6P}]_{0.5}$  de  $95.6 \pm 7.2 \mu\text{M}$  y la estequiometría a saturación de activador es cercana a 6 moléculas de éste (  $6.4 \pm 2.3$  ) por molécula de enzima. Resumiendo, la unión del activador presenta una cinética sigmoide, como corresponde a un sistema V de acuerdo al modelo de Monod, pero la variación de la  $k_{cat}$  en función de la concentración del activador es hiperbólica, cuando se espera que fuera también sigmoide.

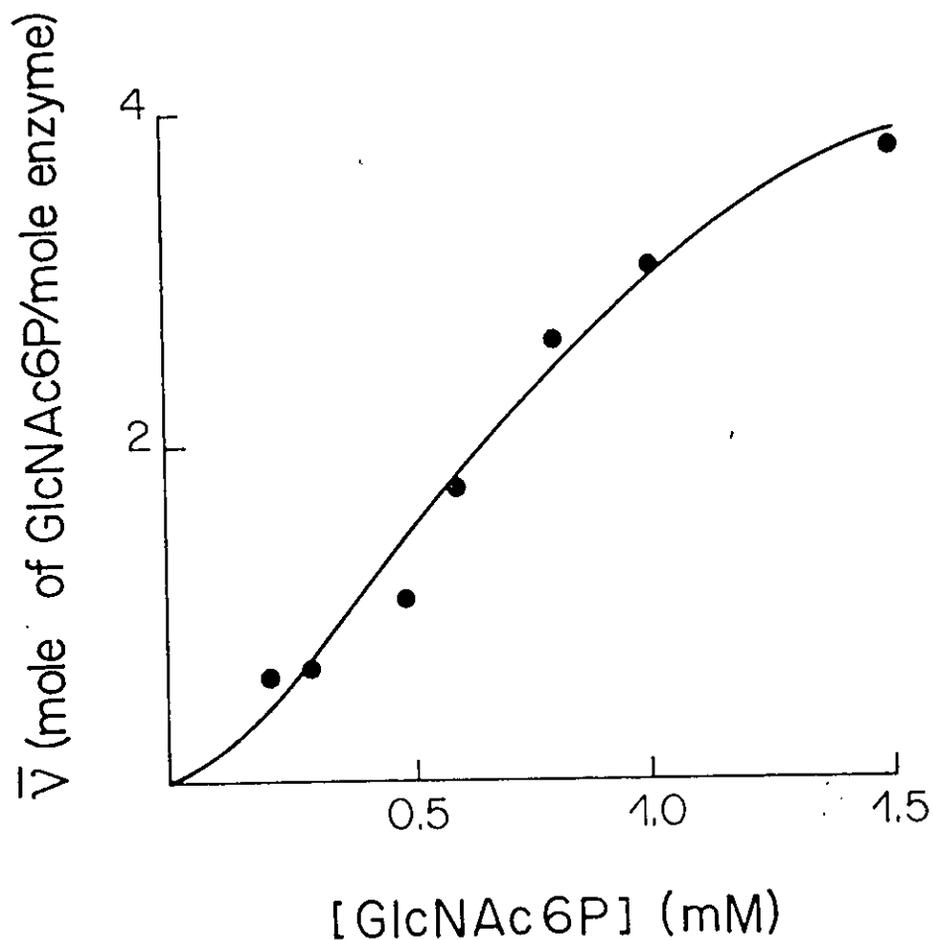
## 2.- La reacción reversa.

En este sentido de la reacción, también se observa un intenso efecto V, como se observa en la figura 18. Por otro lado, los patrones de velocidad inicial (figura19) muestran un conjunto de líneas que se intersectan por debajo del eje del recíproco de la concentración de sustrato. Los datos se ajustaron a la ecuación para un mecanismo

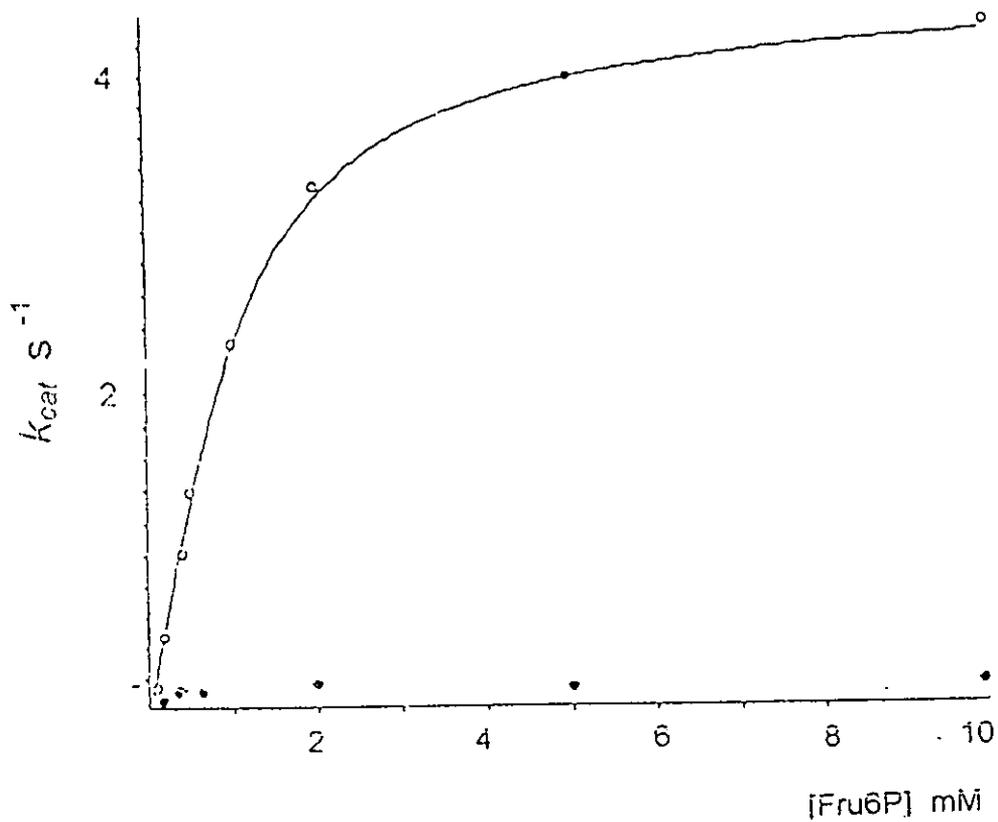


**Figura 16.** Variación de la  $\Delta k_{cat}$  en función de la concentración del activador alostérico de la GlcN6P desaminasa de bovino.

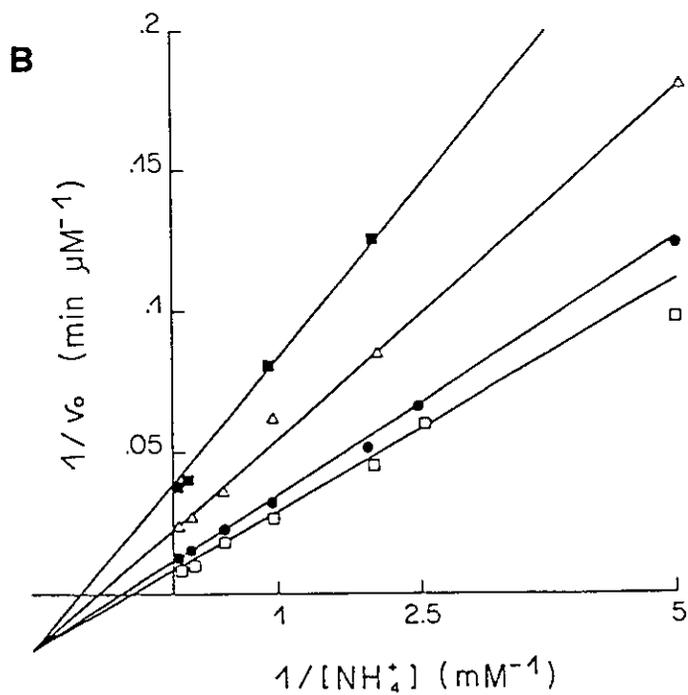
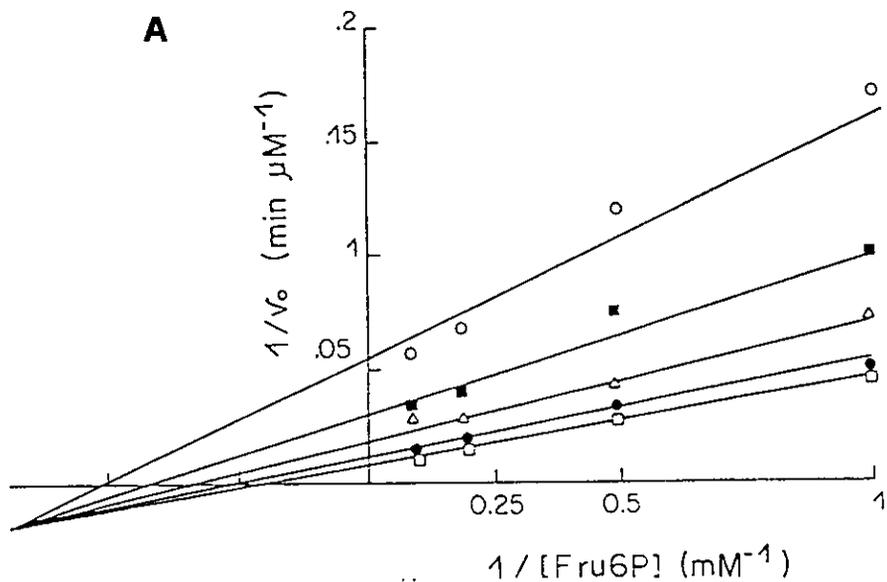
$\Delta k_{cat}$  corresponde a los valores de la constante catalítica para cada concentración de activador obtenidos de la figura 13, restando el valor de la  $k_{cat}$  en ausencia de activador alostérico. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis y los parámetros son:  $K_d$  para el activador de  $17.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$  y  $k_{cat}$   $61.6 \pm 3.6 \text{ s}^{-1}$  para el hexámero.



**Figura 17.** Curva de unión de  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc6P a la desaminasa de bovino. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill, obteniendo un coeficiente de Hill de  $1.55 \pm 0.3$ , una  $S_{0.5}$  para el activador de  $95.6 \pm 7.2 \mu\text{M}$  y  $6.4 \pm 2.3$  moles de GlcNAc6P unida por mol de enzima.



**Figura 18.** Variación de la  $k_{cat}$  en función de la concentración de Fru6P (sentido biosintético). La cinética se realizó variando la concentración de Fru6P, y a una concentración de amonio de 50 mM. (o) corresponde a la cinética con 50 mM de GlcNAc6P; (•) corresponde a la cinética en ausencia de activador alostérico. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis.

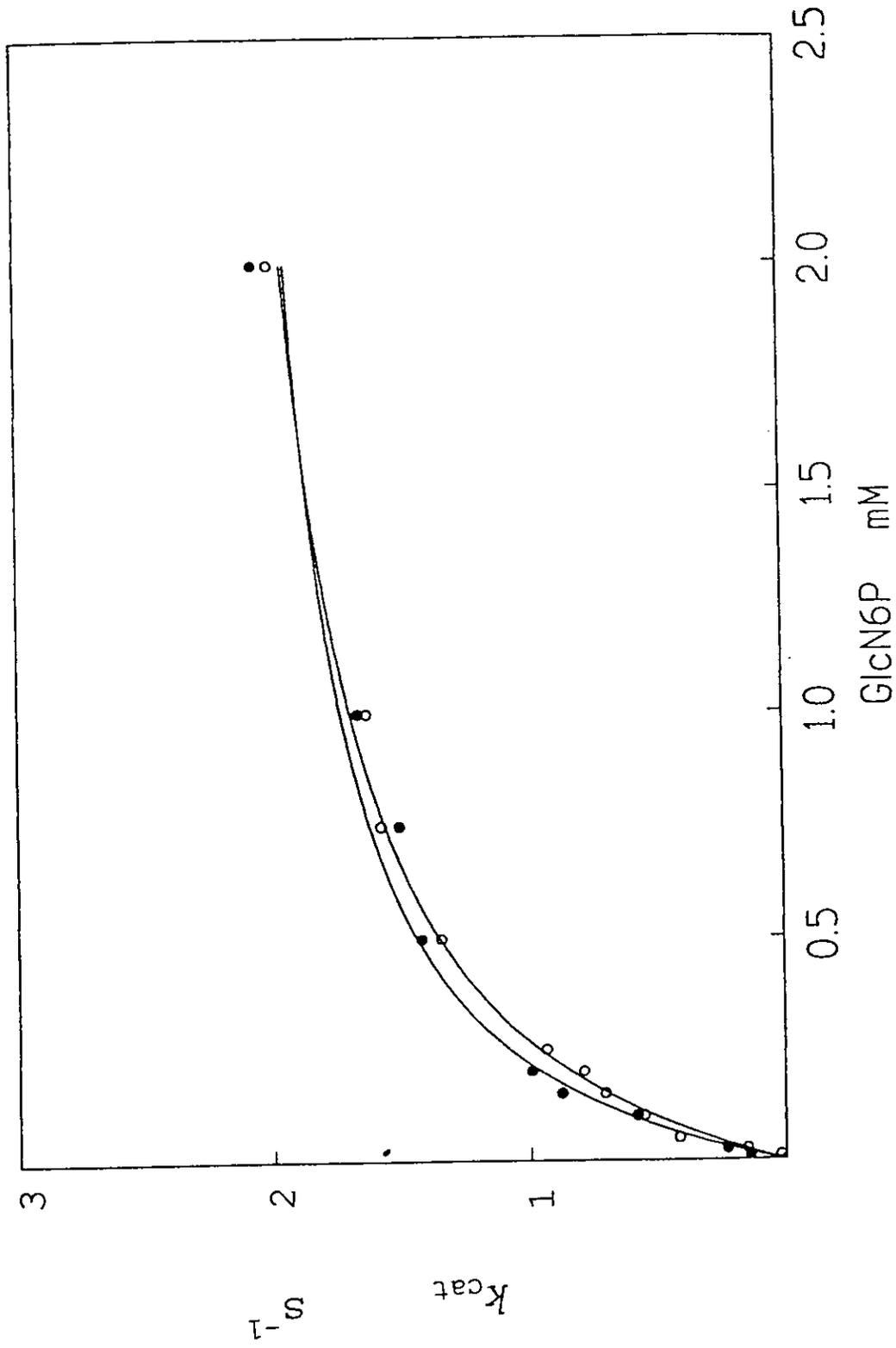


**Figura 19.** Patrones de velocidad inicial de la reacción, en sentido biosintético.  
 A. La concentración de amonio se varió a diferentes concentraciones de Fru6P ( 1, 2, 5 y 10 mM ). B. La concentración de Fru6P se varió a diferentes concentraciones de amonio ( 0.5, 1, 2, 5 y 10 mM ).

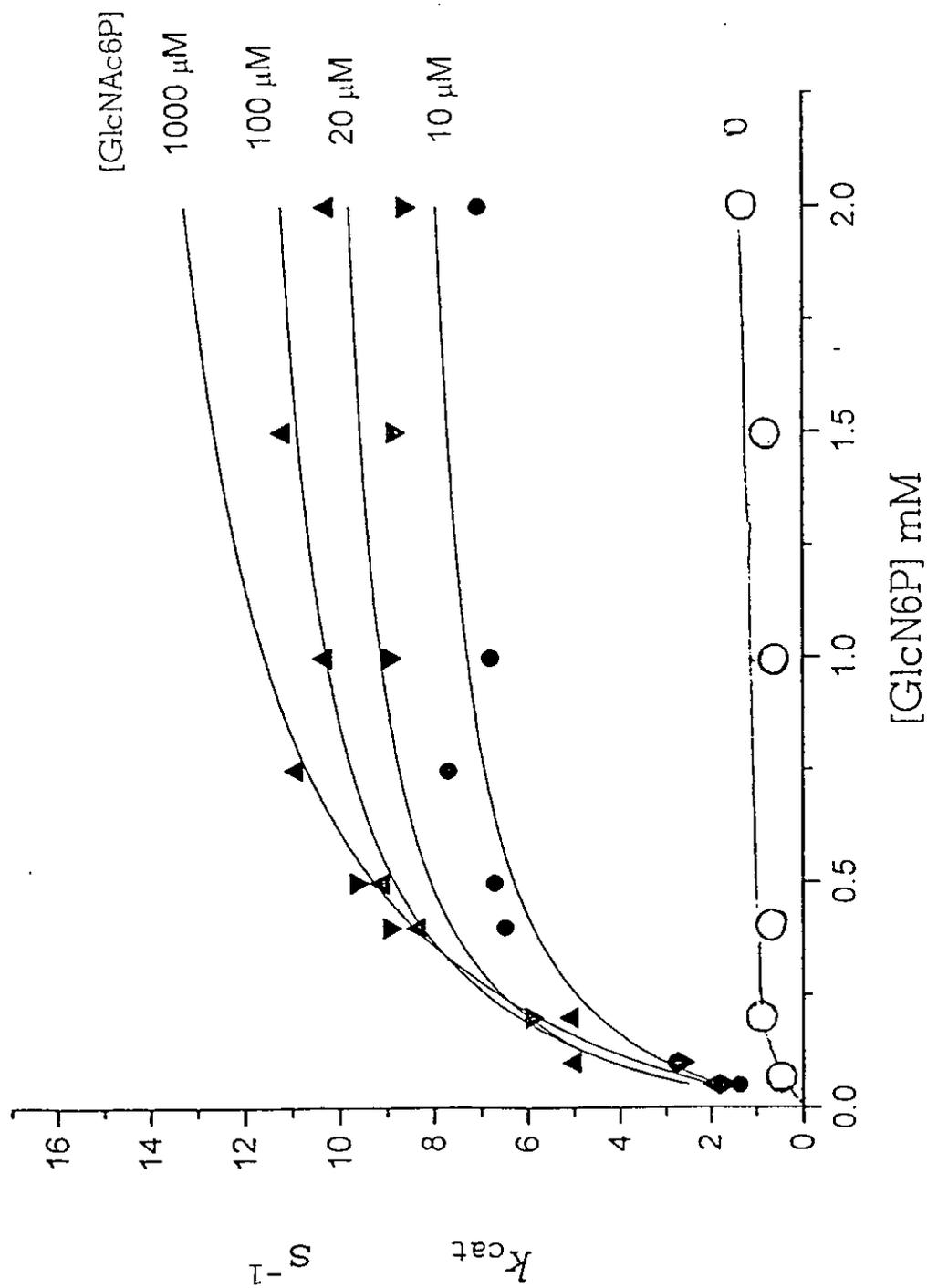
secuencial birreactante en condiciones de estado estacionario ( 34 ), que es la misma relación correspondiente a un mecanismo de equilibrio rápido al azar. Los valores de los parámetros calculados para la desaminasa de bovino son:  $k_{cat}$   $5.8 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m$  Fru6P  $5.9 \pm 0.4 \text{ mM}$  y  $K_m$   $\text{NH}_4^+$   $3.7 \pm 0.8 \text{ mM}$ . Estos valores comparados con los de la desaminasa de *E. coli* nos indican que la  $K_m$  para la fructosa es mayor en el caso de la desaminasa de bovino, pero la afinidad de ésta por el amonio, es casi 6 veces más grande que la de la desaminasa bacteriana

#### *Cinética de la desaminasa Humana recombinante y de la mutante 268 S.*

La activación por GlcNAc6P de ambas enzimas se muestra en las figuras 20 y 21. La desaminasa humana recombinante expresada en *E. coli*, presenta el mismo comportamiento que la desaminasa de corteza renal de bovino respecto a la forma de activación por la GlcNAc6P. La activación de la enzima por el ligando alostérico fue de casi 25 veces con respecto a la  $k_{cat}$  de la enzima en ausencia de activador; la  $K_{dis}$  para el ligando alostérico fue  $14.62 \pm 2.4 \mu\text{M}$ . Este valor se determinó de la misma manera que para la desaminasa de bovino. Como se puede observar en la tabla 3, los valores de las  $K_m$  de la desaminasa humana no muestran una variación muy grande, ni alguna tendencia clara a disminuir o aumentar. Estos datos sugieren que la desaminasa humana también es un sistema alostérico V puro. En el caso de la desaminasa humana recombinante pero truncada en el residuo 268 (268 S), la eliminación de los últimos 21 residuos de la cadena peptídica produjo una enzima en la que se pierde el efecto heterotrópico, es decir, la enzima parece estar permanentemente activada en el estado R (figura 21 ). No obstante, la afinidad por el ligando alostérico está conservada ya que esta mutante se purificó por medio de cromatografía de afinidad por el sitio alostérico y la elución de la columna se realizó con la misma concentración de GlcNAc6P libre utilizada para las desaminasas humana recombinante (no truncada) y de riñón de bovino. La desaminasa humana truncada no muestra activación en relación a su afinidad por el



**Figura 21.** Activación por GlcNAc6P de la GlcN6P desaminasa humana truncada ( 268 S). La cinética se realizó en el sentido catabólico. En la figura se muestran las cinéticas en ausencia de activador alostérico ( o ), y en presencia de 100  $\mu M$  del mismo. Los parámetros cinéticos para éstas y otras concentraciones del activador se muestran en la tabla 4.



**Figura 20.** Activación por GlcNAc6P de la GlcN6P desaminasa humana recombinante. La cinética se realizó en el sentido catabólico. Las concentraciones del activador se indican en la figura. Los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 3.

sustrato, ni en su  $k_{cat}$ . en todo el intervalo de concentraciones de activador que exploramos (tabla 4 ).

[GlcNAc6P]	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>k<sub>cat</sub></i>
μM	mM	s <sup>-1</sup>
0	0.57±0.12	0.42±0.09
10	0.16±0.05	7.1±1.02
20	0.17±0.06	8.5±1.1
100	0.19±0.04	8.8±0.6
500	0.33±0.08	9.9±0.91
1000	0.29±0.1	10.2±2.01

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de la GlcN6P desaminasa humana recombinante, a diferentes concentraciones de activador alostérico. La concentración de enzima fue 10 nM, y los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis.

[GlcNAc6P]	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>k<sub>cat</sub></i>
$\mu\text{M}$	mM	$\text{s}^{-1}$
0	0.34±0.03	2.39±0.73
2	0.47±0.09	2.42±0.82
10	0.28±0.05	2.27±0.4
20	0.22±0.02	2.4±0.031
50	0.26±0.03	2.49±0.21
100	0.26±0.1	2.28±0.41
1000	0.19±0.02	1.78±0.6

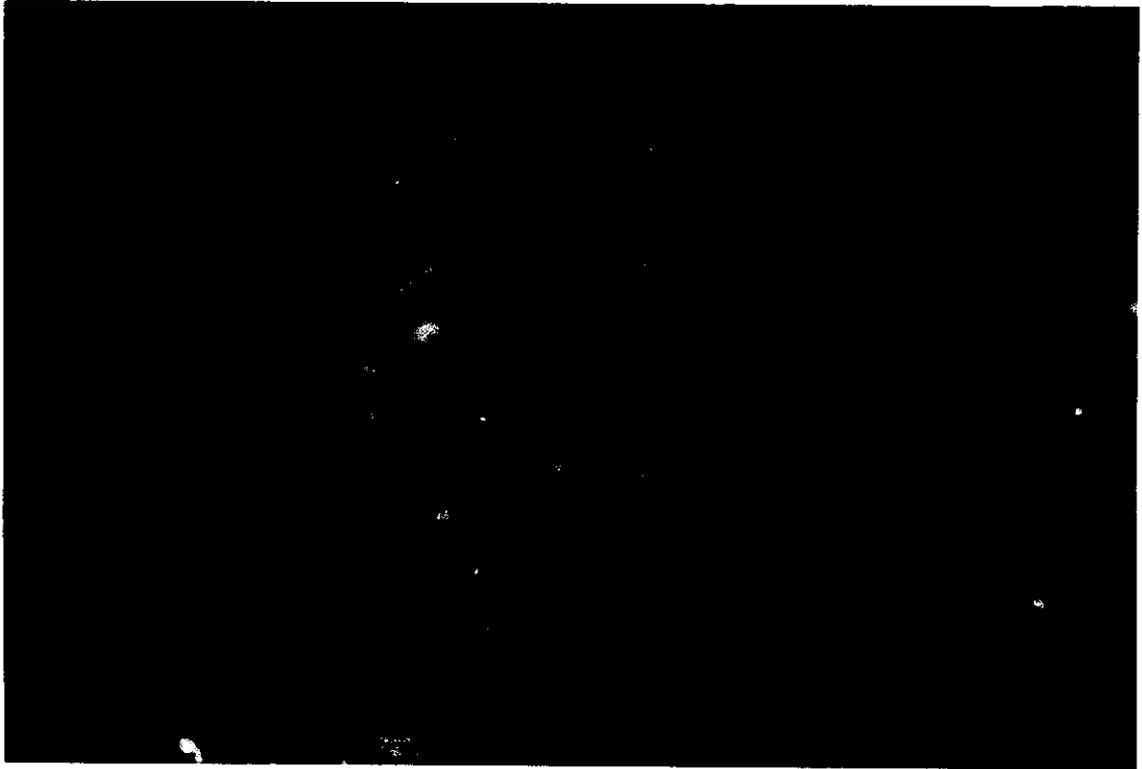
**Tabla 4.** Parámetros cinéticos de la GlcN6P desaminasa humana truncada en el residuo 268 a diferentes concentraciones de activador alostérico. La concentración de enzima fue 10 nM, y los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis.

C) En cuanto a la distribución de la enzima en el riñón.

*Inmunohistoquímica de cortes de tejido renal de bovino.*

Cuando los cortes de tejido renal se analizaron con anticuerpos fluorescentes anti GlcN6P desaminasa de *E. coli*, la fluorescencia se encontró casi exclusivamente en la corteza renal, principalmente en los glomérulos (figura 22 A). Los controles sin embargo, mostraron un poco de marca inespecífica a nivel glomerular. La morfología de las células que incorporaron la marca fluorescente es característica de las células denominadas podocitos, cuya función es sintetizar, junto con las células endoteliales, la matriz aniónica glomerular, rica en heparán sulfato, la cual, debido a su gran cantidad de cargas eléctricas negativas, disminuye la filtración de proteínas a nivel glomerular ( 72, 73 ). Se encontró además que algunas células del epitelio cúbico de los túbulos colectores que descienden hasta la médula renal también fueron positivas para la reacción de la proteína con los anticuerpos fluorescentes (figura 22 B ). Sin embargo, no se detectó reacción positiva en los túbulos contorneados proximales, en donde recientemente se determinó que también se expresa la enzima ( 74 ).

A



B



**Figura 22.** Inmuno detección por fluorescencia de la desaminasa de bovino en cortes de riñón de la misma especie. A. corte de la corteza renal, en donde se aprecia reacción positiva a nivel glomerular. B. Corte de médula renal, se observan algunas células positivas en el epitelio de los túbulos colectores.

## Discusión.

La GlcN6P desaminasa humana, expresada en *E. coli*, tiene el mismo peso molecular que su homóloga de bovino y presentó el mismo comportamiento cinético que ésta; lo cual indica que, aún cuando no conocemos la secuencia aminoacídica completa de la desaminasa de bovino, sus estructuras primaria y terciaria deben ser casi idénticas a las de la humana, como se observa en el caso de la alta identidad que existe entre las desaminasas humana y de hámster. Esto sugiere que en los mamíferos el gen de esta enzima está particularmente conservado. La GlcN6P desaminasa de corteza renal de bovino y la humana recombinante, son además, proteínas que tienen alto grado de homología con la desaminasa de *E. coli*, la cual, a diferencia de las primeras es un sistema alostérico tipo *K* clásico. La homología puede evidenciarse cuando se analizan los siguientes puntos:

- 1.- Existe una clara similitud en la secuencia de los primeros 42 residuos de los extremos amino de la desaminasa de bovino con las demás desaminasas secuenciadas hasta ahora.
- 2.- La estructura primaria de las cinco GlcN6P desaminasas es muy conservada ( anexo 1).
- 3.- En todos los miembros de esta familia se conservan los aminoácidos esenciales para la catálisis, los del sitio alostérico y los de los contactos entre los monómeros, con excepción de la desaminasa de *C. albicans*, la cual no tiene propiedades alostéricas.
- 4.- Por otra parte, el espectro de dicroísmo circular es muy parecido entre las desaminasas de bovino y de *E. coli*, lo cual indica que pertenecen a la misma familia estructural ( proteínas  $\alpha/\beta$ ; 75 ).

5.- Finalmente, los anticuerpos desarrollados contra la desaminasa de *E. coli* reconocen a la desaminasa de bovino, lo cual indica que existe conservación de epítopes entre ambas (fig. 5).

No obstante y, a pesar de dicha homología, las GlcN6P desaminasas humana y de corteza renal de bovino presentan un tipo de activación alostérica poco común y notablemente diferente al mostrado por las desaminasas de *E. coli* y de riñón de perro; y, son dos ejemplos de sistemas alostéricos *V* positivos puros, probablemente los únicos, descritos hasta ahora. Además, son un modelo interesante para el análisis de cómo y por qué ocurrió durante la evolución, un cambio tan drástico en el mecanismo de activación entre estas enzimas, siendo que existe conservación de sus genes a lo largo de la escala filogenética. El significado fisiológico de la activación tipo *V* de la enzima renal de bovino no está claro todavía, pero es importante hacer notar que la regulación por medio de enzimas que modifican la afinidad por su sustrato en respuesta a moduladores alostéricos, ofrece gran flexibilidad en cuanto a los cambios en las concentraciones de ligandos en el microambiente que las rodea. En tanto que los sistemas *V*, tienen una respuesta semejante al tipo todo o nada, esto significa que pequeñas variaciones en la concentración del ligando alostérico afectan en forma importante la actividad catalítica de la enzima, sin que los efectos homotrópicos ( por el sustrato ) participen significativamente en la regulación. Por ello, la regulación alostérica tipo *V* limita la flexibilidad de regulación de la enzima. Con relación al sentido biosintético de la reacción, observamos el mismo efecto *V* ( figura 18). Los parámetros cinéticos muestran que la enzima de bovino tiene la  $K_m$  para el amonio casi seis veces menor que la desaminasa de *E. coli*; mientras que la  $K_m$  para la Fru6P, aunque mayor en la desaminasa de bovino, es casi igual para ambas desaminasas; este hecho, indica que la enzima de mamíferos podría tener algún papel en la eliminación de iones amonio en los tejidos que la expresan ( 76 ). También es importante indicar que los patrones de velocidad inicial mostrados por la enzima de bovino son diferentes a los descritos para la desaminasa de *E. coli*, ( 5 ) esto sugiere que, probablemente el mecanismo cinético es diferente entre ambas enzimas, no obstante con los resultados obtenidos no nos es

posible proponer un modelo cinético, ya que tendríamos que conocer los patrones de inhibición por producto.

Otro punto importante en esta discusión es que la desaminasa renal de bovino no se ajusta completamente al modelo de Monod. Esto se basa en el hecho de que la forma en la que varía la  $k_{cat}$  en función de la concentración de activador, es hiperbólica y no sigmoide como se espera de un sistema V en el modelo de Monod ( 33, 34 ). Sin embargo, la curva de unión del ligando alostérico a la enzima sí muestra una curva sigmoide. Este aspecto debe dar lugar a la proposición de un modelo que explique el comportamiento cinético de la enzima de bovino, y para ello, será de gran utilidad determinar la forma en que se une el inhibidor competitivo radioactivo a la enzima, utilizando la misma estrategia que usamos con el activador alostérico. El valor de la  $k_{cat}$  de la desaminasa de bovino en el sentido desaminante de la reacción, a concentración infinita de activador es un orden de magnitud menor que la correspondiente de la desaminasa de *E.coli*, pero la  $K_m$  de la enzima de bovino para la GlcN6P es también un orden de magnitud menor por lo que la eficiencia catalítica de ambas es similar. Este mismo caso se encontró con la desaminasa de riñón de perro y la desaminasa de *E.coli* ( 37 ). En este punto, es importante hacer notar la segunda diferencia importante encontrada en este estudio, la cual se refiere a la mayor masa molecular relativa del monómero, tanto de la desaminasa humana como de la de riñón de bovino con respecto a las de bacterias y a la de riñón de perro. A partir del análisis de las secuencias de la desaminasa humana y de las desaminasas bacterianas, determinamos que el mayor peso molecular de la primera, se debe a la adición de un segmento de 23 aminoácidos localizado en el extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. Esto corresponde a los 2500 Da de diferencia entre las desaminasas encontrados mediante técnicas electroforéticas. El análisis de la secuencia de este segmento, nos permitió determinar que existe un enlace peptídico particularmente vulnerable en un medio moderadamente ácido, el del Asp<sup>267</sup> y la Pro<sup>268</sup>. Esto nos motivó a investigar si ésta pudiera ser la explicación del menor peso molecular del monómero de la GlcN6P desaminasa de riñón

de perro, ya que el proceso de purificación de ésta se realiza a pH de 5.7, el cual podemos considerar moderadamente ácido y la enzima está expuesta a este medio por varias horas; además, debido a que la desaminasa de corteza renal de perro es un sistema *K* clásico, podríamos determinar también si la diferencia en el peso molecular tiene que ver con el cambio en el tipo de activación alostérica. De tal forma que tratamos a la enzima humana recombinante con un amortiguador de acetato de potasio 100 mM pH 5.7, por 24 horas a 4° C, para determinar si ocurría algún cambio en el peso molecular y en el tipo de activación alostérica. Sin embargo, no se logró la proteólisis ni hubo algún cambio en la activación de la enzima. Ante esta situación, decidimos enfrentar el problema con otra estrategia basada en el diseño de una mutante de la desaminasa humana recombinante, la cual se truncó por mutagénesis dirigida en el residuo 268 y cuyo peso molecular es prácticamente el mismo que el de la desaminasa de *E. coli* y de la desaminasa de riñón de perro (figura 5), sin embargo, no presentó el cambio en el tipo de activación de *K* a *V* como esperábamos. En lugar de ello, resultó una forma de la enzima permanentemente activada que no responde a modificaciones en la concentración de activador ( tabla 4, figura 21), pero sigue siendo capaz de unir al ligando alostérico, ya que esta enzima también se purificó mediante la cromatografía de afinidad por el sitio alostérico empleada para las otras desaminasas. Estos datos en conjunto nos sugieren que la activación alostérica diferente entre las desaminasas de perro, *E. coli* y la humana o de bovino, no se debe simplemente a la presencia o no de esos 23 residuos del C-terminal, sino que es un proceso más complejo y que probablemente participen en la transición alostérica residuos de otros segmentos de la cadena o de otro monómero. Para aclarar estos aspectos estructurales y su correlación con la función de la enzima, se requerirá del conocimiento de las estructuras secundaria y terciaria de la desaminasa humana, así como realizar experimentos encaminados a determinar si existe fosforilación de la desaminasa humana en alguno de los sitios potenciales que se encuentran en esta región de la proteína, ya que, en ese caso se abriría la posibilidad de regulación de la actividad de esta enzima a nivel de factores que controlan estas modificaciones postraduccionales. Una explicación alternativa para

explicar el hecho de encontrar desaminasas distintas en masa molecular y en el tipo de activación alostérica entre mamíferos ( perro y bovinos), sería la existencia de más de un gen para esta enzima, sin embargo, recientemente se determinó la localización del gen de la desaminasa humana mediante hibridación in situ, y sólo se encontró un locus en el cromosoma 5 ( 17 ). Por otro lado, actualmente se está realizando la construcción del modelo cristalográfico del conformero R de la desaminasa humana y los resultados preliminares indican que la hélice 8 en la desaminasa de bacteria se continúa e involucra a algunos residuos de los 23 extra que posee la desaminasa humana y que probablemente existen contactos entre ciertos aminoácidos de este segmento con residuos del monómero vecino ( Dr. Eduardo Horjales, comunicación personal). El análisis comparativo de las secuencias de las desaminasas bacteriana y humana también mostró que los residuos catalíticos y alostéricos están conservados ( figura 9 ). La única diferencia encontrada, es el residuo 44, que forma parte de las interacciones del inhibidor competitivo con la enzima. La Gly<sup>44</sup> en la desaminasa de *E coli* cambia por Ser en la humana. Este pequeño cambio puede tener algún significado en la afinidad de la enzima por el sustrato, ya que la serina puede formar un puente de hidrógeno que la glicina no podría. De hecho existe una diferencia detectada experimentalmente en cuanto a la capacidad de ambas proteínas a unirse a la celulosa fosfato, una resina que actúa como matriz de afinidad por el sitio activo de las desaminasas de mamíferos y a la cual, la desaminasa de *E. coli* no es capaz de unirse. Otro residuo importante es la Tyr<sup>254</sup>, la cual está implicada en la función alostérica de la desaminasa de *E coli*, y también está conservada en la desaminasa humana. Esto es importante porque recientemente se demostró que el cambio de este residuo por Phe, produce una enzima que se comporta como un sistema alostérico mixto ( 52 ); es decir, que la sustitución de un solo residuo afecta el comportamiento cinético de la enzima. La desaminasa humana no tiene más cambios en los aminoácidos importantes detectados hasta ahora con respecto a la enzima de bacteria, por lo que tampoco se puede explicar su diferente tipo de activación alostérica con estas simples consideraciones. El predominio de los sistemas K, en la naturaleza sugiere que existe una presión de selección que favorece a

este tipo de regulación, sobre los V o los mixtos ( 38 ). Sin embargo en algunos trabajos se ha demostrado que pueden producirse alteraciones en la cooperatividad o desviaciones del comportamiento "K puro" a través de modificaciones por mutagénesis sitio dirigida ( 52, 77, 78 ).

La transición alostérica de la desaminasa de *E.coli* y de la desaminasa de mamíferos probablemente no sea igual. Aún cuando el movimiento de las subunidades produce un estado catalítico más activo en ambos casos, es probable que el conformero R heterotrópico sea diferente al R homotrópico en las desaminasas humana y de bovino. En el estudio de los grupos sulfhidrilo de la desaminasa de bovino encontramos una evidencia que apoya fuertemente esta posibilidad, ya que el tior expuesto o reactivo de la desaminasa de riñón bovino es protegido parcialmente por el ligando alostérico, pero el inhibidor competitivo a concentraciones saturantes no tiene ningún efecto protector. En cambio, en la desaminasa de bacteria, los dos tioles expuestos se protegen totalmente por los ligandos heterotrópicos y homotrópicos. Una explicación alternativa del fenómeno observado con la reactividad de los tioles es que el efecto protector de la GlcNAc6P esté en relación con su unión al sitio alostérico y no sea una consecuencia de la transición alostérica como en la desaminasa bacteriana. En cuanto a los grupos tioles encontramos otra diferencia estructural importante entre la desaminasa bacteriana y la humana, ya que la desaminasa de *E.coli* tiene al menos parcialmente oxidadas las Cys<sup>219</sup> de una subunidad con el mismo residuo del monómero vecino ( 8 ); en tanto que, la desaminasa de mamíferos no tiene Cys en la posición 219 y como demostramos, la desaminasa de bovino carece de enlaces disulfuro entre subunidades. La localización de la enzima que determinamos en cortes de riñón de bovino no concuerda con la localización reportada por Wolosker ( 74 ). En este trabajo determinaron que la desaminasa se localiza en riñones de rata principalmente en la región apical de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal, y proponen que la actividad de la enzima está relacionada con la incorporación de los átomos de carbono provenientes de los aminoazúcares a la vía glicolítica, para la obtención de energía, la cual sería utilizada en parte para los procesos de transporte activo que realizan esas células. Nuestros resultados indican que la

desaminasa posiblemente se exprese en los podocitos del glomérulo. Estas células deben tener una síntesis activa y también vías catabólicas para los aminoazúcares, ya que están asociadas al recambio de la matriz extracelular rica en heparán sulfato ( 32 ). Una alternativa probable es que la expresión de la enzima fuese diferente en riñones humanos y bovinos, y para discutir este punto, habría que considerar otros factores como la dieta, mecanismos de excreción renal de sustancias, reabsorción de las mismas, etc. que están fuera del alcance del presente trabajo. Finalmente, es importante mencionar que en trabajos recientes se ha relacionado a la GlcN y a la actividad de la GlcN6P sintasa con algunas alteraciones renales en la síntesis del proteoglicano del heparán sulfato en la matriz extracelular glomerular y que tienen que ver con cambios inducidos por hiperglicemia. Sin embargo, en estos trabajos no se ha mencionado el papel que podría tener la GlcN6P desaminasa renal en dichos procesos. Es posible que en los mamíferos la regulación de la expresión de los genes que codifican para ambas enzimas sea semejante a lo que sucede en las bacterias, es decir, cuando la sintasa está activa, la expresión de la desaminasa debe estar inhibida de alguna manera. En concordancia con esto, las actividades de la desaminasa y sintasa en riñón muestran una relación inversa, siendo más activa la desaminasa. Sin embargo, en el hígado, la relación inversa entre ambas se mantiene, pero la enzima predominantemente activa es la sintasa ( 79 ). Esto indicaría que en los animales además existe una separación de la actividad de ambas enzimas mediante su expresión diferencial en distintos tejidos.

## Conclusiones.

- 1.- En el presente trabajo, purificamos a homogeneidad a la GlcN6P desaminasa de corteza renal de bovino, así como la desaminasa humana recombinante y determinamos que ambas son activadas por la GlcNAc6P por medio de un incremento en la  $k_{cat}$  y sin modificar la  $K_{sp}$ . Esto permite clasificarlas como sistemas  $V$  positivos de acuerdo a la nomenclatura de Monod y cols.
- 2.- El peso molecular de la subunidad de las desaminasas humana y de bovino es 2 500 Da mayor al correspondiente de la desaminasa de *E. coli*.
- 3.- La diferencia en el peso molecular se debe a la presencia de un segmento de 23 aminoácidos localizado en el extremo C-terminal de la desaminasa de mamíferos.
- 4.- La desaminasa de riñón de bovino se localizó principalmente en la corteza, a nivel de los glomérulos específicamente en las células denominadas podocitos.
- 5.- La eliminación de 21 aminoácidos del C-termial de la enzima humana no cambió el tipo de activación de un sistema  $V$  a uno tipo  $K$ . No obstante, la enzima truncada perdió la activación heterotrópica por GlcNAc6P.
- 6.- El presente trabajo constituye la primera demostración de un mecanismo de activación alostérica diferente entre GlcN6P desaminasas de diversas especies, a pesar de que son proteínas homólogas; lo cual constituye un punto interesante para estudiar a futuro, ya que podría ayudar a entender los cambios conformacionales en esas proteínas.

## **Perspectivas.**

Aún cuando ya hemos hecho mención de algunos aspectos que son importantes para la continuación del presente trabajo, tanto en los resultados como en la discusión, es importante subrayar algunas consideraciones que se derivan de este trabajo. Primeramente, es importante obtener datos experimentales que permitan proponer un modelo cinético que explique el comportamiento de las desaminasas humana y de bovino. Para ello será de gran utilidad determinar la forma que tiene la curva de unión del sustrato a la enzima humana. Esto se puede lograr mediante el empleo del inhibidor competitivo radioactivo(GlcN-ol-6P), o bien, de la Fru6P y el amonio por separado. Además esto podría aportar datos en cuanto al mecanismo cinético de la desaminasa de mamíferos. Queda también por aclarar el papel que pueden tener algunos de los 23 residuos localizados en el extremo C-terminal de la desaminasa humana en el tipo de activación diferente encontrado, así como los posibles mecanismos que podrían existir para la regulación ( fosforilación, proteólisis limitada u otro). En este sentido, el estudio cristalográfico de la desaminasa humana, así como los experimentos de fosforilación in vitro, podrán aportar resultados que nos permitan aclarar estos aspectos. Por otra parte, es importante iniciar un estudio encaminado a determinar el papel fisiológico que tiene esta enzima en diferentes tejidos de los mamíferos, principalmente en riñón. Para dicho objetivo es importante contar con un modelo experimental en animales que permita manejar adecuadamente algunos estados metabólicos como la acidosis o la alcalosis metabólica, la producción química de diabetes mellitus o la modificación de factores nutricionales, con el fin de determinar si la actividad de la enzima se modifica en esas circunstancias. En este sentido, hemos probado el tejido renal de la rata, y hemos encontrado una buena actividad de la desaminasa en él. Finalmente, considero de especial interés iniciar el estudio de la regulación de la expresión del gen de la desaminasa. La expresión selectiva de la desaminasa en el tejido renal, y en el cerebro, invitan a determinar los mecanismos que

reprimen su transcripción en otros tejidos, pero también es interesante estudiar los mecanismos que regulan los niveles de transcripción en las células que expresan la desaminasa. Para iniciar esta línea de investigación es importante contar con una sonda dirigida contra una región de la secuencia nucleotídica que sea muy específica de la desaminasa, la cual podría ser la región de la hélice<sub>3,10</sub> o la región carboxilo terminal, la cual no tiene semejanza con otras secuencias almacenadas en el Gene Bank. Esto permitiría la hibridación tanto de DNA como del RNAm del gen y de esta manera poder cuantificar los niveles del transcrito. Adicionalmente debemos contar con anticuerpos contra la desaminasa humana para determinar en forma más precisa los niveles de expresión en la célula.

## Bibliografia.

- 1.- J. A. Plumbridge, O. Cochet, J. M.Souza, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno, B.Badet. 1993. Coordinated regulation of aminosugar-synthesizing and degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* **175**: 4951-4956.
- 2.- K. Nataranjan, A. Datta. 1993. Molecular cloning and analysis of the NAG1cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J.Biol.Chem.* **268**: 9206-9214.
- 3.- P.T. Macechko, P. A. Stemile, D. G. Lindmark, D. G. Erlandsen, E. L. Jarrol. 1992. Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Mol. Biochem Parasitol.* **56**: 301-310.
- 4.- J. A. Plumbridge. 1989. Sequence of the *nagBACD* operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the *nag* regulon. *Mol. Microbiol.* **3**: 506-515.
- 5.- M. Calcagno, P. J. Campos, G. Mulliert, J. Suástegui. 1984. Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **787**: 165-173.
- 6.- J. A. Plumbridge. 1995. Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites. *EMBO J.* **14**: 3958-3965.
- 7.- D. G. Comb, S. Roseman. 1958. Glucosamine metabolism. IV: Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J.Biol.Chem.* **232**: 807-827.

- 8.- **G. Oliva, M. R. M. Fontes, R. C. Grratt, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno, E. Horjales.** 1995. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure*. **3**: 1323-1332.
- 9.- **J. A. Plumbridge.** 1991. Repression and induction of the nag regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol. Microbiol.* **5**: 2053-2062.
- 10.- **J. Plumbridge, A. Kolb.** 1998. DNA bending and expression of the divergent *nagE-B* operons. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1254-1260.
- 11.- **L. F. Leloir, C. E. Cardini.** 1956. Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta.* **20**: 33-42.
- 12.- **D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort.** 1996. Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**: 32-39
- 13.- **H. De Reuse, A. Labigne, D. Mengin-Lecreulx.** 1997. The *Helicobacter pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* **179**: 3488-2493.
- 14.- **L. Warren.** 1972. Glycoproteins part B, Elsevier Pub. Co. Amsterdam. p 1099.
- 15.- **T. N. Pattabiraman, B. K. Bachhawat.** 1961. Purification of glucosamine-6-phosphate deaminase from human brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **54**: 273-283.
- 16.- **E. A. Noltman.** 1972. The enzymes, 3rd ed. vol. 6, Academic Press, New York. pp 314-318.
- 17.- **V. Schevchenko, M. Hogben, R. Ekong, J. Parrington, F. A. Lai.** 1998. The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene.* **216**: 31-38.

- 18.- N. Nomura, T. Nagase, N. Miyahima, T. Sazuka, A. Tanaka, S. Sato, N. Seki, Y. Kawarabayashi, K. Ishikawa, S. Tabata. 1994. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0041-KIAA0080) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res.* **1**: 223-229.
- 19.- J. Parrington, K. Swann, V. Schevchenko, A. K. Sesay, F. A. Lai. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature.* **379**: 364-368.
- 20.- G. L., McKnight, S. L. Mudri, S. L. Mathewes, R. R. Traxinger, S. Marshall, P. O. Sheppard, P. J. O'Hara. 1992. Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 25208-25212.
- 21.- A. G. Nerlich, V. Kolm, U. Sauer, E. Wagner, E. D. Schleicher. 1998. Expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes.* **47**: 170-178.
- 22.- L. M. Hebert, J. Daniels, E. Zhou, R. Crook, S. Turner, J. Simmons, J. Neidigh, S. Zhu, A. Baron, D. McClain. 1996. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **98**: 930-936.
- 23.- P. Faulkner, J. H. Quastel. 1956. *Nature.* **177**: 1216-1218.
- 24.- M. A. Moscarello, L. Sutherland, S. H. Jackson. 1966. Stimulation of <sup>14</sup>Cglucosamine incorporation into plasma proteins by aminonucleoside. *Biochem.Biophys.Acta* **127**: 373-379.
- 25.- K. Kikuchi, S. Tsuiki. 1979. Metabolism of exogenous N-acetylglucosamine in extracts of rat kidney, liver and hepatoma. *Biochim. Biophys. Acta.* **584**: 246-253.

- 26.- **R. L. Benson, S. Friedman.** 1970. Allosteric control of glucosamine phosphate isomerase from the adult housefly and its role in the synthesis of glucosamine 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* **245**: 2219-2228.
- 27.- **E. Enghofer, H. Kress.** 1980. Glucosamine metabolism in *Drosophila virilis* salivary glands: ontogenetic changes of enzyme activities and metabolite synthesis. *Dev. Biol.* **78**: 63-75.
- 28.- **C. W. Heilig, L. A. Concepcion, B. L. Riser, S. O. Freytag, P. Cortes.** 1995. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J. Clin. Invest.* **96**: 1802-1814.
- 29.- **K. A. Robinson, D. A. Sens, M. G. Buse.** 1993. Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes.* **42**: 1333-1346.
- 30.- **A. Giaccari, L. Morviducci, D. Zorretta, P. Sbraccia, F. Leonetti, S. Caiola, A. Buongiorno, R. C. Bonadonna.** 1995. In vivo effects of glucosamine on insulin secretion and insulin sensitivity in the rat: possible relevance to the maladaptive responses to chronic hyperglycaemia. *Diabetologia.* **38**: 518-524.
- 31.- **L. Rosetti, M. Hawkins, W. Chen, J. Gindi, N. Barzilai.** 1995. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J. Clin. Invest.* **96**: 132-140.
- 32.- **S. Marshall, V. Bacote, R. R. Traxinger.** 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **266**: 4706-4712.

- 33.- **J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux.** 1965. On the nature of allosteric transitions. *J.Mol.Biol.* **12:** 88-118.
- 34.- **I. H. Segel.** 1975. Enzyme Kinetics. Wiley-Interscience, New York, Chapt. 9.
- 35.- **A. Cornish-Bowden.** 1995. Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press, London, Chapter 9.
- 36.- **J. M. Souza, J. A. Plumbridge, M. L. Calcagno.** 1997. N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*: purification and molecular and kinetic characterization. *Arch. Biochim. Biophys.* **337:** 338-346.
- 37.- **R. Lara-Lemus, C. A. Libreros-Minotta, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno.** 1992. Purification and characterization of glucosamine-6-phosphate deaminase from dog kidney cortex. *Arch. Biochim. Biophys.* **297:** 213-220.
- 38.- **J. P. Pardo, M. L. Calcagno.** 1998. ¿Por qué Predominan en la Naturaleza los Sistemas Alostéricos de Tipo K? XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Mérida, México.
- 39.- **J. Hurley, H. Faber, D. Worthylake, N. Meadow, S. Roseman, D. Pettigrew, S. Remington.** 1993. Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* IIIIGlc with glycerol kinase. *Science.* **259:** 673-677.
- 40.- **R. D. Dubrow, L. I. Pizer.** 1977. Transient kinetic studies on the allosteric transition of phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **252:** 1527-1538.
- 41.- **R. D. Dubrow, L. I. Pizer.** 1977. Transient kinetic and deuterium isotope effect studies on the catalytic mechanism of phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **252:** 1539-1551.

- 42.- G. A. Grant, D. J. Schuller, L. J. Banaszak. 1996. A model for the regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, a Vmax-type allosteric enzyme. *Protein Science*. **5**: 34-41.
- 43.- E. Sigimoto, L. I. Pizer. 1968. The mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis. I. Purification and kinetics of phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **243**: 2081-2089.
- 44.- E. Sigimoto, L. I. Pizer. 1968. The mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis. II. Optical studies of phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **243**: 2090-2098.
- 45.- I. Winicov, L. I. Pizer. 1974. The mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis. IV. Subunit structure of phosphoglycerate dehydrogenase and steady state kinetic studies of phosphoglycerate oxidation. *J. Biol. Chem.* **249**: 1348-1355.
- 46.- U. B. Rasmussen, B. Mygind, P. Nygaard. 1986. Purification and some properties of uracil phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys Acta.* **881**: 268-275.
- 47.- A. Molloy, L. R. Finch. 1969. *FEBS Lett.* **5**: 211-213.
- 48.- L. Linde, K. F. Jensen. 1996. Uracil phosphoribosyltransferase from the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus shibatae* is an allosteric enzyme, activated by GTP and inhibited by CTP. *Biochim. Biophys Acta.* **1296**: 16-22.
- 49.- J. J. Ye, M. H. Saier. 1995. Purification and characterization of a small membrane-associated sugar phosphate phosphatase that is allosterically activated by HPr(Ser(P)) of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 16740-16744.

- 50.- **G. J. Euverink, D. J. Wolters, L. Dijkhuizen.** 1995. Prephenate dehydratase of the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*: purification and characterization of wild-type and deregulated mutant proteins. *Biochem. J.* **308**: 313-320.
- 51.- **S. Mazumder, T. Mukherjee, J. Gosh, M. Ray, A. Bhaduri.** 1992. Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca(2+)-ATPase by endogenous calmodulin. *J. Biol. Chem.* **267**: 18440-18446.
- 52.- **G. M. Montero-Morán, E. Horjales, M. L. Calcagno, M. M. Altamirano.** 1998. Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry.* **37**: 7844-7849.
- 53.- **M. M. Altamirano, J. A. Plumbridge, E. Horjales, M. L. Calcagno.** 1995. Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry.* **34**: 6074-6082.
- 54.- **R. Chilla, K. Doering, M. Dogmak, M. Rippa.** 1973. A simplified procedure for the isolation of a highly active crystalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Arch. Biochim. Biophys.* **159**: 235-239.
- 55.- **S. Traniello, M. Calcagno, S. Pontremoli.** 1971. Fructose 1,6-diphosphatase and sedoheptulose 1,7-diphosphatase from *Candida utilis*: purification and properties. *Arch. Biochim. Biophys.* **146**: 603-610.
- 56.- **M. M. Bradford.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- 57.- **H. Edelhoch.** 1967. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry.* **6**: 1948-1951.

- 58.- S. C. Gill, P. H. von Hippel. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- 59.- M. M. Altamirano, J. A. Plumbridge, M. L. Calcagno. 1992. Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and study of their functional role by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* **31**: 1153-1158.
- 60.- L. A. Elson, W. T. J. Morgan. 1933. *Biochem. J.* **27**: 1824-1828.
- 61.- G. A. Levy, H. W. Mac Allan. 1959. *Biochem J.* **73**: 127-132.
- 62.- G. J. Howlett, E. Yeh, H. K. Shachman. 1978. Protein-ligand binding studies with a table-top, air-driven high-speed centrifuge. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 809-819.
- 63.- S. Y. Venyaminov, J. T. Yang. 1996. Circular Dicroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. G. D. Fasman, Ed., Plenum New York.
- 64.- U. K. Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- 65.- R. Hawakes. 1982. *Anal. Biochem.* **119**: 142-147.
- 66.- H. Towbin. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **76**: 4350-4354.
- 67.- W. W. Cleland. 1979. Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Meth. Enzymol.* **63**: 103-138.
- 68.- T. W. Tannhauser, Y. Konishi, H. A. Scheraga. 1987. Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins. *Meth. Enzymol.* **143**: 645-648.

- 9.- **M. M. Altamirano, G. Mulliert, M. Calcagno.** 1987. Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochim. Biophys.* **258**: 95-100.
- 0.- **E. P. Withehead.** 1978. Co-operativity and the methods of plotting binding and steady-state kinetic data. *Biochem. J.* **171**: 501-504.
- 1.- **L. Acerenza, E. Mizraji.** 1997. Cooperativity: a unified view. *Biochim. Biophys. Acta.* **339**: 155-166.
- 2.- **F.N. Ziyadeh.** 1993. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* **22**: 736-744.
- 3.- **J. I. Kreisberg, S.H. Ayo.** 1993. The glomerular mesangium in diabetes mellitus. *Kidney Int.* **43**: 109-113.
- 4.- **H. Wolosker, D. Kline, Y. Bain, S. Blackshaw, A. M. Cameron, T. J. Fralich, R. L. Schnaar, S. H. Snyder.** 1998. Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J.* **12**: 1-99.
- 5.- **M.F.Perutz.** 1990. Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in proteins. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
- 6.- **K.A. Aziz, J.C.Cawley, A.T. Treweeke, M. Zuzel.** 1995. Degradation of platelet glycoprotein Ib by elastase released from primed neutrophils. *Br. J. Haematol.* **307**: 46-4.
- 7.- **C. B. Peterson, D. L. Burman, H. K. Schachman.** 1992. Effects of replacement of active site residue glutamine 231 on activity and allosteric properties of aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry.* **31**: 8508-8515.

78.- N. F. van Det, J. van der Born, J. T. Tamsma, N. A. Verhagen, L. P. Heuvel, J. H. Berden. 1995. Proteoglycan production by human glomerular visceral epithelial cells and mesangial cells in vitro. *Biochem. J.* 307: 759-768.

79.- R. Lara-Lemus. 1991. Tesis de Maestría: Glucosamina-6-fosfato desaminasa de riñón de perro: propiedades cinéticas y moleculares. Facultad de Medicina UNAM, México, D.F. p. 27.

## *Anexo 1*

Alineamiento múltiple de las secuencias de la GlcN6P desaminasa  
conocidas hasta la fecha.

	1				50
giardia	MPSIHVSKCA	D...PAIKL	AHRIAIEVRS	KPNC.VLGLA	TGSTPIPVYQ
C_elegans	MKLIIEENAD	KVAEFAARYV	VTKINE.ATE	NGKYLVLGLP	TGSTPLGMYK
H_sapiens	MKLIILEHYS	QASEWAAKYI	RNRIIQFNPG	PEKYFTLGLP	TGSTPLGCIK
M_auratus	MKLIILEHYS	QASEWAAKYI	RNRIIQFNPG	PDKYFTMGLP	TGSTPLGCIK
E_coli	MRLIPLTTAE	QVGKWAARHI	VNRINAFKPT	ADRPFVLGLP	TGGTPMPTYK
H_influe	MRFIPLQTEQ	QVSCWAAQHI	INRINDFKPT	AERPFLVGLP	TGGTPLKTYQ
B_burgdo	MRLIIRPTYE	DISKWAANHV	AQKINEFSPT	KENPFILGLP	TGSSPIGMYK
C_albicans	MRQAFISNPN	DAAEYLANYI	IAKIN....S	TPRTFVLGLP	TGSSPEGIYA
M.capric	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	M.lii.....	....waA..i	..rIn.f.p.	....fvlGLp	TGstP.g.Y.
	51				100
giardia	ELARLHREEG	LDFSQVRFEN	LDEYAGLPPT	HDQTYRFFME	EHLFSKVNIK
C_elegans	KLIEFYNAGV	ISFEKVKTEN	MDEYVDLPRD	HTESYHSFMF	DNFFRHIDIN
H_sapiens	KLIEYYKNGD	LSFKYVKTFN	MDEYBGLPRD	HPESYHSFMW	NNFFKHIDIH
M_auratus	KLIEYYKNGD	LSFKYVKTFN	MDEYVGLPRE	HPESYHSFMW	NNFFKHIDIH
E_coli	ALVEMHKAGQ	VSFKHVVTEN	MDEYVGLPKE	HPESYYSFMH	RNFFDHVDIP
H_influe	ELIRLYQAGK	VSFKHVVTEN	MDEYVALPEE	HPESYHSFMY	NNFFNHIDIL
B_burgdo	NLIELNKNKK	ISFQNVITEN	MDEYIGIEEN	HPESYHSFMW	NNFFSHIDIK
C_albicans	KLIEANKQGR	VSFKNVVTEN	MDEYLGAFPS	DLQSYHYFMY	DKFFNHIDIP
M.capric	.....	.....	.....	.....MK	DNLFDHLDID
Consensus	.Lie..k.g.	.sFk.V.TFN	mDEY.glp..	hpesYhsFM.	.nfF.HiDI.
	101				150
giardia	PENVHFLNGM	ASDYEKECER	YEQELKAIGP	CDVWLLGIGH	NGHIAFNEPG
C_elegans	PANIHILDGN	TSDHEKECEE	YERKIKESGG	IDLFVGGIGP	DGHIAFNEPG
H_sapiens	PENTHILDGN	AVDLQAECDA	FEEKIKAAGG	IELFVGGIGP	DGHIAFNEPG
M_auratus	PENTHILDGN	AADLQAECDA	FEEKIRAAGG	IELFVGGIGP	DGHVAFNEPG
E_coli	AENINLLNGN	APDIDAECRQ	YEEKIRSYGK	IHLFMGGVGN	DGHIAFNEPA
H_influe	PENINILNGN	TDDHNAECRR	YEEKIKSYGK	IHLFMGGVGV	DGHIAFNEPA
B_burgdo	KENINILNGN	ASNLKKECEE	YEKKIKSFGG	IMLFVGGIGP	DGHIAFNEPG
C_albicans	RENIHILNGL	AANIDEECAN	YEKKIKQYGR	IDLFLGGLGP	EGHLAFNEAG
M.capric	PKNINFLDCQ	TSDPKKECQR	YENLIRSVDG	IDFQYISLGI	NGHMAYNEPN
Consensus	peNihiLnGn	a.d...EC..	yE.kIk..Gg	I.lf.gGiGp	dGHIAFNEPg

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

	151				200
giardia	SPRDSRTRVV	CLTQSTI..D	ANARFFGNDK	SKVPTKALSV	GIATIME.SR
C_elegans	SSLASRTRIK	TLNEDTI..Q	ANARFFGGDI	TKVPTQALTV	GVQTVMD.AR
H_sapiens	SSLVSRTRVK	TLAMDTI..L	ANARFFDGEL	TKVPTMALTV	GVGTVMMD.AR
M_auratus	SSLVSRTRVK	TLAMDTI..L	ANARFFDGDL	AKVPTMALTV	GVGTVMMD.AR
E_coli	SSLASRTRIK	TLTHDTR..V	ANSRFFDNDV	NQVPKYALTV	GVGTLDD.AE
H_influe	SSLSSRTRIK	TLTQDTL..I	ANSRFFNNDV	TQVPKYALTI	GVGTLDD.AE
B_burgdo	SSLTSRTRIK	TLTQDTI..I	ANSRFFEGDV	NKVPKNALTV	GIGTIMD.SQ
C_albicans	SSRNSKTRKV	ELVESTI..K	ANCRFFGNDE	SKVPKYALSV	GISTILDNSD
M.capric	TSFNTDTHDV	KLTKETILDM	VNKKKFNS.L	DDCPHTAMTM	GIQTLNNTWK
Consensus	SSl.SrTR.k	tLt.dTi...	AN.RFF..d.	.kVpt.ALtv	GvgT.md.a.

	201				250
giardia	EILLLATGES	KREAVTKSVK	GKCEH.CPA	SFLHEHPHCR	FYVMDAGKV
C_elegans	EVMILITGSH	KALALHQAI	CGISH.MCTV	SAMQMHRCAT	FIATEDATLE
H_sapiens	EVNILITGAH	KAFALYKAIE	EGVNH.MWTV	SAFQQHPRTV	FVCDEDATLE
M_auratus	EVMILITGAH	KAFALYKAIE	EGVNH.MWTV	SAFQQHPRTV	FVCDEDATLE
E_coli	EVMILVLSGQ	KALALQAAVE	GCVNH.MWTI	SCLQLHPKAI	MVCDEPSTME
H_influe	EVMILATGHQ	KALAVQAAVE	GSINH.LWTV	SALQMHRHFL	LVCDEAAQQE
B_burgdo	EVLIIVNGHN	KARALKHAIE	KGVNH.MWTI	SALQLHKNAI	IVSDKNATYE
C_albicans	EIAIIVLGKS	KQFALDKTVN	GKPNDPKYPS	SYLQDHANVL	IVCDNAAA.G
M.capric	KAITVSYGIH	KDFSY.....	.....	.....	.....
Consensus	Ev.il.tG..	Ka.Al..a.e	...nh.mwt.	Salq.H....	.vcDe.at.e

	251				293
giardia	VDNTCCQATN	QASCCGSTSC	HAACA.....	.....	...
C_elegans	LKVKTVKYFK	GLMNHRSVLV	..MF.....	.....	...
H_sapiens	LKVKTVKYFK	GLMLVHNKLV	DPLYSIKEKE	TEKSQSSKKP	YSD
M_auratus	LKVKTVKYFK	GLMLVHNKLV	DPLYSIKEKE	IQKSQAAKKP	YSD
E_coli	LKVKTLYRYFN	EL...EAE..	..NIKGL...	.....	...
H_influe	LKVKTVKYFT	EL...EGAVA	GTDYQDK...	.....	...
B_burgdo	LKVGTVYEFN	DI...ERKNF	NNDLK.....	.....	...
C_albicans	LKSKL.....	.....	.....	.....	...
M.capric	.....	.....	.....	.....	...
Consensus	lkvktv.yf.	.l.....	.....	.....	...

Reprinted from

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

**BBA**

---

Biochimica et Biophysica Acta 1388 (1998) 1-9

Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the *V*-type

Roberto Lara-Lemus <sup>1</sup>, Mario L. Calcagno \*

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-159, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, DF, Mexico*

Received 10 March 1998; accepted 24 June 1998



ELSEVIER

# Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the *V*-type

Roberto Lara-Lemus<sup>1</sup>, Mario L. Calcagno \*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-159, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, DF, Mexico

Received 10 March 1998; accepted 24 June 1998

## Abstract

The enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney has been purified to homogeneity by allosteric-site affinity chromatography. Its amino acid composition and the N-terminal sequence (1-42), were obtained. The amino acid sequence of this segment is essentially identical to the corresponding regions of the human and hamster glucosamine-6-phosphate deaminases. The beef enzyme is a hexamer of 32.5 kDa subunits; this is nearly 2.5 kDa higher than the molecular mass of the homologous enzyme from *Escherichia coli*. Beef kidney deaminase exhibits a notable difference from the bacterial enzyme in its allosteric activation by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate. This metabolite, which is also the allosteric activator of the bacterial glucosamine-6-phosphate deaminase, activates the enzyme by increasing its  $k_{cat}$  without any change in the  $K_m$  values for glucosamine 6-phosphate, over a wide range of activator concentration. This observation places beef kidney deaminase in the class of *V*-type allosteric systems. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Glucosamine-6-phosphate deaminase; Allosteric control; Allosteric *V*-system

## 1. Introduction

The enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6P isomerase-deaminase, EC 5.3.1.10), which converts glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) into fructose 6-phosphate (Fru6P) and ammonia, is an

important enzyme for the regulation of amino sugar catabolism in several organisms. In the bacterium *Escherichia coli*, this regulation has been well characterised and occurs both at the level of gene expression [1] and by means of the allosteric control of deaminase function [2]. The amino sugar degradative genes are encoded by the *nagE-nagBACD* operons, which are turned on when the bacteria grow on amino sugars as carbon source. The inducer of the regulon, which prevents NagC binding to its operators, is *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) [3]. Simultaneously, expression of *glmS*, the biosynthetic gene encoding GlcN6P synthase, is decreased [1,4]. The allosteric control of GlcN6P deaminase is exerted by the activating effect of the allosteric effector, GlcNAc6P [2,5,6]. *E. coli* deaminase is a hexameric homopolymer of 29.7 kDa subunits and the structure

Abbreviations: NbS<sub>2</sub>, 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate); GlcN6P, D-glucosamine 6-phosphate; GlcNAc6P, *N*-acetyl-D-glucosamine 6-phosphate; Fru6P, D-Fructose 6-phosphate, GlcN-ol-6P, 2-deoxy 2-amino D-glucitol 6-phosphate

\* Corresponding author. Fax: +52 (5) 616-2419;

E-mail: mario@bq.unam.mx

<sup>1</sup> Present address: Departamento de Bioquímica de Patógenos, Centro de Estudios sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), INSP, Cuernavaca, MOR, 62508, Mexico.

of its R conformer has been obtained from crystallographic data. Its six subunits appear arranged as a dimer of trimers with an internal 32 symmetry. Its monomers have an open  $\alpha/\beta$  fold which has been described as a modified NAD-binding domain [7]. In contrast, GlcN6P deaminase from the yeast *Candida albicans* is a dimer and lacks any allosteric properties [8]. Although GlcN6P deaminase has been mainly studied in micro-organisms, it has also been found in several higher eukaryotes, such as insects [9,10] and mammalian tissues [5,11] and it has been purified from dog kidney cortex [12]. The putative gene for human GlcN6P deaminase has been cloned from cDNA of myeloid cells and normal melanocytes (locus *nag1* human, Swissprot accession numbers P46916 and N46023, respectively. The sequences are identical). The enzyme from hamster sperm cells has been recently purified and its gene subsequently cloned and sequenced [13]. Both human and hamster GlcN6P deaminases have 289 amino acid residues and their sequences are homologous to the first 258 residues of *E. coli* deaminase. The 1-258 segment contains all groups shown to be relevant for catalysis and intersubunit contacts in the bacterial deaminase molecule [7].

Allosteric activation by GlcNAc6P is observed in all known animal deaminases studied so far. The allosteric control of dog kidney GlcN6P deaminase is essentially similar to that of the *E. coli* enzyme. The kinetics of both *E. coli* [14] and dog kidney deaminases [12] can be well described by the concerted allosteric model of Monod et al. (MWC model, [15]). These enzymes behave as *K*-systems, which means that the allosteric control operates through the modification of the apparent affinity of the enzyme for its substrate, without changing its catalytic constant. With the purpose of extending our studies of eukaryotic GlcN6P deaminases, we started a search for a convenient source of a mammalian GlcN6P deaminase allowing us to prepare sufficient amounts of the protein for structural studies. We found that beef kidney cortex is rich in this enzyme and suitable for the preparation of milligram amounts of the enzyme. The study of this enzyme revealed that it displays interesting and unusual kinetics: it behaves as an allosteric *V*-system, in which the value of  $k_{cat}$ , increases with the allosteric activator concentration. Because of this remarkable regu-

latory behaviour, beef kidney GlcN6P deaminase is an interesting model to analyse the evolution of the allosteric control in these enzymes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Kidneys

Beef kidneys from animals about 6 months old were obtained from a slaughterhouse, placed in crushed ice and transported to the laboratory for immediate processing.

### 2.2. Chemicals and biochemicals

Most biochemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Mexico) or were reagent-grade products. Cellulose phosphate P11 was from Whatman, UK. The affinity chromatography gel, *N*-6-aminohexanoyl glucosamine 6-phosphate agarose was prepared as described [2]. The synthesis of the inhibitor 2-deoxy-2-amino D-glucitol 6-phosphate (GlcN-ol-6P), and the allosteric activator GlcNAc6P were carried out as previously described [14].

### 2.3. Assays

GlcN6P deaminase was assayed in the forward direction of the reaction (deamination of GlcN6P), using a previously described procedure [2]. The reverse of this reaction, i.e. the formation of GlcN6P from Fru6P and ammonia, was measured by means of the colorimetric determination of the GlcN6P according to Levy and Mac Allan [16], as described [2]. In the latter assay, GlcNAc6P, the allosteric activator of the enzyme, interferes with the measurements. Nevertheless, using appropriate blanks, it was possible to explore the kinetics of the reverse reaction in the presence of GlcNAc6P, up to 0.5 mM. Reaction rates were measured at 30°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7.

Protein concentration in crude or partial purified fractions was determined by the dye-binding procedure of Bradford [17]. The concentration of the enzyme in pure preparations was calculated from the absorbance at 280 nm of its solution in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.7. The molar absorption coefficient

used was  $18.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; this value was calculated as described below. The binding curve of  $^{14}\text{C}$ -labelled GlcNAc6P to the enzyme was determined by ultracentrifugation. The procedure was essentially the one described by Howlett et al. [18]. Samples (200  $\mu\text{l}$ ) containing the enzyme and the ligand were centrifuged for 4 h at  $30^\circ\text{C}$  and  $195\,000 \times g$  in a Beckman Optima XL-100K ultracentrifuge using the 42.2 Ti fixed-angle rotor ( $r_m$  10.85 cm). The rotor was decelerated without braking, taking nearly 3.5 h to stop. Samples contained a final concentration of  $2.5 \text{ mg ml}^{-1}$  of dextran (Sigma D4571, average  $M_r$  81 600) to reduce the convective mixing of the sedimented protein. A 70  $\mu\text{l}$  aliquot was taken for scintillation counting. In our hands, this method gives more accurate results than equilibrium dialysis or flow dialysis.

Kinetic and binding data were fitted to different equations using the programme Enzfitter by Robin J. Leatherbarrow (Elsevier 1987), or the programmes developed by W.W. Cleland [19] in a version written in BASIC and obtained from the author's laboratory.

#### 2.4. Enzyme purification

Beef kidney GlcN6P deaminase was purified using a procedure that was modified from one already reported for the isolation of the enzyme from dog kidney cortex [12]. Changes were only introduced in the chromatographic steps of the scheme. In the present procedure, the crude extract was applied to a cellulose-phosphate column equilibrated with 20 mM potassium acetate buffer (pH 5.9), and after washing, the enzyme was eluted with 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 2 mM EDTA. The fractions with deaminase activity were then submitted to allosteric affinity-chromatography in *N*-6-aminohexanoyl glucosamine 6-phosphate agarose equilibrated with 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2 at  $20^\circ\text{C}$ ) containing 2 mM EDTA. The bound enzyme was eluted with a 10 mM solution of GlcNAc6P at pH 8.2, prepared in the same buffer. A single peak of protein was obtained which contains the pure enzyme; the yield is in the range 50–60%, and the resulting enzyme was enriched 200 times with respect to the initial extract. We usually got 1.0–1.5 mg of deaminase for each 100 g of kidney cortical tissue.

The pure beef enzyme was stored at  $-20^\circ\text{C}$  in 50% glycerol containing 20 mM Tris-HCl buffer and 2 mM EDTA, pH 8.2. Under these storing conditions the enzyme conserves its specific activity ( $12.0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) for several months.

#### 2.5. Amino acid analyses and molar absorption coefficient

The analyses of bovine GlcN6P deaminase to determine its amino acid composition and N-terminal sequence were carried out at the W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, New Haven, CT, USA). For amino acid analysis, the enzyme sample (100  $\mu\text{g}$ ) was dialysed against purified water and then lyophilised in a vacuum centrifuge. Hydrolysis was performed at  $150^\circ\text{C}$  for 6 h in 6 M HCl. The sequence of the amino terminal fragment (1–42) was obtained by automatic Edman sequencing.

Cysteines were measured as the thiol groups reacting with  $\text{NbS}_2$ , as previously described [20]. The reaction mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer, 2.5 mM EDTA, and 3 mM  $\text{NbS}_2$  (pH 7.15,  $20^\circ\text{C}$ ), and the reaction was started with the addition of the protein at a final concentration of 0.3  $\mu\text{M}$ . Total thiol groups were measured in the presence of 0.25% SDS. The protein molar concentration of the enzyme, required for these calculations and for the spectrophotometric determination of tryptophan residues, was initially obtained from the theoretical molar absorption coefficient for human GlcN6P deaminase in 6 M guanidinium chloride, pH 6.5, calculated according to Edelhoich [21] and corrected for native conditions as described by Gill and von Hippel [22], using the bovine protein. The result was then refined by sulphhydryl titration data, as previously described [14]. The value obtained for the molar absorption coefficient of the native bovine GlcN6P deaminase at 280 nm and pH 7.7, was  $18.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.6. High performance analytical gel filtration chromatography

Gel filtration was carried out on a Protein-Pak 300-SW column (Waters), equilibrated with 100 mM Tris-acetate buffer at pH 7.5. Several pure proteins were used as molecular weight markers.

## 2.7. Electrophoresis

Electrophoreses under denaturing conditions were carried out according to Laemmli [23]. Electrophoreses under non-denaturing conditions were performed in polyacrylamide gradient gels (3-27% CAP-Gels, ICN, OH, USA). The samples were prepared in a solution of 70 mM Tris base and 80 mM boric acid buffer containing 2.5 mM EDTA (pH 8.3), and ran in this buffer at 6°C at 180 V for 15 h. In each case, several proteins were used as molecular weight standards. Analytical isoelectric focusing was performed in 125×125×2 mm polyacrylamide gel slabs in a horizontal system (Multiphor LKB), using ampholytes covering the pH range 3-10 (Pharmalyte, Pharmacia). After focusing, pH was measured on the gel surface and it was fixed and stained using standard methods. Immunoblots were made by the electrophoretic transferring of the deaminase from a SDS-PAGE, on nitrocellulose or PVDF membranes, and exposing them overnight to polyclonal rabbit antibodies developed against *E. coli* GlcN6P deaminase. Antibodies were detected by the alkaline phosphatase reaction, coupled to the second antibody (anti-rabbit IgG, Sigma).

## 2.8. Circular dichroism (CD) spectrometry

The CD spectrum of the enzyme was recorded in an Aviv 62DS CD spectrometer using an enzyme concentration of 0.1 mg ml<sup>-1</sup> in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, in strength-free cells of 0.1 cm light path. Mean residue ellipticities ( $\theta_{mrw}$ ) were calculated taking into account a residue mean molecular mass of 112. The structural coefficients were calculated according to Chang and Yang [24].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Molecular weight and subunit composition

Bovine GlcN6P deaminase has a subunit relative molecular mass of 32 500 according to its mobility in polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. (Fig. 1A). The molecular mass of the native enzyme is 210 000 as determined by HPLC gel filtration, thus showing that the protein is a hexamer. The

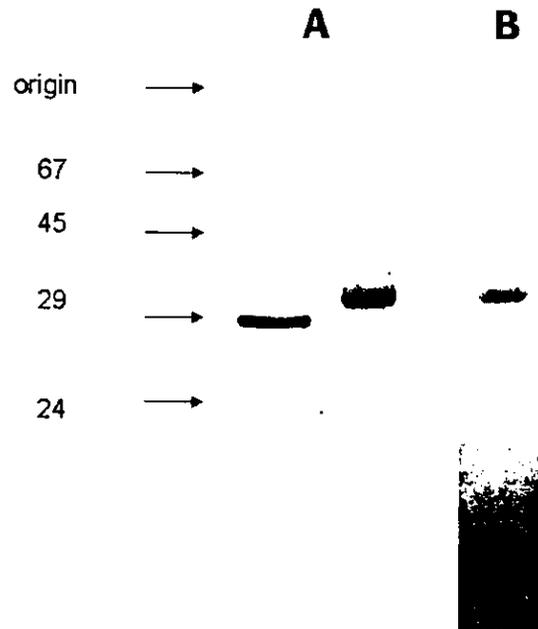


Fig. 1. Electrophoretic purity of GlcN6P deaminase from beef kidney cortex. (A) Right lane: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; total acrylamide, 11%, cross-linkage, 2.6%, sample of 15 µg of enzyme. In the left lane, similar amount of *E. coli* GlcN6P deaminase was run. (B) Immunoblotting of bovine GlcN6P deaminase. A sample of 20 µg of pure enzyme was transferred from a SDS-PAGE gel onto a sheet of nitrocellulose paper. The used antibodies were developed in rabbits against *E. coli* GlcN6P deaminase. The position of molecular mass markers is indicated for lane A.

same result was found by pore-gradient PAGE under native conditions. The isoelectric pH of this protein, determined by electrofocusing in polyacrylamide gels, is 5.9 (not shown).

### 3.2. Amino acid composition

The amino acid analysis of bovine kidney GlcN6P deaminase is shown in Table 1. The titration of thiol groups with NbS<sub>2</sub> in the presence of SDS, indicates the existence of three cysteine residues per enzyme subunit. Only one thiol group per polypeptide chain (1.02 ± 0.05) is reactive in the native protein, while two more sulphhydryls react in the presence of 0.5% SDS (2.97 ± 0.06 thiols per subunit). The modification with NbS<sub>2</sub> of the single reacting sulphhydryl group under native conditions, followed pseudo-first-order kinetics and the enzyme at the end of the reaction is completely inactive. The second-order rate constant for the reaction of the exposed sul-

Tab  
Am  
ney  
Am  
Asx  
Thr  
Ser  
Glx  
Pro  
Gly  
Ala  
Val  
Met  
Ile  
Leu  
Tyr  
Phe  
His  
Lys  
Arg  
Cys  
Trp  
Tot  
\*De  
bCa  
[21]  
in tl  
  
phy  
rep  
coli  
six  
the  
the  
Glc  
grou  
(rat  
s<sup>-1</sup>)  
obt  
sugg  
due  
a bu  
inas  
erot  
char  
tran  
teric  
tive  
itive  
reac  
entia

Table 1

Amino acid composition of GlcN6P deaminase from beef kidney

Amino acid residues per 32.6 kDa (nearest integer)	
Asx	29
Thr	16
Ser	14
Glx	25
Pro	14
Gly	22
Ala	22
Val	19
Met	9
Ile	17
Leu	25
Tyr	14
Phe	17
His	11
Lys	22
Arg	7
Cys <sup>a</sup>	3
Trp <sup>b</sup>	3
Total residues	289

<sup>a</sup>Determined by NbS<sub>2</sub> titration, as described in the text.<sup>b</sup>Calculated from UV spectral data, using Edelhoch equation [21] and the estimated molar absorption coefficient, as described in the text.

phydryl group is  $1.72 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . A similar value was reported for the reaction of Cys<sup>118</sup> and Cys<sup>239</sup> of *E. coli* deaminase [20,25]. This rate constant becomes six times smaller when the reaction is carried out in the presence of saturating concentration (2 mM) of the allosteric activator. The dead-end inhibitor GlcN-ol-6P did not protect this reactive sulphhydryl group when present at a saturating concentration (rate constant of reaction with NbS<sub>2</sub>,  $1.52 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Complete inhibition of the enzyme was also obtained using methyl-methane thiosulfonate, thus suggesting that the inhibition of the enzyme is not due to steric effects produced by the introduction of a bulky group. Both reactive thiols in *E. coli* deaminase are completely protected by homotropic or heterotropic ligands, and this effect was discussed as a change of reactivity produced by the T → R allosteric transition [20]. It is worth emphasising that the allosteric activator only partially protects the single reactive thiol of the beef enzyme, and that the competitive inhibitor GlcN-ol-6P does not modify the reaction rate of the enzyme with NbS<sub>2</sub>. This differential effect of the homotropic and heterotropic lig-

and on thiol reactivity of the beef deaminase, suggests that the structure of the fully homotropically activated enzyme (R homotropic conformer) and the fully heterotropically activated enzyme (R heterotropic conformer) are not structurally identical. An alternative explanation is that the protective effect of GlcNAc6P is related to its binding to the allosteric site, and it is not a consequence of the R → T conformational change, as it is in the case of *E. coli* deaminase.

The possible existence of disulphide linkages was investigated with the NSTB-sulphite reagent, which permits measuring of both thiols and disulphides under denaturing conditions [26]. Three ( $3.22 \pm 0.21$ ) thiols per polypeptide chain were found, thus indicating that the protein does not contain disulphide bonds. By contrast, the residue Cys<sup>219</sup> of *E. coli* deaminase, has been shown to be at least partially oxidised [27,7].

### 3.3. Amino acid sequence of the N-terminal fragment (1-42)

The amino acid sequence of bovine GlcN6P deaminase was determined by Edman automatic sequencing up to residue 42. The sequence is shown in Fig. 2, the alignment with the N-terminal sequence of GlcN6P deaminases of other species available in the GeneBank is also given. The N-terminal sequences of all these proteins are homologous and, in particular, the bovine fragment shows only minor changes with respect to the other two mammalian deaminases. It is interesting to note that the residues 40-42, which are known to be part of the active site of *E. coli* deaminase [7], are completely conserved. In the bacterial deaminase, the phospho group of the bound substrate appears to be hydrogen-bonded to Thr<sup>41</sup> hydroxyl group and to the main chain backbone between 42 and 44, where two glycine residues are conserved [7].

### 3.4. Circular dichroism spectrum

The CD spectrum of the beef kidney GlcN6P deaminase in the far UV range at pH 7.5 is shown in Fig. 3. The curve presents an intense positive peak at 194 nm and a negative one at 218 nm, with a shoulder at 209 nm. The structural coefficients estimated

*Bos taurus*  
MKLIILDHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PDKYFTLGLP TG

*Homo sapiens*  
MKLIILEHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PEKYFTLGLP TG

*Mesocricetus auratus*  
MKLIILEHYS QASEWAAKYI RNRIIQFNPG PDKYFTMGLP TG

*Escherichia coli*  
MRLIPLTAE QVGKWAARHI VNRINAFKPT ADRPFVLGLP TG

*Haemophyllus influenzae*  
MRFIPLQTEQ QVSCWAAQHI INRINDFKPT AERPFVLGLP TG

*Borrelia burgdorferi*  
MRLIIRPTYE DISKWAANHV AQKINEFSPT KENPFILGLP TG

*Candida albicans*  
MRQAFISNPN DAAEYLYNYI IAKINSTP-- --RTFVLGLP TG

Fig. 2. Sequence alignment of the 1-42 segment of bovine GlcN6P deaminase with the homologous N-terminal segment of some animal and microbial GlcN6P deaminases.

from these data are shown in the legend of this figure. This CD spectrum is quite similar to that displayed by *E. coli* GlcN6P deaminase [28] and it is typical of the proteins belonging to the  $\alpha/\beta$  structural class [29].

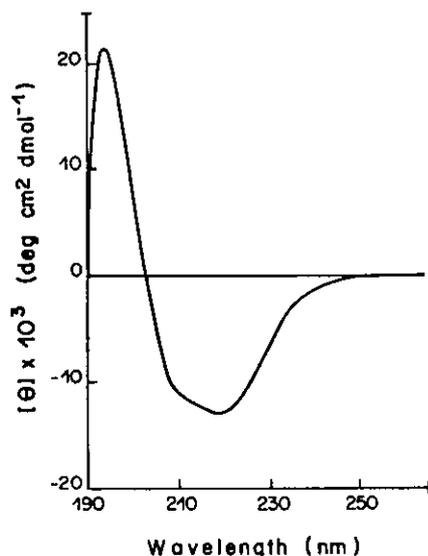


Fig. 3. CD spectrum of beef kidney GlcN6P deaminase. Far UV CD spectrum of beef kidney GlcN6P deaminase. The spectrum plotted is the average of two consecutive runs, using a protein concentration of  $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$ . The structural coefficients obtained are:  $\alpha$  helix, 29%,  $\beta$  strands, 37%, turns 16%, non-repetitive structures, 18%.

### 3.5. Kinetics of beef kidney GlcN6P deaminase: activation by GlcNAc6P.

In the absence of the allosteric activator, bovine GlcN6P deaminase displays a very low activity and follows hyperbolic kinetics (Fig. 4A). The addition of several fixed concentrations of GlcNAc6P, the allosteric activator of most GlcN6P deaminases, activates the enzyme at the expense of an increase of its  $k_{\text{cat}}$  (Fig. 4B). All curves are hyperbolic and the global dissociation quotients [30] are constant over a wide

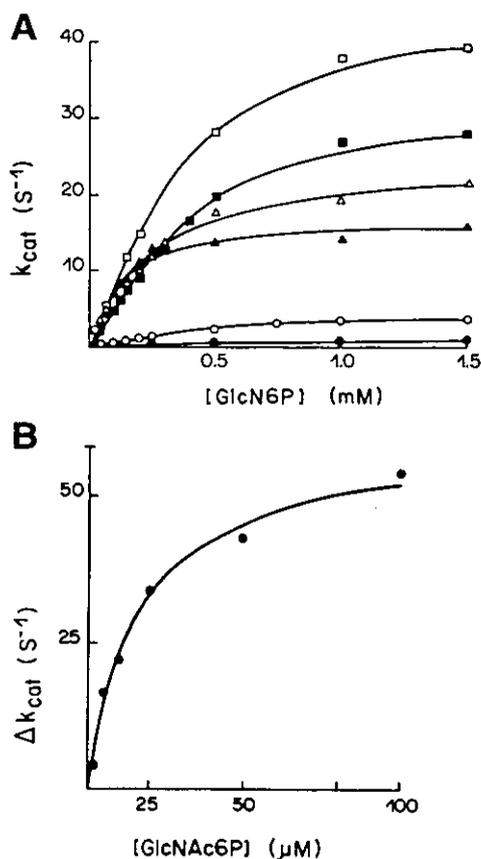


Fig. 4. Kinetics of activation of GlcN6P deaminase from beef kidney. (A) Initial velocities in the forward direction. GlcNAc6P concentrations are:  $\bullet$ , 0;  $\circ$ , 2  $\mu\text{M}$ ;  $\blacktriangle$ , 5  $\mu\text{M}$ ;  $\triangle$ , 10  $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$ , 20  $\mu\text{M}$ ;  $\square$ , 50  $\mu\text{M}$ . The incubation mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 (30°C), 2 mM EDTA, and variable amounts of substrate and allosteric activator. The enzyme concentration was 30 nM. Curves were fitted to hyperbolic kinetics. In the absence of activator ( $\bullet$ ),  $k_{\text{cat}} = 0.37 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m = 0.65 \pm 0.01 \text{ mM}$ . (B) Variation of  $k_{\text{cat}}$  as a function of GlcNAc6P concentration. Replot of the  $k_{\text{cat}}$  values as a function of the allosteric activator concentration. The fitted curve is a hyperbola, with the following parameters  $K_d$ ,  $17.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ , limit  $k_{\text{cat}}$ ,  $61.6 \pm 3.6 \text{ s}^{-1}$ .

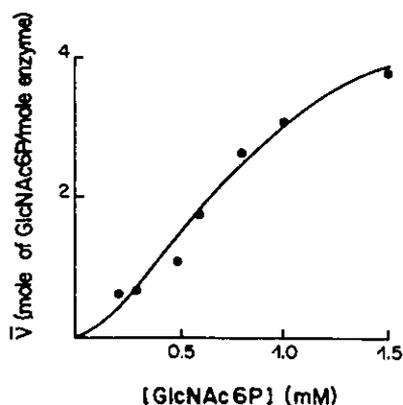


Fig. 5.  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc6P binding to beef kidney GlcN6P deaminase. Data were obtained using the ultracentrifugation technique described in Section 2. Data were fitted to the Hill equation; the corresponding parameters are presented in the text.

substrate concentration range (not shown). The  $k_{\text{cat}}$  values vary hyperbolically with the GlcNAc6P concentration, as shown in Fig. 4B. From these data, a dissociation constant of  $0.025 \pm 0.005$  mM for GlcNAc6P and a  $k_{\text{cat}}$  of  $10.1 \pm 0.2$   $\text{s}^{-1}$  at infinite GlcNAc6P concentration, were obtained. The allosteric transition produces then an increase in  $V_{\text{max}}$  of 27 fold, thus warranting the classification of bovine GlcN6P deaminase as an allosteric enzyme of the  $V$ -type [15]. The enzyme was inhibited by the GlcN6P analogue, GlcN-ol-6P, a dead-end inhibitor of *E. coli* GlcN6P deaminase and thought to be a transition state analogue [31]. The observed inhibition is linear competitive, with a  $K_i$  of  $4.1$   $\mu\text{M}$  (not shown). The binding curve of  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc6P obtained by ultracentrifugation, is shown in Fig. 5. Binding is co-operative ( $h_{\text{max}}$ ,  $1.55 \pm 0.31$ ,  $[\text{GlcNAc6P}]_{0.5}$ ,  $95.6 \pm 7.2$   $\mu\text{M}$ ) and the binding stoichiometry at saturation is six molecules of activator per molecule of enzyme ( $6.4 \pm 2.3$  mol of bounded GlcNAc6P/mol of enzyme). Co-operativity in GlcNAc6P binding denotes the differential affinity of each allosteric conformer for this ligand, in contrast with the similar affinity displayed for the substrate, GlcN6P.

### 3.6. The reverse reaction

The initial velocity patterns for the backward reaction of the allosterically activated enzyme are shown in Fig. 6. The double reciprocal plots consist

of two sets of lines intersecting below the axis of reciprocal substrate concentration. Data were fitted to the equation for a bireactant sequential mechanism under steady state conditions [32].

Beef GlcN6P deaminase displays an intense  $V$ -effect in the reverse direction of the reaction and it is practically inactive in the absence of the allosteric activator over a wide range of Fru6P and ammonium ion concentrations (not shown). It is worth noting that beef GlcN6P deaminase has a  $K_m$  nearly one

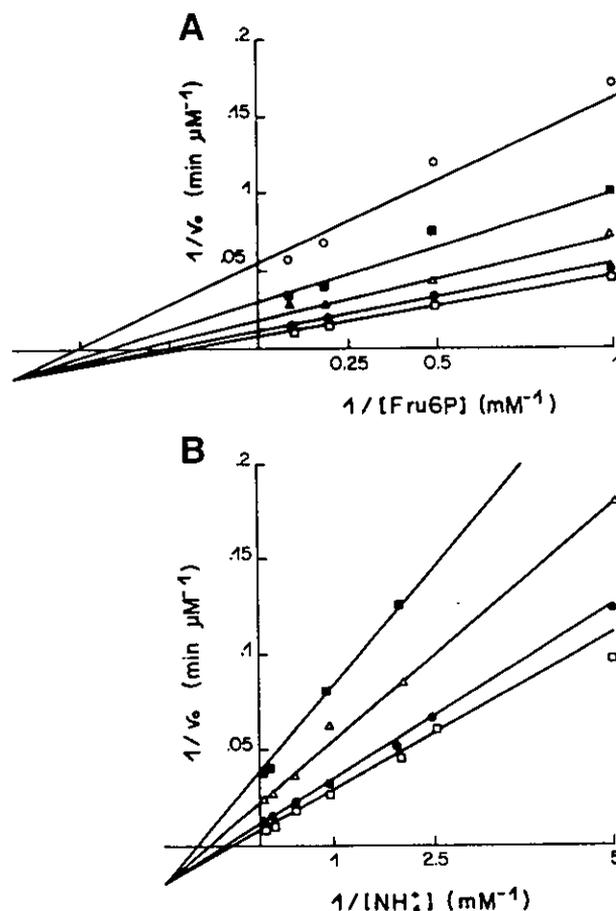


Fig. 6. Initial velocity patterns for the reverse reaction. Double reciprocal plots of kinetic data of beef kidney GlcN6P deaminase in the reverse reaction. (A) Ammonium concentration ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) was varied at different fixed Fru6P concentrations:  $\square$ , 1 mM;  $\bullet$ , 2 mM;  $\triangle$ , 5 mM; and  $\blacksquare$ , 10 mM. The fitted kinetic parameters were  $K_m^{\text{Fru6P}}$   $5.9 \pm 0.1$  mM;  $K_m^{\text{NH}_4^+}$   $3.7 \pm 0.8$  mM;  $k_{\text{cat}}$   $5.8 \pm 0.4$   $\text{s}^{-1}$ . (B) Fru6P concentration was varied at different fixed ammonium concentrations:  $\square$ , 0.5 mM;  $\bullet$ , 1 mM;  $\triangle$ , 2 mM;  $\blacksquare$ , 5 mM; and  $\circ$ , 10 mM. The reaction mixture contained 0.5 mM GlcNAc6P and 25 mM triethanolamine-HCl buffer (pH 7.5). In each case, appropriate blanks containing GlcNAc6P were used.

order of magnitude lower for ammonium than the value reported for the *E. coli* enzyme [2]. Although the synthesis of GlcN6P by the reverse reaction catalysed by this enzyme has been demonstrated in *E. coli* in vivo under particular experimental conditions [33], in this species, deaminase does not normally have a functional role in amino sugar biosynthesis. In beef kidney, however, the lower value of  $K_{mNH_4^+}$  suggests that the reverse reaction could have some biosynthetic role.

#### 4. Conclusion

Bovine GlcN6P deaminase displays an allosteric behaviour that is remarkably different from that of the better known *E. coli* deaminase. This was somewhat surprising since both proteins are undoubtedly homologous, considering their N-terminal sequences and the over all conservation of sequences between the five members of this family whose complete amino acid sequence are known. A conspicuous structural difference between bacterial and mammalian deaminases is that the latter enzymes have a longer polypeptide chain, which is nearly 2.8 kDa heavier and contain 289 amino acid residues, 23 more than in *E. coli* deaminase [34]. The additional residues are located at the C-terminus of the chain. Although we do not know the complete sequence of the bovine deaminase, we have found by SDS PAGE that its subunits are 2.5 kDa heavier than the polypeptide chains of the *E. coli* enzyme. It is tempting to speculate that this structural difference is related to the difference in kinetics observed for the bacterial and bovine enzyme, in particular their different allosteric regulation. It is surprising that the dog kidney GlcN6P deaminase, which has a molecular mass quite similar to that of the *E. coli* enzyme, exhibits the same kind of allosteric activation as the bacterial deaminase [12]. We cannot disregard the possibility that this difference is due to proteolysis at the C-terminal end during the isolation of the dog enzyme.

The remarkably different pattern of allosteric regulation in the bovine and *E. coli* deaminases, although they seem to be so structurally related, is an interesting point for further research that could help to understand the allosteric conformational transition in these proteins.

#### Acknowledgements

This paper was supported by a grant from the National University of Mexico (DGAPA-UNAM Project IN220896). R.L.-L. received a Ph.D. student fellowship also from DGAPA-UNAM and a student research grant from the programme PADEP from the same University. The authors gratefully acknowledge Dr. Jacqueline A. Plumbridge (IBPC, Paris) for critical reading of the manuscript, Drs. Mario Rippa and Franco Dallochio (Istituto di Chimica Biologica, Università di Ferrara, Italy) and Drs. Georges Dreyfus and Georgina Garza-Ramos (IFC, UNAM, Mexico) for access to the CD spectrometer.

#### References

- [1] J.A. Plumbridge, O. Cochet, J.M. Souza, M.M. Altamirano, M.L. Calcagno, B. Badet, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 4951–4956.
- [2] M. Calcagno, P.J. Campos, G. Mulliert, J. Suástegui, *Biochim. Biophys. Acta* 787 (1984) 165–173.
- [3] J.A. Plumbridge, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 2053–2062.
- [4] J.A. Plumbridge, *EMBO J.* 14 (1995) 3958–3965.
- [5] L.F. Leloir, C.E. Cardini, *Biochim. Biophys. Acta* 20 (1956) 33–42.
- [6] D.G. Comb, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 232 (1958) 807–827.
- [7] G. Oliva, M.R.M. Fontes, R.C. Garratt, M.M. Altamirano, M.L. Calcagno, E. Horjales, *Structure* 3 (1995) 1323–1332.
- [8] K. Nataranjan, A. Datta, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9206–9214.
- [9] R.L. Benson, S. Friedman, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 2219–2228.
- [10] E. Enghofer, H. Kress, *Dev. Biol.* 78 (1980) 63–75.
- [11] T.N. Pattabiraman, B.K. Bachhawatt, *Biochim. Biophys. Acta* 54 (1961) 273–282.
- [12] R. Lara-Lemus, C.A. Libreros-Minotta, M.M. Altamirano, M.L. Calcagno, *Arch. Biochim. Biophys.* 297 (1992) 213–220.
- [13] J. Parrington, K. Swann, V.I. Shevchenko, A.K. Sesay, F.A. Lai, *Nature* 379 (1996) 364–368.
- [14] M.M. Altamirano, J.A. Plumbridge, E. Horjales, M.L. Calcagno, *Biochemistry* 34 (1995) 6074–6082.
- [15] J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88–118.
- [16] G.A. Levy, H.W. Mac Allan, *Biochem. J.* 73 (1959) 127–132.
- [17] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [18] G.J. Howlett, E. Yeh, H.K. Schachman, *Arch. Biochem. Biophys.* 190 (1978) 809–819.
- [19] W.W. Cleland, *Methods Enzymol.* 63 (1979) 103–138.

- [20] M.M. Altamirano, J.A. Plumbridge, M.L. Calcagno, *Biochemistry* 31 (1992) 1153–1158.
- [21] H. Edelhoch, *Biochemistry* 6 (1967) 1948–1954.
- [22] S.C. Gill, P.H. von Hippel, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- [23] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] C.T. Chang, C.-S.C. Wu, J.T. Yang, *Anal. Biochem.* 91 (1978) 13–31.
- [25] M.M. Altamirano, G. Mulliert, M. Calcagno, *Arch. Biochim. Biophys.* 258 (1987) 95–100.
- [26] R. Thannhauser, Y. Konishi, H.A. Scheraga, *Methods Enzymol.* 143 (1987) 115–119.
- [27] M.M. Altamirano, J.A. Plumbridge, H.A. Barba, M.L. Calcagno, *Biochem. J.* 295 (1993) 645–648.
- [28] M.M. Altamirano, J.A. Plumbridge, A. Hernández-Arana, M.L. Calcagno, *Biochim. Biophys. Acta* 1076 (1991) 266–272.
- [29] S.Y. Venyaminov, J.T. Yang, in: G.D. Fasman (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum, New York, 1996.
- [30] E. Mizraji, L. Acerenza, J. Lin, *J. Theor. Biol.* 129 (1987) 167–175.
- [31] C. Midelfort, I.A. Rose, *Biochemistry* 16 (1977) 1590–1596.
- [32] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York, 1975, Chapt. 9.
- [33] A.P. Vogler, S. Trentman, J.W. Lengeler, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 6586–6592.
- [34] J.A. Plumbridge, *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 506–515.

*Las cosas aparentemente inanimadas, también desde su fuero interno, entrecornillado, crean un canto: canta la piedra, canta el volcán, cantan las aguas, sobretodo cuando llegan a la dimensión de lágrimas.”*

*Luis Cabero.*