



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

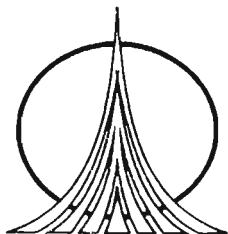
Papel del extremo C terminal
de la GlcN6P Desaminasa Humana Recombinante tipo 1 (*hGNPD-1*)
en la estabilidad y función alostérica.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

RODRIGO MORA LUGO



Unidad en la Diversidad:
Zaragoza Frente al Siglo XXI

MÉXICO, D. F. 2005

m 342819



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.

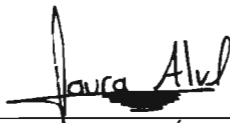
JURADO ASIGANDO

Presidente: Mtra. Leonor Aguilar Santelises
Vocal: Biol.. Laura I. Álvarez Añorve
Secretario: Mtra. Rosalinda Escalante Pliego
1^{er} Suplente: Dra. Maria Teresa Corona Ortega
2^{do} Suplente: Dr. Alberto Monroy García

Este trabajo:

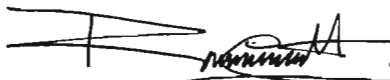
- Se realizó bajo la dirección de la Biol. Laura I. Álvarez Añorve en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas ubicado en el 2º piso de la Torre de Investigación del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Contó con el apoyo del Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL).

Directora de Tesis



Biol.. Laura I. Álvarez Añorve

Sustentante



Rodrigo Mora Lugo

AGRADECIMIENTOS:

A todos los compañeros del “Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas” que ayudaron de una manera u otra en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA:

A mi familia, que es el principal apoyo de todos mis proyectos.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Marco teórico	4
• <i>Aminoazúcares</i>	4
<i>La GlcN y la GlcNAc</i>	4
• <i>Metabolismo de aminoazúcares</i>	5
<i>En <u>E. coli</u></i>	5
<i>En mamíferos</i>	7
• <i>Glucosamina 6-fosfato desaminasa</i>	7
<i>Activación alostérica</i>	12
• <i>Control alostérico</i>	14
<i>Modelo alostérico concertado de Monod, Wyman y Changeux (MWC)</i>	15
<i>Control alostérico de la EcGNPD</i>	19
<i>Sitio alostérico</i>	20
<i>Sitio activo</i>	22
• <i>Estudio comparativo de las GlcN6P desaminasas humana y de <u>E. coli</u></i>	23
<i>desde el punto de vista del mecanismo y la regulación</i>	23
<i>Sitio activo</i>	24
<i>Sitio alostérico</i>	26
Planteamiento del problema	27
Objetivos	28
Hipótesis	29

Material y Métodos	30
<i>Reactivos Químicos</i>	30
<i>Equipo</i>	30
<i>Resina de afinidad</i>	31
<i>Activador alostérico</i>	31
<i>Material Biológico</i>	31
<i>Construcción de la mutante 268fin</i>	32
<i>Cultivo</i>	32
<i>Purificación</i>	33
<i>Cromatografía de afinidad</i>	33
<i>Tabla de purificación</i>	34
<i>Electroforesis</i>	34
<i>Conservación</i>	34
<i>Estabilidad</i>	35
<i>Determinación de la velocidad de reacción enzimática</i>	35
<i>Ajuste cinético</i>	36
Resultados y discusión	
<i>Cultivo</i>	37
<i>Esquema de purificación</i>	37
<i>Electroforesis</i>	39
<i>Conservación</i>	40
<i>Estabilidad</i>	40
<i>Estudios cinéticos</i>	43
Conclusiones	47
Anexo	
1. Protocolo de ensayo cinético de la enzima 268fin	48
2. Protocolo de ensayo cinético de la enzima hGNPD	49
Bibliografía	50

ABREVIATURAS

EDTA	ácido etilendiaminotetracético
<i>EcGNPD</i>	glucosamina 6-fosfato desaminasa de <i>Escherichia coli</i>
268fin	mutante truncada en la posición 268 de la <i>hGNPD</i> -1.
Fru6P	fructosa 6-fosfato
GlcN6P	glucosamina 6-fosfato
GlcNAc6P	<i>N</i> -acetilglucosamina 6-fosfato
GlcN-ol-6P	2-desoxi-2-aminoglucitol 6-fosfato
GNPD	glucosamina 6-fosfato desaminasa
GlcN	glucosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
<i>hGNPD</i> -1	glucosamina 6-fosfato desaminasa humana recombinante 1
<i>hGNPD</i> -2	glucosamina 6-fosfato desaminasa humana recombinante 2
IPTG	Isopropiltiogalactósido
k_{cat}	Constante catalítica
LBamp	medio de cultivo Luria-Bertani complementado con ampicilina
ManNAc	<i>N</i> -acetilmanosamina
MWC	modelo alostérico concertado de Monod, Wyman y Changeaux
NANA	ácido <i>N</i> -acetilneurámico
PAGE-SDS	gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
PTS	Sistema Transportador de la Fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato
SDS	Dodecilsulfato de sodio

RESUMEN

El estudio de la relación entre la estructura de las enzimas y su función es un campo de investigación muy activo en la actualidad. En este laboratorio se investigan las bases estructurales de la función enzimática empleando como modelo experimental algunas enzimas participantes en la vía de utilización de los aminoazúcares. El principal interés de nuestro grupo de trabajo es el de comprender el mecanismo catalítico de estas enzimas, se ha estudiado principalmente la glucosamina-6-fosfato desaminasa humana (*hGNPD*) y la de *Escherichia coli* (*EcGNPD*). Éstas catalizan la isomerización y desaminación reversible de la D-glucosamina-6-fosfato (*GlcN6P*) en D-fructosa-6-fosfato (*Fru6P*) y ión amonio; son hexámeros de seis subunidades iguales, cuya estructura ha sido resuelta por métodos cristalográficos^{15, 18, 21, 27}.

La *EcGNPD* es la desaminasa más estudiada de todas las especies, presenta 266 residuos aminoácidos por monómero¹⁴, en cambio en la especie humana, mamíferos y otros vertebrados terrestres estudiados existen dos glucosamina-6-fosfato desaminasas, denominadas *GNPD-1* y *GNPD-2*. La primera es también conocida como la desaminasa de cadenas pesadas mientras que la segunda es la desaminasa de cadenas ligeras, presentan 289 y 276 residuos de aminoácidos, respectivamente. La desaminasa de cadenas pesadas presenta 23 aminoácidos más que la *EcGNPD* ubicados en su extremo C-terminal.

Tanto las desaminasas humanas (*hGNPD-1* y *hGNPD-2*) como la bacteriana (*EcGNPD*) son reguladas alostéricamente por la *GlcNAc6P*. La regulación alostérica de ésta última es cinéticamente muy simple (sistema *K*, activado por *GlcNAc6P*, explicable casi totalmente por ecuaciones derivadas del modelo alostérico concertado de Monod)¹³, mientras que la *hGNPD-1* presenta un comportamiento alostérico muy complejo. La cinética de la *hGNPD-2* actualmente es motivo de estudio en este laboratorio³⁰.

En este trabajo se investigó el papel del segmento C-terminal no homólogo de la desaminasa humana de cadenas pesadas y su relación con la activación alostérica. Basándose en la hipótesis de que la extensión C terminal en la *hGNPD-1* pudiera ser la causa de la diferente cinética alostérica con respecto a la *EcGNPD*, se estudió cinéticamente la *hGNPD-1* truncada en la posición 268 (mutante 268fin). Esta mutante se construyó mediante mutagénesis dirigida por oligonucleotido, convirtiendo un codón de prolina (residuo 268) en un codón de terminación (UAA). El gen fue clonado en una cepa de *E. coli* -carente de *GNPD*- y la enzima fue purificada por cromatografía de afinidad por el sitio alostérico. Los resultados obtenidos indican que el segmento C-terminal no es el responsable del comportamiento cinético atípico de la *hGNPD-1* ni tiene un papel importante en la estabilidad de su plegamiento.

MARCO TEORICO

AMINOAZÚCARES

Los aminoazúcares son monosacáridos en los cuales uno o más de sus grupos hidroxilo se encuentran sustituidos por aminas primarias, o secundarias al estar sustituidas por un acetilo. Son componentes de la superficie celular de las bacterias y forman parte del esqueleto estructural de péptidoglicanos en eubacterias (pared celular), así como también de la capa externa de lipopolisacárido de las bacterias gram-negativas.

Los aminoazúcares son abundantes en la naturaleza y no son exclusivos de las paredes celulares de las bacterias, también forman parte de diferentes biopolímeros simples o complejos. Son constituyentes de la quitina, que es un homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con uniones β 1-4, y también se encuentran en diversas proteínas glicosiladas. La mayoría de los glicoconjugados (carbohidratos unidos covalentemente a proteínas o lípidos; glicoproteínas y glicolípidos) de las superficies celulares de mamíferos contienen aminoazúcares, incluyendo residuos de ácido siálico. El papel de los carbohidratos en las propiedades de las proteínas es complejo y puede ser tan diverso como: 1) mantener la conformación estructural de una proteína, 2) determinar el tiempo de vida media de glicoproteínas y células circundantes¹, 3) controlar la permeabilidad de la membrana, 4) regular el metabolismo y la división celular^{2,3} y 5) funcionar como receptores de hormonas y patógenos.

La GlcN y la GlcNAc

Los aminoazúcares como la D-glucosamina (GlcN) y la *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) se utilizan como fuente de carbono en *E. coli*. En especial, la GlcNAc promueve velocidades de crecimiento comparables a las producidas por la glucosa. El crecimiento de *E. coli* en un medio con aminoazúcares como única fuente de carbono, induce la expresión

de las enzimas necesarias para el metabolismo de los aminoazúcares, codificadas en el operón divergente *nag* (Figura 1). Los genes *nagB* y *nagA* codifican para dos enzimas, la glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) y la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa (GlcNAc6P desacetilasa), respectivamente.

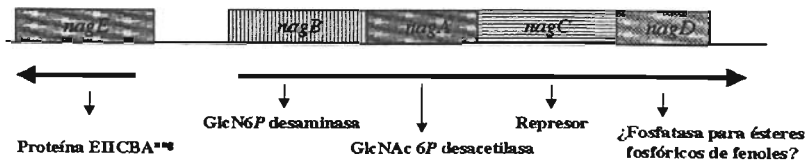


Figura 1. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (Tomado de Plumbridge, 1992).

METABOLISMO DE LOS AMINOAZÚCARES

En *E. coli*:

El metabolismo de GlcN y GlcNAc (Figura 2) se puede llevar a cabo por los procesos catabólicos en los que se utilizan los genes del operón *nag* y por los procesos anabólicos que se llevan a cabo por las proteínas codificados por los genes *glm*. Ambos aminoazúcares son introducidos por productos de los genes *manXYZ* y *nagE* respectivamente que forman parte del sistema de fosfotransferasa (PTS). Durante el tránsito por la membrana son fosforilados y posteriormente se catabolizan hasta Fru6P y amonio por los productos de los genes *nagA* y *nagB*. Cuando la GlcN y la GlcNAc están presentes en el medio son utilizados para la formación de péptidoglicanos y lipopolisacáridos. En ausencia de aminoazúcares, el gen *glmS* es esencial ya que se encarga de la generación de GlcN6P. El gen *glmM* codifica para la enzima responsable de la conversión de GlcN6P en glucosamina

1-fosfato (GlcN1P) mientras que el gen *glmU* codifica para la enzima responsable de la acetilación de la GlcN1P formando *N*-acetilglucosamina 1-fosfato (GlcNAc1P), y posteriormente, se sintetiza UDP-GlcNAc, el cuál se utiliza como donador de aminoazúcares en diversas reacciones de transferencia durante la síntesis de peptidoglicanos. La *N*-acetilmanosamina (ManNAc) entra a la célula por acción del transportador *manXYZ* acoplado al sistema PTS, produciendo *N*-acetilmanosamina 6-fosfato (ManNAc6P). El ácido *N*-acetilneurámico (NANA) entra a la célula por un sistema simporte codificado por *nanT*. Dentro de la célula una aldolasa (*N*-acetilneuraminato liasa, *nanaA*) rompe al NANA generando ManNAc y piruvato. Las vías de degradación del NANA, ManNAc y GlcNAc convergen a nivel de la GlcNAc6P.

La GlcN6P puede ser generada por cuatro diferentes reacciones (Figura 2): 1) Transferencia del grupo amida de la glutamina a la Fru6P (*glmS*, GlcN6P sintasa); 2) Reacción reversa de la GlcN6P desaminasa; 3) Fosforilación de la glucosamina por una hexocinasa (o por fosforilación acoplada al transporte, si estamos hablando de bacterias) y 4) Desacetilación de la GlcNAc6P ^{4,5,6}.

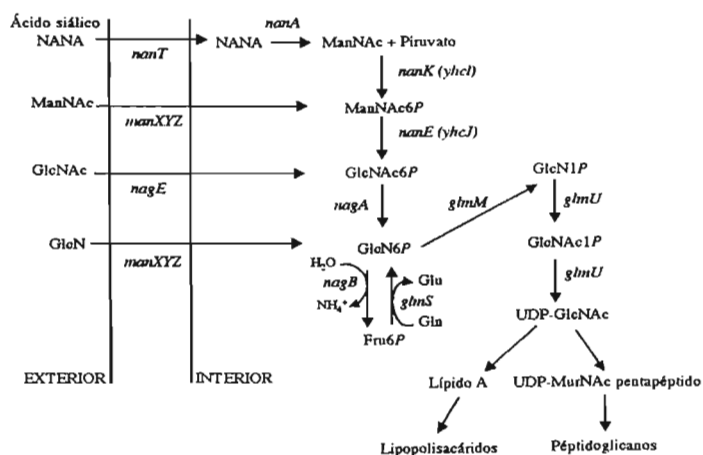


Figura 2. Metabolismo de los aminoazúcares en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) y la vía biosintética (genes *glm*). (Tomado de Plumbridge y col., 1999).

En mamíferos:

El metabolismo de aminoazúcares en mamíferos es esencialmente el mismo al de *E. coli*, a excepción de un cambio en el orden de las reacciones. En éstos, la GlcN6P sufre primeramente una reacción de acetilación para dar GlcNAc6P seguida de una isomerización que produce GlcNAc1P, inverso a lo que ocurre con el metabolismo en las bacterias, en donde la isomerización de la GlcN6P va seguida de la acetilación. En humanos, el gen *gnpi* codifica la GlcN6P desaminasa correspondiente.

GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA

La enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6 antes EC 5.3.1.10) que cataliza la isomerización y desaminación reversible de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y ion amonio (Figura 3) es una enzima clave en la regulación del catabolismo de los aminoazúcares en varias especies. Esta enzima pertenece a la clase (2-R) aldol-cetol isomerasas.

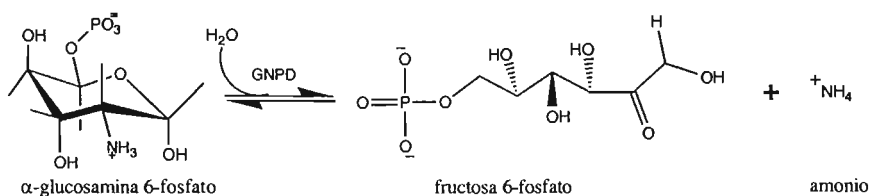


Figura 3. Reacción de isomerización y desaminación llevada a cabo por la GlcN6P desaminasa.

La enzima fue descrita inicialmente por Leloir y Cardini en 1956 y ha sido identificada en diversas especies de animales, protozoarios, hongos y bacterias. Esta enzima ha sido purificada de microorganismos como *Escherichia coli*⁷ y *Candida albicans*⁸; también, a partir de organismos superiores como canino⁹, bovino^{10,11} y de *Metacricetus auratus*¹²; en mamíferos, está presente en concentraciones considerables en espermatozoides maduros. Se conocen, entre otros, los genes de las GlcN6P desaminasas de *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi* y *Bacillus subtilis*.

La GlcN6P desaminasa es una proteína homohexamérica¹³, en *E. coli* cada subunidad está formada por 266 residuos aminoácidos¹⁴ (Figura 4) y cuenta con un peso de 29.7 kDa. Se ha buscado homología con otras proteínas, pero no se ha encontrado similitud significativa, excepto con las GlcN6P desaminasas de otras especies y el gen putativo de la galactosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*.

En mamíferos y otros vertebrados terrestres, existen 2 genes que codifican para la GlcN6P desaminasa que difieren en longitud y comparten identidad en 240 residuos. La secuencia larga en mamíferos (humanos, ratón y hámster) tiene una elevada identidad entre sí, cuenta con 289 residuos aminoácidos, 23 más que la enzima de *E. coli* y es homóloga con la enzima bacteriana sólo en la secuencia de los residuos 1 a 258. Este segmento contiene todos los grupos relevantes para la catálisis y los contactos entre las subunidades en la molécula de desaminasa bacteriana y su plegamiento es prácticamente igual. El segmento 258-289 de la enzima de mamífero forma el extremo C terminal y no tiene una contraparte homóloga con las desaminasas de otros microorganismos. En la Figura 4, se muestra un alineamiento de los residuos de la *EcGNPD*, *hGNPD-1* y *hGNPD-2*, en las 2 últimas se observa el aminoácido prolina (P) en la posición 268, el cuál, como se mencionará más adelante, fue el sitio en el cual se realizó el corte en la *hGNPD-1* para la obtención de un mutante de peso molecular semejante a la enzima de *EcGNPD*.

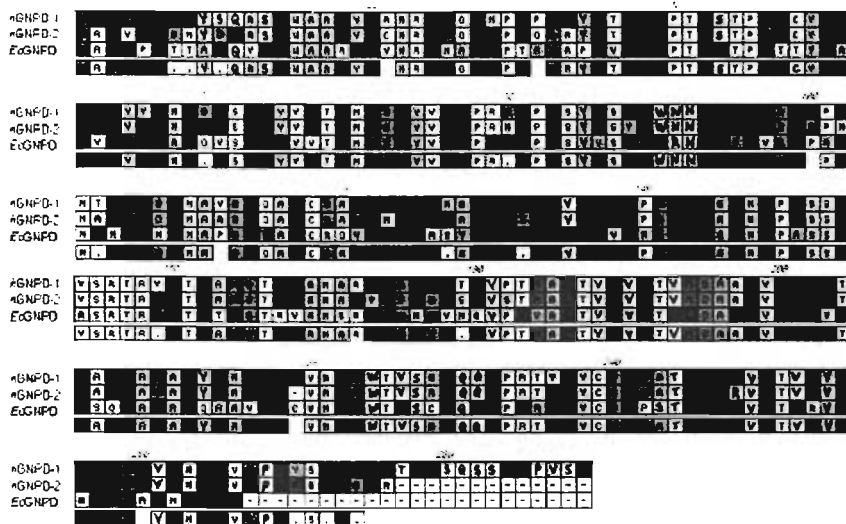


Figura 4. Alineamiento de las enzimas AGNPD-1, AGNPD-2 y EcGNPD.

El hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* está arreglado como un dímero de trímeros (Figuras 5 y 6) con un eje cristalográfico de orden 3, con una simetría interna 32^{15} .

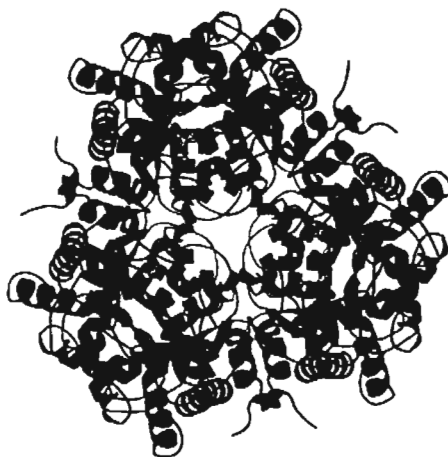


Figura 5. Se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* observándose desde el eje de simetría de orden tres (Tomada de Lara-González, 2001).

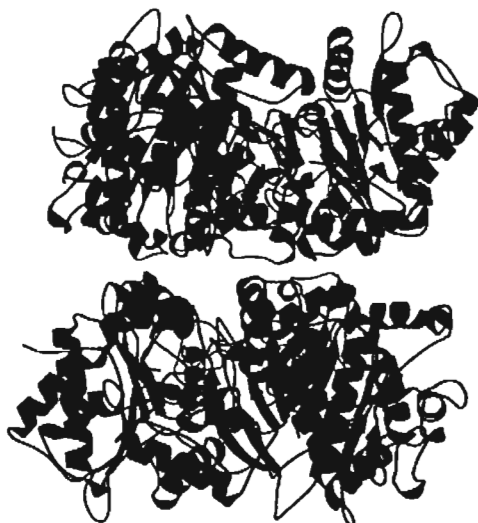


Figura 6. Se muestra un hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, vista lateral, teniendo un arreglo de dímero de trímeros (Tomada de Lara-González, 2001).

Los monómeros de la GNPD presentan un plegamiento α/β abierto. en el siguiente esquema puede verse la estructura secundaria del monómero de la enzima humana (*hGNPD-1*).

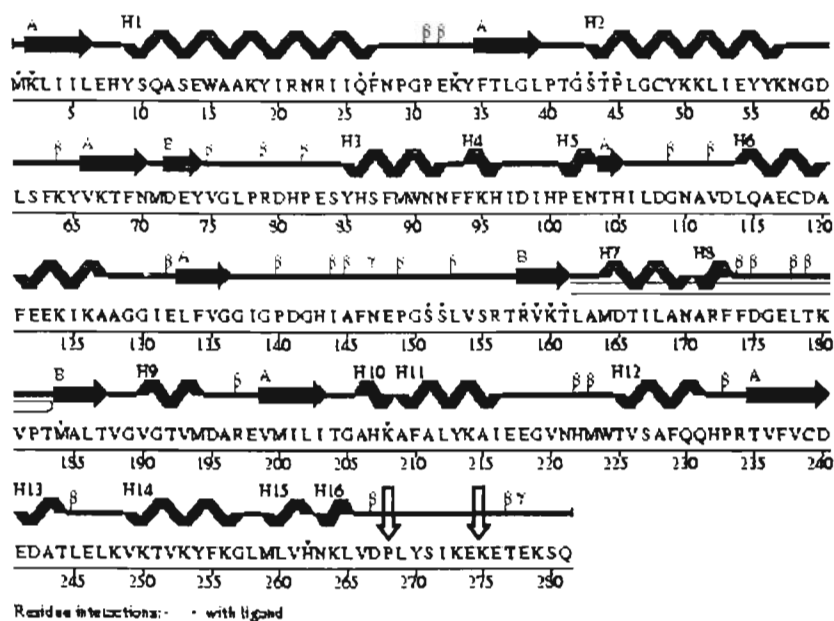


Figura 7. Estructura secundaria de la *hGNPD-1*. El motivo correspondiente a la tapa del sitio activo se muestra subrayado. Las flechas indican los cortes para la obtención de las mutantes 268fin y 275fin. Los asteriscos señalan aquellos residuos que interactúan con el sustrato. (Tomado de *Hinojosa-Ocaña*, 2003).

Activación Alostérica

Todas las GNPDs animales estudiadas hasta ahora (incluida la humana), así como la de *E. coli*, son activadas alostéricamente por *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). En *E. coli*, ésta se une al sitio alostérico para aumentar la afinidad aparente de la enzima por su sustrato, la GlcN6P. A concentraciones saturantes de GlcNAc6P, la GlcN6P desaminasa presenta una cinética hiperbólica. Este comportamiento es característico de los llamados sistemas K^{17} , debido a que al incrementar sucesivamente la concentración del activador, los valores de $S_{0,5}$ disminuyen (efecto K), mientras que los valores de V_{max} no se modifican, esto significa que el control alostérico opera por medio de la modificación de la afinidad aparente de la enzima por su sustrato sin cambio en su constante catalítica¹³. En un sistema K la activación, ya sea homotrópica o heterotrópica, cambia la afinidad de la enzima por el sustrato sin que se modifique la k_{cat} , y por lo tanto, la V_{max} de la reacción (Figura 8a). La presencia del efector es suficiente para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato y a su vez el sustrato modifica la afinidad de la enzima por el efector¹⁷. Por otro lado se encuentran las desaminasas de animales, Lara Lemus y col. fueron los primeros en estudiar desde el punto de vista cinético y regulatorio una GlcN6P desaminasa de mamífero. Su trabajo sobre la desaminasa de corteza de riñón de bovino demostró que ésta enzima presenta una cinética alostérica poco común; se comporta como un sistema V , en el cual el valor de la k_{cat} se incrementa con la concentración del activador alostérico y se acerca a cero en ausencia de éste (Figura 8b). La enzima humana, *hGNPD-1*, presenta una cinética de activación alostérica más compleja debido a que el modulador alostérico es un fuerte activador V , y un discreto inhibidor K , lo llamaremos activador, por ser el efecto predominante. La inhibición por sustrato y el efecto K negativo (aumento de K_m aparente con la concentración del "activador") se comportan como dos fenómenos independientes.

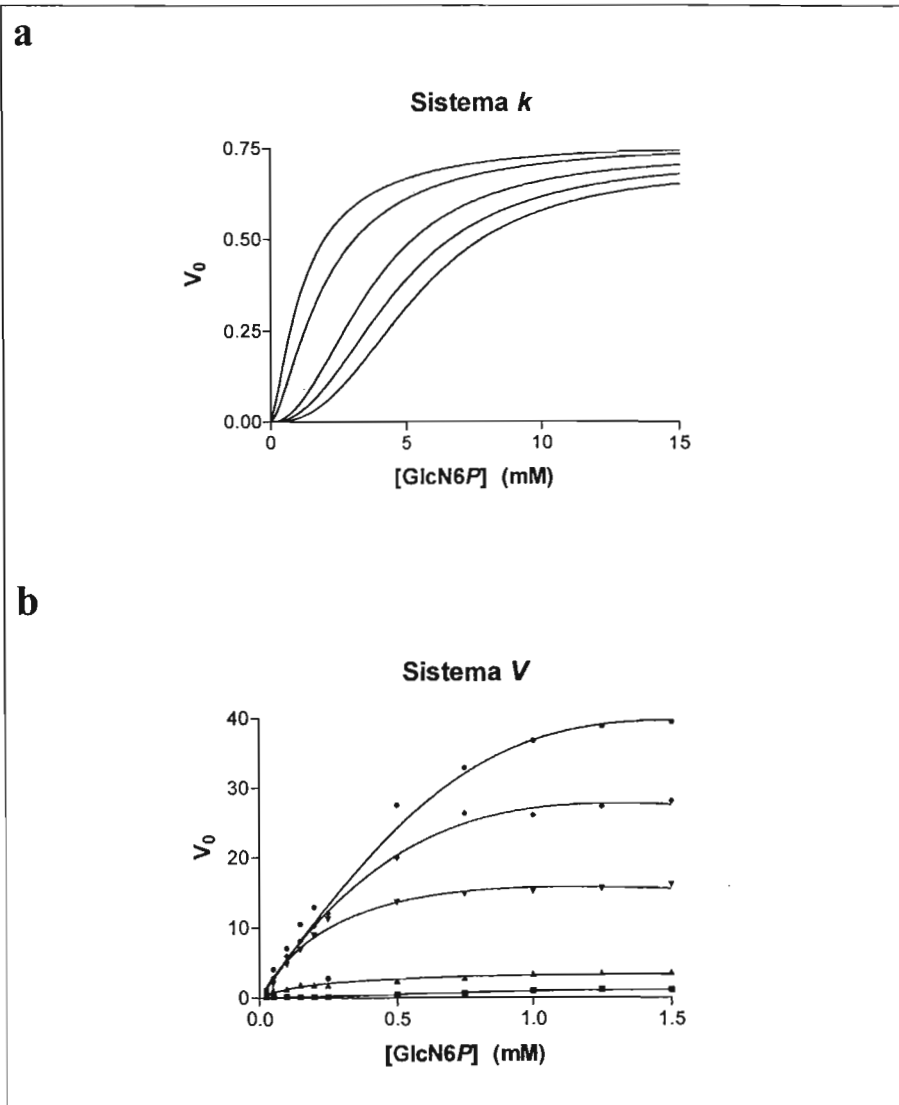


Figura 8. Cinéticas de activación alostérica de las glucosamina 6-fosfato desaminasas a) de *E. coli*, en donde la K_M disminuye con la concentración de activador (GlcNAc6P) (sistema K típico) y b) de hígado de bovino, donde la V_{max} aumenta con la concentración de activador (sistema V típico). (Tomado de Calcagno y col., 1984 y Lara-Lemus y col., 1998).

CONTROL ALOSTÉRICO

El control alostérico de algunos procesos químicos y fisiológicos es esencial en las funciones celulares, juega un papel importante en la regulación metabólica, en la respuesta celular, expresión o represión de genes y comunicación celular entre otras. La regulación en las propiedades de unión de una proteína alostérica puede describirse como un equilibrio entre dos estados conformacionales diferentes: un estado T y un estado R (Figura 9).

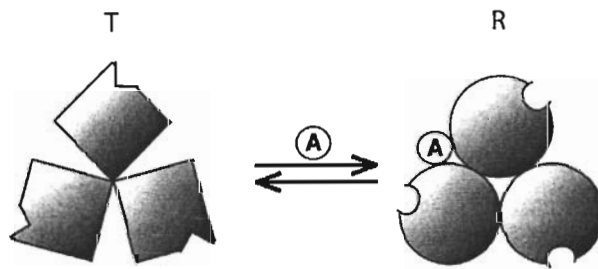


Figura 9. Esquema de la transición alostérica provocada por la unión de una molécula de activador.

En la transición de un estado a otro participan cambios conformacionales a nivel de la estructura cuaternaria, que promueven modificaciones locales en la estructura terciaria de la unidad monomérica, y alteran las propiedades de unión de ligandos²⁰.

La transición alostérica de T a R en la desaminasa ocurre cuando la GlcNAc6P se une al sitio alostérico (Figura 9) o por la unión de sustratos al sitio activo. Las fuerzas que dirigen la transición, están asociadas a la unión del grupo fosfato como consecuencia de la presencia de residuos cargados positivamente que provienen del módulo externo e interno y

del asa catalítica y que forman la estructura de sitio activo. Por lo que la unión del grupo fosfato produce un rearrreglo estructural que dispara la transición alostérica.

El sitio alostérico tiene cargas positivas que se distribuyen a lo largo de ambas subunidades. La presencia de cargas negativas del grupo fosfato genera atracción entre el módulo externo y dos monómeros vecinos. Una vez más, esto genera el carácter rígido del módulo externo que es esencial para generar la misma conformación en el estado R, cuando la transformación está dirigida por fuerzas aplicadas en cada una de las dos diferentes regiones de la molécula. Los cambios conformacionales no solamente afectan al movimiento relativo del módulo interno y externo, sino que se requiere de una delicada regulación electrostática. En el estado T, el Glu148 neutraliza las cargas positivas en el sitio alostérico, mientras que en el estado R el grupo fosfato del activador alostérico neutraliza la carga y el Glu148 queda libre para girar hacia el sitio activo^{21,22}.

Los cambios en la estructura cuaternaria son el resultado de cambios a nivel de la estructura terciaria de cada subunidad, que están asociados a la unión del sustrato o del efector alostérico. Los cambios conformacionales del conformero T a R se describen como un movimiento relativo de dos entidades rígidas dentro de cada monómero, que modifican el sitio activo. Sin embargo, la conformación capaz de unir al efector alostérico sólo es generada en el conformero R. Por lo menos dos diferentes mecanismos desencadenan este proceso, uno desencadenado por el sitio catalítico y otro en el sitio alostérico.

Modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC)

El modelo postula que:

1. Las proteínas alostéricas son oligómeros de monómeros que están asociados de tal manera que ocupan posiciones equivalentes. Esto implica que la molécula posee al menos un eje de simetría.

2. Cada subunidad en la proteína es capaz de existir en dos estados conformacionales, que se llaman T (tenso y menos afín al sustrato) y R (relajado y más afín al sustrato), aún antes de que se adicione un compuesto capaz de unirse (Figura 9).
3. Todas las subunidades del oligómero de proteína están en la misma conformación, ya sea todas en T o todas en R. Los estados mixtos no se generan debido a que las subunidades en distintos estados (T o R) tienen interacciones poco favorables. Las dos formas conformacionales de la proteína están en equilibrio en ausencia de moléculas unidas (Figura 10), por lo que el equilibrio (tendiente a T) se rompe por la adición de estas moléculas (generalmente el equilibrio se desplaza hacia R).
4. Las constantes de asociación de una molécula ligable para las forma T y R son diferentes, porque son estructuralmente distintas.
5. Cuando una proteína alostérica va de un estado al otro, se conserva la simetría molecular. El modelo MWC, también propone la existencia de tres clases de comportamientos que pueden esperarse en los sistemas alostéricos.
 - a) Sistemas K: la unión de un efector a la enzima cambia la constante de afinidad por el sustrato. Ya que tanto el activador como el sustrato tienen diferentes afinidades por las formas T o R, la presencia del efector modificará la afinidad aparente de la proteína por el sustrato, pero sin afectar la V_{\max} de la reacción.
 - b) Sistemas V: el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados. De esta manera, la unión del efector no modifica la afinidad de unión aparente del sustrato, pero produce un cambio en la V_{\max} . Si el efector tiene afinidad máxima por la forma activa (R) o por la inactiva (T), funcionará como un activador (sistemas V positivos) o como inhibidor (sistemas V negativos). El sustrato no funciona como activador en ninguna concentración.
 - c) Sistemas mixto K-V: Todos los sistemas que no son completamente V o K.

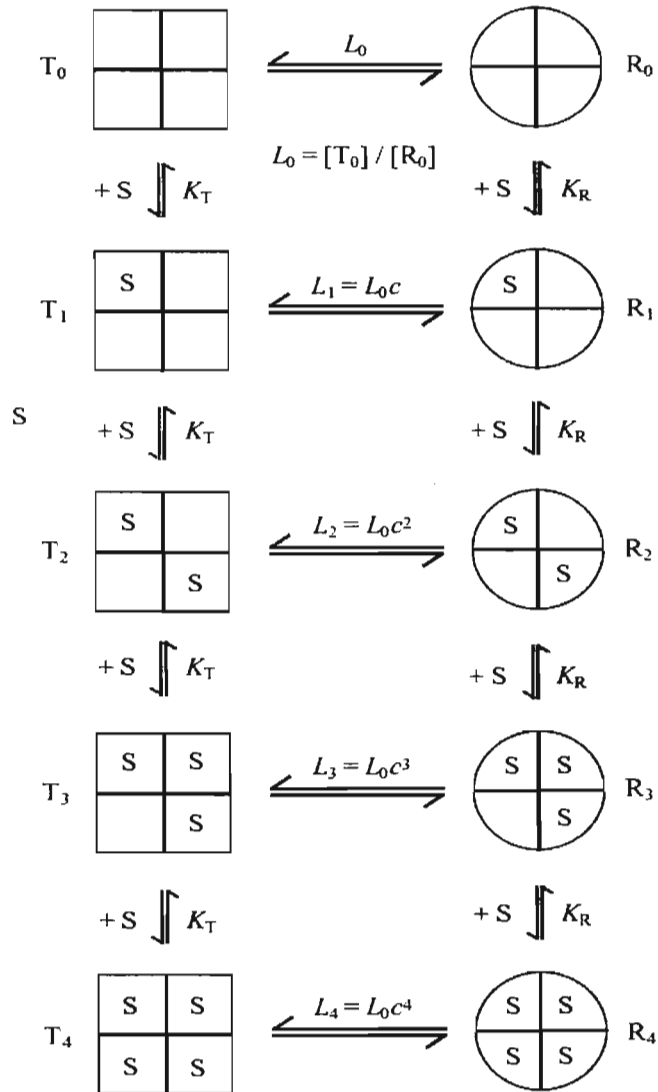


Figura 10. Representación esquemática de los equilibrios involucrados en el Modelo MWC. (Tomado de Segel, 1975).

Utilizando este modelo (Figura 10), se pueden hacer varias afirmaciones¹⁸:

- ❖ En un sistema alostérico enzimático K, un efector debe mostrar interacciones cooperativas homotrópicas.
- ❖ En aquellos sistemas en que el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados, el sustrato no muestra interacciones cooperativas homotrópicas.
- ❖ El cambio conformacional es debido a la diferencial de energías de unión entre los dos estados.
- ❖ El modelo MWC hace predicciones simples basándose en sólo dos parámetros físicos: la constante de equilibrio o constante alostérica, L , que representa la relación de los estados T a R en ausencia de cualquier molécula ligable ($L = [T_0] / [R_0]$) y el coeficiente de unión no exclusivo, c , que es la relación de las constantes de disociación de los estados R y T ($c = K_T / K_R$).
- ❖ Este modelo no puede explicar la cooperatividad negativa.

La ecuación derivada para el modelo de MWC es la siguiente¹⁹.

$$v_o = \frac{k_{cat} n [E_t] \{L c \alpha (1 + c \alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}\}}{L (1 + c \alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Donde $\alpha = K_R / [S]$, $L = [T_0] / [R_0]$ y $c = K_R / K_T$

El modelo de MWC define también las propiedades de los sistemas alostéricos:

- 1) Las proteínas alostéricas son oligoméricas.
- 2) Las interacciones alostéricas están relacionadas con alteraciones en la estructura cuaternaria de las proteínas (como alteraciones en la unión entre las subunidades).

- 3) Mientras que los efectos heterotrópicos, pueden ser tanto positivos como negativos (activación o inhibición), los efectos homotrópicos son siempre positivos.
- 4) Muy pocos sistemas alostéricos presentan solamente efectos heterotrópicos. En otras palabras, los efectos cooperativos homotrópicos se observan invariablemente para al menos una de las moléculas ligantes del sistema.
- 5) Las condiciones, los tratamientos o las mutaciones que alteran las interacciones heterotrópicas, también pueden alterar las homotrópicas.

Control alostérico de la *EcGNPD*

Se conoce la estructura de la forma R de la enzima de *E. coli*, a partir de datos cristalográficos de difracción de rayos X a 2.1 Å. Se resolvieron los complejos enzima-*P* (fosfato inorgánico ocupando los sitios activo y alostérico), enzima-GlcNAc6*P* y enzima-2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-*P* (GlcN-ol-6*P*). Este último ligando es un inhibidor sin salida, que ocupa el sitio activo¹⁵. Más recientemente se obtuvo el modelo de la forma T a 2.2 Å de resolución, en ausencia de ligandos²¹. La estructura de la forma R y sus complejos muestran inequívocamente los sitios alostérico y activo de la enzima. La comparación de la conformación R con la forma T demuestra el cambio global que experimenta la proteína en la transición alostérica (los PDB's de las formas R y T son 1FRZ y 1FS6, respectivamente).

La enzima tiene 6 sitios alostéricos, los cuales se encuentran en los espacios entre las subunidades que forman cada trímero. De este modo, los sitios de unión del activador alostérico se encuentran formados por dos monómeros vecinos. Este hecho hace notar que se establecen contactos importantes entre subunidades al unirse éste ligando.

Se considera que la GlcNAc6*P* se une exclusivamente al estado R (estado de mayor afinidad por los sustratos) y el único capaz de unir al activador. Ambos efectos, la cooperatividad homotrópica y la activación por GlcNAc6*P* en la GlcN6*P* desaminasa

pueden explicarse satisfactoriamente en el marco del modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC). El modelo de MWC es esencialmente un modelo en equilibrio y su aplicación en procesos cinéticos es posible bajo la suposición de que la enzima tiene una cinética en equilibrio rápido y no una cinética en estado estacionario. Sin embargo, para sistemas unirreactantes no hay diferencia entre equilibrio y estado estacionario²³.

Sitio Alostérico

En el conformero T, los residuos del sitio alostérico no se encuentran en posición correcta para unir la GlcNAc6P. En esta conformación, el grupo amino terminal está a más de 10 Å de los residuos Arg158 y Lys160 de la subunidad adyacente y se une por un puente de hidrógeno al oxígeno carbonílico de la Ala150 de la subunidad vecina. El sitio alostérico se encuentra ensanchado en el conformero T; en esta región se acumulan cargas positivas que son neutralizadas con la unión del grupo fosfato de la GlcNAc6P en el conformero R.

Se puede describir el sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa (Figura 11) en el conformero R, el fosfato de la molécula del activador alostérico se liga de la misma forma que el fosfato inorgánico: presenta contactos mediante puentes salinos con Arg158 y Lys160 y por puente de hidrógeno al nitrógeno de la cadena principal del residuo 152 y al O ϵ de la Ser 151¹⁵. La única interacción del grupo fosfato con la subunidad adyacente es por un puente de hidrógeno al grupo N-terminal, el cual se encuentra desprotonado durante la transición alostérica, la protonación de este grupo es responsable de la pérdida de cooperatividad a pH 6 de la enzima²⁴.

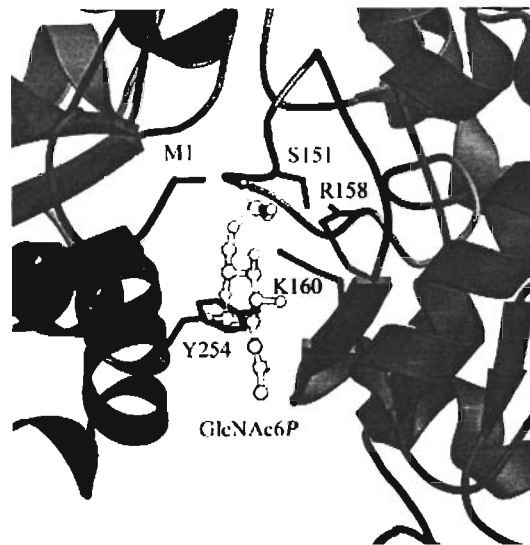


Figura 11. Detalle del sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Se representan los residuos importantes del sitio alostérico y en el centro, transparente, la molécula de GlcNAc6P (Tomada de Lara-González, 2001).

En el sitio alostérico el átomo O3 del activador alostérico se encuentra unido por un puente de hidrógeno al carbonilo del esqueleto principal a nivel del residuo Ile159. La parte hidrofóbica del grupo acetilo se une por contactos de van der Waals con este residuo. La densidad de electrones observada permite distinguir al anómero α del activador alostérico como la forma que se une al sitio alostérico¹⁵.

Un residuo importante en el sitio alostérico es la Tyr254, que interacciona por puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de la Thr161 en el conformero R, mientras que en T hace el mismo tipo de interacción pero con la Pro149, por lo tanto, la Tyr254 funciona como un interruptor²⁵.

Otro residuo importante es la Tyr121 que se encuentra asociada a cambios estructurales y funcionales producidos por la unión del sustrato²⁶.

El cambio conformacional alostérico provoca en cada monómero dentro del hexámero una rotación de 13.1° alrededor de un sólo eje, paralelo al eje de simetría de orden tres y muy cercano al residuo 197 de cada monómero. El hexámero durante la transición alostérica presenta interacciones intermonoméricas limitadas a tres regiones:

1. Cercana al eje de simetría de orden tres, entre los residuos 216 y 232.
2. Cerca al eje de simetría de orden dos, entre los residuos 244 y 250.
3. En el sitio alostérico, ubicado entre monómeros adyacentes²¹.

Sitio Activo

El sitio activo (Figura 12) se forma entre dos asas situadas en el extremo C-terminal de las hebras B y E (Figura 7). El fosfato del sitio activo esta unido por puente salino a la Lys208 y Arg172 y por puentes de hidrógeno al asa formada por los residuos 40-44¹⁵. El inhibidor competitivo se encuentra unido de forma extendida con su O5 apuntando hacia el Nε2 de la His 143. Esta histidina está en contacto con el Oδ1 del Asp141 y el Oε1 del Glu. El residuo Asp72 se encuentra orientado hacia el hidrógeno en C2 del azúcar y hace un puente de hidrógeno con el O1 del inhibidor.

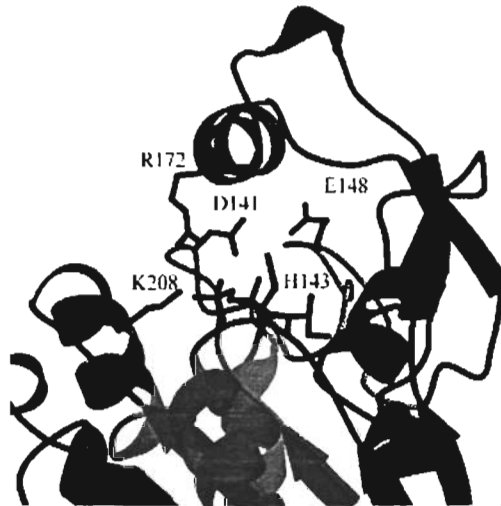


Figura 12. Detalle del sitio activo de la GlcN6P desaminasa. Se muestra el inhibidor competitivo unido al sitio activo (Tomado de Lara-González, 2001).

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS GlcN6P DESAMINASAS HUMANA Y DE E. coli DESDE EL PUNTO DE VISTA DEL MECANISMO Y LA REGULACIÓN

En el estudio cristalográfico llevado a cabo con el confórmero R de la *h*GMPD-1, con el sitio alostérico ocupado por el activador alostérico (GlcNAc6P) y el ion sulfato en el sitio activo, en la que se resuelve la densidad de una molécula del inhibidor sin salida, 2-amino-2-desoxi-D-glucitol-6-fosfato (GlcN-ol-6P) en el sitio activo, se observa que el plegamiento del monómero de la *h*GMPD-1 tiene unas pequeñas diferencias con respecto a la desaminasa de *E. coli* (*Ec*GMPD) además de la existencia de un largo segmento no homólogo en el extremo C terminal (Tesis de doctorado de Rodrigo Arreola Alemón, código PDB 1D9T).

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

Sitio activo

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

Un análisis detallado en las 6 cavidades de sitio activo en los diferentes monómeros de *hGNPD-1* muestran un ion sulfato y una molécula de GlcN-ol-6P (el inhibidor competitivo) en cada sitio activo, ambas moléculas en conformaciones alternadas.

Los residuos en el sitio activo de éstas dos enzimas están altamente conservados, con excepción de la Serina 43 que es glicina en *E. coli*. La cadena lateral de ésta está colocada en posición para construir un puente de hidrógeno con el fosfato del inhibidor (o el ion sulfato) en la enzima humana. Además la Serina 43 está localizada en el asa de unión al fosfato (residuos 41-44) que es una de las pocas regiones donde aparecen diferencias entre la enzima humana y la bacteriana (Figura 13). El residuo serina 43 también aparece en buena posición para unir arginina 172, que es un ligando del sustrato y por lo tanto capaz de competir por el sustrato con éste residuo, conduciendo a un cambio conformacional de la tapa del sitio activo (residuos 162-185). En las densidades electrónicas se aprecian ambos

rotámeros de la cadena lateral de la Ser43, la orientada hacia el fosfato y la orientada hacia la Arg172.

Es importante mencionar que el residuo Serina 43 se encuentra altamente conservado en las desaminasas de mamíferos.

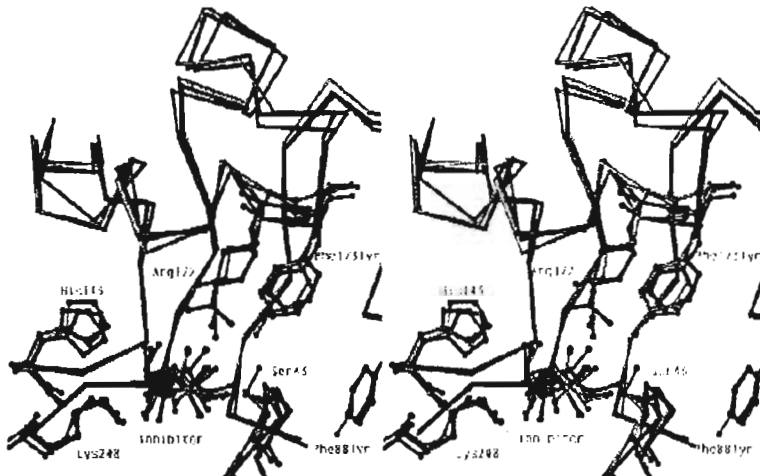


Figura 13. Desorden conformacional en la tapa del sitio activo encontrada en la desaminasa humana (hGNPD-1) en complejo con el inhibidor, las cadenas mostradas son: A (cadena café), B (cadena roja) y F (cadena púrpura). La Enzima de *E. coli* está representada en color verde. Las cadenas laterales de Arginina 172 y Phe 173 muestran un desorden conformacional en la tapa del sitio activo de la enzima humana. El monómero A tiene conformaciones alternadas en la Ser 43 y Arg 172. Las conformaciones alternativas de Serina 43 muestran diferentes interacciones, una unida al fosfato del inhibidor (6 ión sulfato) también como a Arg 172 y la otra unida sólo a Arg 172. Esta geometría no se conserva en la enzima de *E. coli*. (Tomado de *Arreola y col., 2003*).

Sitio alostérico

Cada hexámero de la enzima presenta 6 sitios alostéricos (uno por monómero) y se encontraron 6 moléculas de GlcNAc6P en las hendiduras entre 2 monómeros. La estructura del sitio es igual al de la enzima de *E. coli*¹⁵.

Una diferencia parece ser la presencia de un puente de hidrógeno entre el oxígeno 1 del activador y la His 262 del segundo monómero. La His 262 no está presente en la desaminasa bacteriana. La hendidura del sitio alostérico esta rodeada por estructuras secundarias similares a las presentes en *E. coli*, excepto por la región C terminal que en la desaminasa humana es una cadena más larga que contiene el nuevo ligando His262. Esto hace que el sitio alostérico se vea mas estrecho que el de la enzima de *E. coli*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enzima *hGNPD-1* presenta una cinética de activación alostérica -por *GlcNAc6P*- distinta de la de su homóloga en *E. coli*, la *EcGNPD*. Una diferencia importante entre éstas 2 enzimas radica en la presencia de un extremo C terminal (aminoácidos 267 al 289) en la enzima humana, segmento que no presenta su enzima homóloga en *E. coli*. Por lo anterior, se plantea la pregunta de que papel juega este extremo C terminal en la cinética de activación alostérica de la *hGNPD-1*, así como en la estabilidad de la enzima.

OBJETIVOS

General:

Explorar la función del extremo C terminal (residuos 267 al 289) de la enzima *hGNPD-1* a partir del estudio de una mutante de esta misma, en la cual se interrumpirá la transcripción en la posición 268 (mutante 268fin).

Específicos:

- Realizar la expresión y purificación de la mutante truncada 268fin.
- Realizar estudios cinéticos y de estabilidad de la mutante truncada 268fin.

HIPÓTESIS

Una característica importante de la *h*GMPD-1 es la presencia de una serie de interacciones en el segmento C terminal, entre los residuos 268 y 275, contactando con la hélice 1 y el giro que une la hélice 2 con la hoja beta 3, en el módulo externo de la molécula. Estas interacciones, que no existen en la enzima *Ec*GMPD, pueden ser fundamentales en el mecanismo de transmisión de los cambios conformacionales entre las subunidades, en el proceso de activación alostérica. Podría suponerse que los mecanismos de acoplamiento entre el sitio activo y el sitio alostérico sean diferentes en mamíferos y en bacterias y que éstas interacciones jueguen un papel clave en la función de la enzima.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos químicos:

- Agar LB (Luria-Bertrani) (Difco)
- Caldo LB (Luria-Bertrani) (Difco)
- EDTA (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- KCl (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- SDS (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- IPTG (Sigma)

Equipos:

- Espectrofotómetro (Varian-Cary400)
- Espectrofotómetro (U2000-Pharmacia)
- Sonicador (Cole Parmer)
- Cámara de electroforesis (Hoefer)
- HPLC (Waters)
- Centrifuga (Beckman J-25I)

Resina de afinidad

La resina de cromatografía de afinidad por el sitio alostérico altamente específica para la GlcN6P desaminasa fue sintetizada en este laboratorio y está compuesta por moléculas de GlcN6P unidas por el grupo amino al carbonilo de la *N*-6-aminohexanoil agarosa (Sepharose 4B, Amersham-Pharmacia) para formar el ligando inmovilizado *N*-6-aminohexanoil-GlcN6P que es un análogo del activador alostérico, (GlcNAc6P).

Activador alostérico

El activador alostérico, la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P), fue preparado en este laboratorio debido a su elevado costo comercial. Su síntesis consiste en la acetilación de la GlcN6P con anhídrido acético y su posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico como se describe en *Montero-Morán et al.* (1998).

Material biológico

La cepa bacteriana de *Escherichia coli*, empleada para la expresión de proteína fue la IBPC590, la cual se trabajó en colaboración con la Dra. Jacqueline Plumbridge del Instituto de Biología Físicoquímica de Paris, Francia. Esta cepa fue derivada de la JM101, en donde se eliminó el gen *nagB* (gen de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa) por inserción de un casete de resistencia a kanamicina⁷. Otra característica de ésta cepa es que es *lacI*⁻ (no contiene el gen *lacI*), por lo que expresa la proteína en forma constitutiva.

Construcción de la mutante 268fin: Clonación y expresión del gen que codifica para la enzima truncada.

Con la colaboración de la Dra. Jacqueline Plumbridge del Instituto de Biología y Físicoquímica (IBPC Paris, Francia) se realizó la construcción de la mutante truncada en el aminoácido 268 -mediante mutagénesis dirigida por oligonucleotido- convirtiendo un codón de prolina en un codón de terminación (UAA). Esta construcción se insertó en el vector pTZ19R con el que se transformó la cepa de *E. coli* IBPC590. Esta cepa es *lacI*⁻ (no contiene el gen *lacI*), por lo que expresa la mutante 268fin en forma constitutiva. También se utilizó la clásica cepa JM101, en la que la expresión se realiza bajo el control del promotor *lacI*, por lo que requiere el agregado de IPTG al medio de cultivo. Ambas cepas son Δnag (no contienen el gen *nag*) por lo que la enzima en su forma silvestre no es expresada. La selección de bacterias que incorporaron el plásmido se hizo utilizando medio LB suplementado con ampicilina. Esto es posible, ya que las cepas contienen un vector seleccionable, con un gen de resistencia a la ampicilina (*amp^r*), que las hace crecer bajo las condiciones expuestas.

A partir de éste trabajo se continuó con el cultivo de las cepas y la purificación de la mutante truncada en la posición 268.

Cultivo

Con las cepas portadoras del plásmido pTZ19R se sembraron masivamente 8 placas con agar LBamp (medio Luria Bertani suplementado con ampicilina, 100µg/mL). éstas fueron incubadas en estufa a 30°C, por 12 horas. La biomasa de las placas fue colectada e inoculada en 2 litros de medio LBamp distribuidos en 8 matraces Erlen-Meyer de 500mL de capacidad. Los matraces fueron incubados a 37°C con agitación orbital a 200rpm, durante 6 horas aprox. (hasta obtener una densidad óptica >1, a 550nm). Utilizando las

muestras anteriores para inocular, se hizo un escalamiento a 12 litros manteniendo las mismas condiciones. La biomasa fue obtenida por centrifugación en un rotor Beckman JA15, a 5000rpm por 15 minutos.

Purificación

La biomasa obtenida del cultivo se resuspendió en 250mL de KCl 0.15M frío y se centrifugó a 5000rpm por 15 minutos. Este paso (lavado) se repitió dos veces. El precipitado se resuspendió en 50mL de un amortiguador de Tris 50mM pH 8 y EDTA 10mM, las células se rompieron por sonicación a 4°C utilizando un sonicador marca Cole Parmer, llevando a cabo 20 pulsos de 20 segundos con una amplitud de 40% a intervalos de 2 minutos entre c/pulso para evitar un calentamiento que podría implicar desnaturalización de proteínas. La muestra se centrifugó en un rotor Beckman JA-2550 a 15,000rpm durante 45 minutos. El precipitado (restos celulares) se descartó, mientras que el sobrenadante (fracción soluble de la proteína) se aplicó a la columna de afinidad.

Cromatografía de afinidad

Para llevar a cabo la purificación por cromatografía de afinidad (ver síntesis de la resina en material), la columna se equilibró con 200mL de un buffer de Tris 50mM pH 8.2, enseguida se aplicó la muestra (sobrenadante del sonificado) y posteriormente 200mL del mismo buffer para el lavado de la columna. La enzima fue eluida con 20mL de una disolución de GlcNAc6P a una concentración 15mM (se utilizó el mismo buffer de equilibrado como disolvente). Se colectaron fracciones de 1mL en tubos de ensayo. A estas fracciones se les realizó un ensayo rápido de actividad (cualitativamente), descrito en *Calcagno et. al.* (1984). También, se realizaron espectros de absorción a 280nm.

Tabla de purificación

Para realizar la tabla de purificación se determinó la concentración de proteína por el “método del ácido bicinconínico” y se verificó la actividad de la enzima 268fin en cada una de las etapas del proceso de purificación empleando el “método del Resorcinol” de Roe, (1934).

Electroforesis

Se verificó la presencia de la enzima 268fin, en las distintas etapas de purificación, empleando geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) de acuerdo al método de Laemmli²⁹. Como marcador se utilizó la enzima pura *EcGNPD* (WT de *E. coli*), la cual presenta un peso molecular aproximadamente igual al de la mutante 268fin. La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie R-250.

Conservación

- **En glicerol:** Se colectaron las fracciones de la elución donde se encontró la enzima y se dializaron contra 2L de un buffer de Tris 50mM pH 8.2 durante toda la noche, Posteriormente, la muestra se concentró en 200mL de glicerol durante 2 horas.
- **En Sulfato de amonio:** La enzima en su fracción soluble (elución) se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación (equivalente al 50% P/V). ésta muestra se conservó a 5°C.

Estabilidad

- **Enzima en glicerol:** Se inyectaron 250 μ L de la enzima conservada en glicerol a una columna de exclusión molecular HR 10/10 Shephadex G-25 (Pharmacia Biotech). Esta columna fue equilibrada previamente durante 1 hora con una mezcla de Tris 80mM pH 7.7 y KCl 80mM (proporción 9:1) utilizando una velocidad de flujo de 0.5mL/min. y una presión máxima de 500psi. El cromatograma se muestra en los resultados.
- **Enzima en sulfato de amonio:** La enzima se desaló en una columna de exclusión molecular HR 10/10 (Superose, Amersham-Pharmacia) y luego se paso por una columna Hi-Trap (Amersham-Pharmacia) en la que inmovilizamos fosfatasa alcalina. Esto tiene por finalidad la eliminación de la GlcNAc6P, para ello se centrifugó 1mL de muestra a 15,000rpm durante 15 minutos, posteriormente, el botón (pp.) se resuspendió en 1mL de Tris 50 mM pH 8.2, ésta fracción se inyectó a la columna de exclusión bajo las mismas condiciones inmediatamente y a las 72 horas después de quitarle el sulfato de amonio. El cromatograma se muestra en los resultados.

Determinación de la velocidad de reacción enzimática

La determinación de la actividad en velocidades iniciales de la enzima 268fin se realizó en la dirección de la formación de Fru6P, para ello la enzima se desaló en una columna de exclusión molecular HR 10/10 (Superose, Amersham-Pharmacia) y luego se paso por una columna Hi-Trap (Amersham-Pharmacia) en la que se inmoviliza fosfatasa alcalina. Esto tiene por finalidad la eliminación de la GlcNAc6P. La concentración de la enzima fue calculada mediante su absorbancia a 280nm en agua, usando la absortividad molar

conocida de la *EcGNPD* ($\epsilon=0.202$). Se utilizaron mezclas de reacción de 200 μ L que contienen Tris-HCl 100mM pH 7.7, EDTA 25mM y concentraciones variables de sustrato (GlcN6P). Las velocidades iniciales se calcularon bajo diversas condiciones de reacción, en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de activador alostérico (GlcNAc6P): 0, 0.1, 15, 0.2, 0.3 y 0.5 mM. Las reacciones fueron iniciadas por la adición de la enzima y las mezclas se incubaron a 30°C. Estas se interrumpieron a los 20 minutos con la adición de 2mL de HCl 10M. La concentración de fructosa se determinó con la adición de 0.5mL de Resorcinol, incubando por 10 minutos a 70°C. Después de enfriar a temperatura ambiente se hacen las lecturas espectrofotométricas a 512nm comparadas con una curva patrón de fructosa; como se describe en *Calcagno et. al* (1984), ver protocolo en el anexo. Las reacciones se llevaron a cabo cuidando que se convirtiera menos del 5% del sustrato inicial. Todos los ensayos se realizaron con una concentración de enzima de 15nM.

Ajuste cinético

Los datos fueron analizados por regresión no-lineal utilizando el programa *Prism for Macintosh Version 3.0cx* ©2002, y se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$V_0 = (V S) / (K_m + S + S^2/K_i)$$

En donde: V_0 es la velocidad inicial, S es la concentración de sustrato (GlcN6P), K_m es la constante de Michaelis y K_i es la constante de inhibición.

Esta ecuación corresponde a una función hiperbólica con caída, la cual describe el proceso de unión del sustrato a la enzima, más la constante de velocidad de formación de producto y la constante de inhibición por producto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo

El nivel de expresión fue adecuado y esencialmente el mismo empleando las 2 cepas, la IBPC 590 (cepa constitutiva) y JM101 (cepa no constitutiva). La expresión fue suficiente como para permitir la purificación de enzima en la escala de decenas de miligramos.

Esquema de purificación

El método de purificación de la enzima 268fin implicó pérdida de cierta cantidad de enzima en cada una de las etapas. En la siguiente tabla se muestran los rendimientos de cada una de éstas durante el proceso de purificación.

Tabla 1. Tabla de purificación de la mutante truncada 268fin.

	PROTEINA (totales)			ENZIMA (268fin)			Rendimiento %	Factor de purificación
	Volumen	Conc.	Proteína total	Conc.	Actividad específica	Total de enzima		
	mL	mg/mL	mg	UI/mL	UI/mg ($\times 10^3$)	UI		
Extracto crudo (Sonicado)	92	52.28	4 809	0.1649	3.15	15.18	100	1
Sobrenadante del sonicado	75	35.62	2 671	0.1538	4.31	11.53	76	1.36
Cromatografía de afinidad: Elución	9	2.39	21.56	0.3863	161.2	3.47	23	51.1

La elución de la enzima se colectó en fracciones de 1mL. Cada una de éstas se encuentran representadas por una curva en la Gráfica 1 en donde se observan picos a 280nm, aproximadamente. longitud de onda a la cual absorbe la proteína de interés (268nm). También se observan varias fracciones con absorbancias mayores a 1 lo que significó la disposición de una gran cantidad de enzima para los ensayos que precedieron, tomando en cuenta la relación $c(\mu\text{g/mL})=A/b\epsilon$, dónde: A, absorbancia; $b=1$ y ϵ , es el coeficiente de absortividad molar conocido de la *EcGNPD*, que es de 0.2020.

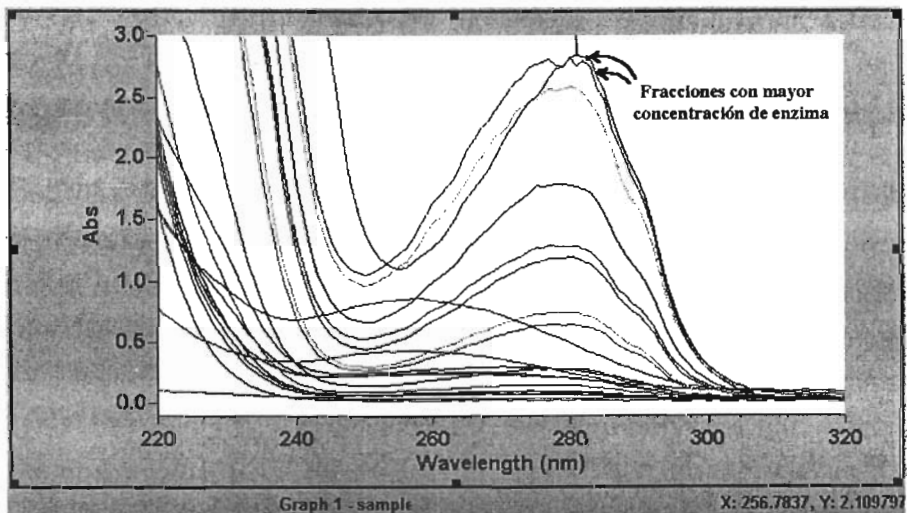


Figura 14. Espectros de absorción de las fracciones de la elución. Se observan a 280nm, los picos correspondientes a la enzima purificada 268nm

Electroforesis

La presencia y la pureza de la mutante 268fin se verificaron mediante geles de PAGE-SDS en las diferentes etapas del proceso de purificación, desde la producción en placa hasta que la enzima es eluida de la columna de afinidad. Para ello, se utilizó a la *EcGNPD* como referencia de peso molecular (marcador). En la figura 2, se observa el monitoreo que se llevó a cabo empezando por el extracto crudo o sonificado que es en donde se encuentra el contenido celular (fragmentos celulares, proteínas plasmáticas, etc.) además de la enzima de interés (268fin). También se observa la presencia de la enzima (además de otras proteínas de diferentes tamaños) en el sobrenadante del sonificado, precipitado del sonificado y en la fracción de la elución lo que indico -hasta este paso- el éxito del proceso. Cabe resaltar que una cantidad de enzima se pierde en el precipitado del sonificado y en el frente de la elución. Finalmente, en el carril 6 se observa una sola banda (correspondiente a la enzima 268fin) con la misma movilidad electroforética que la de referencia, indicando que se llevó a cabo una purificación total.

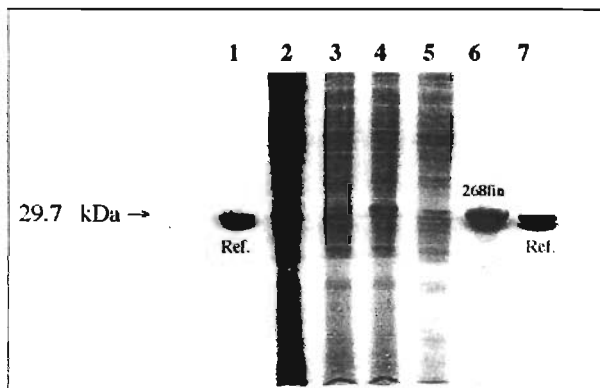


Figura 15. Gel PAGE-SDS de las distintas fracciones del proceso de purificación de la mutante 268fin. En los carriles 1 y 7 se observa la enzima pura *EcGNPD*, en el 2 el extracto crudo o sonificado, en el 3 el precipitado del sonificado, en el 4 el sobrenadante del sonificado, en el 5 el frente de la columna de afinidad y en el 6 la elución

Conservación

- **En glicerol:** Las fracciones que contenían a la enzima se dializaron contra un buffer de tris 50mM pH 8.2 y se concentraron en glicerol.
- **En sulfato de amonio:** Las fracciones que contenían la enzima con absorbancia mayor a 1 se pudieron conservar mediante precipitación con sulfato de amonio al 70% de saturación (equivalente al 50% P/V).

Estabilidad

- **Enzima en glicerol:** la enzima no es estable en glicerol, en los cromatogramas se observa disociada, predominando la forma monomérica. El cromatograma de exclusión molecular indica un tiempo de retención de 32 minutos para la forma hexamérica y 60 minutos para la forma monomérica. (Figura 16). Cabe resaltar que la enzima fue inyectada a la columna de exclusión molecular 48 horas después de ser eluida de la columna de afinidad observando que después de éste tiempo hay una disociación evidente de la proteína, casi en su totalidad. A partir de éstos resultados se descartó la posibilidad de hacer ensayos cinéticos con la enzima conservada en glicerol.
- **Enzima en sulfato de amonio:** la enzima es estable en sulfato de amonio ya que conserva su forma hexamérica casi en su totalidad (Figura 17). De igual forma se mostró la estabilidad de la enzima 72 horas después de no estar precipitada con sulfato de amonio.

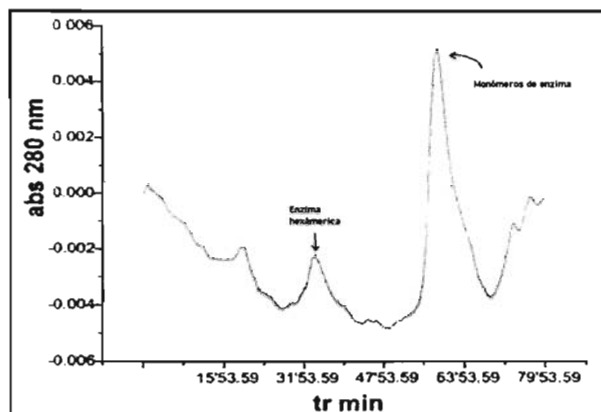


Figura 16. Cromatografía de exclusión molecular de la enzima 268fin conservada en glicerol. Se observa a los 32 min. la fracción del hexámero, y a los 60 minutos la fracción del monómero.

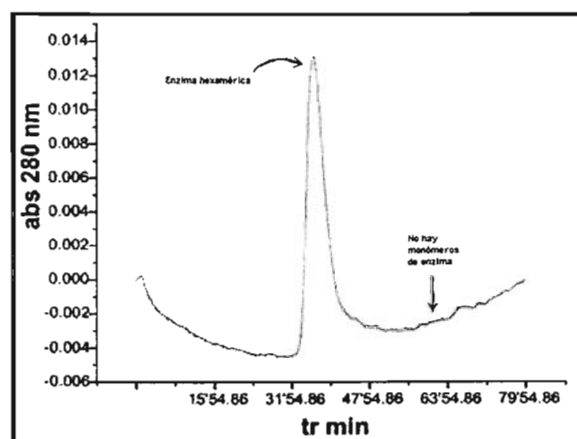


Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular de la enzima 268fin conservada en sulfato de amonio. Se observa un solo pico correspondiente a la enzima en su forma hexamérica.

Conjuntamente con los estudios de cromatografía de exclusión molecular, se realizó una prueba para verificar la estabilidad de la enzima a la temperatura. Lo anterior fue para confirmar la integridad -y por ende la funcionalidad- de la enzima durante los ensayos cinéticos. La prueba consistió en incubar las enzimas *hGNPD-1* (ya purificada) y 268fin a 40°C (temperatura un poco superior a la de los ensayos cinéticos) durante 2 horas realizando mediciones de absorbancia a 512nm cada 10 minutos. El resultado obtenido fue que no hay un cambio drástico en las absorbancias de las enzimas después de 2 horas de incubación a 40°C, demostrando así, que la enzima conserva su estructura durante este tiempo.

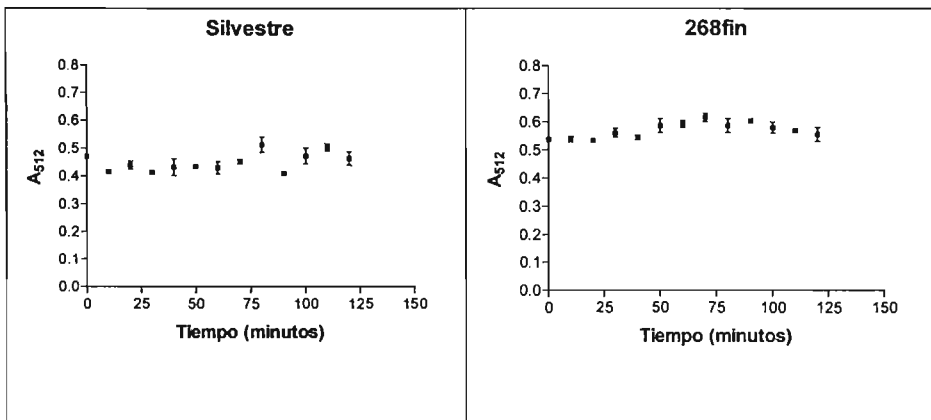


Figura 18. Gráficos que muestran el cambio de absorbancia (a 512nm) de las enzimas *hGNPD-1* y 268fin incubadas a una temperatura de 40°C durante 2 horas.

Estudios cinéticos

La mutante truncada 268fin expresada en *E. coli* presenta el mismo comportamiento que la enzima silvestre (*hGNPD-1*) respecto a la forma de activación alostérica por la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato, *GlcNA6P* (Figura 19). Ambas enzimas muestran un incremento en la k_{cat} con la concentración de activador alostérico y en ausencia de éste exhiben una actividad catalítica muy baja. Presentan concentraciones saturantes a 0.5mM de activador y una disminución de su actividad (inhibición) a concentraciones crecientes de sustrato. Los gráficos de velocidad contra concentración de sustrato a diferentes concentraciones del activador -incluso saturantes- presentan un mínimo de cooperatividad positiva, que no parecen modificarse con la concentración creciente de éste.

Por lo anterior, es evidente que la enzima 268fin presenta una cinética muy semejante a la *hGNPD-1*, sin embargo, se observan ciertas diferencias en algunos parámetros cinéticos. Por ejemplo, para la mutante truncada, hay una disminución en la K_{cat} y en la cooperatividad ($39.2s^{-1}$ y $h=2.1$) en relación con los valores obtenidos para la enzima silvestre ($46.8s^{-1}$ y $h=2.35$). Por otro lado, la afinidad por el activador es semejante para ambas enzimas teniendo un valor de $K_a=0.21mM$ para la mutante y de $K_a=0.15mM$ para la silvestre.

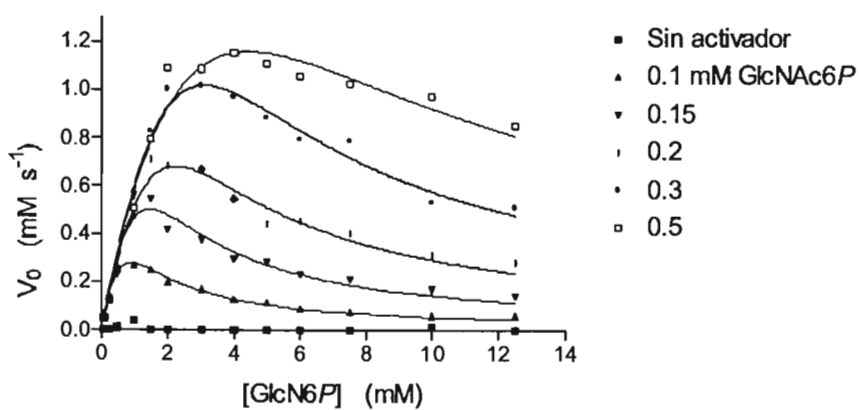


Figura 19. Patrones de velocidad inicial vs concentración de sustrato para la mutante truncada 268fn. Se obtuvieron curvas a diferentes concentraciones de activador alostérico y en ausencia de éste.

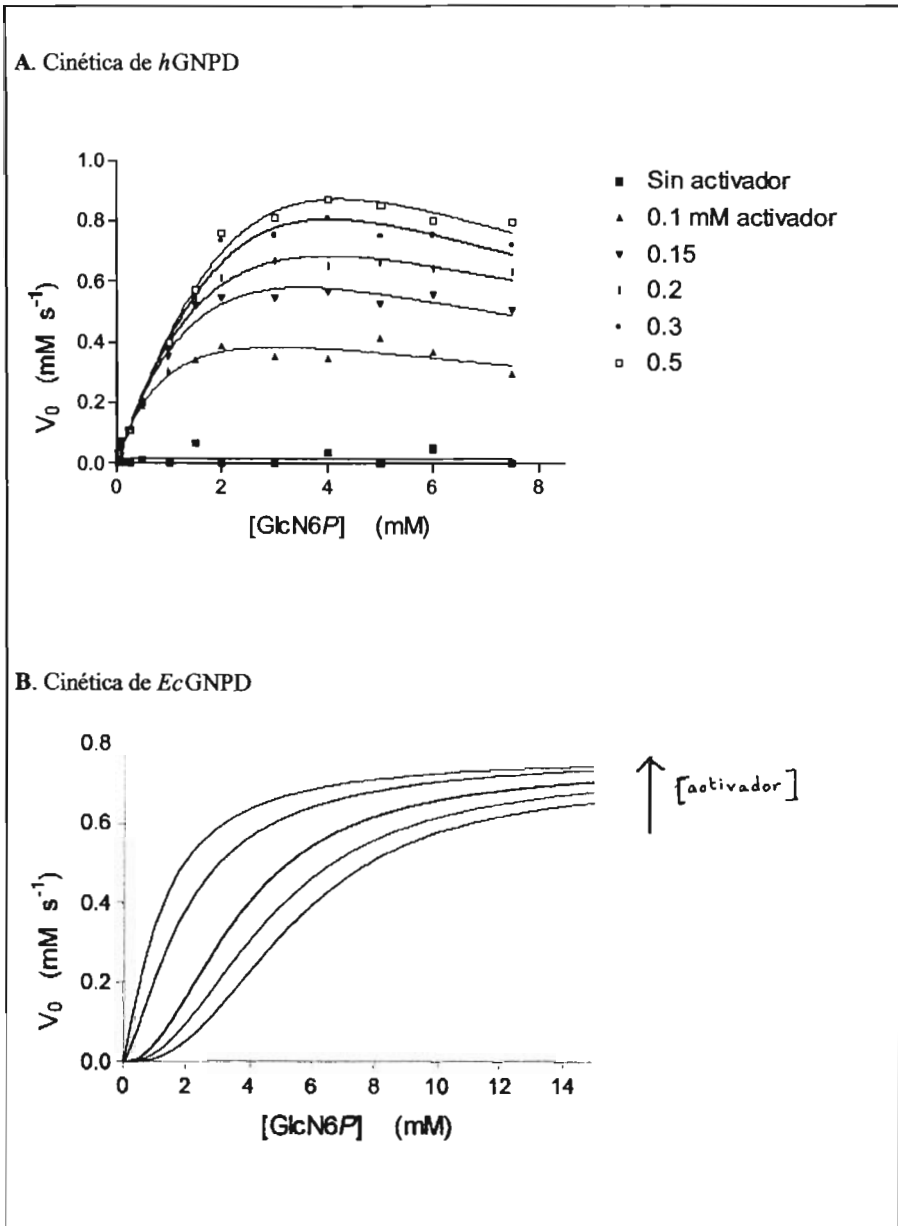


Figura 20. Patrones de velocidad inicial vs concentración de sustrato a diferentes concentraciones de activador alostérico y en ausencia de éste para: A, enzima *h*GNPD-1 y B, *Ec*GNPD.

A partir de los resultados y discusiones anteriores de las curvas velocidad-sustrato a diferentes concentraciones fijas de GlcNAc6P se pueden hacer algunas afirmaciones importantes:

- 1) No se observa reacción en ausencia de GlcNAc6P. El modulador alostérico se comporta como un activador esencial.
- 2) No se observa cooperatividad; las curvas muestran una cinética Michaeliana modificada, con inhibición por sustrato.
- 3) La 268fin presenta una cinética de activación alostérica semejante a la hGNPD-1 silvestre debido a que el modulador alostérico es un fuerte activador V , y un discreto inhibidor K . Lo llamaremos activador, por ser el efecto predominante. La inhibición por sustrato y el efecto K negativo (aumento de K_m aparente con la concentración del activador) se comportan como dos fenómenos independientes.
- 4) La inhibición por sustrato aumenta con la concentración de GlcNAc6P.

CONCLUSIONES

El sulfato de amonio resultó ser un excelente conservador y protege a la enzima de la disociación de tal forma que fue posible estudiarla y caracterizarla cinéticamente.

Las pruebas de estabilidad realizadas en la *hGNPD-1* silvestre y *hGNPD-1 268fin* demuestran que no existe una diferencia significativa en la actividad de éstas 2 enzimas por lo que se descarta que el segmento C-terminal 268-289 tenga un papel relevante en ésta función.

A diferencia de la *EcGNPD*, la *hGNPD-1 268fin* presenta una cinética alostérica compleja. Se descarta que las propiedades alostéricas características de la *hGNPD-1* se expliquen por la existencia del segmento C terminal 268-289.

Los residuos en el sitio activo de éstas dos enzimas están altamente conservados, con excepción de la Serina 43 que es glicina en *E. coli*. La cadena lateral de ésta está colocada en posición para construir un puente de hidrógeno con el fosfato del inhibidor (o el ion sulfato) en la enzima humana. Además la Serina 43 está localizada en el asa de unión al fosfato (residuos 41-44) que es una de las pocas regiones donde aparecen diferencias entre la enzima humana y la bacteriana, por lo tanto el cambio en éste residuo podría explicar las diferencias en la cinética alostérica observadas entre éstas 2 enzimas.

ANEXO

1. Protocolo de ensayo cinético de la enzima 268fin (mutante truncada):

Protocolo de cinética: enzima 268fin											
No. tubo	[GlcN6P] (mM)	Agua	Sustrato ¹	Mezcla ²	Enzima ³	Concentración de activador alostérico (mM)					
						0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
		Volumen (μL)			Resultados Absorbancias a 512nm						
1	0.10	120	((20))	50	10	0.0	0.04800	0.0500	0.05500	0.05600	0.05200
2	0.25	90	((50))	50	10	0.0	0.14100	0.1270	0.12300	0.12200	0.12400
3	0.50	40	((100))	50	10	1.0e-03	0.26500	0.2310	0.26200	0.27000	0.25100
4	1.00	120	(20)	50	10	2.0e-03	0.27116	0.5620	0.47200	0.54900	0.50400
5	1.50	110	(30)	50	10	0.0	0.25000	0.5450	0.71100	0.82600	0.79700
6	2.00	100	(40)	50	10	0.0	0.19900	0.4170	0.68200	1.00000	1.08800
7	3.00	80	(60)	50	10	0.0	0.17100	0.3750	0.66900	1.01400	1.08500
8	4.00	60	(80)	50	10	3.0e-03	0.12900	0.2940	0.54600	0.96900	1.14993
9	5.00	40	(100)	50	10	1.0 e-03	0.11500	0.2810	0.44200	0.88300	1.10518
10	6.00	20	(120)	50	10	0.0	0.08800	0.2280	0.45300	0.79700	1.05800
11	7.50	125	15	50	10	0.0	0.07600	0.2100	0.40100	0.78700	1.02400
12	10.00	120	20	50	10	0.0	0.06100	0.1710	0.31300	0.53100	0.97100
13	12.50	115	25	50	10	1.0e-03	0.06100	0.1450	0.28400	0.51000	0.85100

1. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

Pesar 0.0283g de GlcN6P y disolver en 1000μL de agua destilada.	S
Mezclar 100μL de la disolución anterior con 900μL de agua.	(S)
Mezclar 100μL de la disolución anterior con 900μL de agua.	((S))
Mezclar 100μL de la disolución anterior con 900μL de agua.	((((S)))

2. PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS

[Activador] (mM)	Tris 1M pH 8.0	EDTA 250mM	Activador 100mM	Agua destilada
Volumen en μL/tubo				
0	20	20	0	10
0.1	20	20	0.2	9.8
0.15	20	20	0.3	9.7
0.2	20	20	0.4	9.6
0.3	20	20	0.6	9.4
0.5	20	20	1.0	9.0

3. PREPARACIÓN DE LA ENZIMA

La enzima se utilizó a una concentración 15nM.

CURVA PATRÓN DE FRUCTOSA

No. de tubo	[Fruc] (mM)	Vol. Agua (μL)	Vol. Fructosa St. (μL)	Absorbancia a 512nm
Blanco	0	200	0	0
1	0.05	190	10	0.016
2	0.125	175	25	0.030
3	0.2	150	50	0.060
4	0.50	100	100	0.127
5	0.75	50	150	0.187
6	1.00	0	200	0.239

*Fructosa estándar (St.): mezclar 10μL de fructosa 100mM y 990μL de agua.

2. Protocolo de ensayo cinético de la enzima *hGNPD* (enzima silvestre):

Protocolo de cinética: enzima <i>hGNPD</i>											
No. tubo	[GlcN6P] (mM)	Agua	Sustrato ¹	Mezcla ²	Enzima ³	Concentración de activador alostérico (mM)					
						0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
Volumen (μL)					Resultados Absorbancias a 512nm						
1	0.10	120	((20))	50	10	0.000	0.013	0.016	0.024	0.023	0.036
2	0.25	90	((50))	50	10	0.010	0.025	0.021	0.027	0.022	0.036
3	0.50	40	((100))	50	10	0.015	0.030	0.028	0.031	0.026	0.032
4	1.00	120	(20)	50	10	0.069	0.033	0.047	0.036	0.042	0.039
5	1.50	110	(30)	50	10	0.000	0.044	0.048	0.043	0.051	0.072
6	2.00	100	(40)	50	10	0.000	0.113	0.107	0.114	0.105	0.110
7	3.00	80	(60)	50	10	0.010	0.191	0.199	0.208	0.201	0.200
8	4.00	60	(80)	50	10	0.000	0.305	0.351	0.379	0.381	0.397
9	5.00	40	(100)	50	10	0.070	0.341	0.519	0.543	0.552	0.573
10	6.00	20	(120)	50	10	0.005	0.390	0.548	0.614	0.733	0.761
11	7.50	125	15	50	10	0.000	0.351	0.546	0.669	0.753	0.810
12	10.00	120	20	50	10	0.040	0.349	0.569	0.654	0.811	0.874
13	12.50	115	25	50	10	0.000	0.412	0.528	0.661	0.752	0.853

1. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

Pesar 0.0283g de GlcN6P y disolver en 1000μL de agua destilada.	S
Mezclar 100μL de la disolución anterior con 900μL de agua.	(S)
Mezclar 100μL de la disolución anterior con 900μL de agua.	((S))
Mezclar 100μL de la disolución anterior con 900μL de agua.	((((S)))

2. PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS

[Activador] (mM)	Tris 1M pH 8.0	EDTA 250mM	Activador 100mM	Agua destilada
Volumen en μL/tubo				
0	20	20	0	10
0.1	20	20	0.2	9.8
0.15	20	20	0.3	9.7
0.2	20	20	0.4	9.6
0.3	20	20	0.6	9.4
0.5	20	20	1.0	9.0

3. PREPARACIÓN DE LA ENZIMA

La enzima se utilizó a una concentración 15nM.

CURVA PATRÓN DE FRUCTOSA

No. de tubo	[Fruc.] (mM)	Vol. Agua (μL)	Vol. Fructosa St. (μL)	Absorbancia a 512nm
Blanco	0	200	0	0.000
1	0.05	190	10	0.012
2	0.125	175	25	0.020
3	0.2	150	50	0.047
4	0.50	100	100	0.090
5	0.75	50	150	0.134
6	1.00	0	200	0.191

*Fructosa estándar (St.): mezclar 10μL de fructosa 100mM y 990μL de agua.

REFERENCIAS

1. **Drickamer, K.** (1991). Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* **67**, 1029-32.
2. **Fermini, B.** and Nathan, R.D. (1991). Removal of sialic acid alters both T and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* **260**, H735-43.
3. **Glick, G.D.,** Toogood, P.L., Wiley, D.C., Skehel, J.J., and Knowles, J.R. (1991). Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. *Journal of biological Chemistry* **266**, 23660-9.
4. **Plumbridge, J.,** and Vimr, E. (1999). Convergent pathways for utilization of the amino sugars *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmannosamine, and *N*-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 47-54.
5. **Souza, J.M.,** Plumbridge, J.A., and Calcagno, M.L. (1997). N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*: purification and molecular and kinetic characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **340**, 338-46.
6. **Plumbridge, J.A.** (1989). Sequence of the *nagBACD* operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the *nag* regulon. *Mol. Microbiol.* **3**, 506-515.
7. **Altamirano, M.M.,** Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 266-272.
8. **Nataranjan, K.** and Datta, A. (1993). Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9206-9214.
9. **Lara-Lemus, R.,** Libreros-Minotta, C.A., Altamirano, M.M. and Calcagno, M.L. (1992). Purification and characterization of glucosamine-6-phosphate deaminase from dog kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 213-220.
10. **Lara-Lemus, R.** (1991). Estudio cinético y caracterización molecular de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de corteza renal de bovino. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.
11. **Lara-Lemus, R.** and Calcagno, M.L. (1998). Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from Beef Kidney is an Allosteric System of the V-Type. *Biochim. Biophys. Acta* **1388**, 266-272.
12. **Parrington, J.,** Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., and Lai, F.A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* **379**, 364-368.

13. **Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui (1984).** Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.
14. **Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J. and Söll, D. (1988).** Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* *nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* **62**, 197-207.
15. **Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. and Horjales, E. (1995).** Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* **3**, 1323-1332.
16. **Lara-González, S. (2001).** Desencadenamiento y Propagación de la Transición Alostérica en la Glucosamina-6-Fosfato Desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.
17. **Monod, J., Wyman J. and Changeux, J.P. (1965).** On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **2**, 88-118.
18. **Rudiño-Pinera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P., and Horjales, E. (2002).** Structural Flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* Glucosamine-6-Phosphate Deaminase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 10-20.
19. **Segel, I.H. (1975).** Enzyme Kinetics. *Wiley-Interscience, New York, London*, 431.
20. **Bustos-Jaimes, I., Ramírez-Costa, M., De Anda-Aguilar, L., Hinojosa-Ocaña, P. and Calcagno, M. L. (2005).** Evidence for Two Different Mechanisms Triggering the Change in Quaternary Structure of the Allosteric Enzyme, Glucosamine-6-Phosphate Deaminase. *Biochemistry*, número de identificación 10.1021/bi048514o.
21. **Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, M. L., Garratt R. C. and Oliva, G. (1999).** The allosteric transition of glucosamina-6-phosphate desaminasa: the structure of the state T at 2.3 Å resolution. *Structure*, **7**, 527-537.
22. **Montero-Moran, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J. A. and Calcagno, M. L. (2001).** On the multiple functional roles of the activesite histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **40**, 10187-10196.
23. **Dalziel, K (1968).** A Kinetic interpretation of the allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. *Febs Letters* **5**, 346-348.
24. **Lara-González, S., Dixon, H.B.F., Mendoza-Hernandez, G., Altamirano, M. M. and Calcagno, M. L. (2000).** On the role of the N-terminal group in the allosteric function of Glucosamine-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**, 219-227.

25. **Montero-Morán**, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. and Altamirano, M.M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **37**, 7844-7849.
26. **Altamirano**, M.M., Hernandez-Arana, A., Tello-Solis, S., and Calcagno, M.L. (1994). Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamina-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **220**, 409-13.
27. **Arreola**, R., Valderrama, B., Morante, M.L., and Horjales, E. (2003). Two Mammalian Glucosamine-6-Phosphate Deaminases: A Structural and Genetic Study. *FEBS Letters* **55**, 63-70.
28. **Roe**, J. H. (1934). "A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine". *J. Biol. Chem.* **107**, 15-20.
29. **Laemmli**, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* **227**, 680-685.
30. **Ruiz-Rojina**, G., comunicación personal.
31. **Hinojosa-Ocaña**, M. (2003). "Construcción de una mutante sitio específica como sensor estructural de la transición alostérica de la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*". Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.