



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Clonación, purificación y caracterización de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Bacillus subtilis*

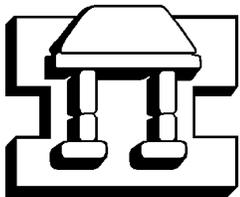
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Tapia Molina Juan Guadalupe



IZTACALA

Director de tesis: Dr. Alejandro Sosa Peinado.

México, D.F.

Febrero del 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Tesis realizada en el
Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas,
Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM

Jurado:

Presidente:
M. en C. Cesar Mateo Flores Ortiz

Vocal:
Dr. Alejandro Sosa Peinado

Secretario:
M. en C. Irma Elena Dueñas García

Suplente:
Dr. Roberto Velasco García

Suplente:
M. en C. Hugo Perales Vela

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
ENZIMAS: DIVERSIDAD Y EVOLUCIÓN	4
LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA	6
LA GlcN6P DESAMINASA DE <i>E. coli</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	6
MECANISMO DE REACCIÓN	8
METABOLISMO DE AMINOAZÚCARES	11
METABOLISMO DE LA GLUCOSAMINA	12
TAXONOMÍA DE <i>Bacillus subtilis</i>	13
ANTECEDENTES	15
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Reactivos	17
Cepas bacterianas y plásmidos	17
Clonación y construcción del vector de expresión	17
Producción de extracto crudo	20
Metodología inicial de purificación	21
Ensayos enzimáticos	22
Secuenciación y alineamiento	22
Predicción del modelo estructural por homología	22
Análisis de identidad	23
RESULTADOS	25
Clonación	25
Subclonación	26
Expresión y sobreexpresión	29
Purificación parcial	31
Estudio cinético preliminar	34
Análisis estructural por homología a partir de la secuencia primaria	35
Desarrollo del modelo computacional probable de la GlcN6P desaminasa de <i>B. subtilis</i> a partir del modelo cristalografico de la enzima de <i>E. coli</i>	37
Análisis de identidad	39
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS DE TRABAJO	53
LITERATURA CITADA	54
ANEXOS	56

ABREVIATURAS.

Fru6P D-fructosa-6-fosfato

GlcN glucosamina

GlcNAc N-acetil-D-glucosamina

GlcNAc6P N-acetilglucosamina-6-fosfato

GlcN6P D-glucosamina 6-fosfato

GlcN6P desaminasa glucosamina-6-fosfato desaminasa

K_{cat} Constante catalítica

K_m constante de Michaelis

MWC modelo alosterico concertado de Monod, Wyman y Changeux

PDB "Protein Data Bank"

SDS Dodecil-sulfato de sodio

V_{max} Velocidad máxima

RESUMEN

La enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) juega un papel muy importante en el catabolismo de aminoazúcares, catalizando la isomerización y desaminación reversible de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y ion amonio. La GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* es una enzima alostérica conformada por seis subunidades idénticas de 266 residuos. La alineación de la secuencia primaria de la desaminasa de *Bacillus subtilis* con la de *E. coli* muestra diferencias reflejadas en la estructura a nivel de contactos intermonoméricos, lo que indica que probablemente el sistema de *B. subtilis* no sea hexamérico y en consecuencia, no presente propiedades alostéricas. Por lo que resulta interesante estudiar un sistema más sencillo que nos permita entender los mecanismos cinético entre una posible enzima no alostérica y uno alostérico. En el presente trabajo se realizó la caracterización bioquímica preliminar de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*, obtenida a partir de la cepa recombinante donde se clono el gen *nagB*. Se verificó la expresión de la enzima y se estimó su peso molecular (~27 kDa) por medio de un gel de acrilamida-SDS 12% a partir de una muestra parcialmente purificada. En el estudio cinético preliminar se observó que esta enzima trabaja en un rango de pH de 6.5-8.8, obteniendo una mayor actividad a pH ~8.2. Al mismo tiempo estos ensayos han demostrado que la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* presenta una cinética no alostérica. La secuencia de aminoácidos de la GlcN6P desaminasa *B. subtilis* con un 36.8% de identidad a la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, muestra una ausencia de 24 residuos de aminoácidos, que comprenden gran parte del extremo C terminal. Los residuos del sitio activo están completamente conservados, por lo que la catálisis no se ve afectada, mientras que los residuos del sitio alosterico se encuentran sustituidos por residuos similares, con excepción del residuo lisina 160 que en *B. subtilis* esta sustituido por una Valina, perdiendo la carga necesaria para el enlace del fosfato del activador. El modelo estructural, sugiere la pérdida de interacciones en la interface en el eje de orden dos, relacionado con la pérdida de residuos del extremo C-terminal, por lo que podemos considerar a la GlcN6P desaminasa de *Bacillus subtilis* como un excelente modelo para estudiar probables interacciones entre subunidades requeridas para procesos cooperativos.

ENZIMAS: DIVERSIDAD Y EVOLUCIÓN

Las enzimas son proteínas extraordinariamente específicas, capaces de disminuir la energía de activación que los reactantes requieren para transformarse en productos, facilitando así la enorme variedad de reacciones que ocurren en las células, permitiendo que los procesos biológicos se realicen en un espacio de tiempo adecuado (Copeland, 2000).

Estructuralmente las enzimas son polipéptidos de más de cien aminoácidos, sin embargo estos se encuentran limitados a un grupo de veinte diferentes moléculas de este tipo, de manera que el arreglo espacial de la cadena lineal de aminoácidos determina la complejidad del sistema, más aun, si consideramos que todos los enlaces que se generan dan origen a la estructura terciaria o conformación nativa, la cual a su vez puede variar ampliamente. Además, existen enzimas formadas por la interacción entre subunidades que forma oligómeros, generando la estructura cuaternaria.

Precisamente estos diferentes grados de oligomerización no sólo generan una variante estructural, sino que también lo hacen de manera funcional. Algunas proteínas con estructura oligomérica, también presentan propiedades alostéricas. Estas se caracterizan por poseer sitios de unión para diferentes ligandos, cuyas afinidades aumentan o disminuyen como consecuencia de efectos indirectos entre dichos sitios, regulando de esta forma la actividad de la enzima. Estas interacciones entre sitios distintos se conocen como efectos heterotrópicos y están mediados a través de cambios conformacionales de la molécula proteica completa (Goodsell, D. S, 2000 y Fersht 1998).

Estas proteínas presentan otra variante más en el funcionamiento y estructura de las enzimas, generando de esta forma una gama de enzimas con multiplicidad de formas a nivel estructural.

Esta diversidad no sólo se limita a aquellas enzimas con funciones distintas presentes en cada uno de los puntos de las rutas metabólicas, ya que no resulta extraño encontrar variantes de la misma proteína cuya estructura y función biológica resulta, en principio, esencialmente la misma y sin embargo presentar polimorfismo proteico, de forma que poseen propiedades funcionales en común que no necesariamente son idénticas.

Muchas proteínas son producto de genes homólogos que han sufrido cambios en el orden definido de sus residuos dentro de la secuencia de nucleótidos, dado por efecto de un número variado de mutaciones que operan aleatoriamente de manera inespecífica e impredecible, generando consigo efectos de eliminación, duplicación, inserción y fusión de regiones que se acumulan en diversos sitios de la secuencia de ADN (ácido desoxiribonucleico) como consecuencia de la evolución (Patthy, 1995; 1999).

Si alineamos dos secuencias homólogas de nucleótidos podemos encontrar sitios que se alinean con una base idéntica en la otra secuencia, sin embargo podemos encontrar sitios que han experimentado mutaciones, ya que en estas circunstancias encontramos bases que no corresponden la una con la otra en el alineamiento (Patthy, 1995; 1999).

Como es de suponerse, diferentes proteínas pueden presentar diferentes limitaciones a variar, es decir, puede presentar diferente tolerancia a los cambios en sus residuos. En estas circunstancias el índice de la sustitución está determinado por el índice de la mutación y de la probabilidad de la fijación de dicha mutación, la cual depende claramente de si la mutación es ventajosa, neutral o deletérea. De esta manera, en aquellas proteínas con gran limitación funcional la mayoría de los cambios alteran la función proteica y disminuyen la eficiencia biológica de los individuos portadores, por lo que se consideraran como cambios deletéreos y serán eliminados de la población por selección, mientras que las mutaciones silenciosas que no conducen a la sustitución del aminoácido en el gen que codifica la proteína y por tanto el cambio resulta ser neutral, serán fijadas no importando el lugar que ocupen en la secuencia (Patthy, 1999).

Es por ello que en muchos casos existen residuos altamente conservados. De esta forma en muchas circunstancias el aminoácido sustituido resulta tener similitud bioquímica con el anterior por lo que la proteína no pierde su actividad, o que dicho cambio se de en una región no funcional de la proteína, sin alterar su estructura. A pesar de ello, podemos encontrar cambios repentinos ya sea resultado de la acumulación de pequeñas mutaciones o no, que pueden generar en la proteína cambios en la especificidad, función, tamaño y estructura (Patthy, 1999).

LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA

La enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) juega un papel muy importante en el catabolismo de aminoazúcares en un considerable número de organismos procariotas y eucariotas, catalizando la isomerización y desaminación reversible de D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y el ion amonio (NH_4^+), permitiendo en estos organismos la utilización de glucosamina (GlcN) como fuente de carbono (Comb y Roseman, 1958; Midelfort y Rose, 1977 y Calcagno *et al.*, 1984).

LA GlcN6P DESAMINASA DE *E. coli* COMO MODELO DE ESTUDIO

La GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli*, en relación con otras enzimas alostericas, presenta una cinética más flexible y susceptible de análisis por medio de los modelos clásicos o derivaciones o adaptaciones de éstos, motivo por lo cual se ha convertido en un buen modelo de estudio de los diferentes aspectos relacionados con el funcionamiento de las enzimas a lo largo de los últimos años (Oliva *et al.*, 1995 y Lara-González *et al.*, 2000).

La GlcN6P desaminasa (EC 3.5.99.6, anteriormente llamada glucosamina 6-fosfato isomerasa, EC 5.3.1.10), producto del gen *nagB*. En *Escherichia coli*, es una enzima alostérica conformada por seis subunidades idénticas de 266 residuos aminoácidos y un peso molecular de 29.7 kDa por monómero (Fig. 1).

La GlcN6P desaminasa presenta un eje de simetría de orden dos y otro de orden tres, por lo que se puede describir como un dímero de trímeros (Fig. 1) (Oliva *et al.*, 1995 y Lara-González *et al.*, 2000).

Esta enzima se puede dividir estructuralmente en dos zonas generales: la interna y la externa. La zona interna, es la responsable de la mayoría de los contactos intermonoméricos del hexámero funcional y consta de tres segmentos: un motivo hélice-asa-hélice (residuos 207 a 232) que unen el hexámero en la zona del eje de orden tres (Fig. 1C), una asa-hélice que establece los contactos intermonoméricos cerca del orden dos (Fig. 1B) (residuos 244 a 253) y una vuelta que está unida por puentes de hidrógeno al fragmento anterior (residuos 137 a 143).

Los residuos restantes (1 a 136, 144 a 206, 234 a 243 y 254 a 266) forman la zona externa que a diferencia de la zona interna presenta un movimiento rotatorio durante la transición alostérica (Rudiño, 2001 y Montero-Morán *et al.* 1998).

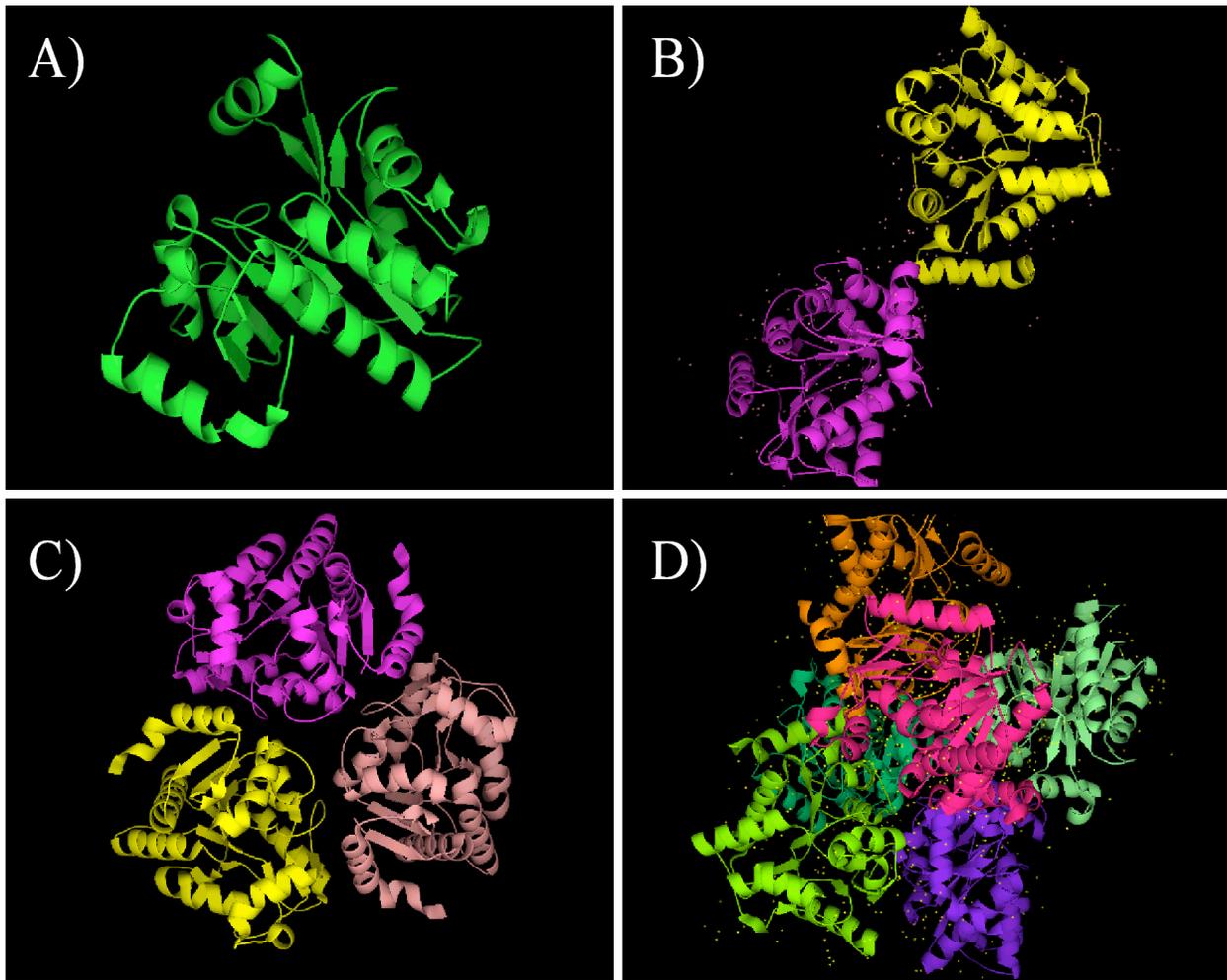


Figura 1. Estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa. Imagen creada a partir del archivo PDB 1CD5 en sus diferentes subunidades: A) monomérica, B) Dimérica, C) Trimérica y D) Hexamérica.

MECANISMO DE REACCIÓN

El mecanismo de reacción de isomerización y desaminación de glucosa-6-fosfato en D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y el ion amonio (NH_4^+) involucra la apertura del anillo de la

piranosa como resultado de la acción de la Histidina 143. El sustrato modelado en su forma piranósica, muestra que su oxígeno 5 está en contacto con el nitrógeno 1 de la Histidina 143, la cual cede un hidrógeno para romper el enlace hemiacetal, quedando abierta la cadena del azúcar; a su vez, el nitrógeno 1 de la Histidina 143 hace contacto con dos grupos ácidos: Aspártico 141 y Glutámico 148.

Una vez que el anillo del sustrato se abre y adopta su conformación extendida, el carboxilato del Aspártico 72 sustrae el protón del carbono 2 y, de manera concertada, se lleva a cabo la enolización a través de la formación del intermediario *cis*-enol-amonio. Para el siguiente paso de la reacción, el protón del carbono 2 del residuo Aspártico 72 se transfiere al átomo de oxígeno del carbonilo en el carbono 1 del intermediario *cis*-enol-amonio, formándose la *cis*-enol-amino. En este paso se da la entrada de una molécula de agua que reacciona con el enlace π entre el carbono 1 y el carbono 2 del *cis*-enol-amonio formando un intermediario carbinol-amonio, cuyo carácter inestable hace que se descomponga en fructosa-6-fosfato y amoniaco. Por último se transfiere un protón al carboxilato del Aspártico 72 (Fig. 2) (Oliva *et al.*, 1995).

Esta reacción presenta un carácter direccional reversible dependiente de la cantidad de *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNac6P) disponible para la célula (Montero-Moran 1998) y cuya cinética se puede considerar bien definida por el modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC) (1965), según lo demostrado por Altamirano *et al.* en 1995.

Como la mayoría de las enzimas alostéricas, la GlcN6P desaminasa presenta un sistema tipo K, lo cuál significa que su control alostérico opera por medio de la modificación de la afinidad aparente de la enzima por su sustrato, sin cambio en su constante catalítica. Por tanto, su regulación es el resultado de un cambio en la afinidad evidente de la enzima causada por la transición estructural cuando la enzima va del estado conformacional T (ausencia de ligandos) al R (presencia de ligandos), acompañado por cambios internos en la estructura de la desaminasa, sin ningún cambio en la constante catalítica (k_{cat}), lo que da por resultado una reorientación de la molécula, la cual se ilustra en la Figura 3 (Calcagno *et al.* 1984).

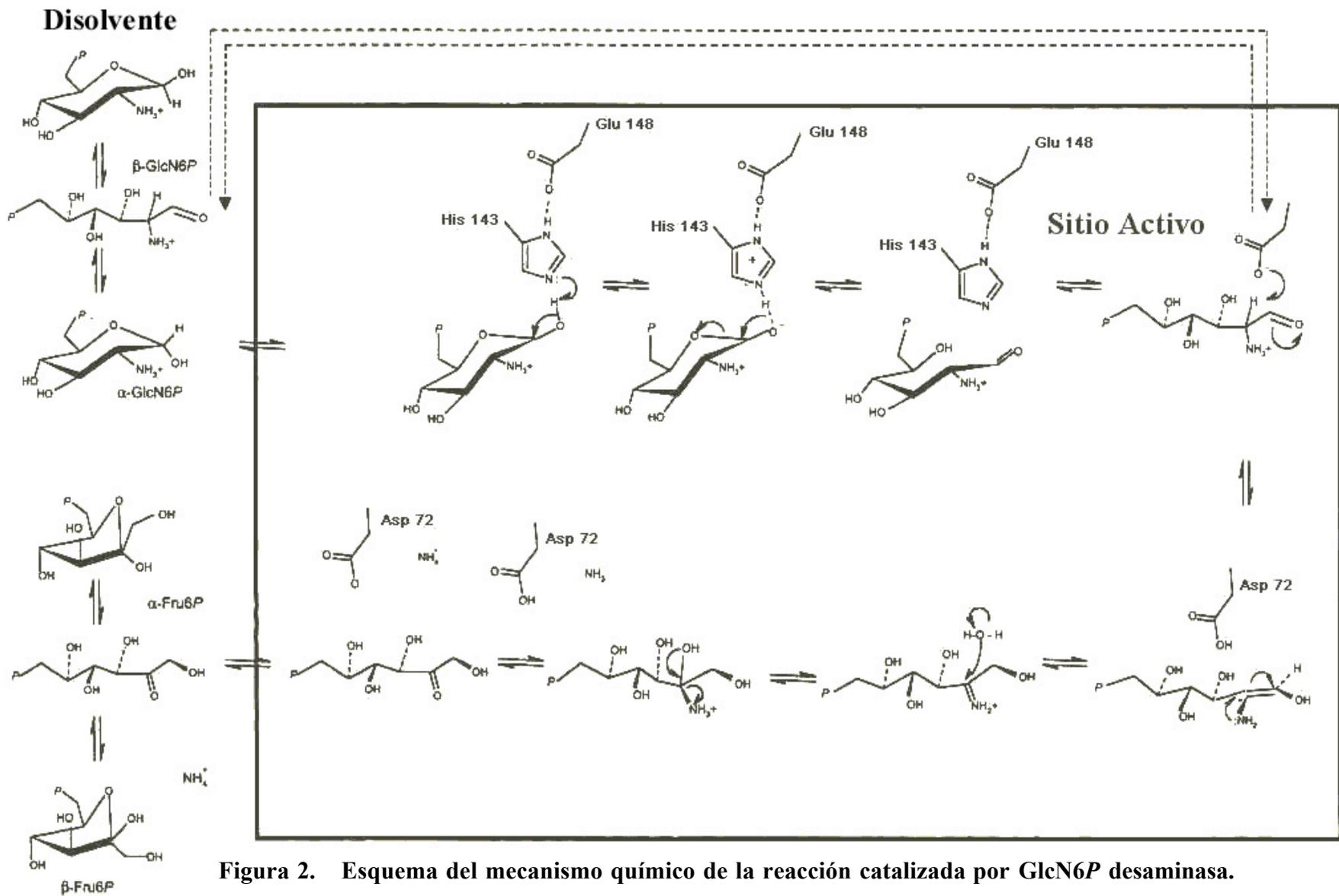


Figura 2. Esquema del mecanismo químico de la reacción catalizada por GlcN6P desaminasa.

Tomado de Montero-Moran 2001.

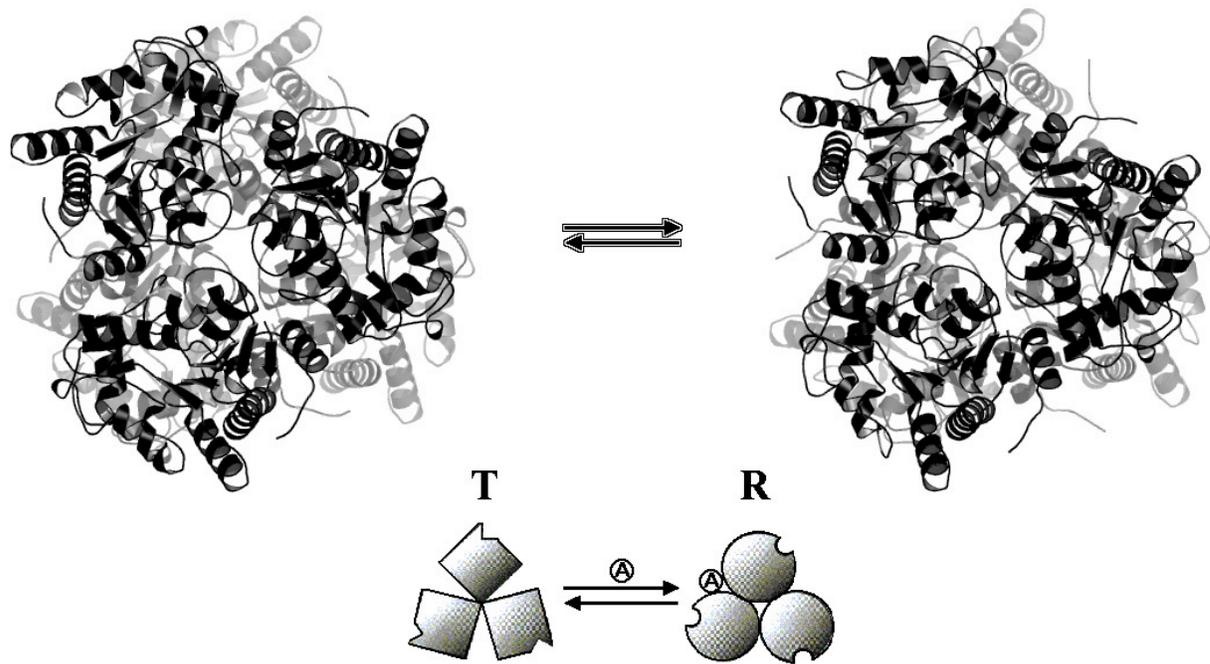


Figura 3. Esquema de la transición alostérica provocada por la unión de una molécula de activador. En la parte superior se presenta el cambio en el hexámero de *E. coli*, vista en el eje de orden tres. Imagen cortesía de Martín González Andrade, Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Facultad de Medicina UNAM.

La estructura de esta enzima en sus dos estados (Fig. 3) se ha obtenido a partir de datos cristalográficos de difracción de rayos X. En 1995 Oliva *et al.* publicaron la estructura de la forma R en presencia del activador a una resolución de 2.1 Å, y más recientemente Horjales *et al.* (1999) obtuvieron el modelo de la forma T a 2.2 Å de resolución.

De esta forma se han podido estudiar a mayor detalle los sitios activo y alostérico de la GlcN6P desaminasa. El sitio activo se encuentra formado por la hélice 5 (residuos 175-183) y el asa 3 (40-46), asa 10 (137-158) y el asa 6 (72-84), mientras que el sitio alostérico se encuentra en los espacios entre las subunidades que forman los trímeros (Fig. 1C), lo que hace que los sitios de unión del activador se encuentren formados por dos subunidades vecinas que contienen cargas positivas que se distribuyen a lo largo de ambas subunidades, lo cual se ha demostrado es fundamental para que se produzcan los cambios estructurales de rotación de las subunidades de la enzima cuando se une el activador.

La conformación alostérica de mayor actividad de la enzima corresponde al estado R, donde al parecer el grupo fosfato juega un papel importante, al igual que los distintos moduladores positivos dentro de los cuales se encuentra incluido el propio sustrato (Montero-Morán *et al.*, 2001). En el estado T los grupos fosfato aparecen separados y el grupo amino del N-terminal se enlaza al grupo del carboxilo de Alanina 150 de la cadena del polipéptido (Lara-González *et al* 2000). En el estado R el grupo fosfato del activador alostérico neutraliza la carga y la cadena lateral de Glutamato148 se mueve hacia el sitio alostérico, ocasionando que la tríada Asp141-His143- Glu148, presente en el estado de R, se convierta en la díada Asp141- His143 mientras que el fosfato de la molécula del activador alostérico se liga, mediante puentes salinos, con Arg 158 y Lys 160, y por puentes de hidrógeno a la Ser 151 de la subunidad de enfrente, al mismo tiempo que forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo de la cadena principal del residuo 152. (Montero-Morán *et al*, 2001).

METABOLISMO DE AMINOAZÚCARES

Los aminoazúcares son monosacáridos en donde uno o más de sus grupos hidroxilo se encuentran sustituidos por aminas primarias o secundarias al estar sustituidas con un acetilo. Los aminoazúcares están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden estar presentes como biopolímeros simples o complejos.

La glucosamina (GlcN) y la *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), al igual que otros aminoazúcares, son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Esto se debe a que son precursores de componentes celulares y extracelulares cuyas funciones son de gran importancia para el desarrollo de diversos organismos, ya que son precursores de macromoléculas como los lipopolisacáridos bacterianos, las glucoproteínas y glucolípidos presentes en plantas y animales y cuyas actividades biológicas son diversas, aunque algunas no bien entendidas actualmente (Plumbridge y Vimr, 1999 y Plumbridge *et al*, 1993). 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. Los aminoazúcares también son componentes de las paredes celulares y de las membranas externas de bacterias. En *Giardia intestinalis* la formación de GlcN6P es requerida para la síntesis de GalNAc, que es necesaria para la formación del quiste. En eucariontes

superiores, como insectos y crustáceos, son constituyentes de la quitina presente en el exoesqueleto, mientras que en mamíferos se encuentran formando gran parte de las superficies celulares como receptores de reconocimiento celular.

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 NH_4^+ proveniente de los aminoazúcares.

METABOLISMO DE LA GLUCOSAMINA

La mayoría de los aminoazúcares contenidos en mucopéptidos y otros polímeros de *Bacillus subtilis* que se utilizan como material celular y energético son derivados de glucosa y glucosamina presentes en el medio.

Tanto la glucosa como la glucosamina, así como algunos otros aminoazúcares exógenos presentes en el medio, son incorporados a la célula. Una vez en el interior, al igual que en otras vías metabólicas de carbohidratos, éstos se fosforilan para que de esta manera pueda darse la síntesis de glucosamina 6-fosfato, la cual se realiza con ayuda de la enzima glucosamina 6-fosfato sintetasa y posteriormente pueden dirigirse a dos vías diferentes (Fig. 4).

En la primera vía, la glucosamina-6-fosfato se degrada hasta fructosa 6-fosfato y amonio por la acción de la enzima de nuestro interés, la glucosamina-6-fosfato desaminasa, mientras que en la otra vía alterna se da la conversión de glucosamina-6-fosfato a glucosamina-1-fosfato, seguida de un paso sucesivo de acetilación que culmina en la biosíntesis de mucopolisacáridos y mucopéptidos (Bates y Pasternak, 1964).

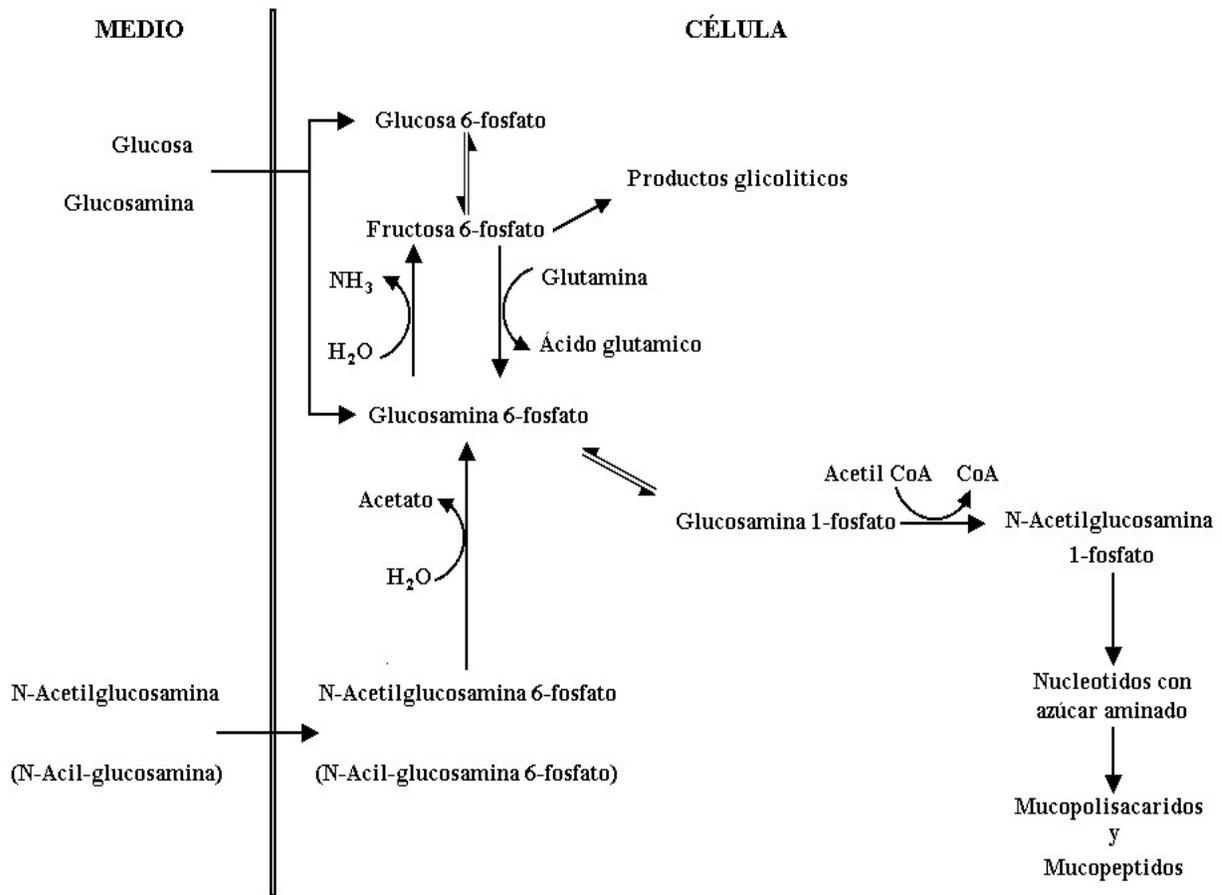


Figura 4. Esquema del metabolismo de aminoazúcares en *B. subtilis*. Tomado de Bates y Pasternak (1965).

TAXONOMÍA DE *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, que a su vez pertenece al orden de las bacterias con bajo contenido de G+C, comprendido en la clase de los Firmicutes (Gram positivas) del Dominio bacteria. Está compuesto de una gran cantidad de microorganismos dado que los únicos requisitos taxonómicos para pertenecer a éste son: ser un bacilo largo, formar endosporas (que pueden ser termorresistentes o no), ser Gram positiva y ser catalasa positivo (Berkeley *et al.*, 1984).

Bacillus subtilis es el miembro más caracterizado de este grupo, tanto a nivel bioquímico como fisiológico y genético. Se le puede encontrar comúnmente en el suelo, el agua y en asociaciones con algunas plantas (Kunts *et al.*, 1997).

Su genoma de 4,214,810 pb, comprende más de 4,000 secuencias codificadoras de proteínas, con tamaño promedio de 890 pb, cubriendo el 87% del genoma (Kunts *et al.*, 1997).

Los genes que codifican las proteínas de *B. subtilis* constituyen tres distintos grupos que difieren en el codón a usar. De esta forma se encuentran la clase 1, que comprende la mayoría de los genes de *B. subtilis* (82%), mientras que la clase 2 incluye aquellos genes de elevada expresión bajo condiciones de crecimiento exponencial (5%) que codifican para proteínas intermediarias del metabolismo y de aquellas que se generan en condiciones de estrés. Por último la clase 3, con el 13%, comprende una proporción muy alta de genes de función desconocida. De esta manera, gracias a la caracterización de las secuencias de su genoma completo podemos obtener una herramienta de entendimiento dentro de la comparación con otros organismos (Kunts *et al.*, 1997).

La alineación de la secuencia primaria de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* con la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y otras especies (Fig 5) muestra diferencias a nivel de contactos intermonoméricos, lo que indica que probablemente el sistema no sea hexamérico y en consecuencia, no presente propiedades alostéricas. Por lo que resulta interesante estudiar un sistema más sencillo que nos permita entender los mecanismos cinéticos entre una posible enzima no alostérica y uno alostérico.

En lo que respecta a su conformación, ni el número de unidades ni los ejes de simetría que conforman la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* se encuentran claramente definidos sin embargo, de acuerdo a los datos estructurales y funcionales de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, parece que está presente un número aun menor de subunidades, en comparación con el hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, por lo que puede pensarse que este modelo resulta ser mucho más sencillo.

OBJETIVOS:

General:

Realizar la clonación, purificación y caracterización bioquímica de la enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Bacillus subtilis*.

Particulares:

Realizar la clonación del gen *nagB* que codifica para la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Bacillus subtilis*, a partir de un plásmido de clonación que contiene el gen *nagB* amplificado del ADN genómico de *Bacillus subtilis*.

Realizar la purificación de la enzima por medio de un sistema cromatográfico.

Determinar la actividad en velocidades iniciales de la enzima en la dirección de la formación de Fru6P más NH_4^+ .

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

La mayoría de los reactivos experimentales utilizados en los procedimientos para la clonación y purificación fueron comprados a la empresa Sigma-Aldrich S.A. de C.V. México.

Cepas bacterianas y plásmidos

La cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) de donde se extrajo el ADN genómico fue donada por el Cepario del Departamento de microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Además de ésta, se usaron las cepas de *Escherichia coli* JM101 y IBPC 590 (Δ nagB::kan, recA1, Δ lacI). para la clonación y expresión, respectivamente. Esta última es una cepa *E. coli* Δ nagB lacI, por lo que no expresa la glucosamina-6-fosfato desaminasa silvestre pero expresa de manera constitutiva la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* al estar bajo el control del promotor lac.

El plásmido pGEM-T Easy de la compañía Promega es un vector que contiene los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 flanqueando la región múltiple de clonación que contiene la región que codifica al α -péptido de la enzima β -galactosidasa, así mismo posee un origen de replicación del fago fl y extremos con timinas. Por su parte el plásmido pTZ18U es un derivado de pUC18 que al igual que el anterior posee un promotor de ARN polimerasa T7, un origen de replicación fl y un gen de resistencia a ampicilina.

Clonación y construcción del vector de expresión

El ADN genómico de *B. Subtilis* se asiló utilizando una modificación al protocolo de extracción de ADN de Ausubel *et al.* (1999) en base a Bustos (1998) (Anexo 1).

Este ADN fue el punto de partida para la amplificación del fragmento que contiene el gen nagB de *B. subtilis*. El ADN genómico fue amplificado por la técnica de PCR con los oligonucleótidos complementarios para las regiones de inicio y término de la secuencia de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* 5' **gga tcc** aag gag gct gac cag 3' BamHI (Tm 65.5 °C) y 5' **aag ctt** tca agg tct taa tga cgc 3' Hind III (Tm 62.1 °C) en presencia de Taq polimerasa, la cual genera extremos con el nucleótido de adenina. El PCR fue corrido en una mezcla de reacción de 50 μ l consistente de:

5µl de Buffer 10X, 1µl de dNTP's stock (100 µM), 7µl del oligonucleótido BamH I (1µM), 5µl del oligonucleótido Hind III (1µM), 3µl de ADN genómico (100ng/µl), 5µl de MgCl₂ (50mM), 23.5µl de agua y 0.5µl de Taq polimerasa (5 U/µl). La amplificación involucró un paso de desnaturalización inicial de 95 °C / 3 min., seguido por 30 ciclos de 95 °C / 1 min. 45-60 °C / 1 min. y 72 °C / 2 min. y una extensión final de 72 °C / 10 min.

El criterio por el cual se seleccionaron a estos dos sitios únicos de restricción para estas enzimas y que fueron adicionados a los oligonucleótidos complementarios es por que generan un patrón de restricción manejable tanto para la utilización del plásmido como de la propia secuencia del gen (Fig. 7 y Anexo 2).

Posteriormente los productos de esta reacción a su vez se ligaron al vector de clonación que contiene extremos libres con Timinas pGEM-T Easy de la compañía Promega, con ligasa T4 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fig. 6).

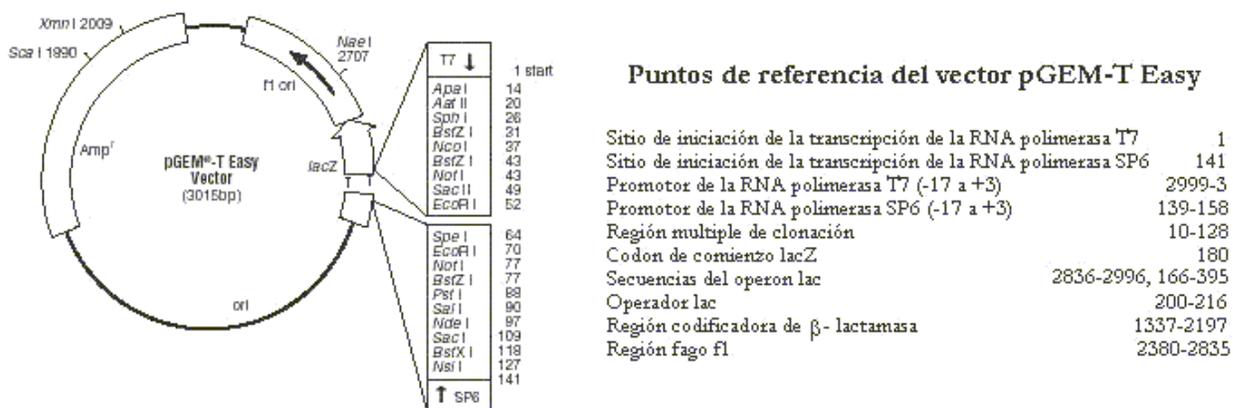


Figura 6. Esquema del vector pGEM-T easy. Tomado del manual de uso del fabricante.

El producto de la ligación se utilizó para transformar una cepa de *E. coli* JM101 por electroporación, utilizando el electroporador Gene Pulser II (BIORAD). Estas células se sometieron a un sólo pulso de 4 mseg a 18 kv con una capacidad de 25 mF y una resistencia de 200 ohms en celdas de 2 mm de separación entre electrodos.

Para la recuperación del gen *nagB* se incubó durante una hora a 37 °C en medio LB (Luria Bertrani) líquido en un agitador orbital a 250 rpm para posteriormente pasar 300 µl de la muestra a placas de agar con medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml).

Para la selección de las colonias se usó como criterio la resistencia a ampicilina dado que el vector utilizado contiene un gen de resistencia a este antibiótico que le confiere esta capacidad a las colonias que han adquirido el plásmido.

A partir de esta caja se aislaron colonias de las cuales se purificó el plásmido con el gen *nagB* utilizando el sistema de minipreparaciones (miniprep de la marca QUIAGEN). El método consistió en romper las células con dodecil sulfato de sodio (SDS) y NaOH, posteriormente se neutralizó la solución con acetato de sodio-potasio. El ADN se pasó a través de columnas de intercambio iónico para lavar y eluir el ADN utilizando una microcentrífuga.

Este ADN se le digirió con las enzimas de restricción *BamH I* y *Hind III* de acuerdo al protocolo siguiente:

ADN	10 µl	Incubar durante hora y media a 37 °C	Aplicar choque de calor a 65 °C durante 5 min. y enfriar en hielo por 3 min.	NaCl	1.5 µl	Incubar durante hora y media a 37 °C
Buffer 2 10x	1.5 µl			BSA 100x	0.2 µl	
Agua	3.0 µl			<i>BamH I</i>	0.5 µl	
<i>Hind III</i>	0.5 µl					

Para corroborar la presencia del plásmido y el inserto del fragmento de ADN del gen de la desaminasa, el producto de la digestión se sometió a una electroforesis a 100 volts en gel de agarosa al 1%, y se visualizaron las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio con ayuda de irradiación de luz UV y una vez contrastados con los marcadores de peso molecular los productos de la digestión, tanto el gen como el plásmido fueron purificados del gel de agarosa con el kit Gene-Clean. Dicho procedimiento consistió en fundir el gel en presencia de KI, se agregó una resina a la cual por interacción de carga se le une el ADN, este material con el ADN se lavó y se le agregó una solución con sales con el fin de desprender el material genético.

El fragmento resultante de la digestión con *BamH* I y *Hind* III correspondiente al gen *nagB* fue subclonado con los sitios correspondiente en el vector pTZ18U (Fig. 7) y fue transfectado por electroporación, usando iguales condiciones a las antes señaladas, a células competentes de *E. coli* IBPC 590 Δ *nagB*.

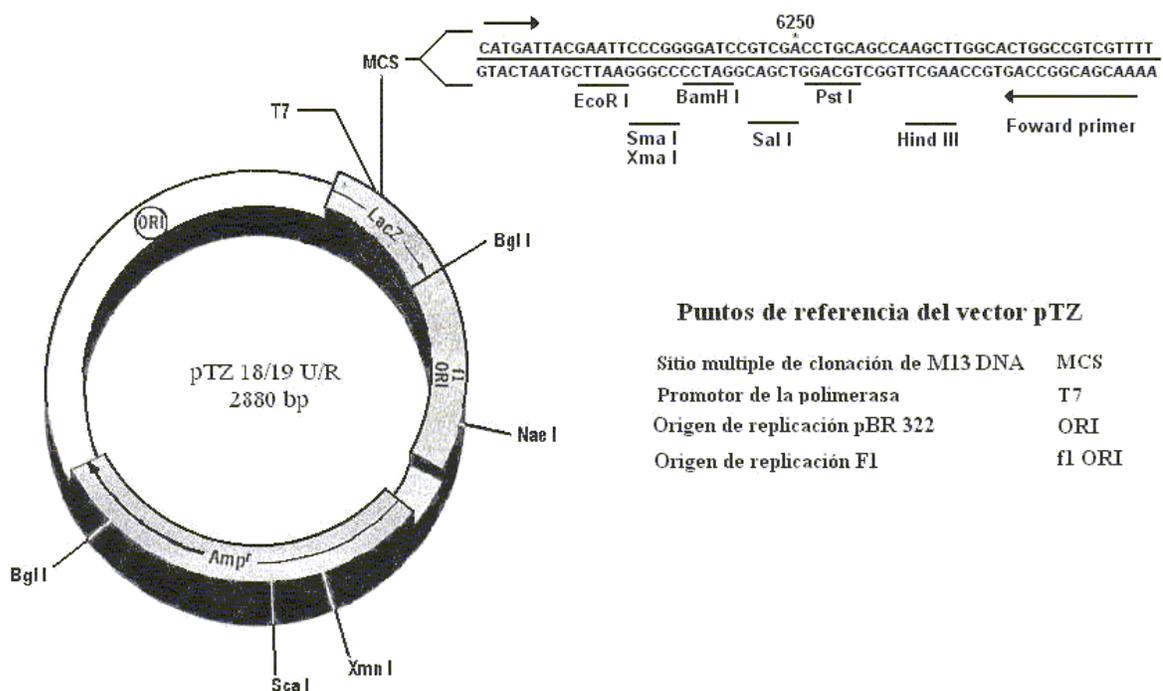


Figura 7. Esquema del vector pTZ18U. Tomado de Lara 1999.

Producción de extracto crudo

Se tomó una muestra de células IBPC 590 transformadas con el plásmido pTZ18U y se sembraron en medio sólido LB con ampicilina (100 μ g/ml). Del medio anterior se tomaron diferentes colonias y se crecieron en tubos de 10 ml de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm durante 12 horas. Por consiguiente se utilizó el cultivo que mostró una mayor expresión para la realización de preinóculos en cuatro matraces Erlen Meyer de 250 ml del mismo medio a 37 °C con agitación orbital de 250 rpm durante 5 hrs, los cuales se adicionaron a matraces con un litro de medio LB con la misma concentración de ampicilina y se incubó durante 12 horas.

Estas células se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C (en una centrífuga Beckman Avanti J-25I rotor Beckman JLA 10.500) y se lavaron con 250 ml de KCl 0.15M en frío

y nuevamente se centrifugaron bajo las mismas condiciones. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el precipitado de biomasa celular resultante se lavó y resuspendió en un amortiguador Tris 50 mM, pH 8.5, EDTA 10 mM a 4°C. Para liberar el contenido de las células se rompieron por sonicación a 4 °C, utilizando un sonicador (Ultrasonic Homogenizer) con pulsos de 20 segundos con una amplitud de 40 % a intervalos de descanso de 2.5 minutos (para evitar calentamiento que podría implicar desnaturalización de proteínas). La muestra se centrifugó a 15,000 rpm a 4°C durante 60 minutos para eliminar restos celulares en una centrífuga Beckman Avanti J-25I rotor Beckman JA 25.50.

Metodología inicial de purificación

Se fraccionó la muestra usando efectos de solubilidad de las proteínas por medio de precipitación con sulfato de amonio de la siguiente forma: al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) hasta obtener una solución saturada del 35 % y nuevamente se centrifugó a 5,000 rpm a 4°C durante 30 minutos, posteriormente se saturó el sobrenadante al 55% y por último se realizó una saturación de 55 a 70%. A todas estas muestras se les realizó una prueba preeliminar que detecta la formación de D-fructosa-6-fosfato por medio de una deshidratación con resorcinol (Midelfort, 1976), originándose una coloración rosada-rojiza, para ubicar aquel porcentaje en donde precipitó la GlcN6P desaminasa y al mismo tiempo se corrieron las muestras en gel de SDS-poliacrilamida 12% usando el buffer Laemli para ubicarla por peso molecular.

Una vez obtenida la fracción con actividad de GlcN6P desaminasa obtenida a partir del precipitado con sulfato de amonio, la muestra se resuspendió en 4ml de buffer Tris 100 mM pH 8.2 y se filtró para eliminar contaminantes con filtros de 0.45 µm y posteriormente se corrió la muestra por una columna cromatográfica de exclusión molecular Superdex S-200 de 16 x 600 mm a un rango de flujo de 0.20 ml por minuto con buffer Tris 100mM pH 7.5 en presencia de β-mercaptoetanol (1%) y posteriormente las fracciones con actividad de la enzima se reunieron y se concentró por centrifugación con amicones. El paso siguiente consistió en colocar la muestra en una columna de intercambio iónico Mono Q HR 16/ 10 donde fue eluida con un gradiente lineal de NaCl (0-600mM) en Tris 100 mM pH 8.5 a un rango de flujo de 1 ml por minuto.

Ensayos enzimáticos

Se realizó la determinación de velocidades iniciales de la enzima en la dirección de la formación de Fru6P en una mezcla de reacción de 200 μ l que contiene amortiguador Tris HCl pH 8.2 100 mM, EDTA 25 mM, con concentraciones variables de activador y de sustrato. La reacción se inició por la adición de la enzima y la mezcla se incubó a 30 °C para posteriormente ser interrumpida a los 20 minutos mediante la adición de 2 mL de HCl 10 M. La concentración de fructosa formada durante la reacción fue estimada a tiempos fijos por el método de resorcinol adicionando 0.5mL de resorcinol e incubando por 10 minutos a 70 °C y leyendo a través de espectrofotométricamente a 512nm. Las lecturas se interpolaron en una curva patrón de Fru6P (Anexo 4).

Estos datos fueron analizados por regresión no lineal utilizando el programOrigin 6.0 (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten.

Secuenciación y alineamiento

Para verificar que se estaba trabajando con el gen correcto, éste se secuenció, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular con un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer, confirmando así la identidad del gen (Anexo 3).

La secuencia de nucleótidos obtenida en este estudio se analizó usando el programa de manipulación de secuencias DNA Strider 1.2 y se tradujo a secuencia de aminoácidos con este mismo programa. Se realizó el alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la desaminasa de *E. coli* y la *B. subtilis* mediante el programa Clustal X 1.8.

Predicción del modelo estructural por homología

A partir de esta misma secuencia se generó un modelo tridimensional de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* en base a la secuencia de aminoácidos por medio de homología comparativa a través de la librería ExpDB usando el servicio automatizado que presta Swiss-Model (a través de su página <http://swismodel.expasy.org>). Este modelo en particular está basado en los archivos 1fs6.pdb y 1hot.pdb que corresponden al conformero T de *E. coli* a 22 Å y al complejo con N-acetil glucosamina a 24 Å de resolución, respectivamente.

Análisis de identidad

Se construyó un dendrograma con el programa Treeview 1.6.6 basado en las secuencias de aminoácidos de las desaminasas de organismos modelos en base a las secuencias depositadas en la base de datos del GeneBank, mientras que la matriz de distancias se realizó con ayuda del programa MegAlign (Lasergene System, DNASTar, Madison, WI).

Diagrama de trabajo



RESULTADOS

Clonación

La región que codifica de la GlcN6P desaminasa fue obtenida a partir del ADN genómico de *B. subtilis* a través de la técnica de PCR usando los cebadores previamente diseñados.

El producto obtenido de la amplificación del gen *nagB* mediante la técnica de PCR se sometió a una electroforesis, obteniendo de esta forma una banda única de peso molecular de aproximadamente 700 pb, y dado que su peso calculado a partir de la secuencia es de 729 pb, asumimos que el producto obtenido corresponde al gen *nagB*.

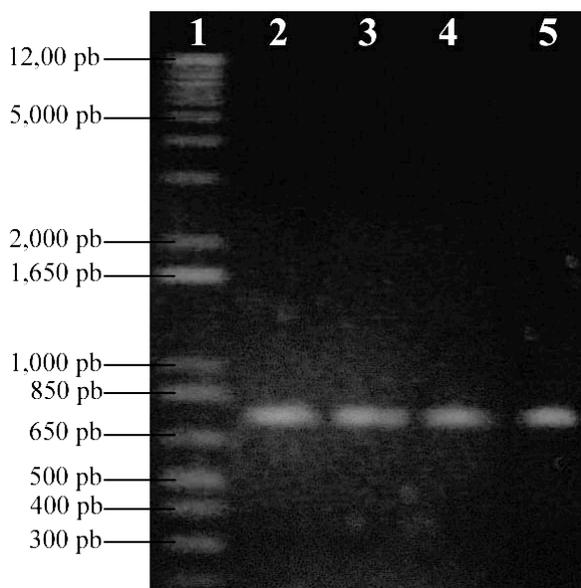


Figura 8. Amplificación por PCR del gen *nagB*. El carril uno corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, mientras que los carriles restantes son el producto obtenido por PCR de la amplificación del gen *nagB*.

El producto de PCR que presenta extremos con el nucleótido de adenina fue ligado al vector de clonación pGEM-T Easy, el cual se encuentra abierto y presenta en sus extremos sitios con timinas (sitio poli T), por lo tanto bajo condiciones de ligación con ligasa T4, el fragmento se une al vector de clonación (Fig. 11).

La razón de usar esta estrategia es buscar una mayor eficiencia de los cortes con las enzimas de restricción *BamH I*- *Hind III* al subclonar en el vector de expresión pTZ18U, esto debido a que la digestión con enzimas de restricción de fragmentos lineales con sitios de corte en los extremos generalmente es menos eficiente que en ADN circular.

El producto de ligación fue utilizada para transformar células electrocompetentes de *E. coli* JM101, ya que nos permite obtener una mayor cantidad del plásmido pGEM-*nagB*.

A las células recombinantes obtenidas de la clonación se les extrajo el plásmido designado con el nombre de pGEM-*nagB* y se purificó de acuerdo a lo descrito previamente en materiales y métodos.

Considerando que la clonación se realizó en una región flanqueada por los sitios para las enzimas de restricción *BamH* I y *Hind* III y no se sabe en que dirección se insertó en el vector pGEM-T Easy, se realizó la digestión correspondiente, obteniendo un fragmento de aproximadamente 740 pb, que se purificó y utilizó para realizar la subclonación en el vector de expresión pTZ18U (Fig. 11).

Subclonación

Se realizó la construcción de un sistema de expresión a través de la inserción del fragmento del gen *nagB* de *B. subtilis* obtenido a partir de la digestión del vector de clonación, en pTZ18U bajo el control del promotor *lac*. Para este proceso el vector fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción con las que se digirió el gen *nagB*. Esto permite que el producto ligado se encuentre direccionado con respecto al promotor *lac* del vector de manera adecuada (Fig. 9, 11 y 12).

Este plásmido resultante designado como pTZ-*nagB* (Fig. 9) fue transformado en la cepa *E. coli* IBPC 590 carente del gen *nagB* de *E. coli* para ser expresado de manera constitutiva y fue crecida durante toda la noche a 37 °C en 10 ml de medio LB.

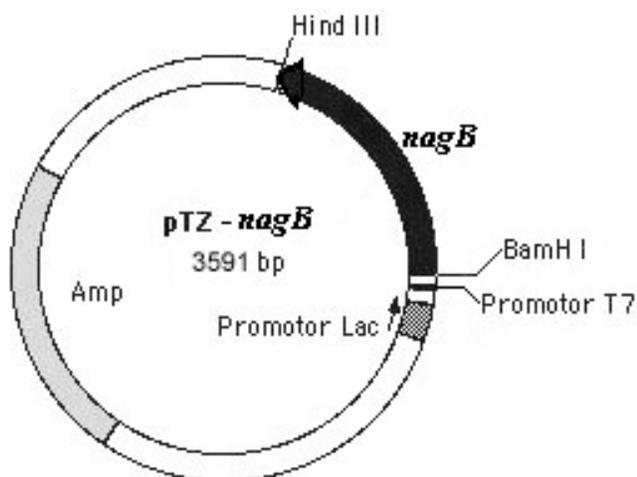


Figura 9. Mapa gráfico del plásmido pTZ-*nagB*.

A continuación se seleccionaron diez colonias a las cuales se les extrajo y purificó el plásmido pTZ-nagB. Para verificar la presencia del inserto se purificó el plásmido con la copia del gen *nagB* que codifica para la GlcN6P desaminasa a partir de dicho cultivo y se digirió con *Hind* III y *Bam*H I, corroborando de esta manera los tamaños correctos del plásmido (2.85 Kb) y el inserto del gen de la *glcN6P* desaminasa (~740 pb) en electroforesis de agarosa al 1% (Fig. 10). Se visualizaron las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio con ayuda de luz UV y se contrastaron con los marcadores de peso molecular λ digerido con *Hind* III, la escalera de 100 pb desde 1500 pb a 100 y el marcador de peso molecular ϕ X174 digerido con *Hae*III.

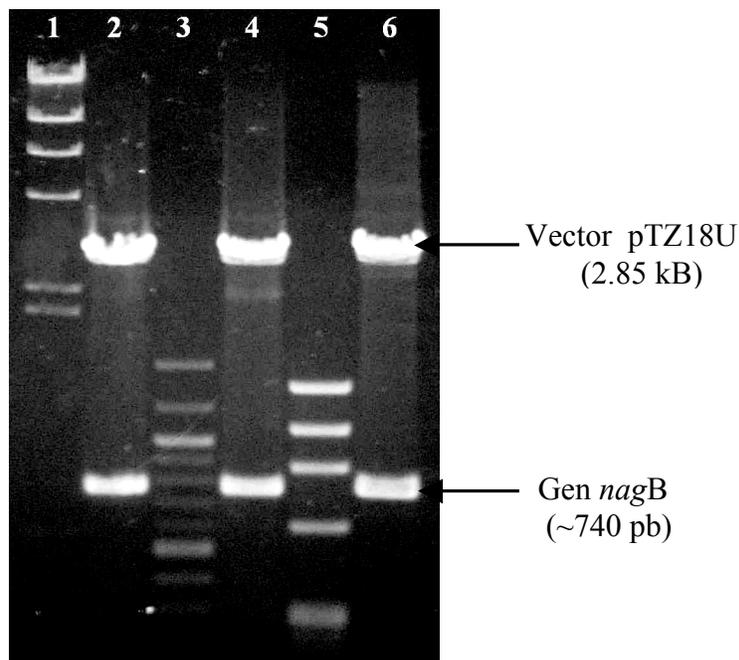


Figura 10. Estimación del tamaño del gen *nagB* y el vector pTZ18U. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a las muestras digeridas con *Bam*H I y *Hind* III que muestran al vector pTZ18U (2.85 Kb) y al gen *nagB* (741 pb). Carril 1 corresponde a el marcador de peso molecular λ *Hind* III (23130 pb, 9416 pb, 6557 pb, 4361 pb, 2322 pb, 2027 pb, 564 pb y 125 pb) el carril 3 corresponde a la escalera de 100 pb (1500 pb, 1000 pb, 900, 800, 700, 600 a 100 pb). El carril 5 es el marcador de peso molecular ϕ X174 DNA/*Hae*III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234, 194, 118 y 72).

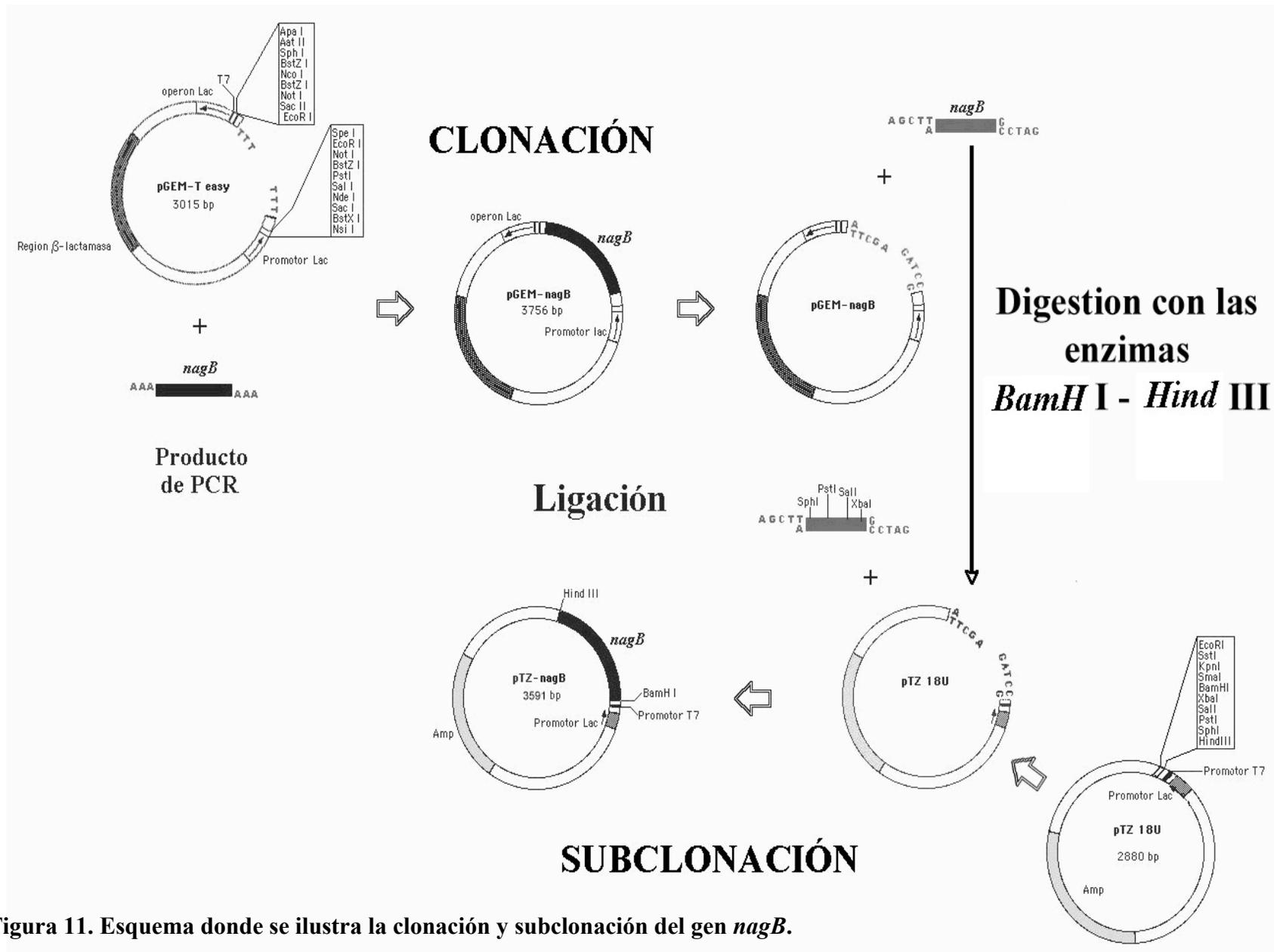


Figura 11. Esquema donde se ilustra la clonación y subclonación del gen *nagB*.

Para corroborar que el gen aislado fuera el indicado se secuenció el plásmido obtenido (Anexo 3) por medio del sistema automatizado ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer, división Applied Biosystems en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El análisis de esta secuencia revela la presencia de la construcción pTZ-*nagB* (Fig. 9) en la cual se observan los sitios correspondientes al promotor T7 corriente arriba del codón de inicio, así como es identificada la secuencia correspondiente al promotor *lac* en la región casi inmediata a éste. Mientras que el producto ligado se encuentre direccionado con respecto al promotor *lac* del vector pTZ18U (Fig. 12). De igual manera se corroboró la presencia de una secuencia Shine-Dalgarno antes del codón de inicio y del sitio de corte BamHI incluido en el cebador, que en principio debe permitir la expresión de la desaminasa de *Bacillus subtilis*.

Expresión y sobreexpresión

Se verificó la expresión de la proteína seleccionando diferentes colonias de la cepa recombinante IBPC 590 por medio de un gel acrilamida-SDS al 12%. Como vemos en la figura 13 los carriles 2-6 que correspondientes a colonias con el plásmido muestran una banda cercana a los 27 kDa que contrasta con los carriles 8 y 9, que son muestras de la cepa IBPC 590 carente de el gen *nagB*, las cuales si bien presentan bandas a esta altura, muestran una intensidad en las bandas menor a aquellas colonias con el gen *nagB*, por lo que asumimos que esta banda pertenece a la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *B. subtilis* y que por lo tanto está expresándose en la cepa.

Se verificó la sobreexpresión de la enzima GlcN6P desaminasa por medio de un gel de acrilamida 12% (p/v) en presencia de SDS, seleccionando de esta forma a aquellas colonias con el mayor grado densitométrico dado por el ancho e intensidades de banda, originados por el colorante de Coomassie en cada uno de los carriles (Fig. 13), extrapolando estos datos con el grado de expresión para realizar los cultivos (un total de cuatro litros) a partir de los cuales se inició la purificación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
1	g	c	c	g	a	a	g	a	g	a	g	100
	Promotor Lac →					Operon Lac →						
101	a	g	c	g	c	a	a	c	a	a	c	200
	Promotor T7 →					BamHI Shine-Dalgarno						
201	a	c	a	a	t	t	t	c	a	c	a	300
	Codon de inicio →											
301	c	a	g	a	t	a	t	g	a	a	a	400
401	c	g	t	t	t	a	g	c	a	a	a	500
501	t	t	g	a	t	g	a	g	a	a	a	600
601	a	t	t	t	a	t	t	c	c	a	a	700
701	c	a	t	c	g	g	c	c	a	a	a	800
801	g	c	a	g	a	t	t	c	a	a	a	900
901	g	a	a	a	a	a	g	c	a	a	a	1000
	⊙ Hind III											
1001	g	a	t	t	a	a	a	a	a	a	a	1100
	Codon de paro											
1101	c	g	c	c	t	t	g	c	a	a	a	1200

Figura 12. Análisis de la secuencia de la Construcción pTZ-nagB.

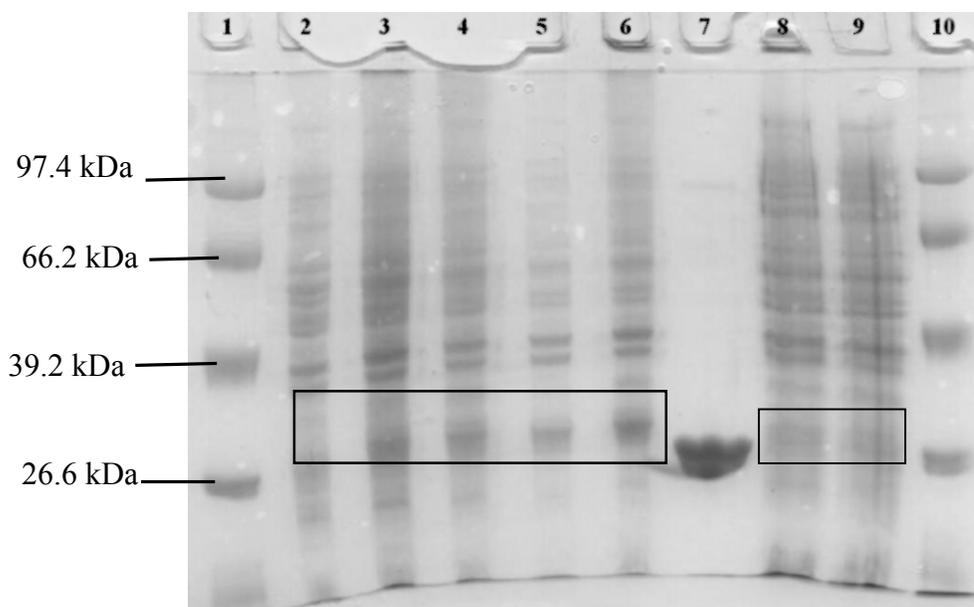


Figura 13. Visualización de la sobreexpresión en gel de acrilamida. Los carriles 1 y 10 corresponden al marcador de peso molecular, los carriles 2-6 corresponden a las cinco colonias con el gen *nagB* de *Bacillus subtilis*, donde se observan las distintas expresiones de la enzima. El carril 7 es una muestra de la enzima TIM (Triosafosfato isomerasa de levadura) de ~27 KDa. Por último los carriles 8 y 9 son IBPC sin transformar.

Purificación parcial

La purificación de la enzima se inició con el fraccionamiento del sobrenadante de la mezcla en crudo, de lo cual se pudo observar que esta enzima precipita en un rango amplio que va de 30-60% de sulfato de amonio. Subsecuente al fraccionamiento la muestra se pasó por la columna cromatográfica de exclusión molecular Superdex S-200 de 16 x 600mm. En este paso la enzima (detectada por actividad) empieza a salir a entre los 60 a 80 ml a un flujo de 0.2 ml/ min, lo que constata su bajo peso molecular. A continuación la muestra con actividad de GlcN6P desaminasa se concentró para ser añadida a la columna de intercambio iónico Mono Q 16/10 inicialmente a pH 7.5 (ya que el punto isoelectrico estimado con el programa Editseq Lasergene System, DNASTar de acuerdo a la secuencia de aminoácidos fue de 5.9), sin embargo la enzima no se unió a la columna por lo que se cambió a pH 8.5.

Durante la purificación la banda correspondiente a la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*, contrario a lo esperado, decrementa su intensidad en cada uno de los pasos (precipitación con

sulfato de amonio y exclusión molecular, superdex 200) (figura 14), por lo que es clara la pérdida de enzima durante el proceso de purificación, lo que implica que la estrategia seguida hasta el momento no es la más adecuada.

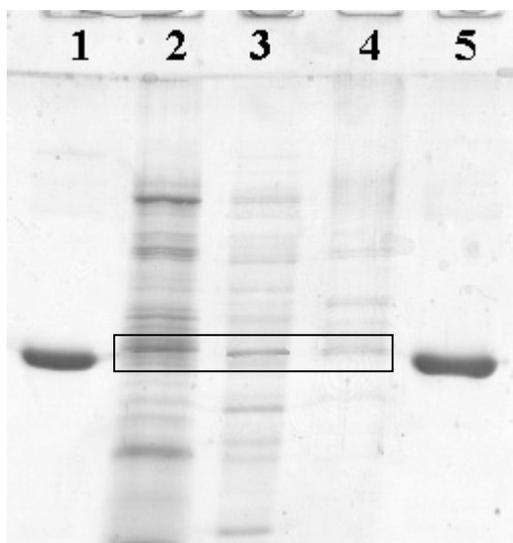
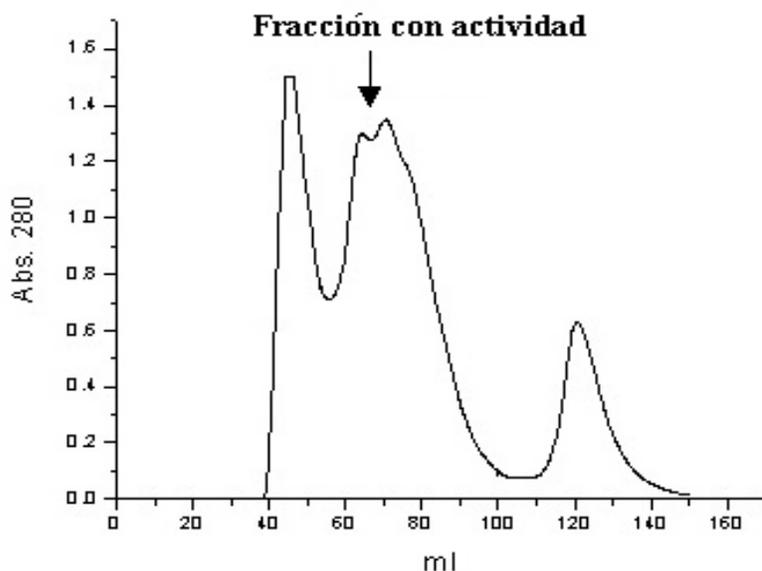


Figura 14. Análisis de las fracciones en los distintos pasos conforme al progreso de la purificación. Carril 1 y 5, TIM (27 ~kDa); carril 2, proteínas de extracto crudo; carril 3, precipitado obtenido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y carril 4, elusión de la columna de exclusión molecular Superdex 200.

Figura 15. Cromatograma de purificación de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* en la columna superdex 200.



los cromatogramas del corrimiento del extracto tanto de la columna superdex 200 como de la columna de intercambio iónico monoQ, no muestran un pico definido en la región de actividad (Fig. 15) y se distribuye en varios tubos por lo que se arrastran otras proteínas junto con la desaminasa y al mismo tiempo se diluye la muestra, como se ve en el gel de la Figura 14.

De acuerdo a los datos electroforéticos obtenidos de su migración en geles de poliacrilamida al 12% p/v en condiciones desnaturizantes, el monomero de la GlcN6P desaminasa de *Bacillus subtilis* tiene una masa molecular relativa cercana a los 27 kDa, tal como se observa en la Figura 16.

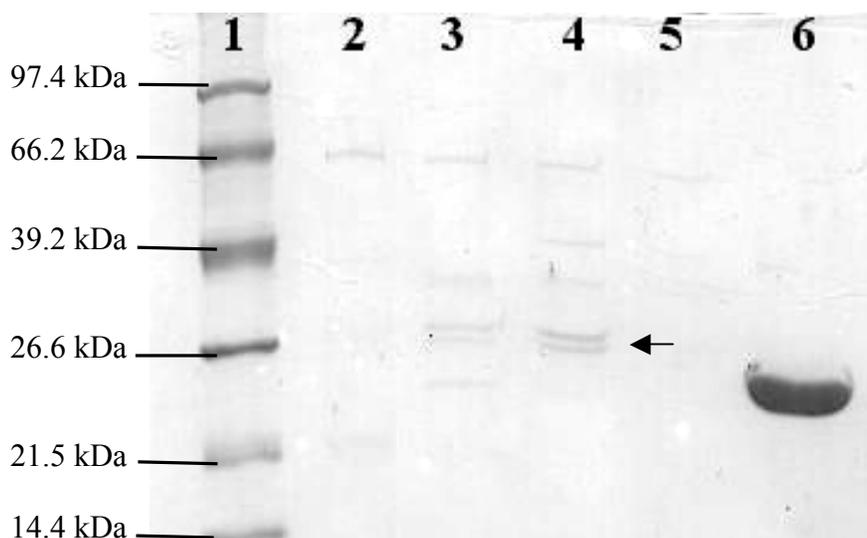


Figura 16. Estimación de la pureza y tamaño de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* mediante electroforésis desnaturizante. Carril 1 muestra el marcador de peso molecular, mientras que los carriles 2-5 pertenecen a los tubos correspondientes al pico de la desaminasa en el cromatograma de intercambio iónico (monoQ 16/10), por último el carril 6 corresponde a la proteína de referencia TIM.

Tabla I. Perfil de purificación de la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *B. subtilis*.

	PROTEÍNA			ENZIMA			Rendimiento (%)	Factor de purificación
	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Proteína total (mg)	Concentración (UI/ml)	Actividad específica (UI/mg)	Total de enzima (UI)		
Extracto crudo	67	59.86	4010.62	1.15	17.16^{-3}	68.82	100	1
Precipitado (NH ₄) ₂ SO ₄	4	46.32	185.28	0.677	169.25^{-3}	31.35	45.55	9.86
Exclusión molecular	15	10.25	153.75	0.663	44.2^{-3}	6.79	9.86	2.58
Intercambio iónico	4	1.57	6.28	0.889	566.24^{-3}	3.55	5.158	32.99

Como vemos en la Tabla I, la actividad específica de la desaminasa en el extracto crudo es de 0.017 unidades/mg de proteína, mientras que después de la purificación parcial, la preparación

de la enzima muestra una actividad específica de 0.5 unidades/mg de proteína, por lo que tenemos un rendimiento de purificación de 5.158%, esta cantidad resulta ser muy baja para dar una resolución en el gel de SDS-poliacrilamida (Fig. 16).

Estudio cinético preliminar

El primer paso en el estudio de la actividad de la enzima aun impura consistió en determinar la forma en que varían los valores de velocidad inicial sobre un rango de valores de pH del medio en el cual se encuentra la enzima. Dichos resultados demuestran que la enzima es activa a pH entre 6.5 a 8.8, obteniendo una mayor reacción colorimétrica con el resorcinol a pH de 8.2.

Con respecto al ensayo cinético se realizaron curvas a diferentes concentraciones de sustrato cuyos resultados preliminares han demostrado que la GlcN6P desaminasa de *Bacillus subtilis* presenta cinética hiperbólica. La adición de diferentes concentraciones de GlcNAc6P que sirve como activador alosterico en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, no produce un incremento en la actividad de la enzima. (Fig.17). Estos datos muestra que la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* no responde alostericamente a GlcNAc6P como el de *E. coli*.

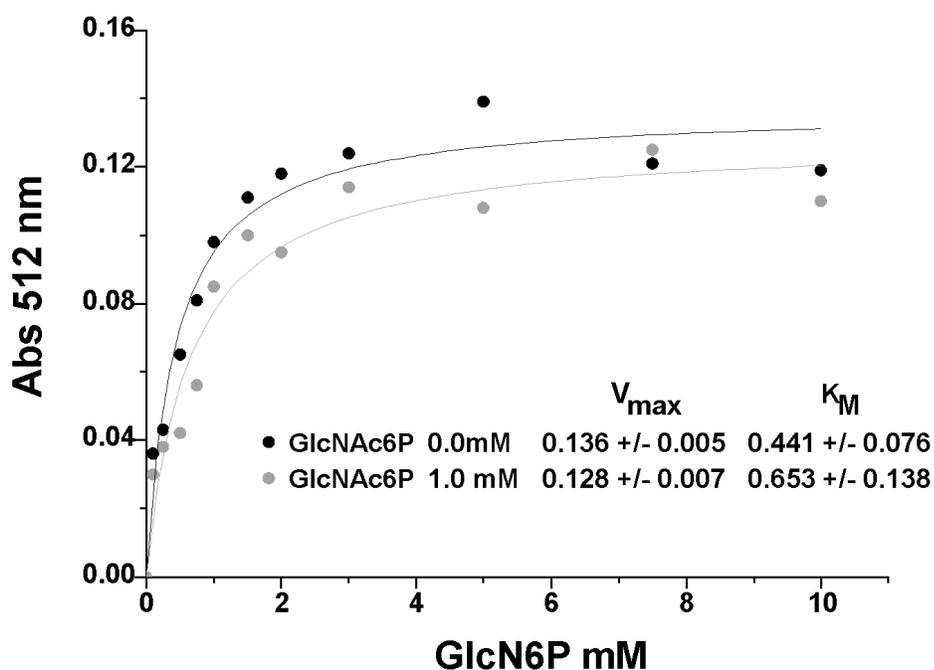


Figura 17. Curva de la cinética de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* a distintas concentraciones de sustrato, en presencia y ausencia de GlcNAc6P.

Análisis estructural por homología a partir de la secuencia primaria

Se obtuvo la secuencia de residuos aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *nagB* usando el programa de manipulación de secuencias DNA Strider 1.2.

Se realizó el alineamiento de las secuencias de la desaminasa de *E. coli* y la *B. subtilis* mediante el programa Clustal X 1.8, a partir de los datos obtenidos de la secuenciación y las bases de datos del Gene Bank y Protein Data Bank, donde primeramente se observó que la cepa con la cual trabajamos presentó cambios en comparación con la secuencia depositada en la base de datos del Gene Bank con clave NP_391382.1. Estos cambios se localizan en tres aminoácidos de la cadena, que consisten en la sustitución de Isoleucina 61 por Valina, Aspártico 121 por Glutámico y Aspártico 125 por Glicina.

Si observamos el alineamiento de las dos secuencias (Fig. 18) algo que resalta a simple vista es que éstas no poseen el mismo número de residuos siendo mayor la de *E. coli* con 266 aminoácidos que le otorgan 24 aminoácidos adicionales en comparación a la secuencia de *B. subtilis* que sólo cuenta con 242 residuos. A pesar de ello el porcentaje de identidad entre los residuos de aminoácidos entre ambas desaminasas resulta ser bajo en comparación con otras secuencias ya que ésta es de solo el 36.8%. Si incluimos las sustituciones conservadoras las dos proteínas son similares tan solo en un 63.77 %, lo que nos lleva a cuestionar que tan conservada se encuentra la estructura primaria de esta enzima durante la evolución.

Todos los residuos que forman parte del sitio activo de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, están completamente conservados en la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*, la única diferencia encontrada, es el residuo correspondiente al Aspártico 141 sustituido por Asparagina. Sólo los residuos del sitio alostérico Met1 y Ser 142 están conservados y el resto de los residuos presentan sustituciones conservadoras, con excepción del residuo Lisina 160 que es sustituido por una Valina y el residuo Tirosina 254 considerado el switch alostérico, que no está presente en la secuencia de *Bacillus subtilis* (Fig. 18).

Otro punto importante a observar en este alineamiento es la ausencia de los residuos 246-250 en *Bacillus subtilis*, representan la pérdida de los residuos que conectan a las subunidades en el eje de orden dos en *Escherichia coli*.

<i>B. subtilis</i>	1	M	K	V	M	E	C	Q	T	E	E	L	S	Q	I	A	A	R	I	T	A	D	T	I	K	E	-	K	P	D	A	-	-	-	V	L	G	L	A	35		
<i>E. coli</i>	1	M	R	L	I	P	L	T	T	A	E	Q	V	G	K	W	A	A	R	H	I	V	N	R	I	N	A	F	K	P	T	A	D	R	P	F	V	L	G	L	P	40
<i>B. subtilis</i>	36	T	G	G	T	P	E	G	T	Y	R	Q	L	I	R	L	H	Q	T	E	N	L	S	F	Q	N	V	T	T	V	N	L	D	E	Y	A	G	L	S	S	D	75
<i>E. coli</i>	41	T	G	G	T	P	M	T	T	Y	K	A	L	V	E	M	H	K	A	G	Q	V	S	F	K	H	V	V	T	F	N	M	D	E	Y	V	G	L	P	K	E	80
<i>B. subtilis</i>	76	D	P	N	S	Y	H	F	Y	M	N	D	R	F	F	Q	H	I	D	S	K	P	S	R	H	F	I	P	N	G	N	A	D	D	L	E	A	E	C	R	115	
<i>E. coli</i>	81	H	P	E	S	Y	S	F	M	H	R	N	F	F	D	H	V	D	I	P	A	E	N	I	N	L	L	N	G	N	A	P	D	I	D	A	E	C	R	120		
<i>B. subtilis</i>	116	Y	E	Q	L	V	E	S	L	G	G	T	D	I	Q	L	L	G	I	G	R	N	G	H	I	G	F	N	E	P	G	T	S	F	K	S	R	T	H	V	155	
<i>E. coli</i>	121	Y	E	E	K	I	R	S	Y	G	K	I	H	L	F	M	G	G	V	G	N	D	G	H	I	A	F	N	E	P	A	S	S	L	A	S	R	T	R	I	K	160
<i>B. subtilis</i>	156	T	L	N	E	Q	T	R	Q	A	N	A	R	Y	F	P	-	S	I	D	S	V	P	K	K	A	L	T	M	G	I	Q	T	I	L	S	S	K	R	I	L	194
<i>E. coli</i>	161	T	L	T	H	D	T	R	V	A	N	S	R	F	F	D	N	D	V	N	Q	V	P	K	Y	A	L	T	V	G	V	G	T	L	L	D	A	E	E	V	M	200
<i>B. subtilis</i>	195	L	L	I	S	G	K	S	K	A	E	A	V	R	K	L	L	E	G	N	I	S	E	D	F	P	A	S	A	L	H	L	H	S	D	V	T	V	L	I	D	234
<i>E. coli</i>	201	I	L	V	L	G	S	Q	K	A	L	A	L	Q	A	A	V	E	G	C	V	N	H	M	W	T	I	S	C	L	Q	L	H	P	K	A	I	M	V	C	D	240
<i>B. subtilis</i>	235	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	242	
<i>E. coli</i>	241	E	P	S	T	M	E	L	K	V	K	T	L	R	Y	F	N	E	L	E	A	E	N	I	K	G	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	265

■ Aminoácidos del sitio alosterico.
 ■ Aminoácidos del sitio activo.
 Aminoácidos que conectan a las subunidades en el eje de orden dos.

Figura 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los genes *nagB* de *B. subtilis* y *E. coli*. En este alineamiento se denotan los residuos de importancia tanto para la actividad como para la alostería.

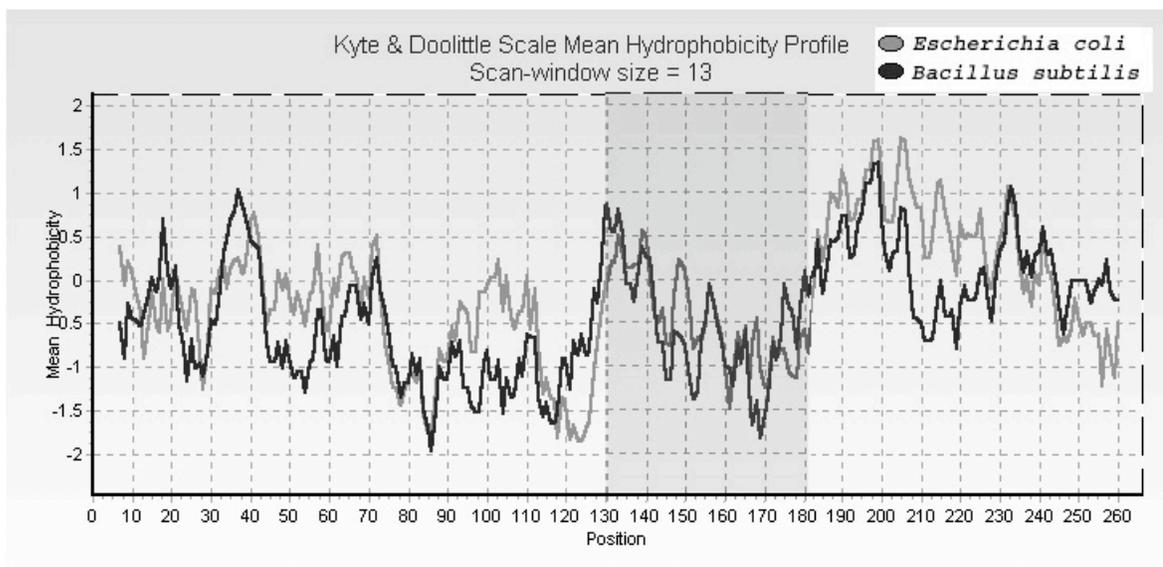


Figura 19. Perfil de hidrofóbicidad de las secuencias de *B. subtilis* y *E. coli*. La parte sombreada comprende gran parte de la ubicación de los residuos tanto del sitio activo como alostérico.

Como se observa en la Figura 19, la secuencia de *B. subtilis* presenta un perfil de hidrofóbicidad similar al de *E. coli*, conservando la mayoría de las interacciones de carácter hidrofóbico que estabilizan el plegamiento. Lo mismo ocurre con los residuos que interactúan en el mecanismo de reacción, lo que sugiere que el plegamiento debe ser similar.

Desarrollo del modelo computacional probable de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* a partir del modelo cristalografico de la enzima de *E. coli*

El modelo computacional de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *B. subtilis* (Fig. 20) basado en su secuencia de aminoácidos, se generó por medio de homología comparativa a través de la librería ExpDB usando el servicio automatizado que presta Swiss-Model (a través de su página <http://swismodel.expasy.org>), obteniendo de esta forma únicamente la unidad monomérica.

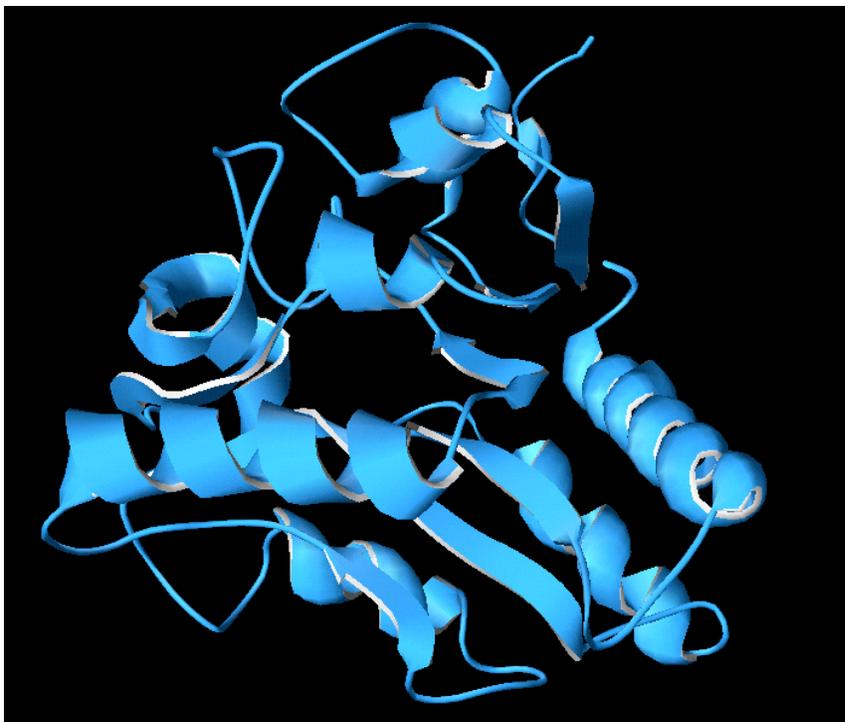


Figura 20. Modelo tridimensional de la unidad monomérica de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*.

Para la construcción del modelo hexamérico se realizó un acoplamiento de las estructuras por medio de un alineamiento estructural usando el programa DeepView-Swiss-PdbViewer v 3.7 a partir del modelo cristalográfico de la enzima homóloga de *E. coli* en su conformero R, ya que éste mostró una mejor simetría con respecto a nuestro modelo.

Una vez realizado esto se obtuvieron las coordenadas tridimensionales de cada monómero superponiendo nuestro modelo con cada uno de los monómeros del modelo de *E. coli*, orientándolos de acuerdo al mismo patrón geométrico considerando el mismo número de aminoácidos. Con esto se pudo construir todo un modelo hexamérico para *B. subtilis* a partir del cual se generaron modelos supuestos tanto del dímero como del trímero para estudiar a detalle la

interface de los sitios de contacto entre las subunidades, tal y como se muestran en las Figuras 21 y 22.

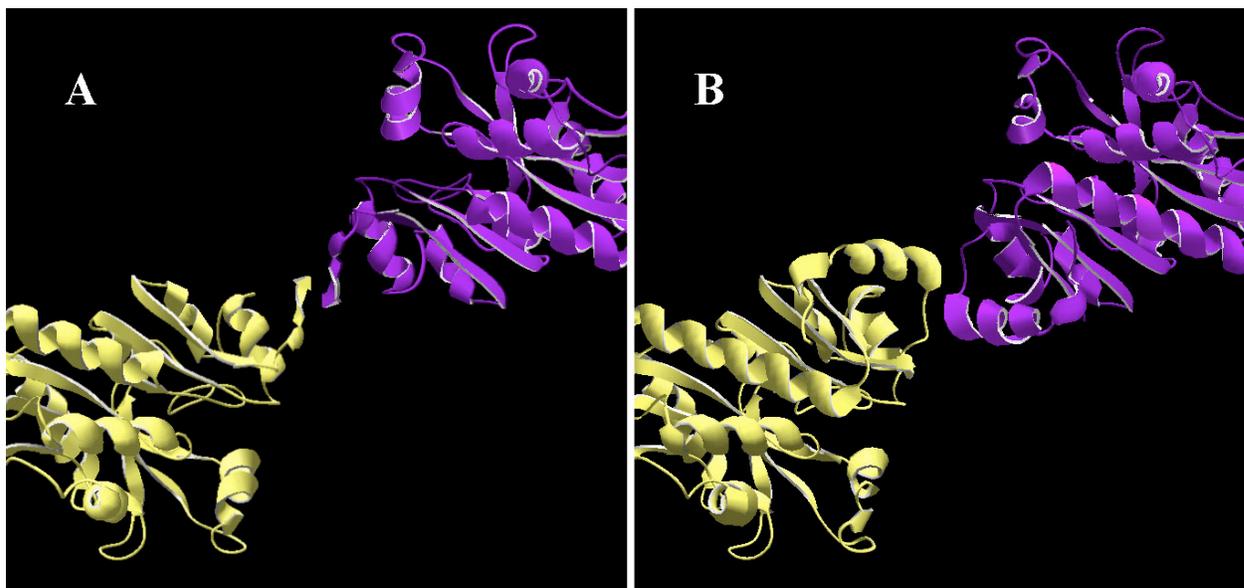


Figura 21. Zona de contacto entre las subunidades en el eje de orden dos. A la izquierda (A) se muestra el modelo de los posibles contactos en la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*, mientras que del lado derecho (B) se muestra la zona de contacto en el eje de orden dos del modelo cristalográfico de *E. coli*.

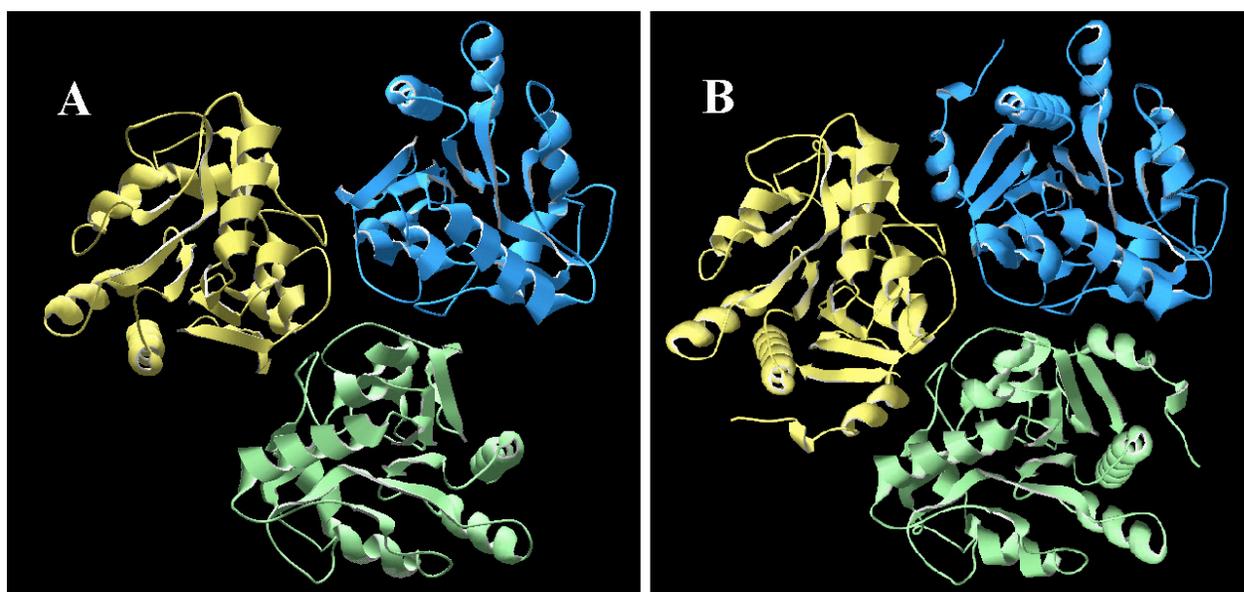


Figura 22. Zona de contacto entre las subunidades en el eje de orden tres. A la izquierda (A) se muestra el modelo supuesto de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*, mientras que del lado derecho (B) se muestra el de *E. coli*.

Análisis de identidad

Como se observa tanto en la Tabla II como en la Figuras 23 y 24, el porcentaje de identidad entre las GlcN6P desaminasas de *Bacillus subtilis*, *Giardia intestinalis* y *Candida albicans* resultan ser mayores que con respecto a *Escherichia coli*, por lo que filogenéticamente se encuentran más relacionados entre ellos que con respecto a esta última. Siendo mayor la identidad entre *G. intestinalis* y *C. albicans* con respecto a *B. subtilis*, siendo la secuencia de *C. albicans* la que presenta mayor porcentaje de identidad con *E. coli*.

La base estructural comparativa en el alineamiento de estas secuencias en los distintos organismos definen dos grupos: el de las GlcN6P desaminasas alostéricas y el de las GlcN6P desaminasas no alostéricas, que pueden diferenciarse principalmente por los siguientes puntos:

- El número de residuos que componen los extremos C-terminal y N-terminal, que marcan al mismo la diferencia tiempo en peso molecular.
- La sustitución de residuos que intervienen en la regulación de tipo alostérico de estas proteínas, principalmente la del residuo 161.
- La sustitución del residuo 141 del sitio activo de esta proteína.

De acuerdo a estos resultados, pareciese que dicha relación de agrupamiento está relacionada con el carácter de oligomerización de estas proteínas, así como del número de residuos que las integran.

A pesar de estas diferencias, esta comparación nos permite decir que estas enzimas pertenecen a una familia de proteínas que realizan la misma función de desaminación e isomerización, ya sea con el mismo sustrato de algún otro aminoazúcar. Por lo que el valor de sustitución de estos residuos puede ser un indicador de las restricciones funcional y estructural en la diversificación de esta proteína. Permitiendo conservar sus propiedades fisico-químicas.

Tabla II. Porcentajes de identidad y valores de divergencia creados a partir de las secuencias de aminoácidos depositadas en la base de datos del GeneBank de organismos modelo a través del programa MegAlign.

Porcentaje de identidad

	D. melanogaster	A. gambiae	Mus musculus1	M. auratus	Homo sapiens1	Xenopus laevis2	Mus musculus2	Homo sapiens2	Xenopus laevis1	C. elegans	Escherichia coli	Candida albicans	Bacillus subtilis	Giardia intestinalis
Drosophila melanogaster		83.2	72.8	72.1	72.1	74.3	72.4	72.8	73.2	64	58.3	48.8	38	35
Anopheles gambiae	19.1		77.7	78.1	78.1	77.3	77	77.3	77	68.4	62.5	47.2	37.2	37.1
Mus musculus1	32.7	26.5		96.5	95.2	87.9	85.4	85.5	86.5	67.8	57.5	45.6	40.9	35.3
Mesocricetus auratus	33.8	25.9	3.5		95.5	88.9	86.5	86.5	86.5	67.4	58.3	45.2	38.4	35
Homo sapiens 1	33.8	25.9	5	4.6		89.6	86.9	86.9	87.6	69.3	57.9	45.2	39.3	35.3
Xenopus laevis 2	30.4	27	13.2	12	11.2		86.9	86.9	88	65.9	60.2	44.8	39.3	35.3
Mus musculus 2	32.4	26.7	16.3	14.9	14.5	14.5		96.4	92	65.9	57.5	44.4	36.8	33.8
Homo sapiens 2	32.8	27.2	16.7	15.3	14.9	14.9	3.8		92.4	66.3	57.1	45.2	37.6	34.2
Xenopus laevis 1	32.1	27.6	14.9	14.9	13.5	13.1	8.1	8.1		67.4	56.4	43.5	37.2	34.6
Caenorhabditis elegans	48.2	40.6	42	42.6	39.4	45.3	44.4	44.2	42.6		54.1	46	41.3	36.8
Escherichia coli	60.2	51.6	61	59.4	60.2	55.5	60	60.5	63.4	68.5		47.2	36.8	32
Candida albicans	79.9	83.2	84.3	85.4	85.4	86.6	83.2	82.6	87.8	86.6	82		38.8	39.5
Bacillus subtilis	109.6	114.3	109.6	119.3	114.3	112.7	113.1	112.1	111.2	108.1	119.3	113.7		43.8
Giardia intestinalis	128.7	115.2	124.3	125.9	124.3	124.3	131.5	128.7	127.6	119.3	135.1	98.5	96.8	

Divergencia

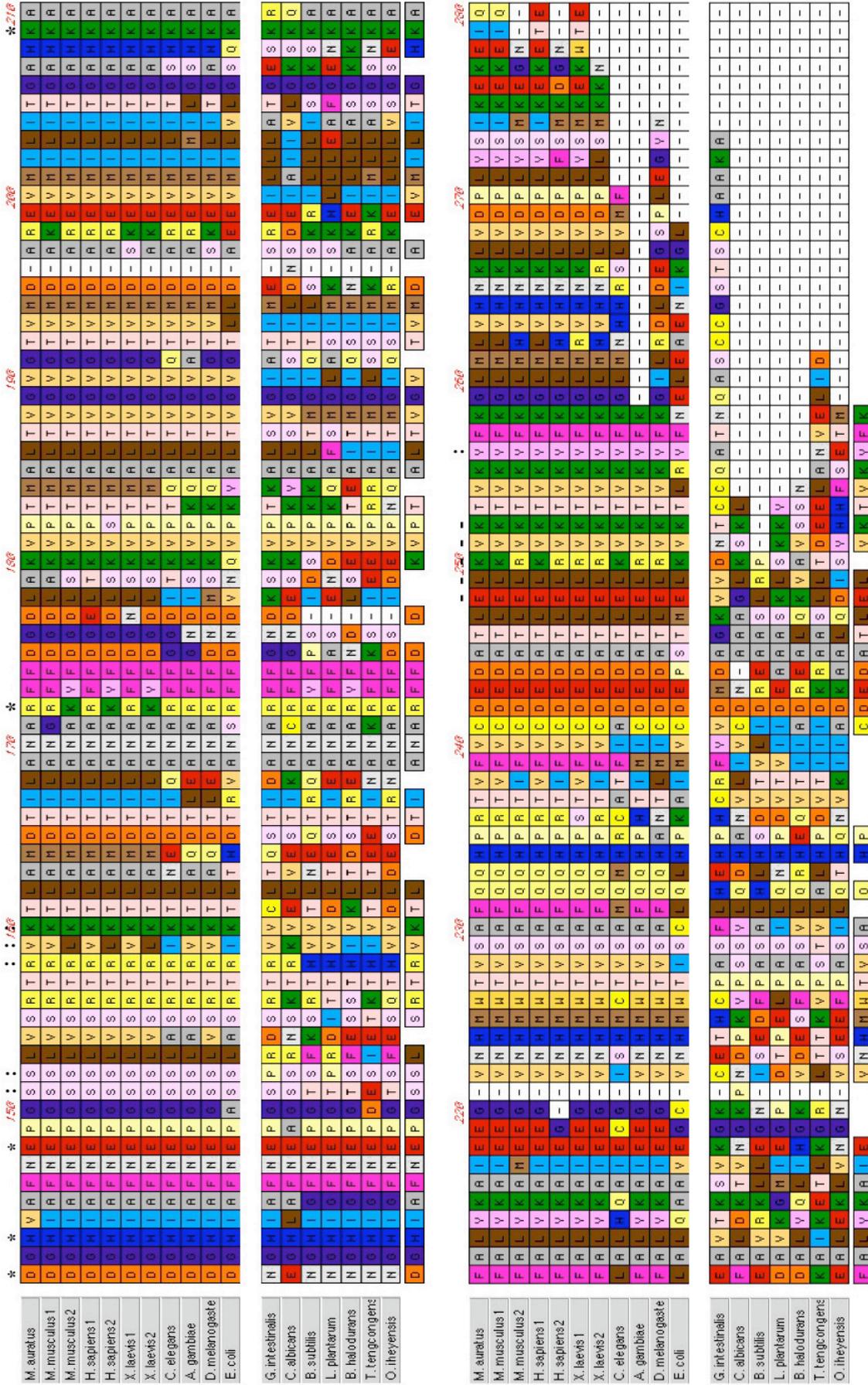


Figura 23. Alineamiento de las secuencias de las GlcN6P desaminasas. Los residuos marcados con un asterisco (*) corresponden a aquellos que integran el sitio activo, mientras que los dos puntos (:) denotan a los residuos del sitio alosterico y por ultimo el gui3n (-) corresponde a los amino3cidos que conectan a las subunidades en el eje de orden dos.

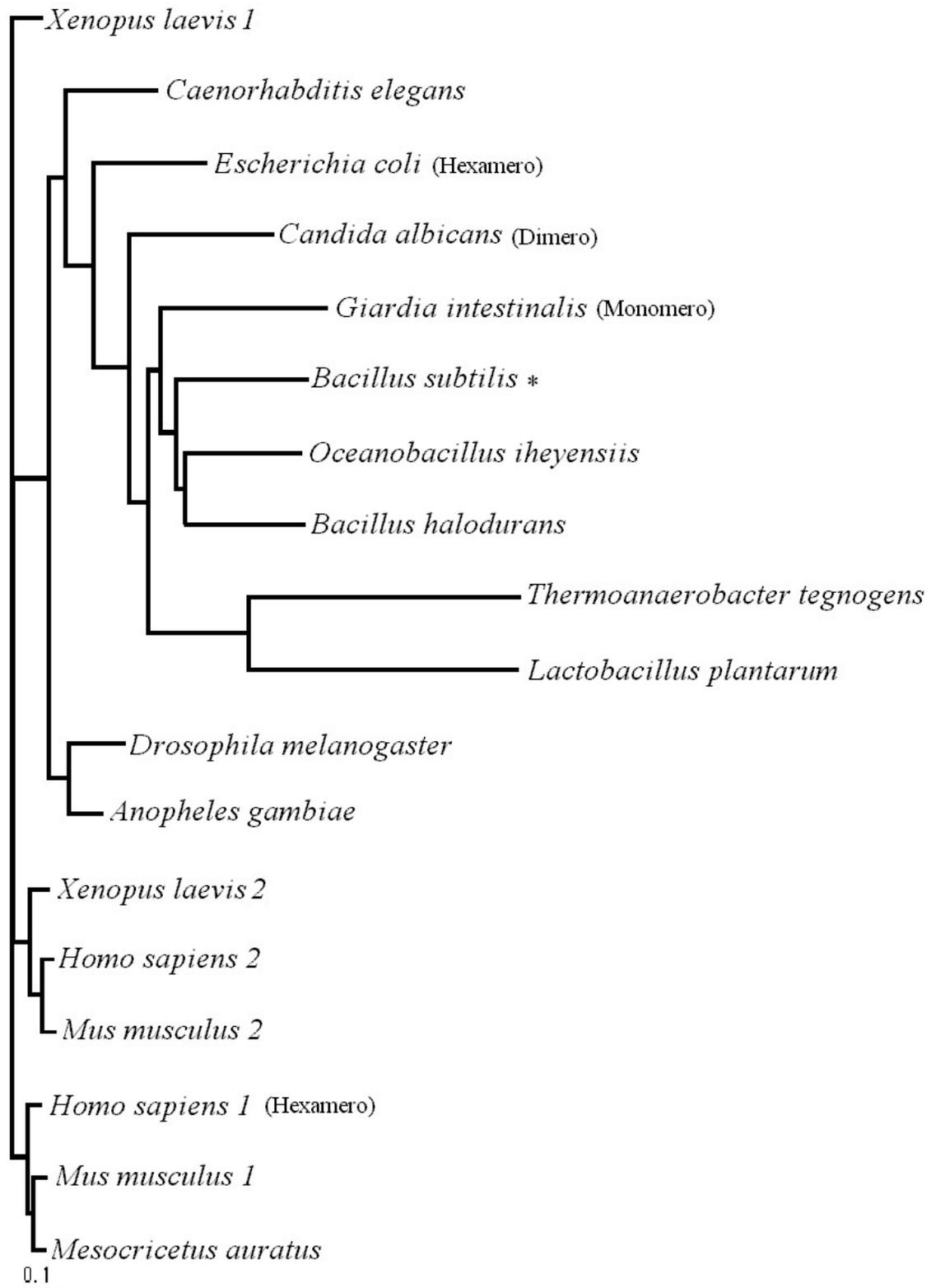


Figura 24. Dendrograma del patrón de agrupamiento creado a partir de las secuencias de aminoácidos depositadas en el GeneBank de organismos modelo a través del programa TreeView.

DISCUSIÓN

La GlcN6P desaminasa de *Bacillus subtilis* exhibe una masa molecular en estado desnaturalizado cercano a los 27 kDa, que es similar a la de las desaminasas de *E. coli* (29.7 kDa) (Calcagno *et al*, 1975), la de riñón de perro (30.4 kDa) (Lara-Lemus *et al*, 1992), la de *C. albicans* (28 kDa) (Nataranja y Datta, 1993) y la de *G. intestinalis* (29 kDa) (Steimle *et al*, 1997).

En cuanto al peso molecular en estado nativo que indique si presenta oligomerización, es difícil hasta el momento realizar una comparación ya que desconocemos el número de subunidades que integran a la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* dado que éstas, como se puede observar en la literatura, pueden variar considerablemente, por ejemplo la desaminasa de *G. intestinales* presenta una masa de 29 kDa tanto en condiciones desnaturalizantes como nativas (Steimle *et al*, 1997), *C. albicans* (43 kDa) que es un dímero (Nataranja y Datta, 1993) difiere considerablemente con respecto a la de *E. coli* (178 kDa) dado que ésta se compone de seis subunidades (Calcagno *et al*, 1975).

Los valores de actividad de GlcN6P desaminasa presento un rango aun mayor que el resto de las GlcN6P desaminasas de 6.5 a 8.8 en comparación con *C. albicans* (pH 7.5-7.8), *G. intestinallis* (pH 8.5-9.0) y *E. coli* (pH 7.6-8.2).

En cuanto a la activación y regulación alostérica, la desaminasa de *B. subtilis* presenta un comportamiento similar al de *G. intestinalis* (Steimle *et al*, 1997) y *C. albicans* (Nataranja y Datta, 1993) las cuales no responden a la GlcNAc6P ya que no presenta cambios significativos en su velocidad al encontrarse bajo efectos del activador GlcNAc6P como sucede en *E. coli*, en cuya ausencia presentan una cinética sigmoide y en la cual el activador alostérico tiene el efecto de aumentar la afinidad aparente de la enzima por la GlcN6P ó la Fru6P en el sentido inverso, por lo que reafirma el estado no alostérico de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis*.

El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de las secuencias de *B. subtilis* y *E. coli* nos permiten obtener una idea de los residuos fundamentales implicados en la catálisis.

Los aminoácidos relacionados con la catálisis se encuentran conservados, así por ejemplo, el Glu 73 que es fundamental para formar un enlace entre la hélice 3 y la hebra beta A' para mantener en su posición a la hebra β A' que contiene al Asp 72, esta presente en ambas GlcN6P desaminasas.

La posición 40 y 41 que en *E. coli* es Pro y Thr mantienen en *B. subtilis* un par de aminoácidos que conserva el patrón estructural: Ala y Thr. En el asa catalítica se mantienen la posición 142 con Gly y 143 con His. Además el residuo 141 mantiene un aminoácido polar que puede estar cargado negativamente dependiendo del aminoácido presente en la posición 148 (por lo general cargado negativamente). Es importante mencionar que estas dos últimas posiciones (141 y 148) forman, junto con la His 143, la triada catalítica que promueve el intercambio de protones durante la abertura del anillo del sustrato. Pese a que existen cambios en el aminoácido 141 se conserva un aminoácido con carga negativa (Glu), estos cambios sugieren que el flujo de protones requiere únicamente dos aminoácidos para abrir el anillo del azúcar (la His y un residuo ácido). En el sitio activo la Gly 205 se requiere para mantener el plegamiento local, y la Lys 208 que es uno de los ligantes del fosfato.

En cuanto a los aminoácidos del sitio alostérico que participan en la unión del fosfato de la GlcNAc6P, se encuentran sustituidos en su mayoría por otro residuo de igual carácter, salvo la posición de la Lys 160 que ésta sustituida en *B. subtilis* por una Valina, perdiendo una carga necesaria para el enlace del fosfato del activador. Sin embargo, estos cambios, aunados a la existencia de cambios en los residuos periféricos, podrían estar interfiriendo en la unión del activador (Fig. 27), lo cual no nos extraña, pues esta misma posición se encuentra de igual manera sustituida en las GlcN6P desaminasas no alostericas de *C. albicans* y *G. intestinalis* por la Val 160 presente en *B. subtilis*.

Siguiendo con este análisis, es interesante hacer notar que a diferencia de GlcN6P desaminasa de *E. coli* los sitios del segmento carboxilo y amino terminal de la enzima, no tienen este segmento, como se observa en la Figura 26.

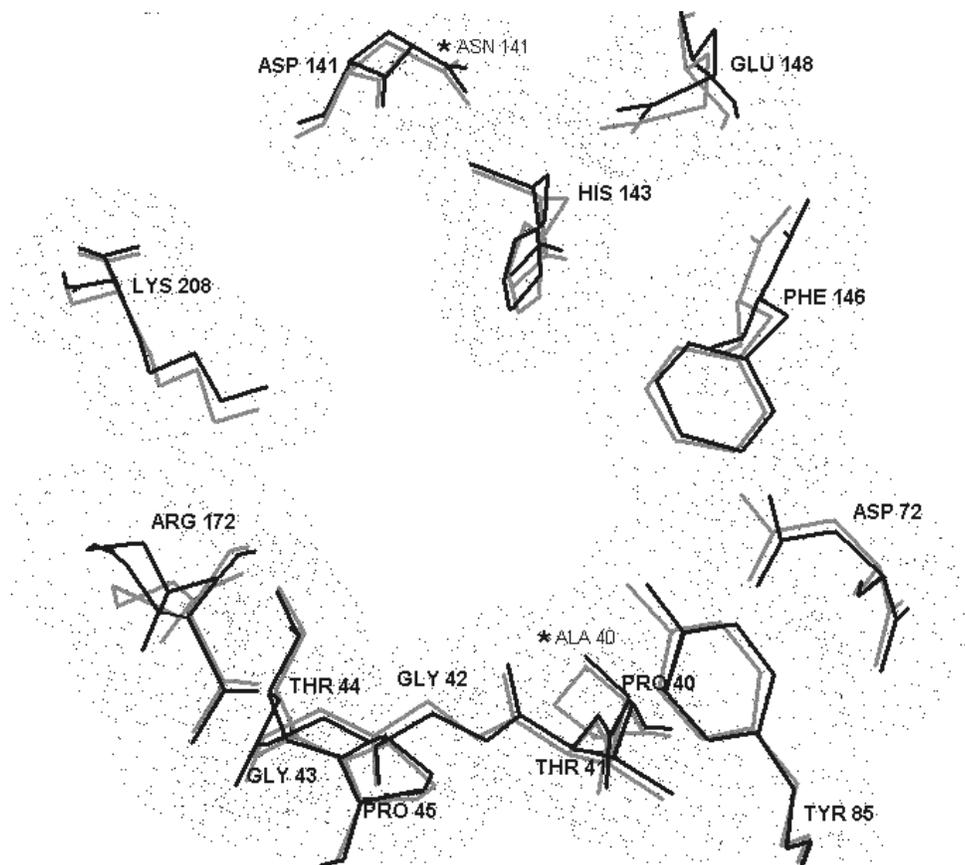


Fig 25. Región del sitio activo del modelo de la enzima de *B. subtilis* (en color oscuro) alineado con la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (en color claro). La denotación con asterisco remarca el cambio del aminoácido en esta región en las secuencias.



Figura 26. Superposición de los modelos tridimensionales de la GlcN6P desaminasa. En color azul se presenta el modelo de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* y en color rojo se muestra la unidad monómerica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

El alineamiento estructural (Fig. 26) nos permite comparar los modelos del plegamiento de la cadena principal y observar los cambios de estructura por los diferentes aminoácidos de cada secuencia, haciendo evidente la similitud de las estructuras.

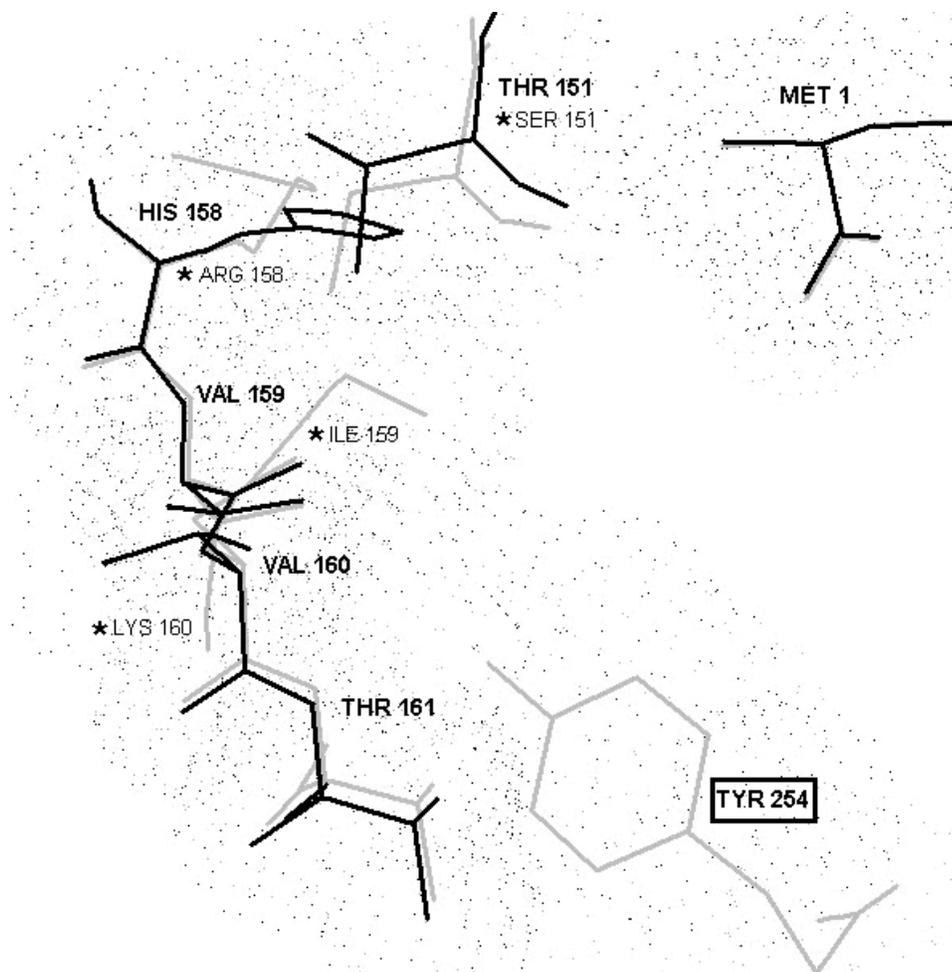


Fig 27. Región del sitio alosterico del modelo de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* (en color oscuro) alineado con la estructura cristalográfica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (en color claro). Los asterisco marcan los aminoácidos variantes en las secuencias. En recuadro se encuentra el aminoácido ausente en *B. subtilis*.

La posición Val 249 que resulta ser una interacción muy importante en la región de contacto entre las subunidades en el eje de orden dos en *E. coli*, debido a la interacción hidrofóbica que éste realiza, se pierde en *B. subtilis*, de igual forma se pierde el puente salino entre el Glu 246 con el nitrógeno de la Lys 248 (Fig. 28), que es clave para la estabilidad del contacto entre las subunidades del dímero.

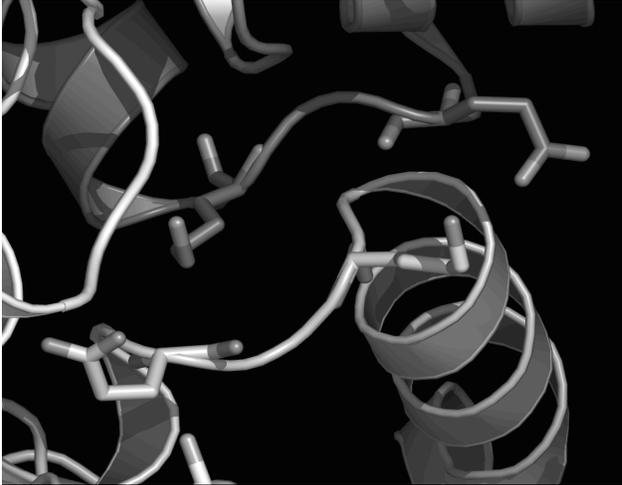


Figura 28. Interacción de la lys 248 y Glu 246 entre las subunidades en el eje de ordenados en la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Imagen cortesía de Ismael Bustos Jaimes, Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, UNAM.

En cuanto a los aminoácidos que interactúan entre las subunidades para formar el trímero, a excepción de la Serina 152, el resto de los residuos se encuentran sustituidos. De esta manera Leu 153 presente en *E. coli* se encuentra sustituida por Phe en *B. subtilis*, Val 216 por Leu y Val 220 por Ile, todos ellos aminoácidos homologos entre sí, al igual que las sustituciones de Ala 150 por Gly, His 222 por Glu y Gln 230 por His, que debido al carácter particular de cada uno de estos pueden cambiar dependiendo de su entorno y por tanto las interacciones que puedan generar.

A pesar de que se creó un modelo de interacción de un posible trímero de *B. subtilis* que mantiene el plegamiento en esta región y que se cuenta con el modelo de esta región creado en base a la estructura de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (Fig. 29 y 30) no es posible obtener una conclusión concreta de esto, ya que no necesariamente se tiene que formar un trímero, como sucede con *Candida albicans*, que se reporta como dímero, pero del cual no existe cristal.

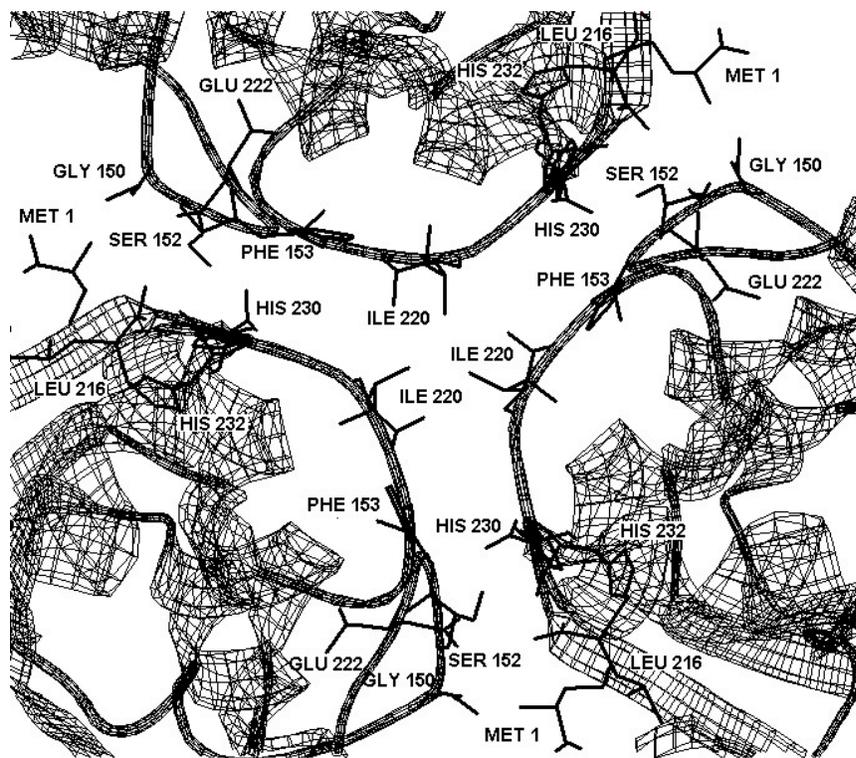


Figura 29. Modelo de interacción de un posible trímero de *B. subtilis*.

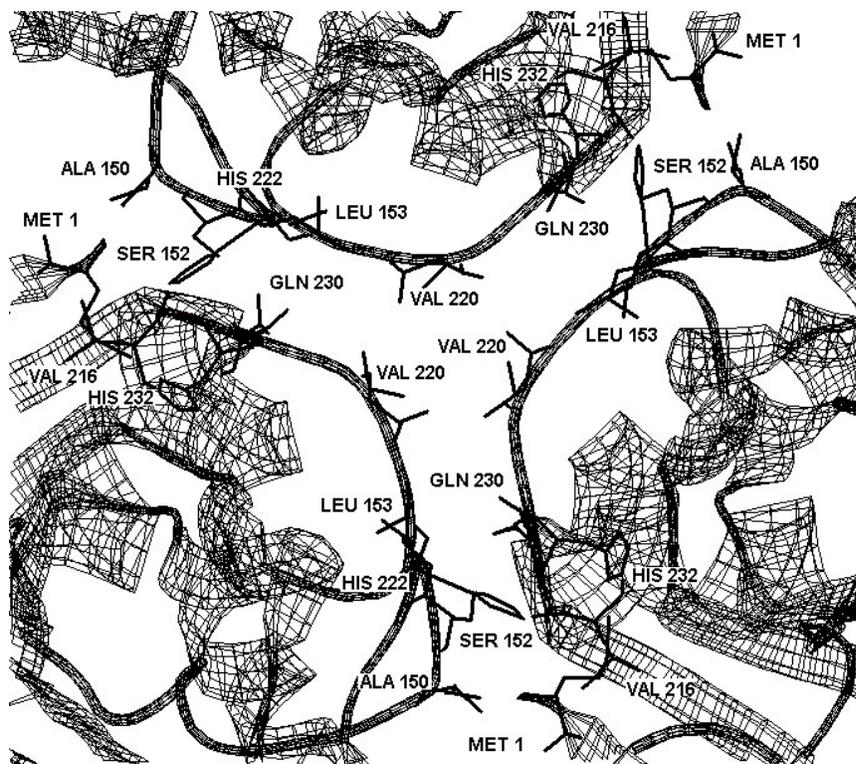


Figura 30. Esquema de interacciones del trímero de *E. coli* en base al archivo 1CD5.

LaGlcN6P desaminasa de *E. coli* tiene regiones estructural y funcionalmente homólogas con los dominios de unión a NAD, presentes en muchas otras enzimas, de forma que el plegamiento de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* se puede describir como un dominio de unión a NAD. Este dominio esta compuesto por una hoja β - α - β que presenta dos motivos estructurales de unión a mononucleotido o “pliegue de Rossmann”, del cual uno está encargado de unir el pirofosfato del NAD.

En laGlcN6P desaminasa de *E. coli* presenta modificaciones a este dominio, sin embargo el plegamiento sigue las mismas características, ejerciendo una función similar: unir el fosfato de la glucosamina. El motivo estructural β A- α 1- β B del dominio de unión a NAD es equivalente al motivo estructural β B- α 2- β C- β A de la GlcN6P desaminasa *E. coli*, donde β C y A están separadas únicamente por dos residuos y forman parte de las modificaciones de la GlcN6P desaminasa (Fig. 31).

Si se pensara que laGlcN6P desaminasa de *B. subtilis* nunca hubiese sido un hexámero, la modificación de la hélice 7 (equivalente al a hélice 5 en el dominio de unión a NAD) no se habría realizado en la enzima. Las modificaciones en la enzima de *E. coli* (hélice α -asa-hélice3-10) en la hélice 7 le permiten la formación del hexámero; por lo tanto, *B. subtilis* no tendría que presentar este motivo estructural.

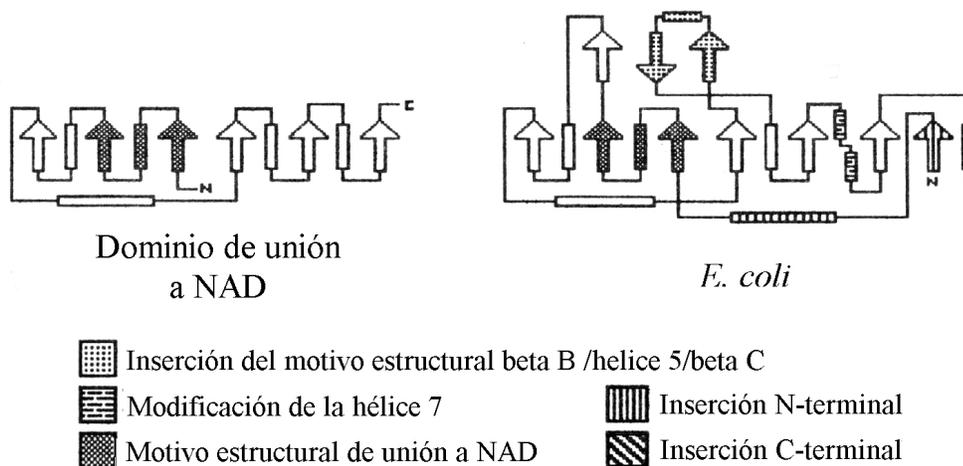


Figura 31. Topología de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* y el dominio de unión a NAD.

CONCLUSIONES.

El gen *nagB* que codifica para la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *B. subtilis* se amplificó por PCR utilizando los cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia y se subclonó en un sistema de expresión que contiene una región promotora de tipo *lac*.

Las células recombinantes de *E. coli* IBPC 590 Δ *nagB* que contenían el plásmido pTZ-*nagB* presentaron actividad de GlcN6P desaminasa.

Dentro del perfil de proteínas intracelulares de células recombinantes de *E. coli* IBPC 590 con el gen de la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* se detectó una proteína de aproximadamente 27 kDa, que podría corresponder a nuestra proteína.

Si bien la construcción realizada muestra estabilidad y la cepa con el gen de la GlcN6P desaminasa expresa esta proteína, la purificación no presentó los resultados esperados, al obtener una cantidad muy baja de la enzima (3.55 UI). Motivo por lo que se cree que el nivel de expresión y la estrategia de purificación hasta el momento no han sido los adecuados, de manera que esto ha retrasado la caracterización bioquímica de la enzima.

Se realizaron estudios cinéticos preliminares con la enzima parcialmente purificada no presentó cambios significativos en su velocidad al encontrarse bajo efectos del activador alosterico de *E. coli* (GlcNAc6P).

Si bien se puede realizar una dinámica molecular que modifica de manera particular las interacciones en algunas partes de las moléculas de nuestro modelo, como en las regiones de contactos intermonoméricos, esto no hace posible comprobar su estado de oligomerización.

El modelo estructural propuesto para la GlcN6P desaminasa de *B. subtilis* y los datos de las mutantes de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* nos permite afirmar que la región C-terminal ausente, es responsable de la marcada diferencia estructural al impedir los contactos entre la zona de orden dos por lo que se pierde la hexamerización. De tal manera que, como ya se había visto en *G. intestinalis* y *C. albicans* la ausencia de regulación alostérica pudiera estar relacionada con

la naturaleza no oligomérica de esta enzima, lo cual constituye un punto interesante para estudiar a futuro, ya que podría ayudar a entender los cambios conformacionales en este tipo de proteínas.

Con base en esto podemos decir que se trata de proteínas homologas derivadas de un gen ancestral que comparten la misma función y probablemente el mismo plegamiento.

La constatación de que a nivel molecular hay diferencias interespecíficas (divergencia) e intraespecíficas (polimorfismo) hace que nos preguntemos por el motivo de los cambios observados y que intentemos distinguir qué factores evolutivos son responsables.

La comparación de estas proteínas homólogas, resulta importante por dos razones; primero, las similitudes encontradas dan una medida de la estructura mínima que es necesaria para llevar a cabo su función biológica; segundo, las diferencias encontradas nos pueden dar claves importantes acerca de la tasa a la cual las mutaciones exitosas han ocurrido a través del tiempo evolutivo y pueden servir como una base adicional para establecer las relaciones filogenéticas.

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. Sin embargo en un sistema diferente como el de *B. subtilis*, la enzima permanentemente activada no responde a modificaciones en la concentración de activador por lo que hay que buscar un significado fisiológico de dicho comportamiento.

Por último es importante resaltar que el estudio de la GlcN6P desaminasa es importante para entender la regulación de las vías metabólicas de los aminoazúcares. No obstante, esta enzima no es vital para el funcionamiento de todos los organismos, ya que no está presente en todos ellos. Sin embargo existen genes homólogos que codifican para enzimas como la fosfoglucosamina 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. 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.

PERSPECTIVAS DE TRABAJO

Por el momento se pretende mejorar el sistema de expresión para purificar a homogeneidad esta enzima.

Una vez que se tenga la enzima completamente puraprimera, es importante obtener datos experimentales que permitan proponer un modelo cinético que explique el comportamiento de la desaminasa de *Bacillus subtilis*. Para ello será de gran utilidad determinar la forma que tiene la curva de unión del sustrato a la enzima así como la realización de la cinética reversa correspondiente para saber si la GlcN6P desaminasa al igual que la de *E. coli* cataliza de manera reversible la isomerización y desaminación de D-glucosa-6-fosfato en D-fructosa-6-fosfato.

Iniciar un estudio cristalográfico de la GlcN6P desaminasa a partir de proteína pura para conocer de manera definitiva la estructura de esta enzima con el fin de aclarar los aspectos estructurales y su correlación con la función de la enzima.

Además, es importante iniciar un estudio encaminado a determinar el papel fisiológico que tiene esta enzima, por medio del estudio de la regulación de la expresión del gen de la GlcN6P desaminasa y los mecanismos que regulan los niveles de transcripción en las células que la expresan.

LITERATURA CITADA

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

Ausubel, M. F., Brent, R., Kingston, E. R., Moore, D.D., Seidman, G. J., Smith, A, J. y Strul, K. (1999). "Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology". Fourth edition. Wiley & Sons. USA.

Bates, C. J. y Pasternak, C. A. (1965). "Further studies on the regulation of amino sugar metabolism in *Bacillus subtilis*". *Biochem. J.* **6**:147-154.

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

Berkeley, R.C.W., Logan, N.A., Shute, L.A y Capey, A.G. (1984). "Identification of *Bacillus* species". *Meth. Microbiol.* **16**: 291-328.

Bustos, J. I. (1998). "Análisis del gen que codifica para la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1". Tesis de Maestría. Facultad de química. UNAM.

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.

Comb, D. G. y Roseman, S. (1958). "Glucosamine metabolism. IV, glucosamine-6-phosphate deaminase". *J. Biol. Chem.* **232**: 807-827.

Friedman, S. y Benson, R. L. (1975). "Glucosamine phosphate isomerase from house flies". *Methods enzymol.* **41**: 400-407.

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

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G; Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B. *et al.* (1997). "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". *Nature.* **390**: 248-255.

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

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

Lara-Lemus, R. y Calcagno, M. L. (1998) "Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type". *Biochimica et Biophysica Acta.* **1388**: 1-9.

Lara, L. (1999). Estudio cinético y caracterización molecular de la enzima GlcN6P desaminasa de corteza renal de bovino. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, UNAM.

Leloir, L. F. y Cardini, C. E. (1956) "Enzymes acting on glucosamine phosphates". *Biochim Biophys. Acta.* **20**: 33-42.

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

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

Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J. P. (1965). "On the nature of the allosteric transitions: A plausible model". *J. Mol. Biol.* **12**: 88-118.

Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J. A y Calcagno M. L. (2001). "On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine-6-Phosphate deaminase". *Biochemistry* **40**: 10187-10196.

Nataranjan, K. y 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.

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

Patthy, L. (1995). "Protein evolution by exon-shuffling". Springer-Verlag. USA.

Patthy, L. (1999). "Protein evolution. Blackwell Science". Gran Bretaña.

Plumbridge J. A., Cochet O., Souza J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. y Badet, B. (1993). Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **175**: 4951-4956.

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

Rudiño, P. E. (2001). Estudios estructurales sobre el mecanismo de activación alostérica de la glucosamina-6-fosfato deaminasa de *E. coli*. Tesis de doctorado. Instituto de biotecnología. UNAM.

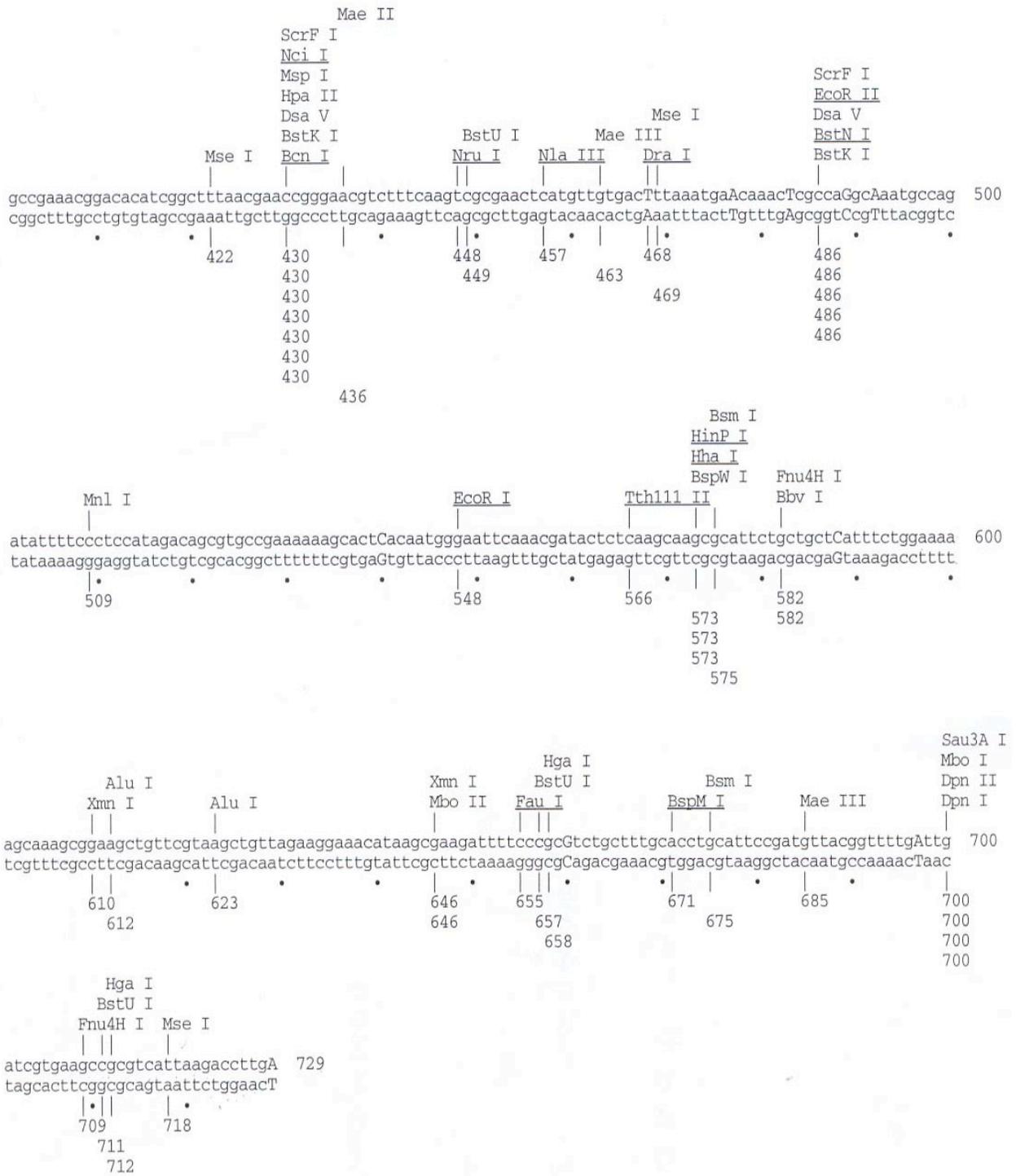
ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN genómico de *B. subtilis*

- 1) Crecer la cepa de *Bacillus subtilis* en 50 ml de medio toda la noche a 37°C con agitación constante a 250 r.p.m.
- 2) Centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20.
- 3) Resuspender las células en 2 ml de amortiguador TE (10 mM, 0.2 mM, pH 8.0).
- 4) Adicionar 1 mg de lisozima e incubar a 37°C durante una hora.
- 5) Agregar 0.5 mg de pronasa E y 150 µL de SDS 10%. Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante una hora.
- 6) Agregar 200 µl de NaCl 5 M Y mezclar suavemente.
- 7) Agregar 200 µl de solución de CTAB/NaCl (10%, 0.7 M). Mezclar e incubar 15 min a 65 °C.
- 8) Agregar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24 : 1). Mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20 durante 10 min.
- 9) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar un volumen de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20 durante 10 min.
- 10) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 0.6 volúmenes de 2-propanol. Mezclar hasta que se observe el ADN precipitado.
- 11) Retirar el líquido con una pipeta y enjuagar el precipitado con 2 ml de etanol al 70%. Secar el ADN a 50°C con vacío y resuspenderlo en 1.0 ml de amortiguador TE pH 8.0 y guardar a -20°C hasta ser usado.

Anexo 2. Mapa de restricción del gen *nagB* de *B. subtilis*

Dde I
 Esp I
 Mbo II
 Ear I
 Mae II Alu I Fnu4H I Bbv I BceF I SfaN I
 atgaaagttaatggaatgtcaaacgtatgaagagctaaagccaaatagcagccagaaataacggcagatacaatcaagaaaaacctgatgtgttctcggtt 100
 tactttcattaccttacagtttgacatacttctcgattcgggttatcgctcggtcttattgcccgtctatgtagtttcttttggactacgacaagaccaa
 . 22 32 46 58 85
 28 28 33 34
 Sau3A I
 Mbo I
 Dpn II
 Dpn I
 Alw I
 Msp I Mae II Alu I Tfi I Sfe I
 Hpa II BsaA I Pvu II Hinf I Mae III
 Fnu4H I BspW I NspB II Bsq I Dde I Mae II Mse I Fok I
 tagcAacAggcggcacacccggaaggcacgtatcgccagctgtagccgctgcaccaaactgagaatctctcatttcaaaacGtcactacagttaatttggga 200
 atcgTtgTccgccgtgtggccttccgtgcatagcggctcgactagggcggacgtggtttgactcttagagagtaaagttttgCagtgatgtcaattaaacct
 110 125 136 148 158 179 191 198
 118 126 136 162 162 181 185
 118 127 137 141 141 141 141 141
 Msp I Hpa II Nae I Rma I BspW I Cfr10 I
 Msp I Hpa II BspW I BspW I Bgl I
 Rsa I Csp6 I Alu I Mcr I BsiE I Taq I Bgl I
 tgagtacgccggactttcaagcgatgaccggaacagctatcacttctatatgaacgaccgttttttccagcatatcgacagcaagcctagccggcatttt 300
 actcatgcccgtgaaagttcgctactgggcttgtcgatagtgaaatatacttgcgtggcaaaaaagtcgtatagctgtcgttcggatcggccgtaaaa
 204 235 255 275 285 290
 204 255 281 285 290
 209 287 290 291 291
 Hae III Mcr I Gdi II Eaq I Eae I BsiE I
 Hae III Mnl I Bsm I Ple I Taq I Mnl I Rma I BsaJ I Fnu4H I Alu I SfaN I
 Mnl I Hae III Mnl I Alu I Hinf I BsaJ I Fnu4H I Alu I SfaN I
 attccgaatggaatgcagacgatttggaggcgaatgcagacggtatgaacagctagtcgaGtccctcggcgGcactgacattcagcttctcggtatcg 400
 taaggcttacctttacgtctgctaaacctccggcttacgtctgccatacttgcgatcagctCaggagccgcCgtgactgtaagtgaagacccgtagc
 328 330 334 353 361 371 386 395
 330 355 361 366 399 399 399 399 399 400
 334 359 366 361



Nota: Las letras en mayúsculas denotan los cambios de la secuencia con respecto a la encontrada en la base de datos del GeneBank.



Model 3100 F-BS_Forward universal.ab1
Version 3.7 Alejandro Sosa
Basecaller-3100SR.bcp 7834f
BC 1.3.0.0 Cap 1

Signal G:2330 A:2058 T:2273 C:1207 Page 2 of 2
DT3100POP6(BD)v2.mob Mon, Aug 25, 2003 11:27 AM
demo_3100 Fri, Aug 22, 2003 4:46 PM
Points 290 to 910 Pk 1 Loc: 290 Spacing: 11.01{11.01}

36TGTGCCGGCCGTGTTCATAACCGGAGA GGC CAT CAGGTTTTTTCCTTGAATGAT CTGCCGTTATCTGGCAGCTTGGCTTTTGGCTTTAGCTCTTT CAT AGGTTTGACATTCCCAT TACATTTTCAI ATCTGGTCAGGC
720 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740

TGCTGCTCCCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCTTATAGNGGAGTGGT ATTAATAATTCGTAATCGINATAGCTGNTCCCTGGTGGNAA TTGNTATCCGCINACANINCCAC AAATACGAGCGGGAGCAT AAGTGT
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890

AAGNCTGGGNGCCTAANAGNGNCTACTCNATTAANINGCCGTGGGCTNCTGNCGGTTTNCAGTCGGAAANCTGNNGNANWN
900 910 920 930 940 950 960 970



Anexo. 4 Protocolo utilizado para la cinética



*Facultad de Medicina, UNAM.
Departamento de Bioquímica.*

Mezcla sin activador.

		1 Tubo
Tris HCl 1M	pH 8.2	20 μ l
EDTA 250	mM	20 μ l
H ₂ O		50 μ l
Total		90 μ l

Mezcla con activador.

		1 Tubo
Tris HCl 1M	pH 8.2	20 μ l
EDTA 250	mM	20 μ l
H ₂ O		48 μ l
GlcNAc6P (100mM)		2 μ l
Total		90 μ l

Tubo	[GlcN6P] final	GlcN6P 100 mM μ l	H ₂ O (μ l)	Mezcla (μ l)	Enzima (μ l)	Incubar a 30 °C durante 20 minutos. Agregar 2 ml de HCl 10N y 0.5 ml de resorcinol. Incubar a 70 °C por 10 minutos.	Abs 512 mn	[Fructosa] mM
1	0.1	0.2	99.8	90	10			
2	0.25	0.5	99.5	90	10			
3	0.5	1.0	99.0	90	10			
4	0.75	1.5	98.5	90	10			
5	1.0	2.0	98.0	90	10			
6	1.5	3.0	97.0	90	10			
7	2.0	4.0	96.0	90	10			
8	3.0	6.0	94.0	90	10			
9	5.0	10	90.0	90	10			
10	7.5	15	85.0	90	10			
11	10	20	80.0	90	10			
12	12.5	25	75.0	90	10			
13	15	30	70.0	90	10			
14	20	40	60.0	90	10			
15	30	60	40.0	90	10			

Curva Patrón.

Tubo		I	II	III	IV	V	VI
Fructosa 1 mM	(μ)	0	10	20	40	60	100
H ₂ O	(μ)	200	190	180	160	140	100
Abs 512 nm							
[Fructosa] mM							