



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**MARCAJE SITIO ESPECÍFICO DE PROTEÍNAS PARA
ESTUDIAR CAMBIOS CONFORMACIONALES EN
SOLUCIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A :

**MARTIN GONZÁLEZ
ANDRADE**

Tutor: DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO



Ciudad Universitaria, D.F., Abril de 2006



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.

MARCAJE SITIO ESPECÍFICO DE PROTEÍNAS PARA ESTUDIAR CAMBIOS CONFORMACIONALES EN SOLUCIÓN

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Sosa Peinado en el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Rosario A. Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Georgina Garza Ramos	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM

ÍNDICE

RESUMEN	3
Abreviaturas	5
Marco teórico	7
Generalidades de las proteínas	7
Estructura y dinámica de las proteínas	8
Interacciones intramoleculares en proteínas	9
Reconocimiento molecular y catálisis	10
Ingeniería de proteínas	11
Aplicaciones de la ingeniería genética (Desarrollo de biosensores)	12
Herramientas teóricas y experimentales para estudiar las interacciones proteína-ligando	13
Dinámicas moleculares.	13
CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics)	15
Espectroscopia de fluorescencia.	16
Marcaje sitio-específico con sondas fluorescentes.	16
La regulación alostérica	19
La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa como modelo de estudio	20
Objetivos	23
Generales	23
Particulares	23
Materiales y métodos	25
Reactivos	25
Cepas y plásmidos	25
Mutagénesis.	25
Expresión y purificación de la enzima silvestre y las mutantes	27
Concentración de proteína.	27
Ensayos enzimáticos.	27
Modificaciones químicas con Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS en las cisteínas reactivas de la GlcN6P desaminasa	28
Determinaciones por fluorescencia en estado estacionario.	29
Determinación de la dependencia de la polaridad relativa del solvente con las propiedades fluorescentes del Mbbm-Cisteína y Dansil-amidoetil-MTS-Cisteína.	30
Rendimiento cuántico.	30
Modelaje molecular y visualización molecular de los conformeros T y R de la GlcN6P desaminasa.	31
Resultados y discusión	32
Comportamiento cinético de la enzima silvestre y de la triple mutante C118S/C228S/C239S	32
Cinéticas de los datos de la GlcN6P desaminasa de <i>E. coli</i> modificada químicamente en las posiciones 164 y 206 con Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS	33
Propiedades espectrales de los fluoróforos Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS unidos a cisteína.	35

Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca relacionados al cambio en el microambiente de las posiciones 164 y 206 modificadas químicamente, al adicionarles los ligandos del sitio activo y alostérico a concentraciones saturantes. ...	38
Correlación de los cambios en la señal de fluorescencia con los cambios conformacionales en la estructura de la GlcN6P desaminasa.	42
Titulación con los ligandos del sitio activo y alostérico, midiendo los cambios de la λ_{\max} de emisión de fluorescencia en las enzimas modificadas químicamente.	44
Diferencias en el microambiente detectadas a través de las sondas fluorescentes; indican diferencias estructurales en el confórmero R cuando es inducido a partir del ligando del sitio activo o del ligando del sitio alostérico.	47
Estabilización del confórmero R de la GlcN6P desaminasa mediante un enlace disulfuro entre los trímeros de la enzima.	50
Diseño de una doble mutante para estabilizar al confórmero R.	50
Separación electroforética en SDS-PAGE bajo condiciones oxidantes y reductoras. ...	53
Determinación de cisteínas reactivas, en condiciones oxidantes y reductoras.	53
Comportamiento cinético de la doble mutante D165C/S206C de la GlcN6P desaminasa.	54
Conclusiones.	57
Bibliografía.	59

MARCAJE SITIO ESPECÍFICO DE PROTEÍNAS PARA ESTUDIAR CAMBIOS CONFORMACIONALES EN SOLUCIÓN

RESUMEN

El estudio de los cambios estructurales asociados con las interacciones proteína-proteína o proteína-ligando es de gran interés. En este sentido, el marcaje sitio-específico de proteínas con sondas fluorescentes es una técnica ideal para estudiar y correlacionar la estructura con la función de las proteínas en un ambiente dinámico. En este trabajo se realizó un marcaje sitio-específico con dos fluoróforos: bromobimano y Dansil-amidoetil-MTS, en las posiciones 164 y 206 de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* para monitorear la transición alostérica en solución. Para este fin se diseñó una enzima con cisteínas reactivas en las posiciones 164 y 206 utilizando mutagénesis sitio dirigida. Estas posiciones se eligieron porque presentan diferentes interacciones en el conformero T y R en las estructuras cristalográficas de la enzima. Las mutantes modificadas químicamente con los fluoróforos no mostraron cambios en cuanto a su activación alostérica de tipo K que es característica de la enzima silvestre, sólo la k_{cat} se redujo a 72 s^{-1} (50 % con respecto a la silvestre). Con estas mutantes se monitorearon los cambios conformacionales a través de fluorescencia en estado estacionario, titulando con ligandos tanto del sitio alostérico como del sitio activo. Estos resultados sugieren que las interacciones resultantes entre los residuos 164 y 206 en el estado R que se alcanza al ser inducida homotrópicamente o heterotrópicamente no son equivalentes. También se evidenció la importancia de la flexibilidad que presenta la glucosamina-6-fosfato desaminasa al llevar a cabo la transición alostérica, por lo que se trató de estabilizar al

confórmero R a través de un enlace disulfuro introduciendo un par de cisteínas en las posiciones 165 y 206 de cada subunidad, obteniendo comportamientos cinéticamente diferentes a la enzima en su forma silvestre. Cinéticamente pierde sus propiedades cooperativas en condiciones oxidantes y en condiciones reductoras muestra una cinética bifásica en que se evidencia la presencia de un intermediario entre los confórmeros T y R (un confórmero TR).

Abreviaturas

ABNR Adopted basic newton raphson

ASA Área superficial accesible al solvente

AUC Ultracentrifugación analítica

Bimano-H164C Enzima mutada en la posición 164 cambiando la histidina silvestre por una cisteína y modificada químicamente con monobromobimano

Bimano-S206C Enzima mutada en la posición 206 cambiando la serina silvestre por una cisteína y modificada químicamente con monobromobimano

Dansil-amidoetil-MTS Dansilamidoetil-metanotiosulfonato

Dansil-Cys Dansil-amidoetil-cisteína

Dansil-H164C Enzima mutada en la posición 164 cambiando la histidina silvestre por una cisteína y modificada químicamente con Dansil-amidoetil-MTS

Dansil-S206C Enzima mutada en la posición 206 cambiando la serina silvestre por una cisteína y modificada químicamente con Dansil-amidoetil-MTS

DM Dinámica molecular

DMSO Dimetilsulfóxido

DTNB 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

D165C/S206C Doble mutante, mutada en la posición 165 y 206 cambiando el aspártico y la serina respectivamente por cisteínas

ϵ Absortividad molar

ϵ Constante dieléctrica

ϕ Rendimiento cuántico

FRET Transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia

Fru6P Fructosa-6-fosfato

GlcN6P Glucosamina-6-fosfato

GlcN6P desaminasa Glucosamina-6-fosfato desaminasa

GlcNAc *N*-acetilglucosamina

GlcNAc6P *N*-acetilglucosamina-6-fosfato

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

H164C Enzima mutada en la posición 164 cambiando la histidina silvestre por una
cisteína

K_I Constante de inhibición

k_{cat} Constante catalítica

λ Longitud de onda

Mbbm Monobromobimano

Mbm Monobimano

Mbm-Cys Monobimano unido a cisteína

RMN Resonancia magnética nuclear

RPE Resonancia paramagnética del electrón

RSP Resonancia superficial de plasmones

PDB Banco de datos estructurales de proteínas “Protein Data Bank”

S206C Enzima mutada en la posición 206 cambiando la serina silvestre por una cisteína

S206C Enzima mutada en la posición 206 cambiando la serina silvestre por una cisteína.

UCA Ultracentrifugación analítica

WT Enzima silvestre

Marco teórico

Generalidades de las proteínas

La composición química de las proteínas es relativamente sencilla: son polímeros lineales compuestos por 20 aminoácidos diferentes enlazados a través de uniones peptídicas, cuya secuencia determina su identidad química y en última instancia su función (Goodsell & Olson, 2000). Sin embargo, las funciones de las proteínas dependen directamente de la conformación que adoptan, es decir, del arreglo espacial de la cadena lineal de aminoácidos, lo que se conoce como estructura o conformación nativa. Una molécula típica de proteína puede estar constituida hasta de varios cientos de aminoácidos, por lo que resulta ser un sistema complejo con varios miles de átomos.

Es sorprendente que en las células existan cientos de proteínas diferentes y que cada una de éstas tenga la capacidad de llevar a cabo un trabajo específico, como por ejemplo, efectuar procesos contráctiles, transportar solutos a través de membranas, establecer comunicación extra e inter celular y catalizar reacciones químicas, entre las más importantes. La formación de una proteína funcional requiere que la cadena polipeptídica adquiera su estructura nativa, lo que le permite la interacción entre diferentes sitios de la cadena; estos sitios pueden estar separados en la secuencia primaria por unos cuantos o muchos aminoácidos. Cuando todas las interacciones entre los distintos sitios de la proteína se han establecido la molécula adopta una estructura tridimensional y es funcionalmente competente.

En muchas proteínas la estructura final se forma con una sola cadena de aminoácidos por lo que se les denomina monoméricas; pero también existen proteínas

oligoméricas (Goodsell & Olson, 2000), que son el resultado de la interacción entre dos o más cadenas de aminoácidos que han adquirido sus respectivas estructuras terciarias. Dentro de las proteínas oligoméricas las más comunes son las diméricas y, dentro de éstas, las homodiméricas (formadas por dos monómeros idénticos); sin embargo existen algunas proteínas que están formadas por más de 20 monómeros (Goodsell & Olson, 2000).

Estructura y dinámica de las proteínas

La determinación experimental de la estructura tridimensional de las proteínas requirió el desarrollo y adaptación de las técnicas de difracción de rayos X a partir de cristales. En la actualidad estas estructuras pueden determinarse en unos cuantos meses constituyendo un logro extraordinario, ya que proporcionan una gran cantidad de información a nivel atómico. También se ha incorporado la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas. Gracias al esfuerzo de cristalógrafos y espectroscopistas existen actualmente más de 32,000 estructuras cristalográficas, de las cuales alrededor de 4,000 corresponden a motivos estructurales diferentes, disponibles en el PDB (Protein Data Bank) <http://www.rcsb.org/pdb/>. Acceder a bases de datos tales como el PDB permite realizar análisis estructurales detallados sobre la arquitectura de estas biomoléculas. Las estructuras cristalográficas y las obtenidas por RMN proporcionan datos sobre la posición de cada uno de los átomos de las proteínas en el espacio y, en consecuencia, de las distancias que hay entre ellos. Esto permite hacer inferencias precisas sobre las interacciones intra e inter moleculares que mantienen las proteínas. Sin embargo, las

proteínas son sistemas moleculares complejos y todo este conocimiento no ha sido suficiente para predecir sus estructuras tridimensionales a partir de la secuencia de aminoácidos, y mucho menos discernir sus funciones. Aunque diversos intentos de predecir la estructura tridimensional han tenido poco éxito, recientemente el programa ROSETTA ha mostrado resultados prometedores. Este programa está constituido a su vez por dos programas ROSETTA FRAGMENTS y ROSETTA AB INITIO que comparan y crean dominios de proteínas, los cuales son utilizados para generar los modelos estructurales (Chivian et al., 2003; Kim et al., 2004).

Interacciones intramoleculares en proteínas

En los estudios de correlación entre la estructura y la función, las superficies de las proteínas juegan un papel clave; consecuentemente la información de las superficies es una de las bases para tratar de predecir la función a partir de la estructura. Uno de los principios observados en las interacciones proteicas es que muchos ligandos deben competir con el agua y con pequeñas moléculas en la superficie de las proteínas. Estos ligandos además deben complementarse a nivel estructural (Hubbell et al., 2000).

La caracterización de las interacciones proteína-proteína o proteína-ligando se puede llevar a cabo experimentalmente, siempre y cuando sea posible tener tanto a la proteína como el ligando puros y estables, por medio de diferentes técnicas tales como la resonancia magnética nuclear (RMN), la resonancia de plasmones en superficie (RPS), la ultracentrifugación analítica (UCA) acoplada a un detector óptico, la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y la fluorescencia (Blow et al., 1992).

Reconocimiento molecular y catálisis

Las estructuras nativas de las proteínas están determinadas por la secuencia de aminoácidos. Las posiciones y las propiedades de los aminoácidos le confieren las características particulares a cada proteína para que desarrolle su función. Por ejemplo, la superficie de una proteína globular con sus hendiduras y movimientos locales constituye un tapiz en el que la naturaleza puede colocar innumerables patrones, que incluyen regiones hidrofóbicas o polares, donadoras oceptoras de puentes de hidrógeno, que permiten establecer una complementariedad de interacciones que determinan la capacidad de reconocimiento molecular.

La mayoría de las reacciones que ocurren en los sistemas vivos están catalizadas por proteínas conocidas con el nombre de enzimas. Las enzimas tienen características muy notables relacionadas con el reconocimiento molecular: contienen una región relativamente pequeña de cadenas laterales de aminoácidos con actividad catalítica, a la que se le denomina sitio activo. Los mecanismos de reacción de las enzimas son muy complejos, implicando un número de etapas elementales, cada una de las cuales puede incluir interacciones complejas entre los grupos de las moléculas de la enzima y del sustrato. Sin embargo, las enzimas no sufren modificaciones químicas irreversibles durante la catálisis. En las reacciones catalizadas por enzimas las velocidades de los pasos de la reacción, se ven afectados por cambios en las propiedades fisicoquímicas: concentración de reactantes, pH, fuerza iónica y temperatura. La capacidad catalítica de las enzimas está representada en términos de la velocidad a la que cursa la reacción catalizada y puede ser expresada en forma última como la k_{cat} (constante catalítica)

definida como el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por sitio activo de enzima y por unidad de tiempo.

Ingeniería de proteínas

A partir de la aparición de las técnicas de DNA recombinante, hace cerca de 30 años se inició una revolución en los enfoques utilizados para estudiar prácticamente todos los fenómenos biológicos y el estudio de las proteínas no fue la excepción. La posibilidad creciente de aislar, caracterizar y modificar genes, dio origen a herramientas cada vez más poderosas y sofisticadas para indagar la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas. Asimismo, la ingeniería de proteínas se ha potenciado en gran medida para ser utilizada con fines tecnológicos. La ingeniería de proteínas es una herramienta de gran utilidad en la actualidad, ya que el uso de técnicas como la mutagénesis dirigida permite modificar la identidad química de cada residuo, lo que a su vez ha llevado a una variedad de estudios enfocados al conocimiento básico y aplicado de las proteínas. Entre los aspectos abarcados en los estudios básicos de las proteínas se encuentran: el plegamiento, la estructura y la estabilidad conformacional, el rediseño de centros catalíticos, los mecanismos catalíticos y las interacciones entre proteínas y ligandos. En lo que se refiere al aspecto aplicado la ingeniería de proteínas se utiliza extensamente en el campo biotecnológico, lo cual ha contribuido al descubrimiento, desarrollo y comercialización de alrededor de 100 nuevos productos biológicos comerciales en las últimas dos décadas tales como: anticuerpos monoclonales, hormonas, interferones, factores de crecimiento, interleucinas, factores de la coagulación (Evens, 2002). Como se puede

observar, la ingeniería de proteínas es de gran importancia e interés en el ámbito actual para el avance tecnológico (van Beilen & Li, 2002).

Aplicaciones de la ingeniería genética (Desarrollo de biosensores)

Los biosensores son sistemas que presentan un mecanismo híbrido que transforma por medio de mecanismos bioquímicos información de interacciones químicas en señales analizables. Los biosensores están constituidos de un sistema receptor, en el que un componente biológico interactúa específicamente con un analito específico, y un transductor fisicoquímico acoplado a un detector. El interés en el diseño de biosensores ha sido particularmente impulsado por las necesidades de contar con técnicas analíticas rutinarias y rápidas para un gran número de muestras, las cuales requieren de robustez, sensibilidad y reproducibilidad. Los biosensores tienen gran utilidad en investigaciones analíticas, en diagnósticos clínicos, en el control ambiental, en la industria alimenticia y farmacéutica. La integración de un componente biológico y un componente transductor son aprovechados para el desarrollo de los biosensores. Las enzimas, los anticuerpos, la superficie de las membranas, los ácidos nucleicos, las células y los tejidos lisos son los más usados como componente biológicos de los biosensores mientras el componente transductor está formado por grupos químicos con propiedades espectroscópicas, fluorescentes, eléctricas, etc. Dentro de los detectores los más utilizados son los electrodos, los semiconductores, los componentes ópticos y las microbalanzas.

La utilización de enzimas alostéricas como potenciales biosensores es una idea actual, ya que los sitios alostéricos pueden actuar como elementos de reconocimiento y los sitios activos como elementos transductores. Por lo tanto, las enzimas alostéricas

integran ambos componentes en una sola estructura lo que permite transmitir las señales de unión vía cambios conformacionales.

El marcaje sitio-específico de proteínas como herramienta para la construcción de biosensores permite incorporar señales, por ejemplo de tipo fluorescente dado que la detección fluorescente es una técnica analítica muy eficiente por su sensibilidad y relativa accesibilidad. El uso de proteínas como componente biológico en los biosensores es una prioridad en la biotecnología, ya que las proteínas le confieren una alta especificidad al biosensor. La estrategia es utilizar proteínas conocidas que al unir sus ligandos de manera específica presentan cambios conformacionales apreciables que modifican el ambiente local del componente transductor para modificarle sus propiedades espectroscópicas. Actualmente existen aplicaciones con algunos sensores basados en proteínas modificadas químicamente con sondas fluorescentes, como es el caso de la apo-enzima glucosa oxidasa marcada con ANS (ácido sulfónico 8-anilino-1-naftaleno) para determinar la concentración de glucosa (D'Auria et al., 1999).

Herramientas teóricas y experimentales para estudiar las interacciones proteína-ligando

Dinámicas moleculares. Los métodos de dinámica molecular (DM) fueron primero introducidos por Alder y Wainwright a fines de los años 50's (Alder, 1957) para estudiar las interacciones de esferas rígidas. Sin embargo, los avances más importantes en el campo de la DM se hicieron en el año de 1964, cuando Rahman realizó la primera simulación usando un potencial para argón líquido (Rahman, 1964). La primera simulación por DM de un sistema real fue hecha por Rahman y Stillinger en 1974. La

primera simulación de una proteína apareció en 1977, con el inhibidor pancreático de tripsina bovina –BPTI- (McCammon et al., 1977). Actualmente en la literatura se encuentran estudios de simulaciones de DM de proteínas solvatadas, de complejos proteína-DNA y de sistemas lipídicos, los cuales son empleados para calcular parámetros termodinámicos de uniones de ligandos y en el plegamiento de proteínas pequeñas principalmente. El número de técnicas de simulación molecular se ha expandido ampliamente; actualmente existen muchas técnicas especializadas para problemas particulares. Las simulaciones de DM proveen de información detallada de las moléculas que son simuladas; por ejemplo nos proporcionan parámetros estructurales de las moléculas tales como las fluctuaciones entre átomos, los cambios conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos en diferentes condiciones de temperatura y presión. Actualmente las dinámicas moleculares se usan de manera rutinaria para investigar la estructura, la dinámica y la termodinámica de macromoléculas biológicas y sus complejos (Ravindranathan et al., 2005). La DM también se usa en el refinamiento de estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X y RMN.

Anteriormente se pensaba que las proteínas eran estructuras relativamente rígidas, pero esto se ha reemplazado actualmente por un concepto de estructura dinámica, en la cual los movimientos internos y los cambios conformacionales juegan un papel esencial en sus funciones. Gracias a las herramientas de DM se pueden simular algunas de estas propiedades, obteniéndose información tanto para un análisis estructural detallado como para obtener parámetros termodinámicos teóricos del sistema (Karplus & McCammon, 2002). En las simulaciones de DM las posiciones, las orientaciones, y las velocidades de los átomos en un sistema molecular son simuladas computacionalmente en intervalos de

tiempo. Una de las limitaciones para utilizar estas herramientas con macromoléculas es el tiempo computacional requerido.

CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics). La minimización energética en proteínas es una herramienta que permite, entre otras cosas, mejorar la geometría de los enlaces lo que a su vez mejora sensiblemente al modelo estructural obtenido, por ejemplo, después de una dinámica molecular. Para ello se pueden emplear diferentes programas que utilizan algoritmos de cálculo de energía tales como CHARMM, AMBER o GROMOS.

CHARMM es un programa de simulación de macromoléculas que incluye minimización de energía, dinámicas moleculares y simulaciones de Monte Carlo. CHARMM es un software aplicado al modelaje de la estructura y el comportamiento de sistemas moleculares de una variedad de sistemas, que van desde moléculas orgánicas individuales hasta grandes proteínas oligoméricas. CHARMM también proporciona información sobre la flexibilidad estructural de las macromoléculas. CHARMM se basa en un algoritmo que utiliza una función de energía empírica para realizar minimizaciones energéticas, simulaciones de dinámicas moleculares y análisis vibracionales; también puede calcular eficientemente un gran número de propiedades moleculares, desde conformaciones de péptidos hasta dinámicas de movilidad entre dominios de las proteínas. La minimización energética ajusta la estructura de la molécula, buscando disminuir la energía del sistema. Para moléculas pequeñas CHARMM puede buscar un mínimo global, pero para macromoléculas examina siempre varios mínimos locales alrededor de una conformación en particular. CHARMM cuenta con seis diferentes

métodos interactivos de minimización de los cuales el método ABNR (adopted basic Newton-Raphson) es el recomendado para el caso de las minimizaciones de los modelos estructurales de proteínas.

Espectroscopia de fluorescencia. La espectroscopia de fluorescencia permite obtener información dinámica de las proteínas y se fundamenta en que una molécula excitada electrónicamente (aumento del nivel energético de los átomos) puede perder su energía de excitación y volver al estado inicial de varias maneras, entre las que se encuentran las transiciones radiativas y no radiativas. En este caso nos referiremos exclusivamente a las radiativas, que son las que corresponden al fenómeno de fluorescencia. Dicho en otras palabras, la energía de los fotones absorbidos por las moléculas son emitidos como fluorescencia cuando se produce una transición radiativa (Lakowicz 1999). La fluorescencia en las proteínas tiene una gran sensibilidad, ya que el límite de detección de los grupos fluorescentes se encuentra en el orden de nanomolar e inclusive picomolar (Bergström, 1999; Mansoor et al., 2002).

La fluorescencia intrínseca en las proteínas permite estudiar fenómenos globales a partir de los movimientos locales, y provee información sobre los complejos proteína-ligando o proteína-proteína que puede ser utilizada para analizar estas interacciones. (E.M. Kosower, 1986).

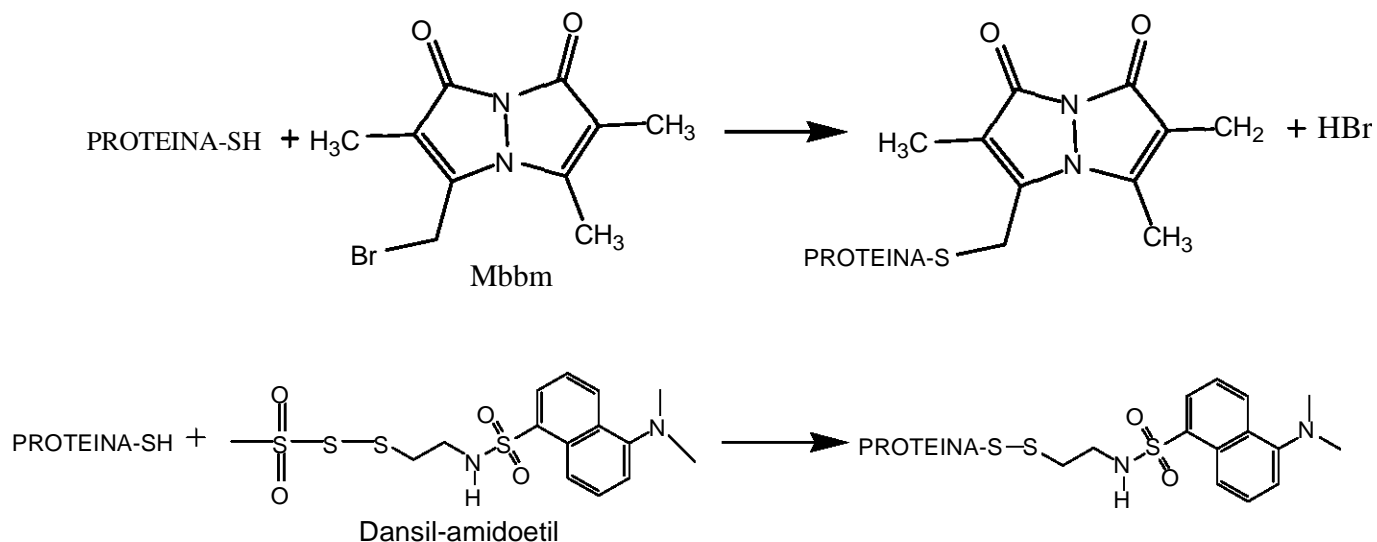
Marcaje sitio-específico con sondas fluorescentes. El propósito de esta técnica es monitorear regiones específicas de una proteína, siguiendo los cambios conformacionales asociados a la unión de diferentes ligandos en solución, para determinar así las relaciones

entre las propiedades fisicoquímicas de las sondas fluorescentes y los cambios conformacionales que presentan las proteínas. La mutagénesis dirigida y marcaje químico de reactivos fluorescentes son necesarios para llevar a cabo el marcaje sitio-específico de proteínas. Para ello, se eligen las zonas a ser modificadas a partir de un análisis estructural de las proteínas, ya que se requiere que la introducción de residuos de cisteínas perturbe lo menos posible al sistema original.

Como una técnica alternativa al estudio de la flexibilidad en proteínas la fluorescencia es una técnica ideal debido a los cambios en los parámetros espectrales de los grupos fluorescentes de acuerdo con diferentes condiciones tales como la accesibilidad al disolvente, los cambios en la polaridad de medio o su propia rotación o movilidad (Lakowicz 1999). Sin embargo, los fluoróforos no siempre se encuentran en regiones de interés. Este problema ha sido resuelto mediante la introducción de sondas fluorescentes en sitios específicos con el uso de técnicas de mutagénesis dirigida combinada con la modificación química (Bergström, 1999). La ventaja del marcaje sitio-específico es que las técnicas utilizadas para llevarlo a cabo se encuentran bastante difundidas, otra ventaja de introducir sondas fluorescentes en las proteínas (fluoróforos extrínsecos) es la elección de fluoróforos con tiempos de vida y eficiencia cuántica (ϕ) mayor al del grupo indol de los triptófanos. También podemos utilizar la técnica de transferencia de energía entre fluoróforos, que permite medir distancias moleculares entre dominios de proteínas (Selvin, 2000). Estudios recientes utilizando el marcaje sitio-específico con fluoróforos incorporados en la lisozima T4 han permitió relacionar el área accesible al solvente y la periodicidad de las posiciones marcadas con la estructura secundaria de la enzima determinada por estudios cristalográficos (Mansoor et al., 1999).

De manera similar, se pueden introducir sondas paramagnéticas a través de la modificación química de residuos de cisteína creados por mutagénesis dirigida. Este tipo de técnicas han permitido determinar distancias entre residuos ($\sim 20 \text{ \AA}$) y patrones de movimiento entre dominios de proteínas, o estudiar la topología de proteínas de membrana (Hubbell et al., 2000). El resultado más espectacular fue la generación de un modelo estructural tridimensional de una proteína integral de membrana, el canal de potasio, que coincide con la estructura obtenida por difracción de rayos X y que permitió medir distancias moleculares entre residuos que se encuentran en la boca del canal de potasio (Columbus & Hubbell, 2002).

Varias de las sondas fluorescentes reactivas al grupo sulfhidrilo de las cisteínas son comercializadas por la compañía Toronto Research Chemical Inc., Canada. A la fecha, se encuentran en el catálogo de esta compañía 15 sondas diferentes con derivados de los grupos dansilo, cumarina, rodamina, etc. La compañía Molecular Probes, USA, cuenta con la sonda fluorescente monobromobimano (Mbbm) que es pequeña y cuyas propiedades espectrales se conocen (Kosower et al., 1980; Mansoor et al., 1999). El marcaje sitio-específico permite introducir varias sondas fluorescentes con propiedades diferentes. Por ejemplo se pueden seleccionar un determinado par donador-aceptor para medir distancias intramoleculares (Bergström, 1999; Ratner et al., 2002). El mecanismo general de la marcación química se presenta en le Esquema 1.



Esquema 1. Reacciones de los fluoróforos Mbbm y Dansil-amidoetil con residuos de cisteína de una proteína para obtener una proteína marcada específicamente.

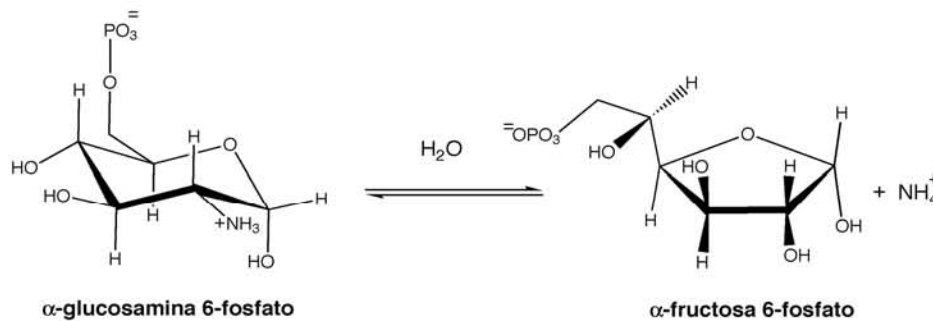
La regulación alostérica

La transición alostérica implica la comunicación entre regiones distantes en las proteínas, mediante la transmisión de señales conformacionales dentro de sí mismas. Los cambios conformacionales que son la base estructural de la regulación alostérica se deben principalmente a la existencia de conformeros con propiedades de unión o catalíticas diferentes y que están en equilibrio entre sí. Las enzimas alostéricas controlan muchos procesos esenciales para la función celular (Perutz, 1989); éstas juegan un papel importante en diferentes procesos, como la regulación metabólica, la respuesta de receptores, la expresión de genes, el plegamiento de proteínas asistido por chaperonas y la comunicación intercelular. Existen diferentes modelos de ajuste cinéticos para explicar el comportamiento alostérico de las enzimas alostéricas, uno de ellos es el modelo de Monod-Wyman-Changeux que plantea que una proteína alostérica puede ser descrita como un equilibrio entre al menos dos diferentes estados conformacionales, uno con baja o nula afinidad por el

sustrato definido como estado T (Tenso) y otro con alta afinidad por el sustrato llamado estado R (Relajado).

La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa como modelo de estudio

Un buen modelo para estudiar los cambios conformacionales de las proteínas en solución es la transición alostérica de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa (EC 3.5.99.6 antes EC 3.5.1.10) de *E. coli*. Esta enzima cataliza la reacción de isomerización y desaminación de la D-glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) para formar fructosa-6-fosfato (Fru6P) más el ion amonio (Comb & Roseman, 1958; Midelfort & Rose, 1977; Calcagno et al., 1984), Esquema 2.



Esquema 2. Reacción catalizada por la Glucosamina-6-fosfato desaminasa.

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) es una proteína homohexamérica (Calcagno et al., 1984). Su estructura primaria se conoce por la secuencia de nucleótidos del gen nagB (Rogers et al., 1988). Las estructuras cristalográficas de la enzima resueltas a nivel atómico para las formas T y R presentan un arreglo hexamérico definido como un dímero de trímeros con un eje de simetría de orden

tres y tres ejes de orden dos perpendiculares al eje de orden tres, que cruzan el centro de la molécula. La estructura presenta un dominio α/β abierto, con siete hebras β en la cavidad central rodeadas por ocho hélices α (Figura 1).

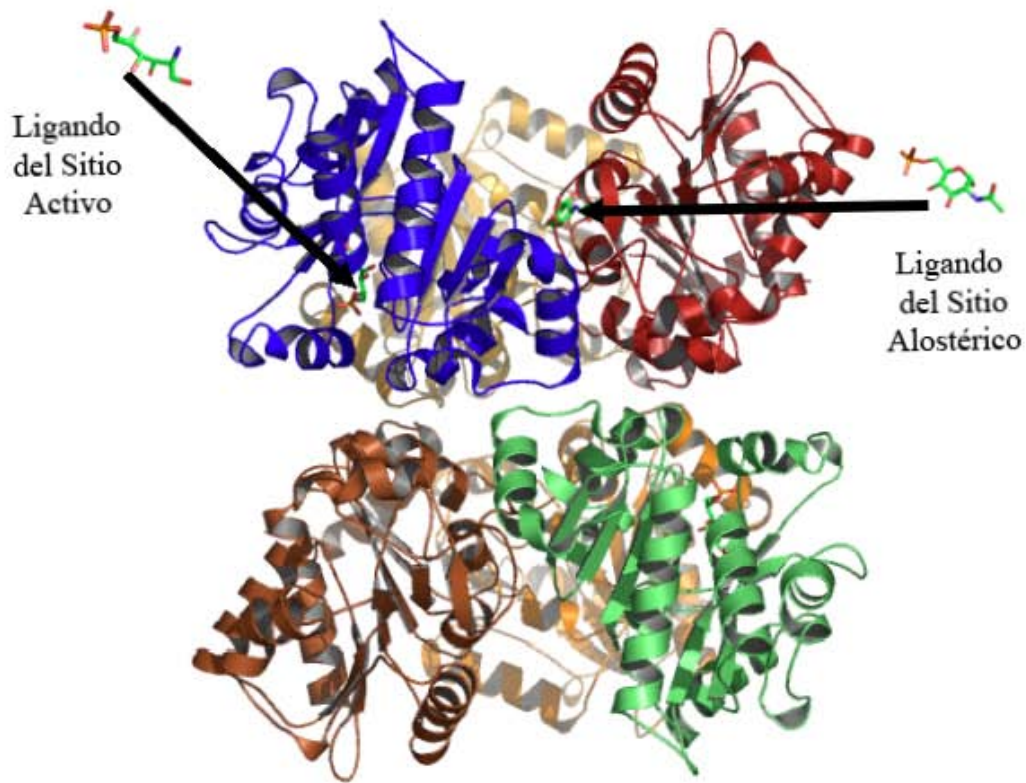


Figura 1. Estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa; la figura fue realizada a partir del archivo PDB 1fs6 con el programa PyMOL.

Como ya se comentó, esta enzima tiene dos estados cuaternarios T y R elucidados cristalográficamente (Figura 2 y Video 1). La transición entre ambos estados se desencadena por la unión de ligandos tanto del sitio activo como del sitio alostérico de la enzima; ésta se activa alostéricamente por *N*-acetilglucosamina-6-fosfato -GlcNac6P- (Calcagno et al., 1984; Altamirano et al., 1995; Montero-Moran et al., 1998), ver Figura 1. Sus propiedades alostéricas y sus constantes cinéticas se describen satisfactoriamente por el modelo de Monod-Wyman-Changeux (Monod et al., 1965; Calcagno et al., 1984).

A concentraciones saturantes de activador, la GlcN6P desaminasa tiene una cinética de saturación tipo hiperbólica. También cuenta con un ligando del sitio activo (ver Figura 1), en este caso un inhibidor competitivo, el 2-amino-2-desoxi-glucitol-6-fosfato (GlcN-ol-6P). La GlcN6P desaminasa se comporta como un típico sistema K, en donde el activador alostérico se une al conformero R (Calcagno et al., 1984; Altamirano et al., 1995). El estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa utilizando el marcaje sitio-especifico de sondas fluorescentes podrá proporcionar información detallada sobre cómo se transmite la transición alostérica en solución.

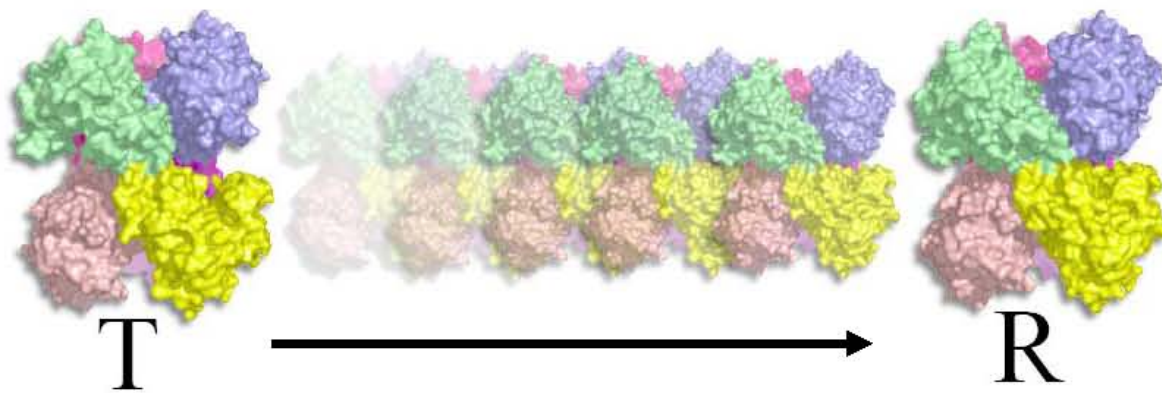


Figura 2. Transición alostérica (T-R) de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*; la figura fue realizada a partir de los archivos de pdb 1fs6 (T) y 1frz(R) con el programa PyMOL.

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

Objetivos

Generales

Usar el marcaje sitio-específico de proteínas como una herramienta para seguir los cambios conformacionales que lleva a cabo la glucosamina 6-fosfato desaminasa al interactuar con sus ligandos, y con ello poder establecer relaciones entre la estructura y la función de la misma.

Estabilizar al conformero R de la glucosamina 6-fosfato desaminasa, colocando cisteínas entre los trímeros de la enzima para que formen un enlace disulfuro que impida la rotación entre ellos.

Particulares

1. Marcar la glucosamina 6-fosfato desaminasa en las posiciones 164 y 206 con los fluoróforos monobromobimano y Dansil-amidoetil-MTS.
2. Monitorear la transición alostérica de la glucosamina 6-fosfato desaminasa marcada, titulando con los ligandos GlcNAc6P (activador alostérico) y GlcN-ol-6P (inhibidor competitivo).
3. Realizar mutaciones “in silico” y minimizaciones moleculares en las posiciones elegidas.

4. Construir mutantes en posiciones factibles para la formación de un puente disulfuro entre los trímeros de la enzima.

5. Realizar experimentos cinéticos y físicos en condiciones oxidantes y reductoras para comprobar la estabilización del conformero R.

Materiales y métodos

Reactivos. La mayoría de los reactivos se obtuvieron a partir de Sigma Aldrich S.A. de C.V., México. Los marcadores fluorescentes Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS se obtuvieron de la compañía Toronto Chemical Research (Toronto, Canada). La matriz de afinidad agarosa *N*-aminohexanoil-glucosamina-6-fosfato, usada para la purificación de la GlcN6P desaminasa, se preparó utilizando el procedimiento ya descrito (Calcagno et al., 1984). El activador alostérico GlcNAc6P y el inhibidor competitivo GlcN-ol-6P se prepararon con los métodos reportados anteriormente (Altamirano et al., 1995).

Cepas y plásmidos. La GlcN6P desaminasa silvestre y las mutantes se obtuvieron a partir de una cepa de *E. coli.*, que tiene insertado el plásmido pTZ18R conteniendo al gen de la desaminasa (*nagB*). La expresión de la proteína se regula por medio del promotor *lac* (Altamirano et al., 1995). Se construyeron plásmidos similares para la expresión de las mutantes. Las células competentes usadas para la expresión de la proteína fueron de tipo IBPC590, en las que la expresión de la copia cromosómica del gen *nagB* se eliminó por inserción de un cassette de resistencia a karamicina (Altamirano et al., 1991). Esta cepa es además $\Delta lacI$, por lo que la expresión de la enzima GlcN6P desaminasa es constitutiva.

Mutagénesis. La mutagénesis sitio dirigida para el cambio de tres cisteínas por serinas se realizó por sucesivas mutagénesis individuales a partir del plásmido silvestre en el siguiente orden: C118S, C228S y C239S. Las mutantes con una única cisterna reactiva, se construyeron a partir del plásmido que contiene la triple mutante

C118S/C228S/C239S. La mutagénesis sitio dirigida se realizó con el Quick Change Kit (Stratagene, La Jolla, CA. USA) usando la enzima Pfu; siguiendo las especificaciones del vendedor. La reacción de PCR se llevo a cabo utilizando las siguientes condiciones: la cantidad de plásmido pTZ18RnagB fue de 50 ng y la de los oligonucleótidos fue de 125 ng; se hicieron 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto y polimerización a 68 °C por 10 minutos. Los oligonucleótidos utilizados para obtener la mutante C118S fueron: 5'-GAC GCC GAG AGC CGC CAG TAT-3' y 5'-ATA CTG GCG GCT CTC GGC GTC-3'; para la doble mutante C118S/C228S fueron: 5'-ATC ATG GTG AGC GAT GAA CCT TC-3' y 5'-GA AGG TTC ATC GCT CAC CAT GAT-3' y para la triple mutante C118S/C228S/C239S fueron: 5'-ATC ATG GTG AGC GAT GAA CCT TC-3' y 5'-GA AGG TTC ATC GCT CAC CAT GAT-3'. Para la mutante con una única cisteína reactiva en la posición 164 (C118S/C228S/C239S/H164C) los oligonucleótidos fueron: 5'-TAT CAA AAC CCT GAC TTG CGA CAC TC-3 y 5'-AGT GTC GCA AGT CAG GGT TTT GAT AC-3. Para la mutante con una única cisteína reactiva en la posición 206 (C118S/C228S/C239S/S206C) los oligonucleótidos fueron: 5'-CGCT GGG TTG CCA GAA AGC AC -3' y 5'-GTG CTT TCT GGC AAC CCA GC-3'. Para la mutante C118S/C228S/C239S/S206C/D165C, la cual fue construida sobre la mutante C118S/C228S/C239S/S206C, los oligonucleótidos fueron: 5'-ACC CTG ACT CAT TGC ACT CGC GTC GCA AAC-3' y 5'-GTT TGC GAC GCG AGT GCA ATG AGT CAG GGT-3'. Después de los experimentos de mutagénesis, el producto de amplificación de la PCR se digirió con la enzima DpnI y se uso para transformar células competentes tipo XL1-blue, siguiendo las indicaciones del vendedor. Las mutaciones deseadas se

confirmaron por la secuenciación del vector con un Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

Expresión y purificación de la enzima silvestre y las mutantes. La expresión de la proteína en la cepa IBPC590 $\Delta lacI$ es de tipo constitutiva, se hizo a una temperatura de 30 °C. La GlcN6P desaminasa se purificó siguiendo el método reportado previamente (Calcagno et al., 1984) usando cromatografía de afinidad. La purificación de las diferentes mutantes se siguió y verificó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Concentración de proteína. La concentración de la enzima silvestre y las mutantes se calculó utilizando la absorptividad molar de la GlcN6P desaminasa $\epsilon_{280} = 202000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Calcagno et al., 1984; Altamirano et al., 1995). Los datos de concentración empleados se refieren siempre a la proteína en su forma hexamérica. La concentración de las mutantes modificadas químicamente con Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS se determinaron por el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), utilizando a la enzima silvestre como estándar. Además, a las proteínas modificadas químicamente con Mbbm se les determinó su concentración por la absorptividad molar del Mbbm unido a proteínas [$\epsilon_{380} = 5000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$] (Mansoor et al., 1999).

Ensayos enzimáticos. La GlcN6P desaminasa fue ensayada en dirección de la formación de Fru6P midiendo la fructosa a tiempos fijos mediante un método

colorimétrico, según el reporte previo (Calcagno et al., 1984). El progreso de la reacción siempre fue menor al 5% de la conversión del sustrato inicial. Las mediciones se hicieron en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a una temperatura de 30 °C; los datos cinéticos se analizaron utilizando una regresión no lineal con el programa Origin 7 (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). Los datos experimentales obtenidos se ajustaron y analizaron con la ecuación de Monod-Wyman-Changeux Ecuación 1 (Monod et al., 1965; Montero-Moran et al., 2001) y con la ecuación de un modelo alostérico que contempla la presencia de dos tipos de sitios de unión en la proteína alostérica Ecuación 2 (Yifrach & Horovitz, 1998).

$$v_0 = \frac{k_{cat}n[E_t][Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1} + \alpha(1+\alpha)^{n-1}]}{L(1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n} \quad (1)$$

En donde α es la concentración de sustrato normalizada $[\text{GlcN6P}/k_m^R]$, L es la relación entre los dos conformeros T/R, c es la relación de la constante de disociación para los estados R y T (k_R/k_T) y $[E_t]$ es la concentración total de proteína.

$$v_0 = \frac{V_{\max 1} + V_{\max 2}([S]/K_1)^n + V_{\max 3}([S]/K_1)^n ([S]/K_2)^m}{1 + ([S]/K_1)^n + ([S]/K_1)^n ([S]/K_2)^m} \quad (2)$$

En donde $V_{\max 1}$, $V_{\max 2}$ y $V_{\max 3}$ son las velocidades iniciales máximas, $[S]$ es la concentración de sustrato, K_1 y K_2 son las constantes de disociación aparentes y n y m son los coeficientes de Hill.

Modificaciones químicas con Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS en las cisteínas reactivas de la GlcN6P desaminasa. La modificación química de las mutantes de la GlcN6P desaminasa en las posiciones 164 ó 206 se realizaron con un exceso molar de 10 veces de los fluoróforos respectivos, disueltos en una solución acuosa al 20%(v/v) de DMSO, con una concentración final de solvente orgánico menor al 5% (v/v), para evitar

la desnaturalización de la proteína. Después de realizar la modificación química, las muestras se incubaron en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 4 °C por 12 horas. La concentración de proteína usada varió entre 5 y 10 mg/ml. Previamente al marcaje, las muestras de proteína fueron reducidas con DTT 1 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, por 1 hora a 4 °C, seguido de una filtración en una columna HR-100 (Pharmacia, Biotech), para eliminar el exceso de DTT. Después de la modificación química, el exceso del marcador se eliminó realizando una serie de lavados (concentración y dilución de la proteína) en filtros Amicon Ultra-4 con un corte de 10 kDa, hasta alcanzar un factor de dilución de 10,000 veces. La eficiencia del marcaje se determinó por la reactividad de los grupos tioles de las cisteínas de la proteína al cromogénico DTNB (5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoato), que forma el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) al reaccionar, el cual es cuantificado por su absorptividad molar $\epsilon_M = 14250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a una λ de 409 nm, temperatura de 25 °C y un pH de 7.4 (Eyer et al., 2003).

Determinaciones por fluorescencia en estado estacionario. La fluorescencia en estado estacionario se determinó en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champine, IL USA), bajo las siguientes condiciones experimentales: temperatura de 30 °C, concentración final de enzima de 1 μM en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. La λ de excitación para la sonda fluorescente Mbbm fue de 381 nm y para el Dansil-amidoetil-MTS fue de 341 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia en los experimentos de titulaciones con los ligandos de la GlcN6P desaminasa (GlcNAc6P y GlcN-ol-6P) se colectaron en los intervalos de 450 a 500 nm y de 450 a 550 nm para el Mbm y Dansil-amidoetil-MTS respectivamente, con un paso de luz de 0.5 nm. Las

rejillas de paso de luz para la excitación y la emisión fueron de 4 y 8 nm respectivamente. La proteína modificada con Dansil-amidoetil-MTS requirió aproximadamente 20 minutos para estabilizar la emisión de fluorescencia basal.

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

Rendimiento cuántico. El rendimiento cuántico (ϕ) de los fluoróforos tanto en forma libre como unidos a la proteína, así como también el de los fluoróforos intrínsecos de la enzima silvestre, se determinó utilizando la siguiente relación (Chen, 1965).

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

En donde los subíndices x y est se refieren a la solución problema y estándar respectivamente, ϕ es el rendimiento cuántico, F es la intensidad de fluorescencia relativa y DO es la densidad óptica a la λ de excitación; como estándar se uso sulfato de quinina, el cual tiene un ϕ de 0.55 en H₂SO₄ 1N. Los espectros de emisión de fluorescencia de los diferentes fluoróforos se colectaron a diferentes intervalos; para el sulfato de quinina fue

de 370 a 700 nm (excitando a una λ de 360 nm), para la enzima silvestre fue de 305 a 450 nm (con una λ_{exi} de 295 nm), para las enzimas modificadas químicamente con Mbbm fue de 391 a 700 nm (con una λ_{exi} de 381 nm) y para las modificadas químicamente con Dansil-amidoetil-MTS fue de 350 a 700 nm (con una λ_{exi} de 341 nm). La fluorescencia del amortiguador fue substraída de cada muestra antes de determinar el ϕ en todos los casos.

Modelaje molecular y visualización molecular de los conformeros T y R de la GlcN6P desaminasa. Las estructuras cristalograficas y los modelos estructurales generados fueron visualizados con el programa PyMOL (DeLano, 2004). El análisis teórico de los efectos de la introducción de los triptófanos en la posición 164 ó 206 (mutaciones “in silico”) se realizó con el programa PyMOL, buscando el rotámero del triptófano con menor energía a partir de la librería de rotámeros del mismo programa. Los archivos de PDB de los conformeros T y R fueron 1fs6 y 1frz, respectivamente. Después, de reemplazar los triptófanos dentro de los archivos de PDB de cada conformero, se les realizó una minimización molecular con el programa CHARMM Beta Release Versión 28b1 (Mainhart et al., 1984; Patel et al., 2004), en una computadora con sistema operativo Linux-2.4.20-8 (i686), con un CPU Athlon a 1.5 GHz, 2.0 GB de RAM, utilizando el método ABNR (adopted basic Newton-Raphson) y 500 pasos de minimización. Los cálculos del área superficial accesible al solvente se realizaron a partir de los archivos PDB correspondientes a los conformeros T y R, con el programa NACCESS, el cual usa el algoritmo de Richard (Hubbard et al., 1992), considerando un radio estándar del solvente de 1.4 Å.

Resultados y discusión

Comportamiento cinético de la enzima silvestre y de la triple mutante C118S/C228S/C239S. La GlcN6P desaminasa en su forma silvestre presenta un comportamiento cinético tipo K. Esta enzima tiene cuatro residuos de cisteínas por monómero (118, 228, 219 y 239), dos de las cuales son altamente reactivas a compuestos de tipo DTNB en el conformero T (118 y 239), es decir, son sensibles al ataque nucleofílico en su grupo sulfihidrido (Altamirano et al., 1992). Para realizar el marcaje sitio-específico se reemplazaron estos residuos. Según reportes previos (Altamirano et al., 1992), el reemplazamiento de las cisteínas 118 y 239 por serinas no modifica la activación alostérica tipo K de la enzima. La cisteína 219 se encuentra localizada en la parte interna de la enzima y parece ser importante para la estabilidad, ya que según los datos cristalográficos forma un enlace disulfuro (Oliva et al., 1995), lo que explica que este residuo no sea reactivo. Por lo tanto, para conseguir un sistema ideal para realizar el marcaje sitio-específico, de inicio se reemplazaron tres de las cuatro cisteínas por serinas, dando como resultado una triple mutante C118S/C228S/C239S que no mostró reactividad al DTNB en estado nativo. La Tabla 1 muestra los parámetros cinéticos de la enzima silvestre y de la triple mutante (C118S/C228S/C239S). La triple mutante es activa y muestra un comportamiento similar a la enzima silvestre para la reacción de desaminación. La $K_{0.5}$ para el sustrato disminuye a concentraciones altas de activador alostérico, en la misma forma que en la enzima silvestre. Sin embargo, la k_{cat} determinada fue de 96 s^{-1} (~66% de la silvestre); los parámetros L y c en el modelo de MWC también fueron similares a la enzima silvestre (Tabla 1). Podemos por tanto concluir que las propiedades cinéticas de la triple mutante se mantienen similares a las de la enzima

silvestre. Considerando a la enzima triple mutante (C118S/C228S/C239S) como un sistema adecuado de inicio para realizar el marcaje sitio-específico.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la GlcN6P desaminasa; enzima silvestre y triplemutante C118S/C228S/C239S.

	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_M (mM) ^b	$K_{0.5 \text{ GlcN6P}}$ (mM) ^c	k_{cat} / K_M (M/s)	L ($\times 10^6$) ^d	c^e
GlcN6P desaminasa silvestre	153 \pm 0.08	0.5 \pm 0.04	5.2 \pm 0.04	3.06 $\times 10^5$	1.0 \pm 0.04	0.02 \pm 0.002
GlcN6P desaminasa C118S/C228S/ C239S	96 \pm 0.06	0.46 \pm 0.07	5.1 \pm 0.06	2.08 $\times 10^5$	0.8 \pm 0.05	0.022 \pm 0.005

^aParámetros estimados a partir del ajuste con el modelo de MWC (Monod et al., 1965). ^bParámetros estimados a partir del ajuste con la ecuación de Michaelis-Menten en concentraciones saturantes de activador alostérico.

^cParámetros estimados a partir del ajuste con la ecuación de Hill en ausencia del activador alostérico.

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

Cinéticas de los datos de la GlcN6P desaminasa de E. coli modificada químicamente en las posiciones 164 y 206 con Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS. Para obtener un sistema con cisteínas reactivas en una posición se construyeron mutantes en las posiciones 164 y 206a partir de la triple mutante C118S/C228S/C239S. Las mutantes obtenidas, H164C/C118S/C228S/C239S y S206C/C118S/C228S/C239S, fueron llamadas H164C y S206C, respectivamente, cuando estas mutantes se modificaron químicamente con los fluoróforos Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS, fueron llamadas Bimano-H164C, Bimano-S206C, Dansil-H164C y Dansil-S206C. La eficiencia del marcaje con los fluoróforos de estas mutantes fueron alrededor del 98%, determinado por la reactividad residual frente al DTNB (ver Materiales y métodos). Las mutantes modificadas químicamente con los fluoróforos no mostraron cambios en cuanto a su activación alostérica de tipo K, pero la k_{cat} se redujo aproximadamente en un 25 % con respecto a la enzima de inicio (triple mutante). No obstante siguieron manteniendo el comportamiento tipo K en todos los casos (Tabla 2 y Figura 3). Los datos de velocidad inicial se ajustaron con el modelo de MWC y se obtuvieron los siguientes resultados: a) la k_{cat} de las cuatro

enzimas se encuentran entre 70 y 72 s⁻¹ después del marcaje; b) la K_M de las diferentes mutantes determinadas en presencia de activador alostérico (~2 mM) se mantienen alrededor de 0.5 mM en todos los casos y la $K_{0.5}$ determinadas en ausencia de activador alostérico fueron alrededor de 5.0 mM; c) la relación k_{cat} / K_M prácticamente no cambió; d) el parámetro L varió de 0.7×10^6 a 1.0×10^6 y el valor del parámetro c se encuentra entre 0.02 a 0.04. Estos resultados nos indican que el equilibrio entre los conformeros T y R de las mutantes modificadas químicamente está desplazado hacia el conformero T en ausencia de ligandos, semejante a lo que mostró la enzima silvestre. Por lo tanto, el ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P) y el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) se utilizaron para inducir la transición alostérica. El ligando del sitio activo (inhibidor competitivo) se empleó en lugar del sustrato, ya que según parámetros cinéticos y evidencias cristalográficas el inhibidor competitivo induce la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de T a R (Oliva et al., 1995; Horjales et al., 1999).

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las mutantes H164C y S206C modificadas químicamente con los fluoróforos Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS.

	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_M (mM) ^b	$K_{05(GlcN6P)}$ (mM) ^c	k_{cat} / K_M (M/s)	L^d	c^e
Bimano-H164C	71.6 ± 0.08	0.52 ± 0.014	5.1 ± 0.011	1.30 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁶	0.042 ± 0.003
Dansil-H164C	70.6 ± 0.11	0.51 ± 0.021	5.2 ± 0.023	1.38 × 10 ⁵	0.8 × 10 ⁶	0.020 ± 0.002
Bimano-S206C	69.5 ± 0.07	0.52 ± 0.018	4.6 ± 0.052	1.33 × 10 ⁵	0.75 × 10 ⁶	0.038 ± 0.004
Dansil-S206C	70.9 ± 0.11	0.49 ± 0.023	5.1 ± 0.043	1.44 × 10 ⁵	0.9 × 10 ⁶	0.033 ± 0.002

^aParámetros cinéticos a partir del ajuste con el modelo de MWC (Monod et al., 1965) ^bParámetros cinéticos a partir del ajuste con la ecuación de Michaelis-Menten en concentraciones saturantes de activador alostérico. ^cParámetros cinéticos a partir del ajuste con la ecuación de Hill en ausencia del activador alostérico. ^{d,e}Parámetros cinéticos a partir del ajuste con la ecuación de MWC en ausencia del activador alostérico.

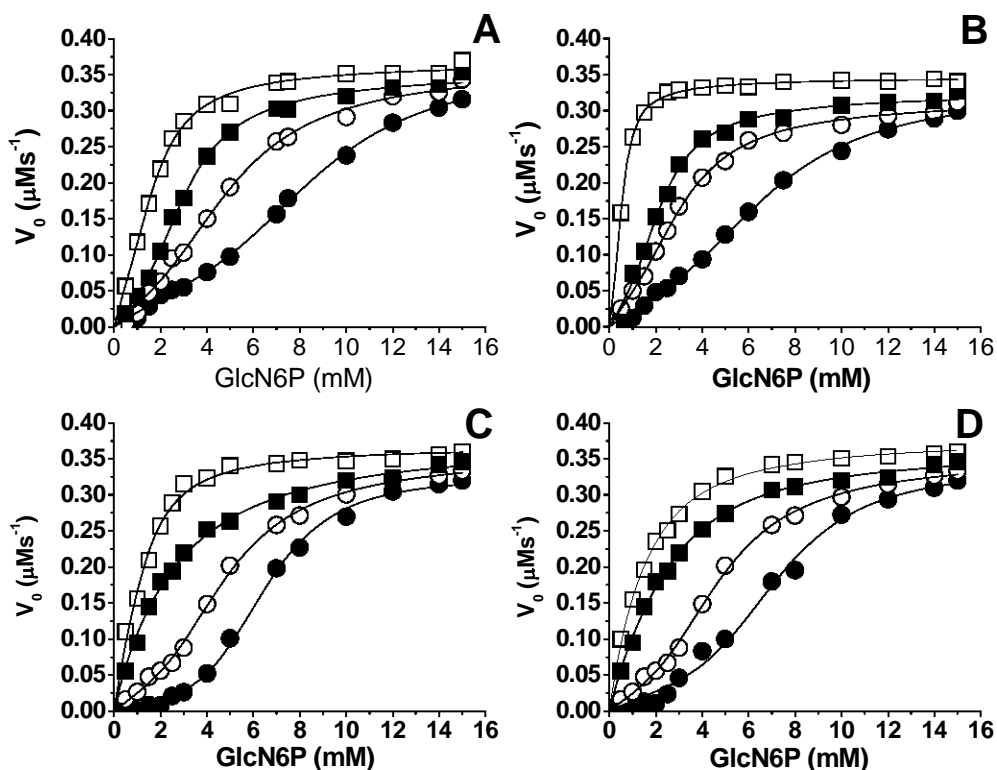


Figura 3. Curvas de saturación con sustrato para la reacción de desaminación de las mutantes Bimano-H164C (A), Dansil-H164C (B), Bimano-S206C (C) y Dansil-S206C (D); a diferentes concentraciones del activador alostérico (GlcNac6P) 0 mM (●), 0.05 mM (○), 0.5 mM (■) y 1 mM (□). Las velocidades iniciales fueron expresadas en μM de fructosa producida por segundo y por molécula de enzima (hexámero), medidas a 30 °C en 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5). Las curvas corresponden al ajuste de los datos utilizando el modelo de MWC.

Propiedades espectrales de los fluoróforos Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS unidos a cisteína. Las propiedades espectroscópicas del Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS unidos a las cisteínas se analizaron con respecto a la polaridad relativa del disolvente. Las propiedades espectroscópicas del Mbbm se describieron anteriormente por Mansoor y colaboradores (Kosower et al., 1979; Kosower et al., 1980; Mansoor et al., 1999), pero para el Dansil-amidoetil-MTS no existe en la literatura una caracterización espectroscópica. Por lo tanto, se realizó la caracterización tanto del Dansil-amidoetil-

MTS como del Mbm, para este último con el propósito de compararlo con los datos en la literatura y establecer nuestras condiciones de trabajo. El espectro de absorción del Mbm muestra dos longitudes de onda máxima (λ_{\max}) a 250 nm y 400 nm; una λ_{\max} de emisión a 473 nm excitando a una λ de 381 nm. El Dansil-amidoetil-MTS posee una λ_{\max} de absorción a 341 nm y dos λ_{\max} de emisión a 498 nm y 532 nm excitando a una λ de 341 nm. Para estudiar el cambio que muestran los espectros de emisión en fluorescencia con respecto a la polaridad del solvente (Figura 4) se realizaron mezclas de agua ($\epsilon = 79.5$) y dioxano ($\epsilon = 2.2$). Los espectros de emisión de fluorescencia para el Mbm unido a cisteína mostraron un cambio en la λ_{\max} de ~440 a 475 nm (λ_{exc} 381 nm) cuando la polaridad del solvente aumentó (Figura 4A), y se observaron dos relaciones lineales en diferentes intervalos (Kosower et al., 1979; Mansoor et al., 1999). El Dansil-amidoetil-MTS unido a cisteína mostró dos λ_{\max} en el espectro de emisión de fluorescencia: $\lambda_{\max 1}$ que cambió de ~490 a 505 nm y la $\lambda_{\max 2}$ que cambió de ~530 a 560 nm (λ_{exc} 341 nm) cuando la polaridad del solvente se incrementó. Para el primer máximo ($\lambda_{\max 1}$) se observaron dos intervalos lineales, mientras que para el segundo máximo ($\lambda_{\max 2}$) se observó sólo una correlación lineal (Figura 4A). Asimismo, la relación entre la polaridad del solvente y la intensidad de fluorescencia (IF) muestra dos zonas lineales para la $\lambda_{\max 1}$ y una para la $\lambda_{\max 2}$ (Figura 4B). Por lo tanto, ambos fluoróforos resultan excelentes marcadores para correlacionar la polaridad del disolvente con los cambios en los espectros en fluorescencia (Kosower et al., 1980; Mansoor et al., 1999). Las relaciones lineales fueron ajustadas mediante regresión lineal. Para el Mbm-cisteína, $\lambda_{\max} = 1.63$ (nm/ ϵ) X + 434.5 nm (para una ϵ entre ~2-18) con una $r^2=0.993$ en donde X es la constante dieléctrica (ϵ); $\lambda_{\max} = 0.278$ (nm/ ϵ) X + 457.3 nm (para una ϵ entre ~18-60)

con una $r^2=0.987$; para el Dansil-amidoetil-MTS-cisteína, $\lambda_{\max1} = 0.185$ (nm/ ϵ) X + 494.2 nm (para una ϵ entre ~2-56) con una $r^2=0.998$, $\lambda_{\max2} = 0.419$ (nm/ ϵ) X + 527 nm (para una ϵ entre ~2-80) con una $r^2=0.991$. Para el Dansil-amidoetil-MTS-cisteína las relaciones de intensidad fluorescente con la constante dieléctrica, son: $IF(\lambda_{\max1}) = -0.233$ (u.a./ ϵ) X + 15.74 u.a. (para una ϵ entre ~25-56) con una $r^2=0.992$, $IF(\lambda_{\max2}) = -0.236$ (u.a./ ϵ) X + 13.61 u.a. (para una ϵ entre ~2-56) con una $r^2=0.994$.

Una de las razones por las que se utilizaron estas sondas fluorescentes es la gran sensibilidad que poseen debido a su alto rendimiento cuántico (ϕ), en comparación con el de los fluoróforos intrínsecos de las proteínas. Por ejemplo, el Mbm-proteína tiene una eficiencia cuántica de 0.1461 comparado con 0.0007 de los fluoróforos intrínsecos de la GlcN6P desaminasa (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento cuántico (ϕ) de Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS solos y unidos a diferentes elementos.

	ϕ
Quinina ^a	0.55
Mbbm	0.0241
Mbm-Cys	0.0166
Mbm-Proteína	0.1461
Dansil-aminoetil-MTS	$0.0451^1/0.0254^2$
Dansil-aminoetil-MTS -Cys	$0.0555^1/0.0412^2$
Dansil-aminoetil-MTS-Proteína	$0.0936^1/0.0735^2$
Trp (GlcN6P deaminase)	0.0007

^a Sulfato de quinina, utilizado como estándar.

¹ $\lambda_{\max1}$ comprendida en el intervalo de 490-505 nm.

² $\lambda_{\max2}$ comprendida en el intervalo de 530-560 nm.

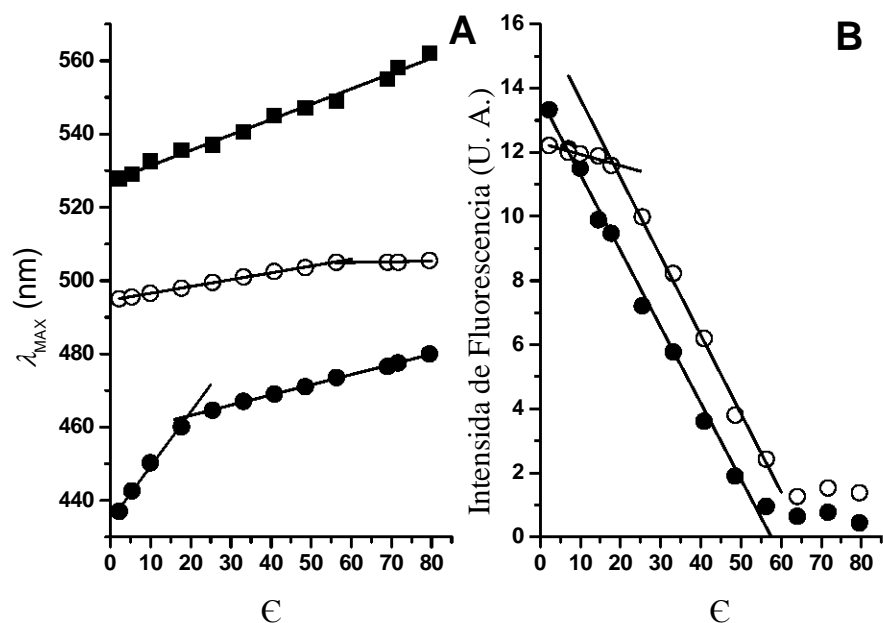


Figura 4. Efectos de la polaridad del solvente sobre los espectros de emisión de fluorescencia del Mbm-Cisteína y del Dansil-amidoetil-MTS-Cisteína. Los espectros de emisión de fluorescencia se determinaron a 30 °C en mezclas agua:dioxano para generar las diferentes polaridades del solvente. A) Relaciones lineales entre las λ_{max} de los espectros de emisión de fluorescencia y la constante dieléctrica del disolvente. Para el Mbm-Cisteína (●) y Dansil-amidoetil-MTS-Cisteína (λ_{max1} ○, y λ_{max2} ■). B) Relaciones lineales entre los cambios en la intensidad de fluorescencia de los espectros de emisión y la constante dieléctrica del medio para las longitudes máximas de Dansil-amidoetil-MTS-Cisteína, λ_{max1} (○) y λ_{max2} (■).

Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca relacionados al cambio en el microambiente de las posiciones 164 y 206 modificadas químicamente, al adicionarles los ligandos del sitio activo y alostérico a concentraciones saturantes. Las ventajas experimentales de la incorporación de fluoróforos extrínsecos a la proteína, como el Mbm (λ_{exi} 381 nm) o el Dansil-amidoetil-MTS (λ_{exi} 341nm), además de su alta eficiencia cuántica, es que se trabaja a una λ que no interfiere con los fluoróforos intrínsecos de las proteínas, por lo que la señal producida dependerá exclusivamente del fluoróforo extrínseco y de su posición en la proteína. Existe un efecto de apagamiento en la emisión de fluorescencia en el Mbm por los triptófanos cuando éstos se encuentran a

menos de 10 Å de distancia entre sí (Mansoor et al., 2002). No obstante, la posición 164 está localizada a más de 10 Å del triptofano más cercano en la enzima (Trp224), que además se encuentra a 14.7 Å del NE2 del residuo His143 (residuo del sitio activo) y a 20.2 Å del NH2 del residuo Arg158 (residuo del sitio alostérico), por lo que también se evita una posible influencia de los fluoróforos en estos dos sitios (ver video 2). Adicionalmente, se tituló el Mbm-cisteína con GlcNAc6P y GlcN-ol-6P hasta 1 mM y 5 mM respectivamente, observándose que los ligandos no producen cambios en los espectros de emisión de fluorescencia (datos no mostrados). Por lo tanto, los cambios en los espectros de fluorescencia de los fluoróforos extrínsecos observados al realizar las titulaciones de la enzima modificada químicamente con estos dos ligandos se deben exclusivamente a los cambios conformacionales producidos por los ligandos. Por lo cual, se pueden relacionar los cambios en el microambiente con los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia. Los espectros de emisión de fluorescencia de la enzima Bimano-H164C mostraron una λ_{max} de 475 nm en ausencia de ligandos, cambiando a 472 nm después de la adición del ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P) a concentraciones saturantes, o a 468 nm con la adición de ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P) a concentraciones saturantes (Tabla 4 y Figura 5A). Para la enzima marcada en la posición 206 (ver video 3), Bimano-S206C, la λ_{max} cambió de 477 nm en ausencia de ligandos a 474 nm en presencia de GlcN-ol-6P a concentración saturante y a 472 nm en presencia de GlcNAc6P a concentración saturante (Tabla 4 y Figura 5B). La posición 206 se encuentra a 16.24 Å del NE2 del residuo His143 y a 27.20 Å del NH2 del residuo Arg158. Por lo tanto, en ambas posiciones (164 y 206) se detectó una disminución en la polaridad del microambiente cuando se produce la transición al conformero R con cualquiera de los dos

ligandos. De acuerdo con nuestra curva de polaridad relativa (Figura 4), se observa que la polaridad del microambiente cambia de ~55 unidades de constante dieléctrica en ausencia de ligandos a ~48 en presencia de GlcN-ol-6P y ~43 en presencia de GlcNAc6P. Los cambios en la λ_{\max} en los espectros de emisión de fluorescencia producidos por el activador alostérico no fueron modificados por la adición posterior del inhibidor competitivo. Sin embargo, los espectros de emisión de fluorescencia producidos por el inhibidor competitivo (GlcN-ol-6P) sí fueron modificados por la adición del activador alostérico (GlcNAc6P), mostrando espectros similares a los obtenidos con la adición única de GlcNAc6P (Figura 5). Las diferencias en los cambios en las λ_{\max} de los espectros de emisión de fluorescencia indican diferentes microambientes en las posiciones modificadas químicamente cuando la transición alostérica es producida con el ligando del sitio activo o con el ligando del sitio alostérico.

La adición de GlcN-ol-6P (1 mM) o GlcNAc6P (5 mM) tampoco cambió los espectros de emisión de fluorescencia del Dansil-amidoetil-MTS-cisteína (datos no mostrados). La enzima Dansil-H164C en ausencia de ligandos muestra dos máximos en el espectro de emisión en fluorescencia a 493 nm ($\lambda_{\max 1}$) y 530 nm ($\lambda_{\max 2}$) a una λ_{exi} de 341 nm. Con la adición de GlcN-ol-6P a concentraciones saturantes cambiaron las dos λ_{\max} de los espectros de emisión a 496 y 536 nm, respectivamente, y con la adición de GlcNAc6P a concentraciones saturantes cambiaron las dos λ_{\max} a 498 y 538 nm, respectivamente (Tabla 4 y Figura 5C). Estos cambios en λ_{\max} sugieren que en esta posición el fluoróforo experimenta un incremento en la polaridad del microambiente, debido a la transición alostérica inducida por los ligandos, lo que contrasta con el comportamiento observado en la enzima Bimano-H164C. Sin embargo, estos resultados

se analizarán en términos cristalográficos (ver más adelante). Para la enzima Dansil-S206C las λ_{\max} cambiaron de valores de 500 y 538 nm en ausencia de ligandos a 494 y 529 nm después de la adición de GlcN-ol-6P y a 492 y 528 nm con la adición de GlcNAc6P (Tabla 4 y Figura 5D). Los valores de polaridad relativa estimados a partir de nuestra curva de λ_{\max} en función de la constante dieléctrica fueron aproximadamente de 10 unidades de ϵ en el microambiente de las posiciones modificadas químicamente en ausencia de ligandos, disminuyendo a 5 y 3 en presencia de GlcN-ol-6P y GlcNAc6P, respectivamente (Figura 4A). Estos datos indican una reducción en la polaridad del microambiente en la posición 206 cuando es inducido el confórmero R. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos con la enzima Bimano-S206C y sugieren diferencias en la polaridad del microambiente que rodea a las sondas fluorescentes en presencia de cada ligando.

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

	Ausencia de ligandos (nm)	GlcN-ol-6P 1 mM (nm)	GlcNAc6P 5 mM (nm)
Bimano-H164C	$\lambda_{\max} = 475$	$\lambda_{\max} = 472$	$\lambda_{\max} = 468$
Bimano-S206C	$\lambda_{\max} = 477$	$\lambda_{\max} = 474$	$\lambda_{\max} = 472$
Dansil-H164C	$\lambda_{\max 1} = 493$ $\lambda_{\max 2} = 530$	$\lambda_{\max 1} = 496$ $\lambda_{\max 2} = 536$	$\lambda_{\max 1} = 498$ $\lambda_{\max 2} = 538$
Dansil-S206C	$\lambda_{\max 1} = 500$ $\lambda_{\max 2} = 538$	$\lambda_{\max 1} = 494$ $\lambda_{\max 2} = 529$	$\lambda_{\max 1} = 492$ $\lambda_{\max 2} = 528$

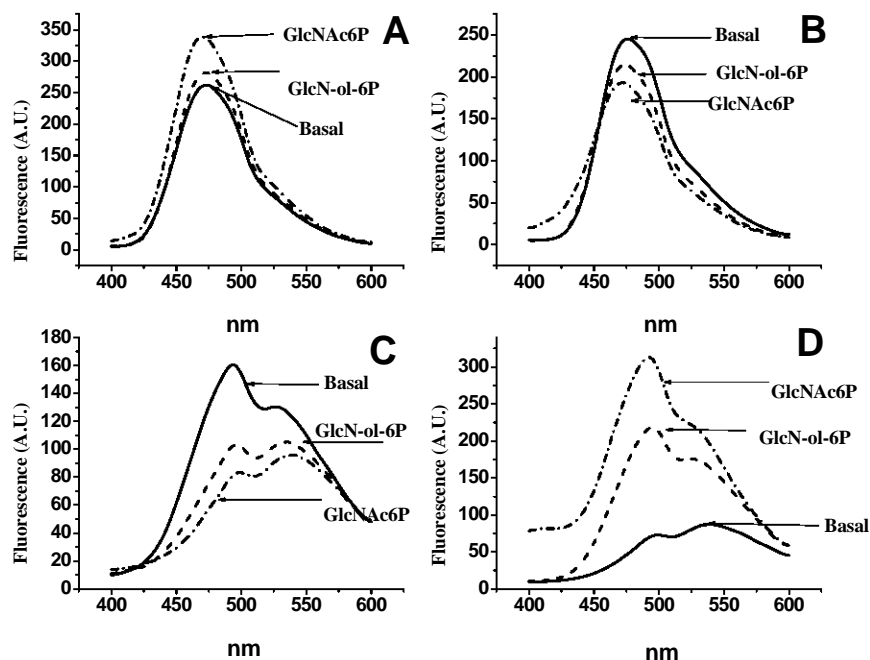


Figura 5. Espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario de la GlcN6P desaminasa modificada químicamente con las sondas fluorescentes Mbbm y Dansil-amidoetil-MTS, en presencia de los ligandos del sitio activo y alostérico. Los espectros fluorescentes fueron colectados a 30 °C en Tris HCl 50 mM, pH 7.5. A) Bimano-H164C, B) Bimano-S206C, C) Dansilo-H164C y D) Dansil-S206C.

Correlación de los cambios en la señal de fluorescencia con los cambios conformacionales en la estructura de la GlcN6P desaminasa. El área superficial accesible al disolvente (ASA) se determinó a partir de los modelos de estructura cristalográfica de la enzima, tanto en la conformación T como en la R. Previamente se construyeron las mutantes “in silico”, substituyendo tanto la His164 como la Ser206 por triptófanos, ya que el tamaño del Mbbm y del Dansil-amidoetil-MTS unidos a la proteína es aproximadamente similar al de un triptófano (Mansoor et al., 1999). El área superficial accesible al disolvente fue calculada con el programa NACCESS (Hubbard et al., 1992), tomando un radio de esfera del solvente de 1.4 Å. Para la posición 164 el ASA se reduce 79.5 Å², pasando de 191.2 Å² (confórmero T) a 111.7 Å² (confórmero R). Para la posición 206 el ASA también se reduce, en este caso en 27.93 Å², pasando de 99.85 Å²

(confórmero T) a 71.92 \AA^2 (confórmero R). Las reducciones del ASA en ambas posiciones indican una disminución en la polaridad del microambiente de cada posición, que correlaciona con las mediciones de fluorescencia, excepto para la posición 164 modificada químicamente con Dansil-amidoetil-MTS (Dansil-H164C), en donde la polaridad relativa medida por fluorescencia incrementa con la adición de los ligandos. El comportamiento contrastante de esta mutante modificada químicamente (Dansilo-H164C) puede explicarse en términos estructurales, ya que al llevarse a cabo la transición T a R el residuo 164 interacciona con la Arg253, la cual se acerca desde una distancia de 15.23 \AA (confórmero T) hasta 4.22 \AA (confórmero R), considerando la distancia entre el CB del residuo His164 y el NH2 de la Arg253 como referencia (Figura 6). Esta interacción puede ser la responsable del comportamiento contrastante de esta posición, ya que la Arg253 puede ser probablemente la responsable de mostrar un apagamiento en la fluorescencia de la sonda a través de un efecto de transferencia de energía resonante (Eisinger, 1969; Lakowicz 1999), que afecta las propiedades espectroscópicas de la sonda fluorescente en el residuo 164.

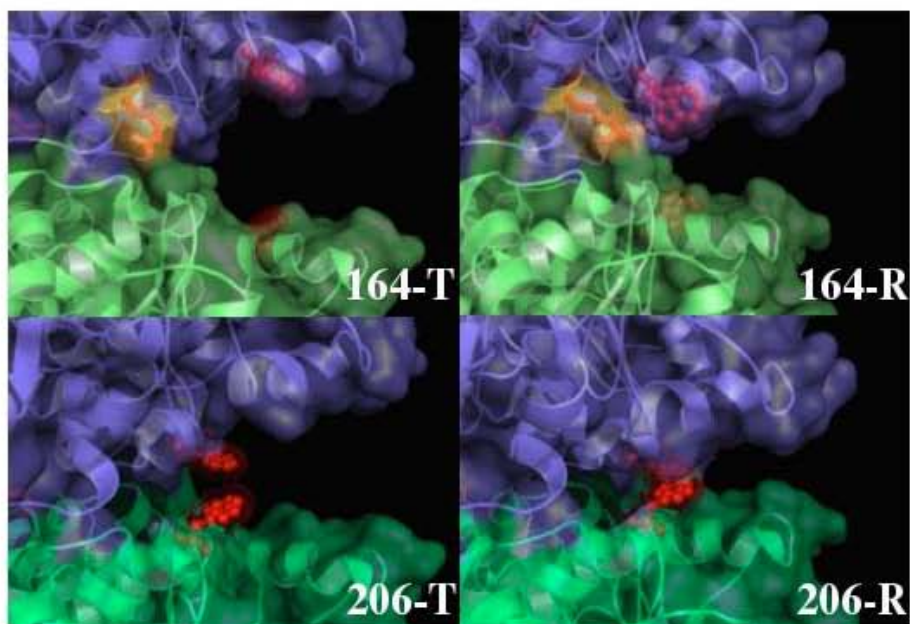


Figura 6. Modelo de la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa mostrando las diferentes interacciones de los residuos en la interfase de los trímeros en los conformeros T y R. Los residuos 164 y 206 se muestran en color rojo en el estado T (izquierda) o estado R (derecha) y la arginina 253 en color naranja. En los paneles superiores se muestra la interacción que lleva a cabo con la posición 164 en el estado R. Los residuos histidina 164 y serina 206 fueron mutados “in silico” por residuos de triptófano como se describió en materiales y métodos. La figura fue realizada con el programa PyMOL.

Titulación con los ligandos del sitio activo y alostérico, midiendo los cambios de la λ_{max} de emisión de fluorescencia en las enzimas modificadas químicamente. La Tabla 5 y la Figura 7 muestran los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia de las enzimas modificadas químicamente al ser tituladas con los ligandos del sitio activo y alostérico. Los cambios de la λ_{max} (valores absolutos) se utilizaron como parámetros de correlación para la titulación con los ligandos. Los valores de $K_{0,5}$ para el GlcNAc6P se encuentran en un intervalo de ~0.194 mM a 0.143 mM para ambas enzimas modificadas químicamente (Tabla 5 y Figura 7). Estos valores son semejantes a los valores reportados anteriormente ($K_{0,5} = 0.180$ mM) para la GlcNAc6P (Montero-Moran et al., 2001; Bustos-Jaimes et al., 2005). La incorporación de los fluoróforos en la interfase de la proteína podría estar perturbando la transición alostérica, originando una reducción en la afinidad

del sitio alostérico por su ligando. La $K_{0.5}$ para GlcN-ol-6P en todas las mutantes modificadas químicamente fue de ~ 0.03 mM (Tabla 5), mientras que la $K_{0.5}$ reportada es de 0.001 mM, es decir 30 veces menor. El número de Hill es mayor para el ligando del sitio alostérico con valores entre 2 y 3, mientras que para el ligando del sitio activo refleja menor cooperatividad con un valor entre 1 y 2. A pesar de las perturbaciones creadas por la introducción de los fluoróforos, se mantiene una activación alostérica tipo K semejante a la enzima silvestre.

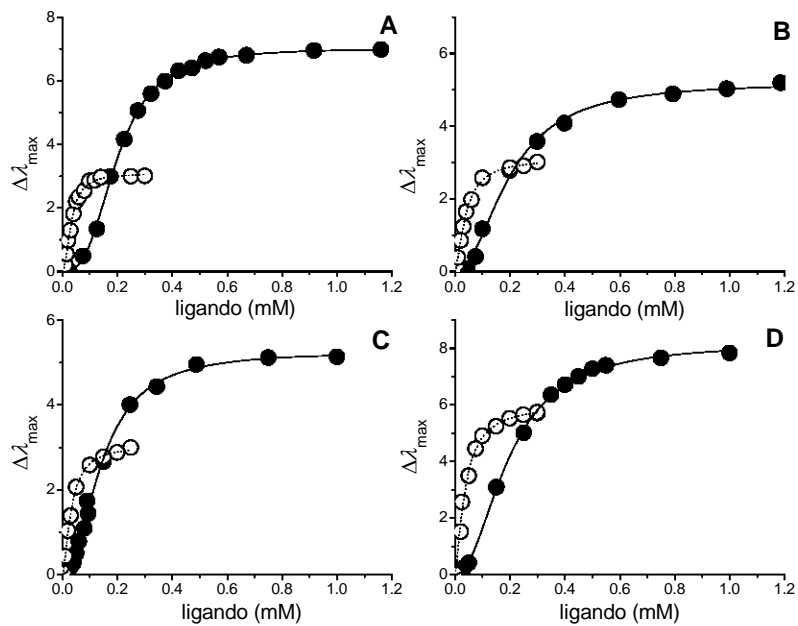


Figura 7. Titulación del sitio alostérico y sitio activo de las mutantes de la GlcN6P desaminasa modificadas químicamente con los fluoróforos. Las titulaciones fueron medidas por los cambios (valor absoluto) de la diferencia en los máximos de los espectros de emisión fluorescente ($\Delta\lambda_{\max}$). Las titulaciones fueron hechas con el ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P, ●) y con el ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P, ○), a 30 °C en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. A) Cambios de $\Delta\lambda_{\max}$ en Bimano-H164C. B) Cambios de $\Delta\lambda_{\max}$ en Dansil-H164C. C) Cambios de $\Delta\lambda_{\max}$ en Bimano-S206C. D) Cambios de $\Delta\lambda_{\max}$ en Dansil-S206C.

Tabla 5. Titulación de las mutantes de la GlcN6P desaminasa modificadas químicamente con los ligandos de sitio alostérico y activo. Cambios en valor absoluto de la diferencia de las λ_{\max} de los espectros de emisión de fluorescencia en ausencia de ligandos y presencia de ligandos ($\Delta\lambda_{\max}$).

	Ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P)			Ligando del sitio activo (GlcN-ol-6P)		
	$\Delta\lambda_{\max}^{a,b}$ (nm)	$K_{0.5}$ GlcNAc6P (mM) ^c	h^d	$\Delta\lambda_{\max}^{a,b}$ (nm)	$K_{0.5}$ GlNol6P (mM) ^c	h^d
GlcN6P desaminasa silvestre	-	0.180 ± 0.050	2.41 ± 0.05	-	0.001 ± 0.0001	2.4 ± 0.13
Bimano-H164C	7.1	0.194 ± 0.005	2.90 ± 0.08	3.08	0.032 ± 0.009	1.84 ± 0.09
Dansil-H164C	5.03	0.198 ± 0.009	2.15 ± 0.12	3.01	0.038 ± 0.004	1.36 ± 0.07
Bimano-S206C	5.05	0.143 ± 0.004	2.06 ± 0.01	3.0	0.032 ± 0.003	1.42 ± 0.012
Dansil-S206C	8.3	0.192 ± 0.015	2.09 ± 0.016	6.0	0.035 ± 0.004	1.39 ± 0.014

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

^{c,d}Parámetros estimados utilizando la ecuación de Hill.

Por lo tanto, el proceso que se lleva a cabo durante la transición alostérica, evidenciado por los cambios espectrales (λ_{\max}) de los fluoróforos cuando se indujo el conformero R, refleja alteraciones a nivel cuaternario asociados con los rearrreglos en la interfase de los trímeros, ya que estos fluoróforos se encuentran en la interfase de los dos trímeros. Al realizar este tipo de modificación química existen perturbaciones que se reflejaron en la actividad catalítica de la enzima (disminuyó aproximadamente un 50% con respecto a la enzima silvestre). Sin embargo, la disminución en la actividad catalítica no se debe exclusivamente a la modificación química con los fluoróforos, ya que la introducción de cisteínas reactivas en las posiciones a ser modificadas y la eliminación de las cisteínas reactivas originales de la enzima resultó en una disminución aproximada del 33% de la actividad catalítica de la enzima y, en un menor grado la modificación química con los fluoróforos (Tablas 1 y 2). Uno de los criterios para la elección de las posiciones para introducir los fluoróforos es que estas posiciones se encuentren con una ASA ≥ 40 Å²; condición que cumplen ambas posiciones modificadas (164 y 206). La pérdida de

estabilidad con la modificación química con el Mbbm se estima menor a 1.5 kcal si el ASA es $\geq 40 \text{ \AA}^2$, según lo reportado para el caso de la lisozima T4 (Mansoor et al., 1999). Este dato se debe tomar en cuenta para la elección de las posiciones factibles a ser modificadas químicamente por sondas fluorescentes. Para el caso de la GlcN6P desaminasa, las modificaciones químicas en posiciones donde el ASA era menor a 40 \AA^2 afectaban severamente tanto la actividad catalítica como la estabilidad (datos no mostrados).

Diferencias en el microambiente detectadas a través de las sondas fluorescentes; indican diferencias estructurales en el conformero R cuando es inducido a partir del ligando del sitio activo o del ligando del sitio alostérico. Los datos obtenidos con las cuatro combinaciones posición-fluoróforo muestran un comportamiento consistente con la transición alostérica; esto es, los cambios producidos con cualquiera de los ligandos llevan hacia una sola dirección (Figura 5) y los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia producidos con el GlcN-ol-6P fueron siempre enmascarados por el GlcNAc6P (hasta alcanzar el nivel producido únicamente por este último), pero no al contrario. Una de las ventajas de introducir este tipo de fluoróforos es que permite detectar con gran sensibilidad pequeños cambios en la polaridad relativa local, gracias a su gran eficiencia cuántica comparada con la de los fluoróforos intrínsecos (Tabla 3). El microambiente que se produce cuando se induce la transición alostérica a través del ligando del sitio activo es diferente al inducido por el ligando del sitio alostérico; por lo tanto, existe una diferencia estructural que permite mostrar un conformero intermedio el

cual lo podemos llamado R', el cual es inducido por el ligando del sitio activo y un conformero R inducido por el ligando del sitio alostérico (Figura 8).

La comparación de las estructuras cristalográficas entre los conformeros T y R lleva a cabo una rotación de 131° entre los trímeros de la estructura hexámerica (ver Video 1), que posiblemente se asocie a la transición alostérica. Por lo que una hipótesis sería que el GlcN-ol-6P no sea capaz de inducir toda la rotación requerida mientras que el GlcNAc6P sí pudiera inducir esta rotación completa. Un dato adicional que apoya esta hipótesis es que los cristales de la GlcN6P desaminasa en el conformero T son fácilmente desintegrados por la adición del ligando del sitio alostérico (GlcNAc6P), pero la adición del GlcN-ol-6P no modifica el cristal de la enzima en el conformero T, lo que fue atribuido a los contactos cristalinos que pueden formarse o romperse con cada uno de los ligandos (Oliva et al., 1995; Horjales et al., 1999). La Arg158 y la Lys160 de uno de los monómeros junto con el grupo amino terminal de la subunidad adyacente unen la parte fosfatada del activador alostérico en el conformero R (Oliva et al., 1995; Horjales et al., 1999). La inducción del conformero R por el ligando del sitio activo podría no ser suficiente para estabilizar las cargas positivas del sitio alostérico, a menos que se adicione fosfato. Esta idea es congruente con los datos obtenidos en este trabajo: mayores $\Delta\lambda_{\max}$ y efectos cooperativos observados en los espectros de emisión de fluorescencia en presencia del ligando del sitio alostérico que en presencia del ligando del sitio activo (Tabla 5 y Figura 7).

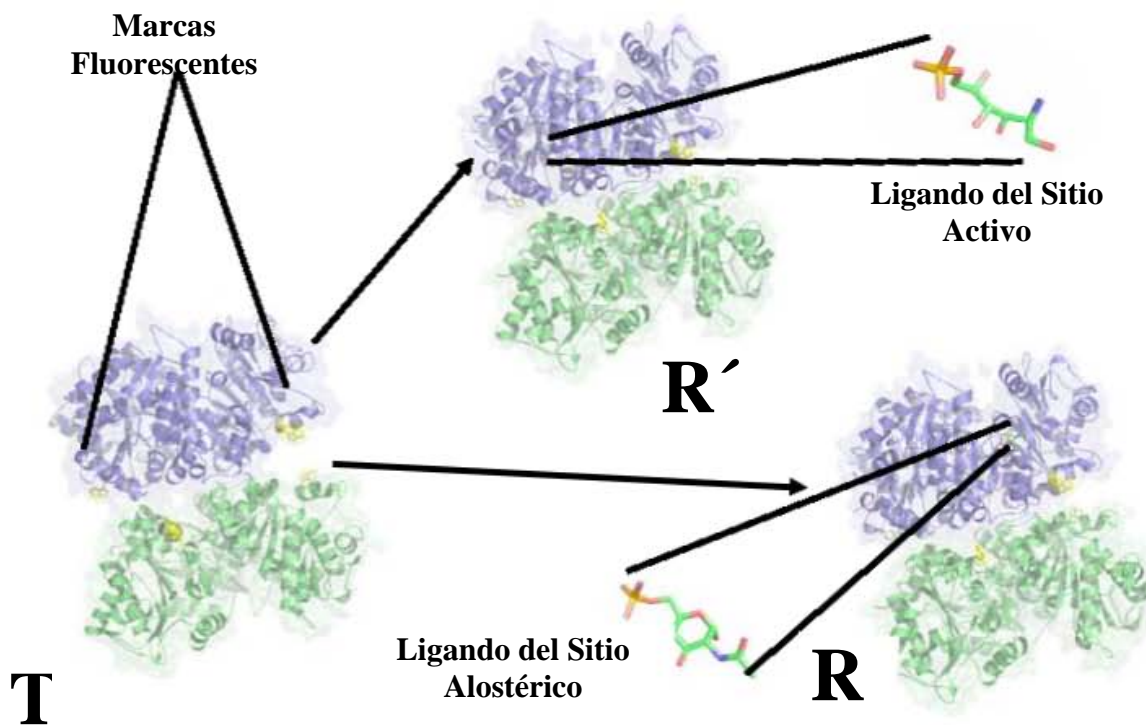


Figura 8. Representación esquemática de las diferencias estructurales del conformero R inducido por el ligando del sitio activo (R') y por el ligando del sitio alostérico (R) de la GlcN6P desaminasa marcada con fluoróforos en la interfase de los trímeros. La figura fue realizada con el programa PyMOL.

Estabilización del conformero R de la GlcN6P desaminasa mediante un enlace disulfuro entre los trímeros de la enzima. El marcaje sitio-específico con fluoróforos evidencia que la rotación entre los trímeros de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* juega un papel importante en la transición alostérica de la enzima. Por tanto el modificar o limitar la rotación debería producir un cambio en la respuesta cinética cooperativa característica de la enzima silvestre. Con esta idea se estabilizó a el conformero R a través de la creación de residuos vecinos de cisteínas que fueran capaces de formar un enlace disulfuro en la conformación R de la enzima. Con los datos obtenidos al monitorear la transición alostérica con las sondas fluorescentes en solución y después de un análisis estructural, se eligieron dos posiciones factibles para la formación de un enlace disulfuro con dos cisteínas de cada subunidad, partiendo de la triple mutante (C118S/C228S/C239S). Las posiciones seleccionadas fueron los residuos 165 (Asp165) y 206 (Ser206) de cada subunidad. Estas posiciones se encuentran apartadas tanto del sitio activo como del alostérico, lo que reduce la posibilidad de una perturbación de los mismos.

Diseño de una doble mutante para estabilizar al conformero R. Las posiciones 165 y 206 de cada subunidad se encontraron factibles para la formar un enlace disulfuro en el conformero R pero no así para el conformero T. Estos residuos se obtuvieron analizaron los cambios estructurales en la interfase de los trímeros de la enzima durante la transición alostérica hacia el conformero R, basándose en una construcción de un modelo estructural de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa, que se generó con el servidor Morphing Server (<http://www.molmovdb.org/morph/>). Se realizó una

animación de esta transición en el visualizador molecular PyMOL (DeLano, 2004), se hicieron mutaciones “in silico” (D165C y S206C) con el programa PyMOL a partir de los archivos de pdb de las estructuras del conformero T (1fs6) y del conformero R (1frz), se eligió el rotamero de menor energía en la librería de rotameros del programa y posteriormente se modeló las estructuras con el programa CHARMM, que utiliza una función de potencial empírica de energía (Figura 9 y 10).

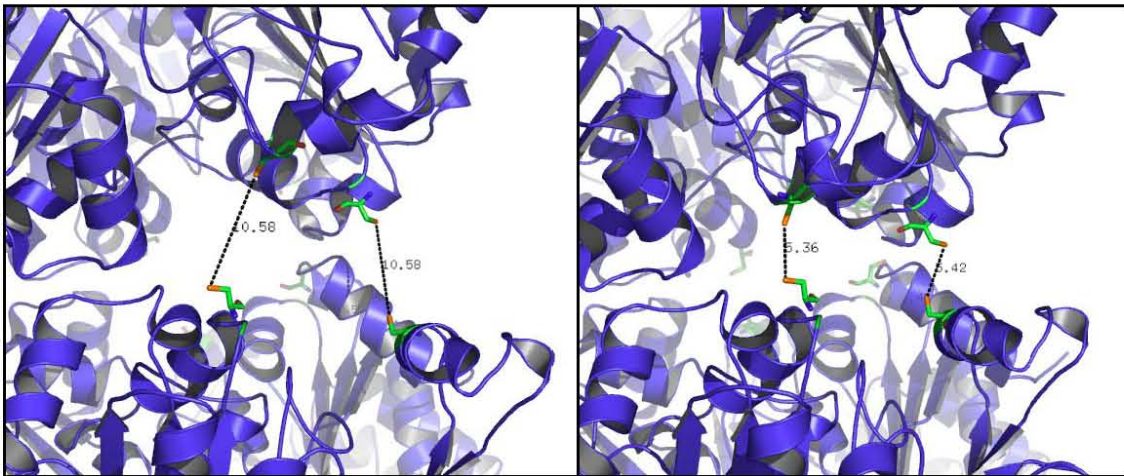


Figura 9. Estructuras tridimensionales de la GlcN6P desaminasa, modelando las mutaciones “in silico” D165C y S206C. Conformero T (izquierda) y conformero R (derecha), mostrando una distancia entre las cisteínas 165 y 206 de 10.58Å en T y de 5.36Å en R, las figuras fueron realizadas con PyMOL.

Las mutaciones “in silico” mostraron que las distancias entre los átomos de azufre (SG) en los dos residuos de cisteínas se reducen de 10.58 Å en el conformero T a 5.36 Å en el conformero R (Figura 9). Después de la minimización de energía de 1000 pasos se reduce la energía total del sistema calculada con CHARMM, lo cual indica que no existe una penalización al formarse el enlace disulfuro entre las subunidades (Figuras 10 y 11), mostrando una distancia de 2.17 Å entre los átomos de azufre de los dos residuos de cisteínas (165 y 206), con un ángulo de torsión entre la unión SG y SG de cada residuo

involucrado de -116.1° , parámetros que son adecuados para los enlaces disulfuros normales.

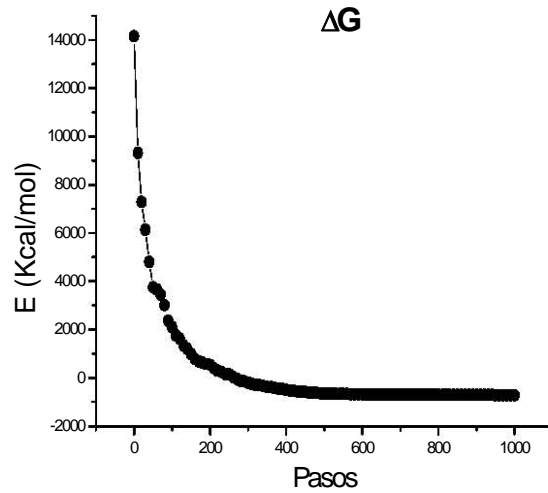


Figura 10. Minimización energética en función de la energía total de la D165C/S206C conformero R (●).

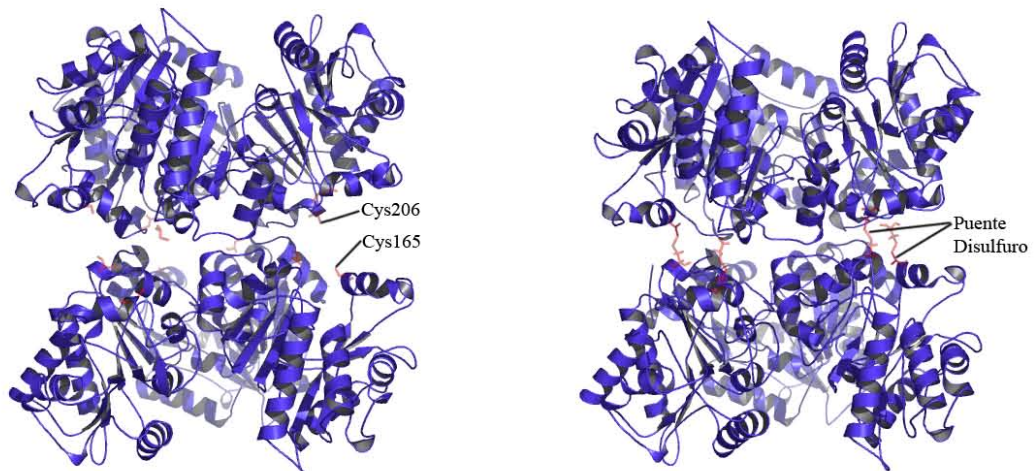


Figura 11. Estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa, modeladas las mutaciones “in silico” de las posiciones D165C y S206C. Conformero T (izquierda) y conformero R con el enlace disulfuro (derecha). Los modelos fueron generados con el programa CHARMM y las figuras fueron realizadas con PyMOL.

Separación electroforética en SDS-PAGE bajo condiciones oxidantes y reductoras. La triple mutante C118S/C228S/C239S y la doble mutante D165C/S206C se analizaron mediante electroforesis en condiciones oxidantes y reductoras (Figura 12). El carril 2 muestra la banda correspondiente al monómero de la GlcN6P desaminasa, la cual corresponde a 30 kD aproximadamente (Figura 12A y 12B). En el carril 3, que corresponde a la doble mutante D165C/S206C en condiciones oxidantes (Figura 12A), se observan dos bandas una de 30 kD y otra de 60 kD aproximadamente. La banda de 60 kD correspondería al dímero formado por dos monómeros unidos por el enlace disulfuro. En contraste, en el carril 3 (Figura 12B), correspondiente también a la doble mutante D165C/S206C pero en condiciones reductoras, solamente se observa la banda de 30 kD, lo que indica que el enlace disulfuro no se forma en condiciones reductoras.

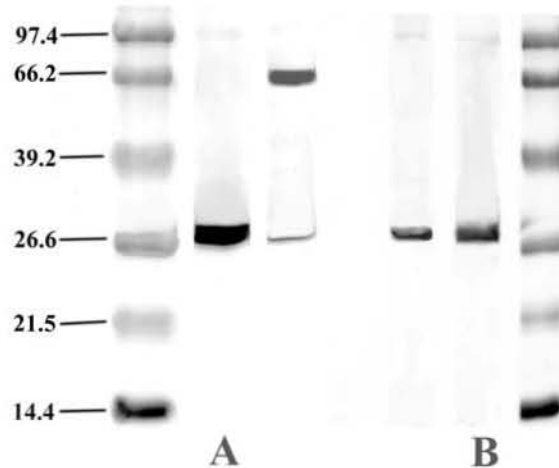


Figura 12. SDS-PAGE de la GlcN6P desaminasa en condiciones oxidante (A) y en condiciones reductoras (B). Carril 1 marcadores de masa molecular (en kD), carril 2 enzima libre de cisteínas reactivas (silvestre) y carril 3 doble mutante D165C/S206C.

Determinación de cisteínas reactivas, en condiciones oxidantes y reductoras. Las cisteínas reactivas de la doble mutante D165C/S206C se determinaron por el método de Ellman (Eyer et al., 2003). En condiciones oxidantes los grupos sulfhidrilos determinados

fueron ~ 0.345 SH/enzima, mientras que en condiciones reductoras ~ 6.125 SH/enzima. Para lograr las condiciones oxidantes, la enzima se expuso a un flujo continuo de oxígeno por un lapso de 3 a 4 horas, mientras que las condiciones reductoras se obtuvieron utilizando DTT (1 mM) como agente reductor, el cual se eliminó a través de una columna de filtración HR-100 (Pharmacia, Biotech) antes de cuantificar las cisteínas reactivas. Con la cuantificación de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas en la enzima D165C/S206C se establece que en condiciones oxidantes prácticamente ninguno de estos grupos se encuentra accesible. En condiciones reductoras se titularon ~ 6 grupos de los 12 posibles expuestos que posee la enzima. Una de las posibles causas de la titulación de la mitad de los grupos sulfhidrilos disponibles en condiciones reductoras es el impedimento estérico del TNB que evitaría la modificación de ambas posiciones en las subunidades, ya que éstas se encuentran muy cercanas entre sí (ver Figura 9). Mientras tanto, en condiciones oxidantes no se determinó ningún grupo sulfhidrilo.

Comportamiento cinético de la doble mutante D165C/S206C de la GlcN6P desaminasa. Las determinaciones cinéticas de la mutante D165C/S206C muestran un comportamiento diferente a las de la enzima silvestre y mutante C118S/C228S/C239S (sistema de inicio). La actividad catalítica (k_{cat}) disminuye aproximadamente un 50 % con respecto al sistema inicial (Tabla 6). El comportamiento cinético de la mutante D165C/S206C en estado oxidado y en estado reducido (1 mM de DTT) es diferente. La mutante D165C/S206C en estado oxidado muestra curvas de saturación tipo hiperbólicas tanto en presencia como en ausencia de activador alostérico, mientras en estado reducido las curvas son de tipo doble sigmoide mostrando este comportamiento bifásico más

marcado en ausencia de activador alostérico (Tabla 7 y Figura 13). La mutante D165C/S206C en condiciones oxidantes y en ausencia de activador alostérico presenta un comportamiento cinético tipo hiperbólico diferente a la enzima silvestre y al sistema de inicio (C118S/C228S/C239S), ya que éstas últimas presentan un comportamiento tipo sigmoide. La adición del activador alostérico cambió la K_M de 1.175 mM en ausencia de activador a 0.677 mM en presencia de activador, lo cual nos indica que la mutante D165C/S206C que puede tener el enlace disulfuro no se encuentra totalmente estabilizada en estado R.

En condiciones reductoras la mutante D165C/S206C presenta curvas bifásicas que fueron ajustadas a un modelo alostérico que contempla la presencia de dos tipos de sitios de unión en la proteína, siendo más evidente estas dos fases en ausencia de activador alostérico. En el modelo se plantean tres constantes catalíticas correspondientes a tres velocidades iniciales máximas (V_{max1} , V_{max2} y V_{max3}) que corresponderían a las actividades catalíticas de los conformeros TT, TR y RR, dos constantes de unión (K_1 y K_2) y dos coeficientes de Hill (n y m) Esquema 3. Las constantes catalíticas de la mutante D165C/S206C en condiciones reductoras, en ausencia y presencia de activador alostérico muestran diferencias principalmente en la k_{cat1} la cual correspondería al conformero TR Tabla 7. En esta condición de manera general los parámetros cinéticos nos indican que la mutante D165C/S206C presenta un intermediario entre los conformeros T y R (un conformero TR), el cual está evidenciado de manera marcada en ausencia de activador alostérico.



Esquema 3. Modelo cinético que contempla la presencia de dos tipos de sitios de unión secuencial para diferentes estados conformacionales de la mutante D165C/S206C de la GlcN6P desaminasa.

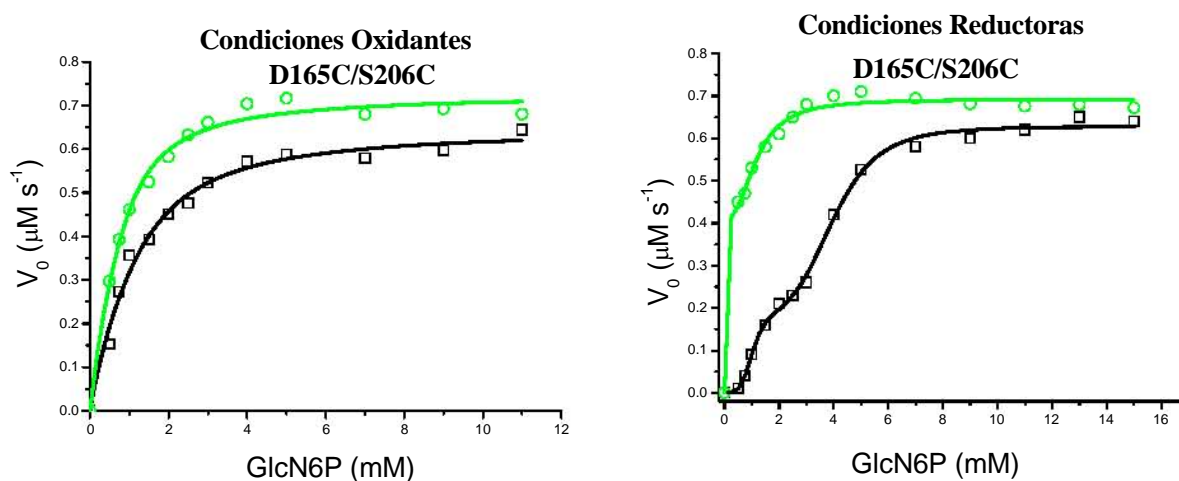


Figura 13. Curvas de saturación de la GlcN6P desaminasa, mutante D165C/S206C; 0 mM de activador (\square), 1 mM de activador (\circ). En condiciones oxidantes (izquierda) y condiciones reductoras con 1mM de DTT (derecha).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de GlcN6P desaminasa, libre de cisteínas reactivas C118S/C228S/C239S y de la mutante D165C/S206C en condiciones oxidantes.

	0 mM GlcNAc6P		1 mM GlcNAc6P	
	k_{cat} (s^{-1})	k_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_M (mM)
C118S/C228S/C239S	96 ± 0.06	5.1 ± 0.4	101.38 ± 0.72	0.465 ± 0.039
D165C/S206C	51 ± 0.28	1.175 ± 0.122	53.65 ± 0.56	0.677 ± 0.075

Parámetros obtenidos a partir del ajuste con la ecuación de Michealis-Menten.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de GlcN6P desaminasa, mutante D165C/S206C en condiciones reductoras (1 mM de DTT).

	$k_{cat 0}$ (s^{-1})	$k_{cat 1}$ (s^{-1})	$k_{cat 2}$ (s^{-1})	K_1 (mM)	K_2 (mM)	n	m
D165C/S206C (0 mM GlcNAc6P)	0.12 ± 0.051	19.3 ± 0.2	62.7 ± 0.7	1.035 ± 0.05	3.99 ± 0.04	4.3	4.8
D165C/S206C (1 mM GlcNAc6P)	0.01 ± 0.002	40.6 ± 0.4	69.1 ± 0.1	0.116 ± 0.07	$1.17 \pm .014$	90.1	2.3

Parámetros obtenidos a partir del ajuste con la ecuación 2 (ver Materiales y métodos).

Conclusiones

Los resultados de este estudio mediante el marcaje sitio-específico con fluoróforos indican que la inducción del conformero R de la GlcN6P desaminasa es diferente cuando es inducido por el ligando del sitio alostérico o por el ligando del sitio activo. Estas diferencias son a nivel estructural, ya que las sondas fluorescentes monitorean cambios en el microambiente local donde se encuentran. Estos resultados muestran que la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa es más complicada que un simple cambio conformacional entre dos estados, lo que sugiere la existencia de una serie de sub-estados alrededor de ambas conformaciones (T y R) y que éstos se encuentran en equilibrio. Estas conclusiones coinciden con trabajos recientes que muestran la complejidad de las enzimas alostéricas (Kern & Zuiderweg, 2003; Viappiani et al., 2004), donde nuevas estructuras cristalográficas intermedias entre el estado T y R son reportadas para enzimas que se han descrito como modelos de dos estados.

Las enzimas alostéricas deben tener una flexibilidad conformacional. Para evidenciar la importancia de esta flexibilidad en la GlcN6P desaminasa se le introdujo un enlace disulfuro entre sus trímeros, con el objetivo de disminuirle la flexibilidad conformacional (tratando de estabilizar el conformero R). Esta construcción muestra propiedades diferentes en condiciones oxidantes y reductoras evidenciadas por datos cinéticos y físicos (SDS-PAGE). Con la introducción del enlace disulfuro en la interfase de los trímeros se trató de estabilizar el conformero R, pero éste no concuerda exactamente con las propiedades del conformero R de la enzima silvestre y además cinéticamente se evidenció un estado intermedio entre T y R (mutante D165C/S206C en condiciones

reductoras). Por lo tanto se piensa que se estabilizó un conformero intermedio entre los dos estados (un conformero llamado TR).

Los arreglos estructurales inducidos por ligandos en las enzimas alostéricas es un aspecto que requiere el desarrollo de metodologías en solución, con el objetivo de complementar la información obtenida a partir de datos cristalográficos y cinéticos.

Bibliografía

- Alder BJaW, T. E. 1957. Phase transition for a hard sphere system. *J Chem Phys* 27:1208.
- Altamirano MM, Plumbridge JA, Calcagno ML. 1992. Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their functional role by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31:1153-1158.
- Altamirano MM, Plumbridge JA, Hernandez-Arana A, Calcagno M. 1991. Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1076:266-272.
- Altamirano MM, Plumbridge JA, Horjales E, Calcagno ML. 1995. Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* 34:6074-6082.
- Bergström F, Hägglöf P., Karoli, J., Ny, T., Johansson, L, B-A. . 1999. The use of site directed fluorophore labeling and dono-donor energy migration to investigate solution structure and dynamics in proteins. *Natl Acad Sci* 96:12477-12481.
- Blow DM, Collyer CA, Goldberg JD, Smart OS. 1992. Structure and mechanism of D-xylose isomerase. *Faraday Discuss*:67-73.
- Bustos-Jaimes I, Ramirez-Costa M, De Anda-Aguilar L, Hinojosa-Ocana P, Calcagno ML. 2005. Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* 44:1127-1135.
- Calcagno M, Campos PJ, Mulliert G, Suastegui J. 1984. Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 787:165-173.
- Columbus L, Hubbell WL. 2002. A new spin on protein dynamics. *Trends Biochem Sci* 27:288-295.
- Comb DG, Roseman S. 1958. Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase. *J Biol Chem* 232:807-827.
- Chen RF. 1965. Fluorescence quantum yield measurements: vitamin B6 compounds. *Science* 150:1593-1595.
- Chivian D, Kim DE, Malmstrom L, Bradley P, Robertson T, Murphy P, Strauss CE, Bonneau R, Rohl CA, Baker D. 2003. Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server. *Proteins* 53 Suppl 6:524-533.
- D'Auria S, Herman P, Rossi M, Lakowicz JR. 1999. The fluorescence emission of the apo-glucose oxidase from *Aspergillus niger* as probe to estimate glucose concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 263:550-553.
- DeLano WL. 2004. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 228:U313-U314.
- E.M. Kosower RG, A. Radkowsky, D. Hebel, A. Shusterman. 1986. "Bimanes. 22. Flexible Fluorescent Molecules. Solvent Effects on the Photophysical Properties of syn-Bimanes (1,5-Diazabicyclo[3.3.0]octa-3,6-diene-2,8-diones)." *Journal of Physical Chemistry*. pp 5552-5557.

- Eisinger J. 1969. Intramolecular energy transfer in adrenocorticotropin. *Biochemistry* 8:3902-3908.
- Evens RP. 2002. BIOTECHNOLOGY AND BIOLOGICAL PREPARATIONS. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*:211-220.
- Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. 2003. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem* 312:224-227.
- Goodsell DS, Olson AJ. 2000. Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:105-153.
- Horjales E, Altamirano MM, Calcagno ML, Garratt RC, 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.
- Hubbard SJ, Thornton JM, Campbell SF. 1992. Substrate recognition by proteinases. *Faraday Discuss*:13-23.
- Hubbell WL, Cafiso DS, Altenbach C. 2000. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat Struct Biol* 7:735-739.
- Karplus M, McCammon JA. 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol* 9:646-652.
- Kern D, Zuiderweg ER. 2003. The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr Opin Struct Biol* 13:748-757.
- Kim DE, Chivian D, Baker D. 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res* 32:W526-531.
- Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM. 1979. Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3382-3386.
- Kosower NS, Newton GL, Kosower EM, Ranney HM. 1980. Bimane fluorescent labels. Characterization of the bimane labeling of human hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 622:201-209.
- Lakowicz JR. 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York.
- Mainhart CR, Potter M, Feldmann RJ. 1984. A refined model for the variable domains (Fv) of the J539 beta(1,6)-D-galactan-binding immunoglobulin. *Mol Immunol* 21:469-478.
- Mansoor SE, McHaourab HS, Farrens DL. 1999. Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling. Studies of T4 lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane. *Biochemistry* 38:16383-16393.
- Mansoor SE, McHaourab HS, Farrens DL. 2002. Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence. *Biochemistry* 41:2475-2484.
- McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. 1977. Dynamics of folded proteins. *Nature* 267:585-590.
- Midelfort CF, Rose IA. 1977. Studies on the mechanism of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* 16:1590-1596.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J Mol Biol* 12:88-118.

- Montero-Moran GM, Horjales E, Calcagno ML, Altamirano MM. 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.
- Montero-Moran GM, Lara-Gonzalez S, Alvarez-Anorve LI, Plumbridge JA, Calcagno ML. 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.
- Oliva G, Fontes MR, Garratt RC, Altamirano MM, Calcagno ML, Horjales E. 1995. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* 3:1323-1332.
- Patel S, Mackerell AD, Jr., Brooks CL, 3rd. 2004. CHARMM fluctuating charge force field for proteins: II protein/solvent properties from molecular dynamics simulations using a nonadditive electrostatic model. *J Comput Chem* 25:1504-1514.
- Perutz MF. 1989. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q Rev Biophys* 22:139-237.
- Rahman A. 1964. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Phys Rev* 136:405.
- Ratner V, Kahana E, Eichler M, Haas E. 2002. A general strategy for site-specific double labeling of globular proteins for kinetic FRET studies. *Bioconjug Chem* 13:1163-1170.
- Ravindranathan KP, Gallicchio E, Levy RM. 2005. Conformational Equilibria and Free Energy Profiles for the Allosteric Transition of the Ribose-binding Protein. *J Mol Biol* 353:196-210.
- Rogers MJ, Ohgi T, Plumbridge J, Soll D. 1988. Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* nagE and nagB genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* 62:197-207.
- Selvin PR. 2000. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol* 7:730-734.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- van Beilen JB, Li Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol* 13:338-344.
- Viappiani C, Bettati S, Bruno S, Ronda L, Abbruzzetti S, Mozzarelli A, Eaton WA. 2004. New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14414-14419.
- Yifrach O, Horovitz A. 1998. Transient kinetic analysis of adenosine 5'-triphosphate binding-induced conformational changes in the allosteric chaperonin GroEL. *Biochemistry* 37:7083-7088.

Articles

Site-Directed Fluorescence Labeling Reveals Differences on the R-Conformer of Glucosamine 6-Phosphate Deaminase of *Escherichia coli* Induced by Active or Allosteric Site Ligands at Steady State[†]

Alejandro Sosa-Peinado* and Martín González-Andrade

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
P.O. Box 70-159, México, D.F. 04510, México

Received February 18, 2005; Revised Manuscript Received September 8, 2005

ABSTRACT: Engineered glucosamine 6-phosphate deaminase of *Escherichia coli* with unique reactive cysteines at positions 164 or 206 was created by site-directed mutagenesis to monitor the allosteric transition in solution by the fluorescence emission of the bimane or dansyl-amidoethyl groups attached to the indicated residues. The selection of both positions was due to the differential interaction of these residues between T- and R-conformers at the interface of two trimers that form the hexameric structure; in the T-conformer, residue 164 or 206 presents only intrasubunit contacts, but in the R-conformer, new intersubunit contacts are established. As in the wild-type enzyme, fluorescent-labeled mutants show no modification on the allosteric activation of the *K*-system, only the k_{cat} was reduced to a value of 72 s^{-1} (~50% of wild-type). With these preparations, conformational changes were detected by the fluorescence emission spectra at steady state when the active site or the allosteric site ligands were titrated. Despite the similar changes in the fluorescence spectra that were correlated with the induction of the R-state, differences were observed at the maximal change in the fluorescence spectra and in the relative solvent polarities at the positions labeled. These data suggested structural differences in the conformation of the R-state when it is induced from the active site or from the allosteric site, which is not consistent with the two-state structural model proposed by previous crystallographic studies of this enzyme.

Conformational flexibility in allosteric proteins plays a fundamental role for understanding the changes in the affinity of ligands during the propagation of multiple conformational changes throughout the molecule (1). Evidences mainly from thermodynamics (2), nuclear magnetic resonance (NMR, 3),

and spectroscopical studies (4) proposed that several allosteric transitions could be described as a dynamic equilibrium between conformers, in which the conformational change may be driven by conformer stabilization from preexisting equilibrium after ligand binding. NMR techniques have revealed motions accounted by proteins during ligand binding or catalysis (5). However, oligomeric enzymes are usually not amenable to these studies; therefore, it is fundamental to develop systems to study the dynamics of oligomeric enzymes in solution.

Site-directed labeling (SDL)¹ methods by fluorescent or spin labels have emerged as a powerful technique to obtain

[†] This work was partially supported by Grant IN5582E from DGAPA of National Autonomous University of México (UNAM) and Grants IN213301 and 41328 from the National Council of Science and Technology (CONACyT, México). M.G.-A. is a recipient of the fellowship for Ph.D. studies from CONACyT, México and DGAPA-UNAM.

* To whom correspondence should be addressed. Phone, (525) 623-2275; fax, (525) 623-2419; e-mail, asosa@bq.unam.mx.

structural information of proteins in solution (6–9). These methods are based on the correlation of physicochemical parameters of the labels introduced at specific sites of a protein with solvent accessibility, solvent polarity, or mobility. These techniques (SDL) have allowed the detection of secondary structure motifs of a protein, movements among different regions, and the generation of a three-dimensional structural model of a membrane-bound protein (9). In particular, chemical modification of T4 lysozyme (6, 7) with monobromobimane (mBBBr, about the size of tryptophan after incorporation to the protein) has several advantages: it does not perturb protein stability of exposed sites to the solvent; energy destabilization ($\Delta\Delta G$) ≤ 1.5 kcal is obtained when residues are exposed to the solvent ≥ 40 Å² (6); and solvent accessibility is correlated with λ_{\max} of fluorescence emission and steady-state anisotropy values (6, 7). In addition, tryptophan is able to quench the fluorescence of bimane when the distance between them is ≤ 6 Å (7).

Here, we used as a model the allosteric transition carried out by glucosamine 6-P deaminase of *Escherichia coli* (EC 3.5.99.6). This enzyme catalyzes the reversible conversion of D-glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) into D-fructose-phosphate and ammonia, and it is allosterically activated by N-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNac6P), the allosteric site ligand (10–12). The three-dimensional structures of the enzyme in the R-conformer and in the T-conformer have been obtained at resolutions between 1.9 and 2.2 Å (13, 14). The enzyme is a homo-hexamer arranged as a dimer of trimers with a 32 internal symmetry. Active sites are located at the crevice in each identical subunit, and the allosteric sites are located in the clefts adjacent to each subunit around the three-fold axes of the molecule (13, 14). The crystallographic structure of the R-conformer is invariant in the presence of the active site ligand (in the presence of inorganic phosphate, 13) or in the presence of the allosteric ligand; the crystallization of the enzyme only in the presence of the active site ligand is never achieved (13, 14). Since phosphate binds to the allosteric site, it may obscure the effect of the active site ligand in the formation of the R-state. Furthermore, Arg158 and Lys160 of one monomer, together with the N-terminal of the neighboring subunit, bind to the phosphate moiety of the allosteric activator in the R-conformer. Hence, site-directed labeling (SDL) was used to test if the R'-conformer induced from the active site is able to generate a similar conformer to the one induced from the allosteric site without stabilization of the adjacent positive charges present

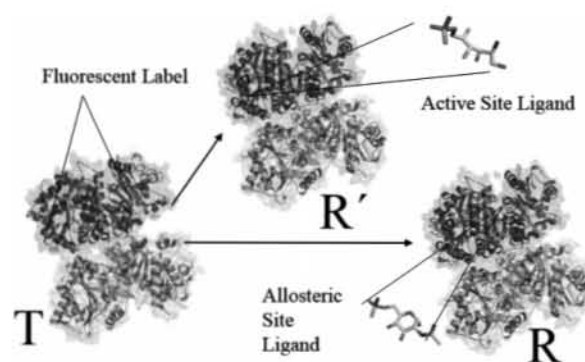


FIGURE 1: Schematic representation of the differences on the R-conformer induced from the allosteric site and the R'-conformer induced from the active site for the GlcN6P deaminase of *E. coli*. The structure of the enzyme is represented in a surface model in combination of the three-dimensional structure. The models were created with protein data bank files 1fs6 (T-conformer) and 1frz (R-conformer) with the PyMOL program (23).

at the allosteric site (13, 14). The idea of two structural different R-conformers, one induced by the active site ligand (R') and other (R) generated from allosteric site ligand, is schematized in Figure 1. Despite the kinetic constants for GlcN6P deaminase of *E. coli* being satisfactorily described by the symmetry model of Monod–Wayman–Changuex, this does not exclude the presence of more than two-state structural conformers, as indicated by a new paradigm for the study of the regulation of allosteric enzymes (15, 16).

Labeled mutants of GlcN6P deaminase of *E. coli* with mBBBr or dansyl-amidoethyl-MTS at position 164 or 206 showed an allosteric activation *K*-type pattern as in the wild-type enzyme (11). Fluorescence changes at the interface of two trimers upon addition of the active or the allosteric ligands correlated with enzyme kinetics. Also, changes in the fluorescence spectra and solvent polarity were analyzed in terms of the different microenvironment interaction of residue 164 or 206 observed at the crystallographic structures. The changes on the fluorescence spectra at steady state were taken as an evidence of the differences in the quaternary changes associated to the formation of the R-state from the active or from the allosteric site. The work presented here illustrates the advantage of using site-directed fluorescence labeling for probing the conformational dynamics of a relatively large allosteric enzyme like GlcN6P deaminase in solution.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Most chemical and biochemical reagents were from Sigma Aldrich S.A. de C.V., Mexico. Fluorescent labels bromobimane (mBBBr) and dansyl-amidoethyl methanethiosulfonate (dansyl-amidoethyl-MTS) were purchased from Toronto Chemical Research (Toronto, Canada). The affinity gel used for GlcN6P deaminase purification (*N*-aminohexanoyl-glucosamine-6-P agarose) was prepared as described (10) except that ECH-Sepharose (Pharmacia) was used. The allosteric activator GlcNac6P was prepared as described (11). Preparation of the competitive inhibitor GlcN-ol-6P was synthesized as described (11) by reduction of GlcN6P with NaBH₄.

Strains and Plasmid. Wild-type and mutants of GlcN6P deaminase were prepared from a strain of *E. coli* carrying a

¹ Abbreviations: 164C-GlcN6P deaminase, mutant C118S/C228S/C239S/S164C of glucosamine 6-P deaminase; 206C-GlcN6P deaminase, mutant C118S/C228S/C239S/S206C of glucosamine 6-P deaminase; bimane-164C-GlcN6P deaminase, mutant C118S/C228S/C239S/S164C of glucosamine 6-P deaminase labeled with monobromobimane; dansyl-amidoethyl-164C-GlcN6P deaminase, mutant C118S/C228S/C239S/S164C of glucosamine 6-P deaminase chemically modified with dansyl-amidoethyl-MTS; bimane-206C-GlcN6P deaminase, mutant C118S/C228S/C239S/S206C of glucosamine 6-P deaminase chemically modified with monobromobimane; dansyl-amidoethyl-206C-GlcN6P deaminase, mutant C118S/C228S/C239S/S206C of glucosamine 6-P deaminase chemically modified with dansyl-amidoethyl-MTS; dansyl-amidoethyl-MTS (dansyl-amidoethyl methanethiosulfonate), 2,5-dimethylaminonaphthyl-1-sulfonamido ethyl methanethiosulfonate; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); GlcN-ol-6P, 2-deoxy-2-aminoglucitol 6-phosphate; GlcN6P, glucosamine 6-phosphate; GlcNac6P, N-acetyl-glucosamine-6-phosphate; GlcN6P deaminase, glucosamine 6-phosphate deaminase; λ_{\max} , fluorescence emission maxima; mBBBr, monobromobimane; SDL, site-directed labeling.

plasmid (pTZ18R), which contains the deaminase gene of *E. coli* (nagB) for expression of the protein from the *lac* promoter as described (11, 17). Similar plasmids expressing mutated sequences were constructed on the same vector. The host strain for protein expression was *E. coli* IBPC590, where expression of the chromosomal copy of the nagB gene was eliminated by insertion of a kanamycin-resistance cassette (17). IBPC590 is in addition Δ *lacI*; therefore, the expression of deaminase is constitutive.

Mutagenesis. Site-directed mutagenesis for the elimination of three cysteines (substituted by serines) was done by a successive single-directed mutagenesis from the wild-type plasmid in the following order: 118, 228, and 239. Creation of unique reactive cysteines was done from a plasmid encoding the triple mutant C118S/C228S/C239S. Site-directed mutagenesis was carried out with the Quick change kit (Stratagene, La Jolla, CA) following vendor specifications. The amount of plasmid (containing the gene encoding GlcN6P deaminase) pTZ18RnagB was 50 ng, and the amount of mutagenic oligonucleotides was 125 ng. PCR amplification included 25 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and polymerization at 68 °C for 10 min, followed by one final extension step at 68 °C for 10 min. Oligonucleotides used to create the single mutant C118S were 5'-GACGCCGAGAGCCGCCAGTAT-3' and 5'-ATACTGGCGGCTCTCGGCGTC-3'; for the double mutant C118S/C228S, 5'-ACCATCAGCAGT CTGCAACTGC-3' and 5'-GCAGTTGCAGGCTGATGGT-3'; and for the triple mutant C118S/C228S/C239S, 5'-ATCATGGTGAGC-GATGAACCTTC-3' and 5'-GAAGGTTTCATC GCTCAC-CATGAT-3'. For creation of the unique reactive cysteine at position 164 (C118S/C228S/C239S/H164C), oligonucleotides were 5'-TATCAAACCCTGACTTGCGACACTC-3 and 5'-AGTGTCTCGCAAGTCAGGGTTTTGATAC-3, and for the creation of the unique reactive cysteine at position 206 (C118S/C228S/C239S/S206C), 5'-CGCTGGTTGCCAGA-AAGCAC-3' and 5'-GTGCTTTCTGGCAACCCAGC-3'. After the mutagenesis experiments, the products of PCR amplification were digested with DpnI enzyme and transformed in competent XL1-blue cells. The sequences of all constructs were corroborated with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) at the sequencing facility of Instituto de Fisiologia Celular, UNAM, México.

Protein Expression and Purification of the Wild-type Enzyme and the Mutants. Protein expression in strain IBPC590 is constitutive; temperature for expression was selected at 30 °C. GlcN6P deaminase was purified as previously reported (10) using allosteric site-affinity chromatography. Mutants were purified following the same procedure. The purity of the preparations was verified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12%) with a yield higher than 98% as judged by densitometry analysis of the Coomassie blue-stained gel.

Protein Concentration. Concentrations of wild-type enzyme and mutant enzymes before labeling were calculated from their absorbance at 279 nm in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), using the known molar absorptivity of $20.02 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (10, 11). Concentration data always refer to the hexameric protein. Protein concentrations of mutants chemically modified with mBBr and dansyl-amidoethyl-MTS were measured with the bicinchoninic method (18), using wild-type protein as standard. mBBr-labeled protein concentrations

were estimated using the molar absorptivity at 380 nm of $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (19).

Enzyme Assays. GlcN6P deaminase activity was assayed in the direction of fructose-6P formation by the colorimetric measurement of fructose at fixed times as previously reported (10). The progress of the reaction was always kept below 5% conversion of the initial substrate. Measurements were made in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), at 30 °C. Kinetic data were analyzed with the nonlinear regression subroutine of the program Origin 7 (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). The experimental data obtained were fitted to the MWC equation (12, 20).

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} n [E_t] [Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}]}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad (1)$$

Where α is normalized substrate concentration [$\text{GlcN6P}/K_m^R$], L is the ratio between the two conformers T/R, and c is the ratio of the dissociation constants for the R- and T-states (K_R/K_T); $[E_t]$ is the concentration for the hexameric protein.

Chemical Modification of Unique Reactive Cysteines at Position 164 or 206 with mBBr and Dansyl-amidoethyl-MTS and Binding Efficiency. Labeling of purified mutants of GlcN6P deaminase at unique reactive cysteine positions 164 or 206 was carried out with a 10× molar excess of fluorophores dissolved in 20% DMSO (v/v), with a final concentration of the organic solvent not higher than 5% (v/v) to avoid protein denaturation. To carry out the complete chemical modification, the samples were incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 4 °C for 12 h (overnight). Protein concentrations used during the chemical modification procedures varied between 5 and 10 mg/mL. Previous to labeling, protein samples were reduced with 1 mM DTT (in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 h at 4 °C), followed by gel filtration in an HR-100 column (Pharmacia, Biotech) to eliminate the excess of DTT. After chemical modification, the excess of the label was removed by successive protein concentration and dilution with an Amicon Ultra-4 filter device (10 kDa of cutoff), for at least 10 000 times of dilution factor for complete removal of the excess of label. Labeling efficiency was tested by the reactivity of the protein to 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB, 21), by measuring the release of 2-nitrobenzoate (TNB). Incubation of the triple mutant C118S/C228S/C239S in its native state showed that the level of background labeling was less than 1%, as judged by the fluorescence of mBBr spuriously bound to the protein.

Fluorescence Determinations at Steady State. Fluorescence emission at steady state was carried out on an ISS PC1 spectrofluorometer (ISS Inc., Champine, IL); the temperature of the samples was equilibrated at 30 °C with a water bath, using 1 μM of final enzyme concentration in 50 mM Tris-HCl (pH7.5). Excitation wavelength for mBBr-labeled proteins was 381 nm and for dansyl-amidoethyl-MTS-labeled proteins was 341 nm. The band-passes for excitation and emission were 4 and 8 nm, respectively. The fluorescence emission spectra at saturation of ligands were measured from 400 to 600 nm, with an integration time of 1 s and a step size of 1 nm. Titrations of ligands measured by fluorescence emission spectra were collected for bimane- or dansyl-amidoethyl-labeled proteins from 450 to 500 nm or from

Table 1: Kinetic Parameters of Triple Mutant C118S/C228S/C239S of GlcN6P Deaminase and Wild-type Enzyme of *E. coli*

	k_{cat} (s^{-1}) ^a	K_{M} (mM) ^b	$K_{0.5\text{GlcN6P}}$ (mM) ^c	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	L ($\times 10^6$) ^d	c ^d	$K_{\text{i GlcN-ol-6P}}$ (μM) ^e
wild-type GlcN6P deaminase	153 \pm 0.08	0.5 \pm 0.04	5.2 \pm 0.04	1.43×10^5	1.0 \pm 0.04	0.02 \pm 0.002	2.23 \pm 0.4
C118S/C228S/C239S GlcN6P deaminase	96 \pm 0.06	0.46 \pm 0.07	5.1 \pm 0.06	2.23×10^5	0.8 \pm 0.05	0.022 \pm 0.005	4.3 \pm 0.2

^a Data calculated from the fitted MWC model (20) by nonlinear regression. ^b Data calculated from the fitted Michaelis–Menten equation in saturating concentrations of the allosteric activator. ^c Data calculated from the fitted Hill equation in absence of the allosteric activator. ^d Data calculated from the fitted MWC equation in the absence of the allosteric activator. ^e Data calculated from the fitted linear competitive equation in the presence of 2 mM of the activator. All constants and deviations standards were calculated from at least three experiments.

450 to 550 respectively, with an integration time of 3 s and a step size of 0.5 nm. The λ_{max} of the emission spectra was calculated from the first derivative of the spectra. Protein modified with dansyl-amidoethyl-MTS required approximately 20 min to stabilize a drift in basal fluorescence emission before the addition of ligands.

Relative Solvent Polarity Determinations with Bimane–Cysteine and Dansyl-amidoethyl–Cysteine. Correlation curves for fluorophores attached to cysteine with solvent polarity was carried out by reacting mBBR (30 μM) or dansyl-amidoethyl-MTS (30 μM) with L-cysteine (150 μM), and then measuring the fluorescence emission spectra in dioxane/water mixtures that ranged from 0 to 100% (v/v) of dioxane at 30 °C. For fluorescence emission calibration, final concentration of fluorophores attached to cysteine was 1 μM , in 50 mM Tris-HCl (pH7.5).

Quantum Yield Measurements. The quantum yield of mBBR- or dansyl-amidoethyl-MTS-labeled proteins and the intrinsic fluorescence of the wild-type enzyme were measured as described (22), using quinine sulfate (quantum yield equal to 0.55 in 1 N H₂SO₄) as standard. Corrected emission spectra for the different fluorophores were collected at different intervals: for quinine sulfate was from 370 to 700 nm (360 nm of λ_{exc}), for wild-type protein was from 305 to 450 nm (295 nm of λ_{exc}), for dansyl-amidoethyl-labeled proteins were from 350 to 700 nm (341 nm of λ_{exc}), and for bimane-labeled proteins were from 391 to 700 nm (381 nm of λ_{exc}). Basal buffer fluorescence was subtracted from each sample before quantum yield.

Molecular Visualization and Analysis of Structural Differences between T- and R-Conformer. Molecular models and figures were created with PyMOL program (23). Introduction of tryptophan at position 164 or 206 (mutation in silico) was done by choosing a rotamer of tryptophan with lowest energy into the protein data bank (PDB) file of the hexameric T-conformer (1fs6) and R-conformer (1frz), from the PyMOL program rotamer library. After tryptophan replacement into the structure file of each conformer, the CHARMM energy function algorithm (24) was used to minimize the rotamer conformation of the introduced tryptophan. Minimizations were performed using the program CHARMM Beta Release Version 28b1 on a Linux-2.4.20-8 (i686) 1.5 GHz Athlon CPUs, by the adopted basic Newton–Raphson (ABNR) method, using 500 cycles of minimization. Calculation of the solvent accessible surface areas from the PDB files on the T- or R-conformer was done by the NACCESS program that use the algorithm of Richard (25), considering a radius of the probe of 1.4 Å.

RESULTS

Wild-type GlcN6P Deaminase and Triple Mutant C118S/C228S/C239S Behave as Allosteric System of K-type. From the four residues of cysteine per monomer in the wild-type enzyme (118, 228, 219, and 239), two react with thiol reagents in the T-conformation (positions 118 and 239), while the reactivity for thiols is completely protected in the R-conformation (26). However, these cysteines were not suitable for monitoring conformational changes by SDL, because of a notably reduction in the activity after chemical modification. Nevertheless, it has been reported that replacement of cysteine 118 and/or 239 by serine does not modify allosteric activation of K-type (26). Therefore, to eliminate the unwanted reactivity of thiol groups during fluorescent labeling, three of these cysteines were replaced by serine (C118S/C228S/C239S). The triple mutant was not reactive to DTNB in the native state, since the only residue of cysteine present (position 219) is at the center of the hexameric structure and is probably forming a disulfide bond, as evidenced by crystallographic studies (13). Table 1 shows the kinetic parameters of the wild-type and the triple mutant C118S/C228S/C239S of the enzyme. The triple mutant was active and exhibited a positive homotropic and positive heterotropic activation of K-type for the deaminase reaction: the $K_{0.5}$ for substrate decreased at higher concentrations of the allosteric ligand (in measurements of initial velocities at different concentrations of GlcNAc6P), while k_{cat} did not change (see Table 1). However the k_{cat} was reduced to 96 s^{-1} (~66% of the wild-type), while the L and c parameters of the MWC model remained as in the wild-type enzyme (see Table 1). Also the K_{i} measured (4.3 \pm 0.2 μM) for the linear competitive inhibitor (GlcN-ol-6P) in the presence of allosteric activator was similar to the one for the wild-type enzyme (2.43 \pm 0.2 μM , Table 1). Therefore, the allosteric properties of the triple mutant used as the starting point for SDL remained as in the wild-type GlcN6P deaminase of *E. coli*.

Kinetics of GlcN6P Deaminase Labeled at Position 164 or 206 with Bimane or Dansyl-amidoethyl Moiety. To obtain a system with cysteine reactivity to the positions 164 or 206, site-directed mutagenesis was carried out from the previously described triple mutants (C118S/C228S/C239S); the mutants obtained, H164C/C118S/C228S/C239S and S206C/C118S/C228S/C239S, were named as 164C-GlcN6P deaminase and 206C-GlcN6P deaminase, respectively. Labeling efficiency of the mutant enzymes with mBBR or dansyl-amidoethyl-MTS was 98% as determined by their reactivity to DTNB (see Materials and Methods). Kinetics of deaminase activity of labeled proteins showed a reduction of velocity of 50%

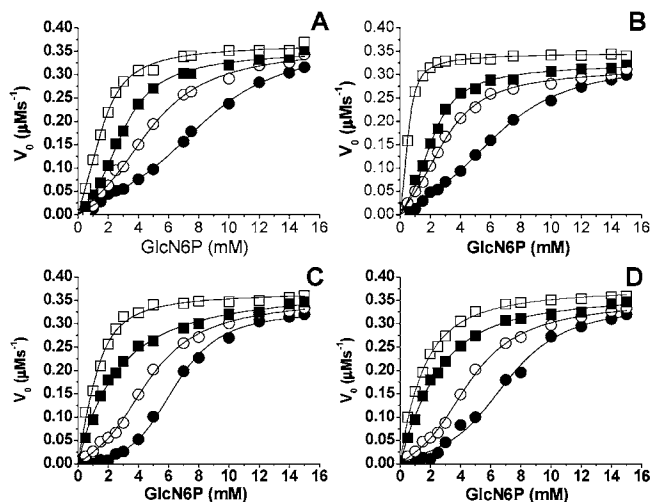


FIGURE 2: Initial velocity curves for the deaminase reaction for 164C-GlcN6P and 206C-GlcN6P deaminases chemically modified with mBBr and dansyl-amidoethyl-MTS at different fixed concentration of the allosteric ligand. Initial velocities were expressed in micromolar of fructose produced per second per mole of hexameric enzyme and were measured at 30 °C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). (A) Bimane-164C-GlcN6P deaminase; (B) dansyl-amidoethyl-164C-GlcN6P deaminase; (C) bimane-206C-GlcN6P deaminase; and (D) dansyl-amidoethyl-206C-GlcN6P deaminase. The fixed concentrations of the allosteric activator (GlcNAc6P) were 0 (●), 0.01 (○), 0.5 (■), and 1 mM (□) for all protein preparations. The curves corresponded to the fit of the data to the MWC model (20) by nonlinear regression.

as compared to wild-type enzyme. Nevertheless, positive homotropic and heterotropic activations were obtained when initial velocities were followed at different GlcNAc6P concentrations (Figure 2). Kinetic data adjusted to the MWC model indicated a K -type allosteric activation pattern: $K_{0.5}$ for substrate diminished from ~ 5 mM in the absence of allosteric activator to ~ 0.5 mM in the presence of allosteric activator (Figure 2 and Table 2), and the k_{cat} of the four mutant enzymes did not change; their values were between 70 and 72 s^{-1} . The L parameter varied from 0.7×10^6 to 1.0×10^6 ; and the c parameter ranged from 0.02 to 0.04, which indicated that the equilibrium between T- and R-conformers is remarkably displaced toward the T-conformer in the absence of ligands as in the wild-type enzyme. The K_i measured for the competitive inhibitor GlcN-ol-6P with these enzymes was similar to the value reported (12, Table 2). Therefore, GlcN-ol-6P was used as a ligand of the active site to induce conformational changes instead of the substrate

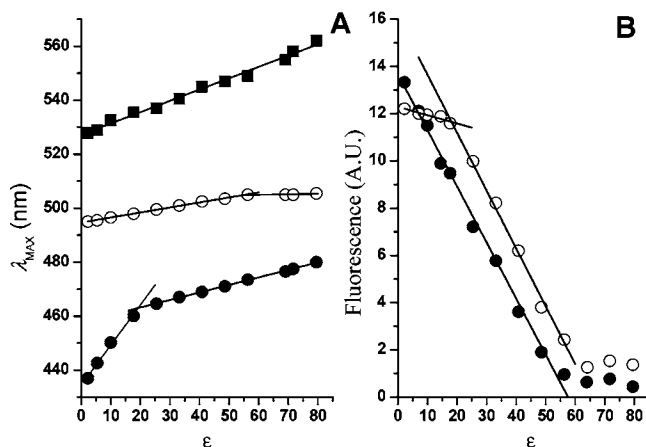


FIGURE 3: Dependence of fluorescence emission spectra of bimane-cysteine and dansyl-amidoethyl-cysteine with the solvent polarity (ϵ) of the medium. The fluorescence spectra were recorded at 30 °C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) with mixtures of buffer/dioxane to generate the different solvent polarities. (A) Linear correlations on λ_{max} of the fluorescence emission spectra at different dielectric constant values generated by mixtures of buffer/dioxane for bimane-cysteine (●) and for the two maxima of the fluorescence emission spectra (λ_{max1} , ○, and λ_{max2} , ■) of dansyl-amidoethyl-cysteine. (B) Linear correlations for the changes in the intensity of fluorescence emission (in arbitrary units) of dansyl amidoethyl-cysteine at different dielectric values generated by mixtures of buffer/dioxane. Intensity of fluorescence emission for the first maximum (○) and for the second maximum (●).

(GlcN6P), due to the kinetic and crystallographic evidences that GlcN-ol-6P induce the T to R transition (13, 14).

Fluorescence of Bimane or of Dansyl-amidoethyl Attached to Cysteines Is Dependent on Solvent Polarity. To correlate the changes on the fluorescence emission spectra of the labels at positions 164 or 206 of GlcN6P deaminase with the T to R transition, the solvent polarity dependence of the spectral properties of the mBBr and dansyl-amidoethyl-MTS attached to cysteine were tested prior to the chemical modification the enzyme. The spectroscopic properties of mBBr have been described (6, 27); however, we include the mBBr characterization for comparison purposes. Correlation curves of the change in the maximal emission wavelength (λ_{max}) with the solvent polarity of the medium (Figure 3A) were obtained with mixtures of dioxane ($\epsilon = 2.2$) and water ($\epsilon = 79.5$). Fluorescence emission spectra of bimane-cysteine showed a shift in the λ_{max} from ~ 440 to 475 nm (λ_{exc} 381 nm) when solvent polarity was increased (Figure 3A), and two intervals of linear correlations were observed (6, 27); there was no linear correlation with fluorescence intensity (data not

Table 2: Kinetic Parameters of the Mutants of GlcN6P Deaminase of *E. coli*, Labeled with mBBr and Dansyl-amidoethyl-MTS

	k_{cat} (s^{-1}) ^a	K_M (mM) ^b	$K_{0.5GlcN6P}$ (mM) ^c	k_{cat}/K_M	L ($\times 10^6$) ^d	c ^d	K_i GlcN-ol-6P (μ M) ^e
bimane-164C GlcN6P deaminase	71.6 \pm 0.08	0.52 \pm 0.014	5.1 \pm 0.01	1.30×10^5	1.0 \pm 0.05	0.042 \pm 0.003	3.6 \pm 0.5
dansyl-164C GlcN6P deaminase	70.6 \pm 0.1	0.51 \pm 0.02	5.2 \pm 0.02	1.38×10^5	0.8 \pm 0.06	0.020 \pm 0.002	4.1 \pm 0.6
bimane-206C GlcN6P deaminase	69.5 \pm 0.07	0.52 \pm 0.018	4.6 \pm 0.05	1.33×10^5	0.7 \pm 0.03	0.038 \pm 0.004	3.5 \pm 0.4
dansyl-206C GlcN6P deaminase	70.9 \pm 0.11	0.49 \pm 0.02	5.1 \pm 0.04	1.44×10^5	0.9 \pm 0.07	0.033 \pm 0.002	3.8 \pm 0.6

^a Data calculated from the fitted MWC model (20) by nonlinear regression. ^b Data calculated from the fitted Michaelis-Menten equation in the saturating concentrations of the allosteric activator. ^c Data calculated from the fitted Hill equation in absence of the allosteric activator. ^d Data calculated from the fitted MWC equation in the absence of the allosteric activator. ^e Data calculated from the fitted linear competitive equation in the presence of 2 mM of the activator. All constants and deviations standards were calculated from at least three experiments.

shown). Dansyl-amidoethyl–cysteine showed two maxima in its fluorescence emission spectra: the $\lambda_{\max 1}$ which was shifted from ~ 490 to 505 and the $\lambda_{\max 2}$ which was shifted from ~ 530 to 560 nm when the solvent polarity of the medium was increased (λ_{exc} 341 nm). For the first peak, two intervals of linear correlation of λ_{\max} with solvent polarity were observed, while for the second peak ($\lambda_{\max 2}$), one linear correlation was found (Figure 3A). The correlations between solvent polarity and fluorescence intensity showed two linear correlations for the first maximum and one linear correlation for the second maximum (Figure 3B). No further changes in the fluorescence intensity were observed at values higher than ~ 50 in the dielectric constant of the medium (Figure 3B). It is noteworthy that the ratio of fluorescence intensity between the two peaks observed for dansyl-amidoethyl–cysteine was inverted at values of the dielectric constant lower than 10; the ratio of fluorescence intensity of the first peak with respect to the second peak was >1 at values higher than 10 of the dielectric constant, while at values lower than 10, the ratio was <1 . Therefore, both fluorophores seem to be excellent labels to correlate the solvent polarity of the medium with measurable changes in the spectroscopic parameters (6, 27). In summary, the observed relationships for linear correlations were, for bimeane–cysteine, $\lambda_{\max} = 1.63$ (nm/ ϵ) $D + 434.5$ nm (for ϵ between ~ 2 and 18), $\lambda_{\max} = 0.278$ (nm/ ϵ) $D + 457.3$ nm (for ϵ between ~ 18 and 60) and, for dansyl-amidoethyl–cysteine, $\lambda_{\max 1} = 0.185$ (nm/ ϵ) $D + 494.2$ nm (for the ϵ between ~ 2 and 56), $\lambda_{\max 2} = 0.419$ (nm/ ϵ) $D + 527$ nm (for the ϵ between ~ 2 and 80), where D is the dielectric constant.

Changes in Spectra of Fluorescence on Labeled Positions with Bimeane Moiety upon Addition of Active Site or Allosteric Ligands at Saturation. The experimental advantage of incorporating fluorophores such as mBBr or dansyl-amidoethyl-MTS is that the wavelength of excitation (381 or 341 nm, respectively) does not interfere with the intrinsic fluorescence of proteins, except for a possible quenching effect of tryptophan on bimeane moiety when both residues are less than 10 \AA apart from each other (7). Nevertheless, position 164 is located at more than 10 \AA from the closer tryptophan (residue 224) and is located at 14.7 \AA from the NE2 residue of the His143 at the active site and 20.2 \AA away from the NH2 residue of the Arg158 from the allosteric site in the closer distance. Also, addition of GlcN-ol-6P (1 mM) or of GlcNAc6P (5 mM) to cysteine–bimeane induced no changes in fluorescence emission (data not shown); therefore, fluorescence changes observed during ligand titration must be directly correlated to the changes in the microenvironment of the labeled residues of the protein. Emission spectrum of fluorescence of bimeane-164C-GlcN6P deaminase showed a λ_{\max} of 475 nm in the absence of ligands and was shifted to 472 nm after addition of the active site ligand (GlcN-ol-6P) at saturating concentrations, or to 468 nm after addition of the allosteric site ligand (GlcNAc6P) at saturating concentrations (Figure 4A). For the enzyme labeled with bimeane at position 206 (bimeane-206C-GlcN6P), the λ_{\max} shifted from 477 nm (in the absence of ligand) to 474 nm in the presence of GlcN-ol-6P at saturating concentrations or to 472 nm in the presence of GlcNAc6P at saturating concentrations (Figure 4B). Therefore, both positions 164 and 206 sensed a reduction of microenvironment polarity when the R-conformer was induced by either ligand, and according to our

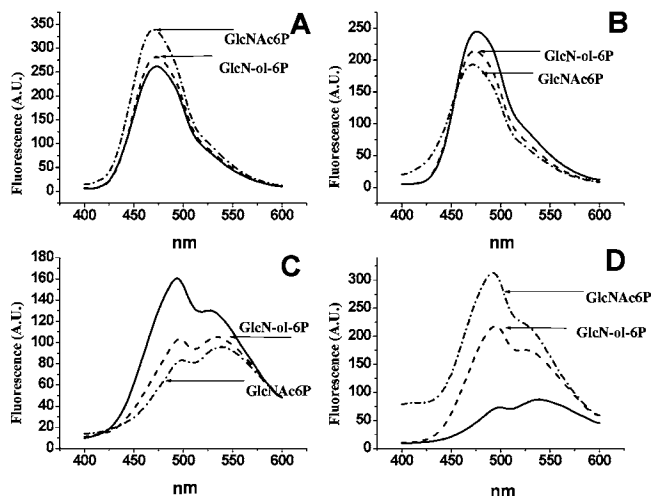


FIGURE 4: Steady state of fluorescence emission spectra of the fluorescently labeled GlcN6P deaminases with bimeane or dansyl-amidoethyl moieties in the presence of the ligands of the active site or the allosteric site at saturation. The fluorescence spectra were recorded at $30 \text{ }^\circ\text{C}$, in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). For the four fluorescently labeled proteins, the saturating concentrations of GlcNAc6P were 2 mM and of GlcN-ol-6P were 0.3 mM. (A) Bimeane-164C-GlcN6P deaminase; (B) bimeane-206C-GlcN6P deaminase; (C) dansyl-amidoethyl-164C-GlcN6P deaminase; and (D) dansyl-amidoethyl-206C-GlcN6P deaminase.

polarity calibration, the microenvironment polarity changed from ~ 55 units of the dielectric constant in the absence of ligands to ~ 48 in the presence of GlcN-ol-6P or ~ 43 in the presence of GlcNAc6P (Figure 3). Both preparations presented maximal changes in their fluorescence emission spectra after GlcNAc6P addition. Additionally, the change in the λ_{\max} in the fluorescence emission produced by the allosteric activator was not further modified when the ligand of the active site was added. On the contrary, the fluorescence spectra produced by the active site ligand GlcN-ol-6P were modified by addition of GlcNAc6P, giving rise spectra similar to the ones obtained with the allosteric ligand alone (Figure 4). The differences in the maximal change in the λ_{\max} of fluorescence emission indicate different microenvironments in the labeled positions when the allosteric transition was induced from the active site or from the allosteric site.

Changes in Spectra of Fluorescence on Labeled Positions with Dansyl-amidoethyl Moiety upon Addition of Active Site or Allosteric Ligands at Saturation. Position 206 is 15.3 \AA away from the NE2 residue of the His143 of the active site and is 27 \AA away from the NH2 residue of Arg158 of the allosteric site in the closer distance. Addition of GlcN-ol-6P (1 mM) or GlcNAc6P (5 mM) did not change the fluorescence emission of the dansyl-amidoethyl–cysteine (data not shown). Therefore, the variations in fluorescence emission spectra were also due to changes in the environment of the labeled positions of the protein. Dansyl-164C-GlcN6P deaminase in the absence of ligands exhibited two maxima in its fluorescence spectra at 493 ($\lambda_{\max 1}$) and 530 ($\lambda_{\max 2}$) nm (λ_{exc} of 341 nm); addition of GlcN-ol-6P at saturating concentrations shifted the two λ_{\max} values of the emission spectra to 496 and 536 nm, respectively; addition of GlcNAc6P at saturating concentrations shifted the two λ_{\max} values to 498 and 538 nm, respectively (Figure 4C). The shift in the λ_{\max} suggested that the dansyl-164C-GlcN6P deaminase sensed an increase in the microenvironment

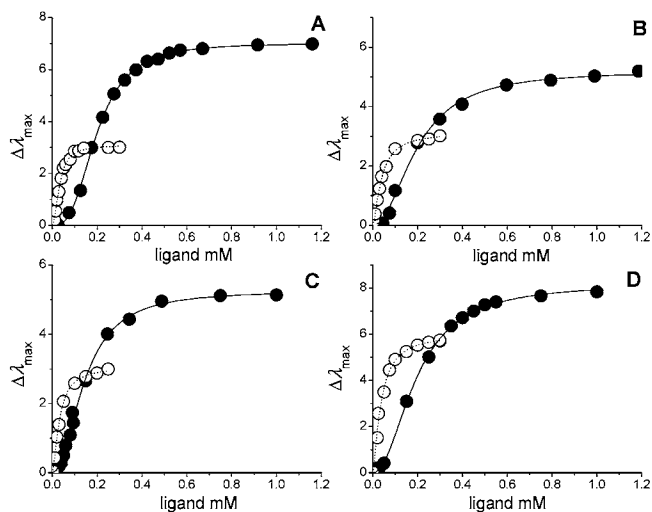


FIGURE 5: Titration of the allosteric site and the active site of the fluorescent-labeled GlcN6P deaminases. Titrations were measured by the changes in the absolute value of the difference of the maxima of the fluorescence emission spectra in the absence of the ligand minus in the presence of the ligand ($\Delta\lambda_{\max}$). The titration experiments were made with the ligand of the allosteric site (GlcNAc6P, ●) or the ligand of the active site (GlcN-ol-6P, ○), recorded at 30 °C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). (A) Changes of $\Delta\lambda_{\max}$ for bimane-164C-GlcN6P deaminase; (B) changes of $\Delta\lambda_{\max}$ for dansyl-amidoethyl-164C-GlcN6P deaminase; (C) changes of $\Delta\lambda_{\max}$ for bimane-206C-GlcN6P deaminase; and (D) changes of $\Delta\lambda_{\max}$ for dansyl-amidoethyl-206C-GlcN6P deaminase. The curves corresponded to the fit of the data to the Hill equation by nonlinear regression.

polarity in the presence of the ligands (conformer R). This contrasted strongly with the behavior observed for the bimane-164C-GlcN6P deaminase. This discrepancy in the solvent polarity reported by each fluorophore is analyzed in terms of the crystallographic structure (see Discussion). For dansyl-206C-GlcN6P deaminase in the absence of ligands, the two λ_{\max} values were 500 and 538 nm, and after addition of GlcN-ol-6P at saturating concentrations, the λ_{\max} values were shifted to 494 and 529 nm, respectively. In the presence of GlcNAc6P at saturating concentrations, the two λ_{\max} values were shifted to 492 and 528 nm, respectively (Figure 4D). The estimated value of relative polarity from our correlation was close to 10 in the dielectric constant of the microenvironment of the labels (in absence of ligands) but decreased to 5 and 3 in the presence GlcN-ol-6P and GlcNAc6P, respectively (Figure 3A). These data indicated a reduction

in the microenvironment polarity at position 206 when the R-conformer was induced. Higher changes in the fluorescence spectra were observed in the presence of the allosteric ligand than with the ligand of the active site. Also, addition of the allosteric ligand to the enzyme saturated with the active site ligand always generated a change in the fluorescence spectra (increasing the values obtained by the allosteric ligand alone). These results were consistent with those obtained with the bimane-206C-GlcN6P enzyme and suggest differences in the microenvironment polarity detected by the fluorescent labels when the T to R transition was induced by either ligand.

Titration of the Active Site or Allosteric Ligands Measured by the Changes in λ_{\max} of Fluorescent-Labeled Mutants. Figure 5 and Table 3 show the changes in the fluorescence spectra of labeled enzymes titrated with the ligands of the active site or the allosteric site. The changes in the absolute value of λ_{\max} of fluorescence emission were used as the correlation parameters for the titration with ligands with the labeled enzymes to avoid negative values (the shifts in the λ_{\max} were to lower wavelengths when the relative polarity diminishes). For dansyl-164C-GlcN6P deaminase and dansyl-206C-GlcN6P deaminase, both $\Delta\lambda_{\max 1}$ (first peak) and the changes in fluorescence intensity gave the same correlation parameters for the titration with the active or the allosteric site ligands. In general, the $K_{0.5}$ for GlcNAc6P ranged from $\sim 194 \mu\text{M}$ (for both labeled proteins of 164C-GlcN6P deaminase and dansyl-206C-GlcN6P deaminase) to $143 \mu\text{M}$ for bimane-206C-GlcN6P deaminase (see Figure 5 and Table 3). These values are 4–5 times higher than the K_d reported for GlcNAc6P from direct binding to the wild-type enzyme (12, 28). Therefore, steric effects produced by incorporation of fluorescent labels at the protein interface may disturb propagated critical contacts that originate the reduction in the affinity for the allosteric site. $K_{0.5}$ for GlcN-ol-6P for all labeled mutants was $\sim 30 \mu\text{M}$ (Table 3), which is in agreement with the K_d obtained by direct binding in the absence of allosteric ligand (28). The Hill parameters were higher for allosteric site ligand ranging from 3 for 164-GlcN6P deaminase to 2 for the other three enzyme preparations, while Hill values for GlcN-ol-6P were notably less cooperative, ranging between 1.84 (for bimane-164-GlcN6P deaminase) to ~ 1.4 in the other three fluorescent-labeled preparations. The perturbation created by the introduction of labels maintains an allosteric activation of K-type as in

Table 3: Titration by the Active or the Allosteric Site Ligands to the Mutants of GlcN6P Deaminase Labeled with Fluorophores and Measured by Changes in the Absolute Value of the Difference of the λ_{\max} of Fluorescence Emission Spectra in the Absence of Ligand Minus in the Presence of Ligand ($\Delta\lambda_{\max}$)

	$\Delta\lambda_{\max}$ (nm) ^{a,b}	allosteric site ligand, GlcNAc6P		$\Delta\lambda_{\max}$ (nm) ^{a,b}	active site ligand, GlcN-ol-6P	
		$K_{0.5\text{GlcNAc6P}}$ (mM) ^c	Hill number ^c		$K_{0.5\text{GlcNol6P}}$ (mM) ^c	Hill number ^c
bimane-164C GlcN6P deaminase	7.1	0.194 ± 0.005	2.90 ± 0.08	3.08	0.032 ± 0.009	1.84 ± 0.09
dansyl-164C GlcN6P deaminase	5.03	0.198 ± 0.009	2.15 ± 0.12	3.01	0.038 ± 0.004	1.36 ± 0.07
bimane-206C GlcN6P deaminase	5.05	0.143 ± 0.004	2.06 ± 0.01	3.0	0.032 ± 0.003	1.42 ± 0.012
dansyl-206C GlcN6P deaminase	8.3	0.192 ± 0.015	2.09 ± 0.016	6.0	0.035 ± 0.004	1.39 ± 0.014

^a Data were calculated from a Hill equation in which $(\lambda_{\max}x^n)/(K_d + x^n)$; x is the wavelength in nanometers. ^b Absolute value of the difference of λ_{\max} of the fluorescence emission spectra in the absence of ligand minus λ_{\max} of the fluorescence emission spectra in the presence of ligand. All constants and deviations standards were calculated from at least three experiments. ^c Data were calculated from the titration curves adjusted to the Hill equation by nonlinear regression.

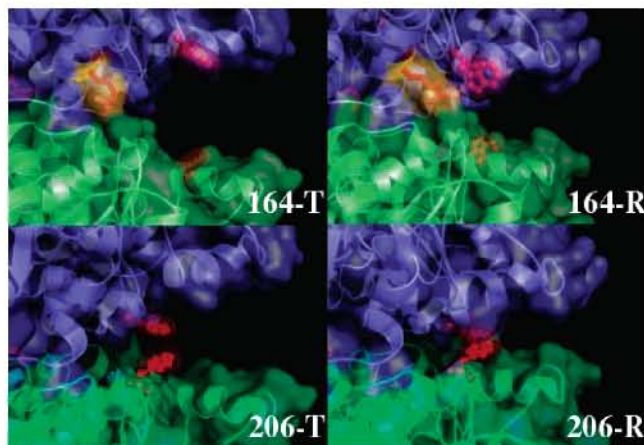


FIGURE 6: Model of the three-dimensional structure of GlcN6P deaminase to indicate the differential interaction of the residues at the interface of two trimers among the T to R transition. The residues 164 and 206 were in red in the T (left) state and R (right) state, respectively; the Arg253 in orange (see Discussion) residues were indicated; also, the solvent-accessible surface is indicated to appreciate the closure process from T to R states. Residues His164 or Ser206 were mutated “in silico” for tryptophan residue as described in Materials and Methods. Molecular graphic representations were made with PyMOL program (23).

the wild-type enzyme, and the binding constants obtained by changes in fluorescence spectra correlated with the kinetic constants measured in this work and previous studies (11, 12). Therefore, the process studied here throughout spectral changes (λ_{\max}) of the fluorescent labels when the R-conformer was induced from the active or from the allosteric site indicated structural differences in the rearrangements at the interface of the two trimers that form the enzyme.

DISCUSSION

Glucosamine 6-phosphate deaminase of *E. coli* has two described conformers by the crystallographic studies that apparently correlate with the kinetic activation described for its ligands: a T-conformer in the absence of ligands and an R-conformer in the presence either allosteric ligand (GlcNAc6P) or the active site ligand (GlcN-ol-6P, in the presence of inorganic phosphate 13, 14). The homotropic activation of the substrate with a distinctive sigmoidal shape of initial velocity of GlcN6P deaminase is explained by a change in affinity to the substrate when the equilibrium is shifted toward the R-conformer (Figure 2). Also, heterotropic activation by the allosteric ligand (Figure 2) produces a conformational change in the enzyme toward its R-conformer (Figure 6). Kinetics of this enzyme has been satisfactorily described by the MWC equation (20); however, the renewed interest to correlate the relations between the structure and function of the allosteric proteins have shown that neither the simple two-state model nor the sequential model described the network of allosteric communications of the phosphofructokinase of *E. coli* (14) and *Bacillus stearothermophilus* (15), systems that have been previously described by the two-state allosteric model. Also, recent kinetic studies of encapsulated hemoglobin in silica gels were explained by an extension of the two-state model, in which a preequilibrium between two functionally different tertiary states, rather than quaternary conformations, plays the central role in the allosteric regulation of the hemoglobin (29). Therefore, it is fundamental to develop methods that allow quantitative

determinations of the dynamics of the allosteric systems in solution. Here, fluorescent labeling of GlcN6P deaminase at the residues of the interface between two trimers was performed, to monitor quaternary structure modifications in solution without interfering with important residues at the active or the allosteric sites that may perturb the equilibrium between the T to R transition and test if the conformation of the R'-state induced from the active site indicates structural differences to the R-conformer induced from the allosteric site.

Quaternary Changes of the Structure of GlcN6P Deaminase upon Binding of Ligands at Positions 164 and 206. Histidine 164 is located in the base of the region denominated the lid of the active site (residues 154–184) at the α -helix 7 (Figure 6), facing the interface between trimers. At the T-conformer, position 164 has only intramonomeric contacts, but in the R-conformer, it establishes a van der Waals contact with Arg253 and Glu257 of the contiguous subunit (across a symmetry axis of order two). Arg253 also establishes different contacts: when the enzyme is in the T-conformer, it has a contact with the Glu241, but in the R-conformer, the guanidine moiety is rotated to create a new van der Waals contact with Glu257 and His164. Also, the distance from the NE residue of Arg253 to the NE2 residue of His164 is reduced from 12.5 to 4.8 Å when the T-state is shifted to the R-state.

Ser206 is located in helix 9 that belongs to the external module of the α/β structure described in ref 14. This residue is also facing the interface of two trimers of the hexameric structure. Ser206 in the T-conformer has only intrasubunit interactions, but in the R-conformer, it establishes a closer van der Waals contact with Asp165 of the contiguous subunit (across a symmetry axis of order three). Asp165 also establishes an ionic contact with Lys250 in the R-conformer, which may stabilize this interaction.

Since residues 164 and 206 create new contacts with contiguous subunits upon the T to R shift, the microenvironment of the fluorescent labels introduced at these positions must change accordingly (Figure 6). To gain more insights on the microenvironment changes around residues 164 and 206, surface solvent accessibility was estimated by the program NACCESS (25) based on the crystallographic structures of the T- and R-conformers. Because the size of a biplane attached to the protein is about the size of the tryptophan (6), residues 164 and 206 were modeled as energy-minimized tryptophans (see Materials and Methods). Solvent accessibility calculations for residue 164 indicated a reduction of 36.6 Å² from T-conformer (153.3 Å²) to R-conformer (116.7 Å²), and for residue 206, a reduction of 56.7 Å² from T-state (152.1 Å²) to R-conformer (96.2 Å²). A similar reduction was determined for the original residues His164 and Ser206. The reduction of microenvironment polarity at positions 164 and 206 measured by fluorescent labels correlated with a reduction in solvent accessibility calculated from crystallographic structures (Figure 6), except for the dansyl-164C-GlcN6P deaminase, in which the microenvironment polarity increased after ligand addition. Emission spectra of fluorophore labels attached to proteins are subject to perturbations of the fluorescence signal such as the effect of hydrogen bonds or electrostatic interactions (6, 7). Also, the chemical nature of the label may influence the interval of microenvironment polarity detected; for the

bimane-labeled proteins, the value of the microenvironment polarity detected was ~ 50 in the dielectric constant of the environment, while for dansyl-amidoethylated protein, it was ~ 10 . A possible explanation of the anomalous change for solvent polarity detected by the dansyl-164C-GlcN6P deaminase is that position 164 of the R-conformer may establish a polar contact with Arg253. This interaction was not modified even by the tryptophan substitution made "in silico" (Figure 6). The dansyl-amidoethyl moiety may be more sensitive to detect the polar contacts than bimane. Also, the effect of burying position 164 in the R-conformer could contribute to the lack of detection of this polar contact with bimane but not with dansyl-amidoethyl label. Further studies are required to understand the fluorescence-induced differential effect.

The changes in the fluorescence spectra reflect rearrangements of the enzyme during T to R transition. In fact, the kinetic constants obtained for the labeled proteins (Tables 2 and 3) correlate with the previous kinetic studies (10–12). The only appreciable effect on the kinetic parameters was a reduction of k_{cat} of the labeled proteins (approximately 50% of wild-type activity). This may be due to a steric perturbation of the interface contacts during the allosteric transition. Also, it is important to note that the main decrease in enzyme activity was attributed to the replacement of serines by cysteines (33% of the original activity) and, to a minor extent, to the chemical modification (Tables 1 and 2). Although SDL does not perturb the secondary structure of proteins (6–9), the introduction of new residues, combined with the chemical moieties, disrupts the precise three-dimensional contacts required for maximal velocity. The energy perturbation generated by introduction of chemical groups such as a bimane moiety was minimized at position 164 or 206, because both residues were exposed $\geq 40 \text{ \AA}^2$ in both conformers. The energy destabilization is less than 1.5 kcal for residues labeled with mBBr if the solvent accessible area is $\geq 40 \text{ \AA}^2$, as observed on lysozyme T4 (7). This is an important requisite that should be taken in consideration in SDL studies. For GlcN6P deaminase, chemical modifications of residues with less than 50 \AA^2 of exposed solvent surface in any of the two enzyme conformers produced loss of activity or reduction in the yield of protein production (data not shown).

The Differences in the Microenvironment Detected by the Fluorescent Labels Indicated Structural Differences in the Conformation of the R-State When Is Induced from the Active Site or from the Allosteric Site. A similar behavior of the changes of the fluorescence spectra was observed when GlcN-ol-6P or GlcNAc6P was added. In all cases, the microenvironment polarity was reduced with both ligands (λ_{max} was shifted to lower wavelengths), except for dansyl-164C-GlcN6P deaminase, in which an increase in the microenvironment polarity was obtained with any ligand. Altogether, the data are in agreement with the induction of T to R transition upon interaction with either ligand. Nonetheless, the changes in the fluorescence spectra obtained with the active site ligand was always modified by the allosteric ligand (to the level of the GlcNAc6P alone), but not vice versa. The spectra of fluorescent labels introduced at GlcN6P deaminase were very sensitive to the changes in local polarity due to the high quantum efficiency (0.145 for bimanated proteins and 0.09 for dansyl-amidoethylated

proteins, as compared with 0.007 for the two tryptophans in the wild-type enzyme). For example, note that the small changes in λ_{max} were detected during the ligand titration, despite the wider slit for the emission channel of the spectrofluorometer. Therefore, the microenvironment generated at the R'-conformer from the active site ligand is different to the one generated from the allosteric ligand. Comparison of the crystallographic structures between the two conformers indicated that the upper and lower trimers of the hexameric structure rotate 13.1° around a three-fold axis of symmetry; accordingly, it is likely that the conformational changes associated with GlcN-ol-6P are not as pronounced as the conformational changes (or rotation between the two trimers) associated with GlcNAc6P. Also, crystals of GlcN6P deaminase on the T-conformation are easily disintegrated by the addition of the allosteric ligand. In contrast, addition of GlcN-ol-6P did not modify the crystals of the T-enzyme; this was attributed to the fact that crystalline contacts could have hindered the T to R transition (13, 14). Here, we take this structural information as another evidence of the different role for the ligands to stabilize the R-conformer. In addition, Arg158 and Lys160 of one monomer, together with the terminal amino group of the neighboring subunit, bind the phosphate moiety of the allosteric activator at the R-state (13, 14). Therefore, the R-conformer induced by the active site ligand may not stabilize the positive charges of the allosteric site unless phosphate is added. This idea correlates with the data obtained in the present work: bigger changes and cooperative effects were observed in the fluorescence spectra in the presence of the allosteric ligand as compared with smaller and noncooperative effects observed in the presence of the active site ligand (Figure 5 and Table 3).

Concluding Remarks. The data presented here indicate that the R-conformer induced from the active site is different from the one induced from the allosteric site for the GlcN6P deaminase, as suggested by the differences at the microenvironment of the interface of two trimers of the hexameric enzyme studied by SDL. This information contrast with the two-state model proposed from the crystallographic structures of the R-conformer in the presence of either ligand. Nonetheless, it was not surprising to have a different contribution of either ligand to the conformation of the R-state when fluorescent techniques were applied, due to the inability of crystallographic techniques to reveal or stabilize the diversity of the conformers in solution. These data are in agreement with recent works that show the complexity of the allosteric enzymes regulation (5, 29), in which new intermediates of the crystallographic structures between the T- and R-states were reported, from a single mutant that destabilizes the native R-state of the aspartate transcarbamylase (30). Fluorescence studies of fructose-1,6-biphosphatase indicated that the R-state is part of a conformational family of the T-state (4). Also, a recent study that combines kinetics and tryptophan fluorescence techniques for the GlcN6P deaminase of *E. coli* indicated that the pathway of quaternary changes propagation from the active site is different of the pathway propagation from the allosteric site (28). Ligand-induced quaternary structural rearrangements of allosteric enzymes are an important task that should be undertaken with a combination of techniques in solution, to refine and complement the information obtained from crystallographic

approaches for the advance in the dynamics of the allosteric proteins.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Mario L. Calcagno for introducing to us the GlcN6P deaminase and for helpful discussion, Dr. Jacqueline A. Plumbridge for the *E. coli* strain (IBPC590), Dr. Diego Gonzalez-Halphen for critical reading of the manuscript, and Veronica Cortés-Avilés for technical assistance.

REFERENCES

- Hammes, G. G. (2002) Multiple conformational changes in enzyme catalysis, *Biochemistry* 41, 8221–8228.
- Luque, I., Leavitt, S. A., and Freire, E. (2002) The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 235–256.
- Volkman, B. F., Lipson, D., Wemmer, D. E., and Kern, D. (2001) Two state allosteric behavior in single domain signaling protein, *Science* 291, 2449–2433.
- Nelson, S. W., Iancu, C. V., Choe, J. Y., Honzatko, R. B., and Fromm, H. J. (2000) Tryptophan fluorescence reveals the conformational state of a dynamic loop in recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase, *Biochemistry* 39, 11100–11106.
- Kern, D., and Zuiderberg, E. R. P. (2003) The role of dynamics in allosteric regulation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 748–757.
- Mansoor, S. E., McHaourab, H. S., and Farrens, D. L. (1999) Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling. Studies of T4 lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane, *Biochemistry* 38, 16383–16393.
- Mansoor, S. E., McHaourab, H. S., and Farrens, D. L. (2002) Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence, *Biochemistry* 41, 2475–2484.
- Hubbell, W. L., Gross, A., Langen, R., and Lietzow, M. A. (1998) Recent advances in site-directed spin labeling of proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 649–656.
- Perozo, E., Cortes, D. M., and Cuello, L. G. (1998) Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K⁺ channel studied by EPR spectroscopy, *Nat. Struct. Biol.* 5, 459–469.
- Calcagno, M. L., Campos, P. J., Mulliert, G., and Suástegui, J. (1984) Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine 6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 787, 165–173.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E., and Calcagno, M. L. (1995) Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121, *Biochemistry* 34, 6074–6082.
- 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 homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase, *Biochemistry* 37, 7844–7849.
- Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garrat, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., and Horjales, E. (1995) Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase of *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution, *Structure* 3, 1323–1332.
- Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garrat, R. C., and Oliva, G. (1999) The allosteric transition of glucosamine 6-phosphate deaminase: the structure of T-state at 2.3 Å resolution, *Structure* 7, 527–537.
- Fenton, A. W., and Reinhart, G. D. (2002) Isolation of a single activating allosteric interaction in phosphofructokinase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 41, 13410–13416.
- Ortigosa, A. D., Kimmel, J. L., and Reinhart, G. D. (2004) Disentangling the web of allosteric communication in a homotetramer: heterotropic inhibition of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*, *Biochemistry* 43, 577–586.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Hernandez-Arana, A., and Calcagno, M. (1991) Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from an amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 266–277.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Kosower, N. S., and Kosower, E. M. (1987) Thiol labeling with bromobimanes, in *Methods in Enzymology* (William, B. J., Owen, W. G., Ed.) pp 76–84, Academic Press, New York.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.* 12, 88–118.
- Ellman, G. L. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans, *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443–450.
- Chen, R. (1965) Fluorescence quantum yield measurements: vitamin B6 compounds, *Science* 150, 1593–1595.
- DeLano, W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system on world wide web, <http://www.pymol.org>.
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.* 4, 187–217.
- Hubbard, S. J., and Thornton, J. M. (1993) 'NACCESS', computer program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, London, U.K.
- Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., and Calcagno, M. L. (1992) Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their functional role by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 31, 1153–1158.
- Kosower, E. M., Giniger, R., Radkowsky, A., Hebel, D., and Shusterman, A. (1986) Bimanes 22. Flexible fluorescent molecules. Solvent effects on the photophysical properties of syn-bimanes (1,5-diazabicyclo[3.3.0]octa-3,6-diene-2,8-diones), *J. Phys. Chem.* 90, 5552–5557.
- 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* 44, 1127–1135.
- Viappiani, C., Bettati, S., Bruno, S., Ronda, L., Abruzzetti, S., Mozzarelli, A., and Eaton, W. A. (2004) New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14414–14419.
- Stieglitz, K., Stec, B., Baker, D. P., and Kantrowitz, E. R. (2004) Monitoring the transition from the T to the R state in *E. coli* aspartate transcarbamylase by X-ray crystallography: crystal structures of the E50A mutant enzyme in four distinct allosteric states, *J. Mol. Biol.* 341, 853–868.

BI050306O