

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

**PROPAGACIÓN DE LOS CAMBIOS CONFORMACIONALES
ASOCIADOS A LA TRANSICIÓN ALOSTÉRICA DE LA
GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA
DE *Escherichia coli*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A

Q. A. LORENA DE ANDA AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS
DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FÍSICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM.

ESTE PROYECTO SE CONTÓ CON EL APOYO DEL PROYECTO CONACyT (41328Q).

*A mis padres,
A Lety, Oscar y Alberto.*

AGRADECIMIENTOS

A Ismael Bustos, por su apoyo todos estos años y de quien he aprendido mucho.

A Mario Calcagno, por su apoyo y compartirme su enorme conocimiento y experiencia.

A Vale y Lalo, por nuestra amistad y la historia que seguimos escribiendo. Los quiero mucho.

A Susanne, Leny, Raquel y Victor por su amistad y cariño aun en la distancia. Los quiero mucho.

A Yasser, porque sabemos agradecer a pesar de lo vivido, porque perdimos el equipaje con nuestras rutinas, porque las cosas cambian... y no estamos aquí de visita.

A Martín y Luis, sin su apoyo este trabajo no hubiese sido posible.

A Sergio, por nuestras sustanciosas y divertidas pláticas.

A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas por hacer de ese lugar algo único.

A Felipe Cruz por haber alimentado mi inquietud por la ciencia y por las invaluable lecciones de vida.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus consejos y comentarios.

A los miembros del Jurado, por sus correcciones, sugerencias y atinados comentarios.

A la Facultad de Química y a la UNAM por mi formación.

*“El experimentador que no sabe lo que está buscando,
no comprenderá lo que encuentra.”
Claude Bernard*

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	8
I. ANTECEDENTES	9
ALOSTERÍA Y COOPERATIVIDAD	9
Alostería.....	9
Cooperatividad	11
MODELOS ALOSTÉRICOS CLÁSICOS	13
Modelo concertado MWC	13
Modelo secuencial de KNF	17
AMINOAZÚCARES.....	20
GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA	23
i) Transición alostérica	26
ii) Sitio alostérico	27
iii) Sitio Activo.....	28
iv) Mecanismo.....	30
CONSTRUCCIÓN DE HETEROHEXÁMEROS COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS ALOSTÉRICAS.....	32
II. OBJETIVOS	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Reactivos.....	35
Construcción de las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E	35
Mutagénesis	35
Expresión de las enzimas mutantes.....	36
Purificación de la mutante L3I.....	37
Purificación de la mutante L3I:R172A:K208E.....	37
Cuantificación de enzima.....	37
Determinación de los patrones cinéticos de las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E.....	37
Análisis cinético	38
Construcción de heterohexámeros.....	38
Cromatografía de filtración molecular	39
Caracterización hidrodinámica de la Glucosamina-6P-desaminasa silvestre y la mutante L3I:R172A:K208E	39
Construcción de heterohexámeros.....	40
Separación de heterohexámeros.....	40
Identificación de heterohexámeros.....	41
Comparación del comportamiento cinético de la enzima silvestre en condiciones nativas, después del tratamiento con urea y de los posibles heterohexámeros 3:3.....	41
Influencia de la urea 8 M sobre la actividad de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa.	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
Construcción, expresión y purificación de la enzima mutante L3I	43
Construcción, expresión y purificación de la enzima mutante L3I:R172A:K208E.....	43
Caracterización cinética de la enzima mutante L3I	44
Caracterización cinética de la mutante L3I:R172A:K208E	48
Caracterización hidrodinámica de la Glucosamina-6P-desaminasa silvestre y la mutante L3I:R172A:K208E	53

Construcción de heterooligómeros.....	60
Influencia de la urea en la actividad enzimática de la Glucosamina-6P-desaminasa.....	68
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS.....	71
REFERENCIAS	74

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son moléculas dinámicas que pueden modular su actividad catalítica o capacidad de reconocimiento molecular mediante cambios conformacionales generados por la unión de ligantes específicos. Estos cambios tienen un origen local en donde el ligante interactúa con un número reducido de residuos en la proteína. Sin embargo, los efectos que tiene esta unión se propagan al resto de la molécula. Lo más extraordinario de este fenómeno es que, aun cuando los efectos se propaguen a zonas distales de la proteína, sólo un pequeño conjunto de aminoácidos es el que se afecta. Entonces, es plausible la idea de que la transmisión de los cambios conformacionales sea posible debido a la existencia de una red cooperativa de interacciones, y a la comunicación entre los sitios catalíticos y de regulación. Una de las metas de estudiar este tipo de mecanismos llamados alostéricos, es determinar cómo una alteración inicial originada en un sitio específico, es capaz de llegar a la estructura de subunidades distantes.

La descripción de los cambios conformacionales es la base para la comprensión de la función alostérica; los modelos cinéticos hasta ahora propuestos sobre la transición alostérica no plantean un mecanismo detallado. Si bien la determinación de la estructura de una enzima proporciona información sobre los arreglos estructurales, no ofrece ningún detalle sobre la naturaleza de dicho mecanismo. En este contexto, la construcción de especies híbridas, basada en la combinación de subunidades silvestres y subunidades con mutaciones específicas, ha sido una herramienta valiosa que ha permitido a otros grupos de trabajo el análisis de la transmisión intramolecular de señales regulatorias. Estos trabajos ponen de manifiesto lo diverso de los mecanismos que generan cooperatividad y lo peculiar de éstos para cada enzima.

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa es un excelente modelo para el estudio de las bases estructurales de la regulación alostérica en las enzimas por su simplicidad estructural y cinética. El extenso trabajo de investigación que se ha realizado con esta enzima a lo largo de más dos décadas ha permitido la exploración del comportamiento alostérico así como el entendimiento de éste en la *GlcN6P* desaminasa. Sin embargo, preguntas sobre el mecanismo de comunicación entre subunidades y los cambios que ocurren, principalmente a nivel de la estructura terciaria, permanecen sin contestar.

RESUMEN

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (EC 3.5.99.6) de *Escherichia coli* es una enzima alostérica constituida por seis subunidades y es activada alostéricamente por *N*-acetilglucosamina-6-fosfato. Participa en el metabolismo de aminoazúcares y está ampliamente distribuida entre bacterias y mamíferos. Esta enzima cataliza la desaminación e isomerización de la glucosamina-6-fosfato para producir fructosa-6-fosfato e ión amonio. En el marco del estudio de la propagación de los cambios conformacionales que sufre el hexámero durante la transición alostérica, Lucumí-Moreno (2005) planteó la metodología para la construcción de especies heterohexaméricas. Estas especies han sido de utilidad en diversos sistemas alostéricos para analizar la transmisión de información entre subunidades. En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización cinética de las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E de la glucosamina-6-fosfato desaminasa para emplearlas en la construcción de heterooligómeros. La mutación L3I tiene la función de facilitar la identificación de las cadenas por secuenciación de Edman; esta mutante mostró ser esencialmente un sistema alostérico del tipo *K*. El análisis de las propiedades catalíticas de la mutante L3I muestran que es menos activa que la enzima silvestre. Lo que sugiere que la mutación alteró la conformación de los residuos responsables de la catálisis pero no así los de unión. Por otra parte, la mutante L3I:R172A:K208E exhibió un comportamiento cinético complejo consistente en dos fases. Este comportamiento podría explicarse por la presencia de isoformas de la enzima generadas por la modificación de su vía de plegamiento. Sin embargo, son necesarios estudios fisicoquímicos y estructurales minuciosos para confirmar el origen de dicho comportamiento. Aun cuando la mutante L3I:R172A:K208E, por sus propiedades catalíticas, no es el mejor modelo para la formación de heterooligómeros, se ensayó la metodología propuesta por Lucumí-Moreno para la construcción de especies híbridas. Este método se basa en la exposición de una mezcla de enzimas silvestre y mutante a una alta concentración de urea por tiempo corto, suponiendo que esto produce un intercambio de monómeros entre hexámeros mutantes y hexámeros silvestres, y su posterior renaturalización al retirar el agente caotrópico. Los resultados mostraron que la desnaturalización de la glucosamina-6-fosfato desaminasa en

las condiciones ensayadas no es reversible y no fue posible observar la generación de especies híbridas.

I. ANTECEDENTES

ALOSTERÍA Y COOPERATIVIDAD

Alostería

La alostería es el fenómeno fundamental en el control de la transmisión de señales, de la catálisis y de la expresión de genes en la célula, cuya característica es el cambio de conformación de una zona de la proteína debida a la unión de un ligante en una región distante o sitio alostérico. Esto permite la modulación de la actividad de la proteína mediante cambios en el reconocimiento del sustrato o en la catálisis a través de efectores o variaciones en la concentración de los ligantes del sitio alostérico.

La palabra alostérico se deriva de las raíces griegas *allos*, “otro”, y *stereos*, “sólido” o “espacio”, y hace referencia a distintas conformaciones estructurales de las proteínas. Los cambios alostéricos se producen por la ocupación de un sitio diferente del sitio activo, el cual se encuentra en otra posición de la molécula. Ambos sitios interactúan entre sí gracias a una serie de cambios conformacionales definidos, que reciben el nombre de *transición alostérica*. Así, la unión de un ligante a un sitio diferente al sitio activo, es el que permite la modulación de la actividad de una proteína a través de cambios en el reconocimiento del sustrato, en la catálisis o en ambos. En años recientes se ha generalizado el concepto de alostería, que la propone como una propiedad potencial de las proteínas globulares y no necesariamente oligoméricas mediante la cual, cualquier cambio ocurrido en alguna región de la molécula genera cambios en una zona distante de la misma (Gunasekaran y col., 2004; Lindsley y Rutter, 2006). En los primeros años del nacimiento de la teoría alostérica, los modelos propuestos por Monod-Wyman-Changeaux (MWC) y Koshland-Némethy-Filmer (KNF), aun cuando se oponían entre sí, concebían la existencia de las proteínas alostéricas como de dos estados estructurales extremos cuya interconversión daba lugar a la transición alostérica; estos cambios conformacionales involucraban a su vez, cambios locales que no necesariamente se limitaban a la interfase de las subunidades. El desarrollo de mejores técnicas ha permitido un estudio más profundo de estos sistemas, lo que ha originado el surgimiento de nuevos modelos que, al igual que los antecesores, sólo se ajustan al comportamiento de ciertas enzimas. Por ejemplo, el comportamiento de la hemoglobina, proteína paradigmática de

la alostería, puede ser explicada por el modelo MWC sin embargo, un estudio más profundo empleando la técnica de encapsulamiento de la proteína en geles de sílice (Bruno y col., 2001) puso en evidencia que el modelo MWC es insuficiente para explicar la contribución de los cambios terciarios y cuaternarios en el comportamiento alostérico de la hemoglobina. Otro ejemplo es el de la chaperona GroEL, cuyo comportamiento ha sido analizado con un modelo cinético-alostérico, que es la combinación del modelo MWC y de la teoría del estado de transición (Inobe, y col., 2003). Esto evidencia la compleja naturaleza de la alostería que, sin embargo, puede ser abordado desde puntos de vista muy específicos. La concepción actual de la alostería incluye los cambios en la dinámica molecular y propone la preexistencia de subestados entre otras cosas. Así, en la literatura podemos encontrar trabajos que abordan el tema de la alostería como un fenómeno puramente termodinámico en el cual las señales regulatorias se transmiten del sitio alostérico al sitio activo sin la necesidad de un cambio conformacional cuaternario (Tsai y col., 2008), idea ya propuesta por Cooper y Dryden en 1984. Del mismo modo se pueden encontrar mecanismos como el de la porfobilinógeno sintasa, en el que la transición alostérica involucra cambios cuaternarios de diferente orden, donde según el arreglo se tienen estructuras hexaméricas de menor afinidad por el sustrato que aquellas que son octámeros (Jaffe, 2005).

Hasta ahora ningún modelo ha sido capaz de explicar de forma general la diversidad que existe en el comportamiento alostérico de diferentes proteínas. Es probable que cada proteína presente un mecanismo característico, inherente a su naturaleza y que esta sea la razón de la divergencia en el comportamiento entre distintas proteínas.

El enfoque clásico de la alostería plantea que este fenómeno está asociado al de cooperatividad. Existen algunos casos en los que lo anterior se cumple sin embargo, en algunos otros se ha observado que, tanto la cooperatividad como la alostería pueden ser independientes una de la otra.

Cooperatividad

La cooperatividad en términos generales, es el proceso en el cual el primer evento afecta eventos similares subsecuentes, ya sea en la unión de ligantes, interacciones proteína-proteína, procesos de plegamiento-desplegamiento, ensamblaje macromolecular, unión de proteínas al ADN o la unión de proteínas a los receptores de membrana (Neet, 1995). Hablando en un sentido más estricto y en el enfoque de este trabajo, la cooperatividad es la mutua asistencia termodinámica entre ligantes que se unen a sitios diferentes y equivalentes en una proteína oligomérica. Este tipo de cooperatividad sólo puede ser exhibida por una proteína ligante en condiciones de equilibrio. Aunque existen mecanismos cinéticos, como lo es la histéresis o fenómenos de memoria conformacional (Ricard y col. 1974), capaces de generar cinéticas no hiperbólicas.

La influencia que tiene la unión de un ligante o de un efector sobre la unión de otros ligantes a la proteína da lugar a dos tipos de cooperatividad: *homotrópica* y *heterotrópica*. La cooperatividad homotrópica se refiere al efecto que tiene la unión de un ligante sobre la afinidad aparente de otros sitios equivalentes de la proteína por el mismo ligante. Por ejemplo: la unión de la primera molécula de oxígeno a la hemoglobina influye en la unión de la segunda, ésta sobre la unión de la tercera y lo mismo en la cuarta molécula de oxígeno. En contraste, la cooperatividad heterotrópica es la influencia que tiene la unión de un efector sobre el acoplamiento de ligantes de naturaleza diferente en un sitio de unión distinto (sitio alostérico). Cuando el ligante, llamado efector, disminuye la afinidad aparente de la proteína por los ligantes subsecuentes, se habla de un inhibidor alostérico y por el contrario, cuando la afinidad aparente aumenta se habla de un activador alostérico.

La cooperatividad en un sistema enzimático puede detectarse y medirse mediante el análisis de datos obtenidos de experimentos de unión al equilibrio o de experimentos cinéticos. La importancia de detectar cooperatividad de manera experimental radica en que es el primer indicio de cambios conformacionales y de interacciones alostéricas. Aun cuando existen diversos métodos analíticos para determinar cooperatividad en un sistema, el que prevalece en la literatura es la determinación del *coeficiente o número de Hill*.

i) Coeficiente de Hill

En 1910 A. V. Hill, en un intento de explicar el comportamiento sigmoideal de la curva de saturación de la hemoglobina por oxígeno, propuso la hipótesis de que h moléculas de ligante se unían simultáneamente a la proteína. La consecuencia teórica de esta hipótesis propone que la relación de la fracción de saturación Y y la concentración de ligante está dada por la ecuación:

$$Y = \frac{[A]^h}{[A]^h + K} \quad (1)$$

Donde A es el ligante que se une y K es la constante de disociación. El número de Hill, h , es el número de sitios ligantes y puede ser determinado mediante la siguiente relación derivada de la ecuación previa:

$$\log (Y / (1-Y)) = \log K + h \log [A] \quad (2)$$

Cuando este modelo se aplicó a los datos experimentales de la unión de oxígeno a la molécula de hemoglobina, el valor del coeficiente de Hill que se obtuvo fue de 2.8. El coeficiente de Hill no corresponde al número de sitios ligantes de la proteína **FALTA ALGO PREGUNTAR A MARIO NO ENTIENDO LO QUE DICE LA CORRECCIÓN**, el primero de estos resultados apoyó el uso del número de Hill como una medida de la cooperatividad (Wyman J. y Gill S. J., 1990). Así, en la ecuación (1) observamos que en ausencia de cooperatividad $h = 1$; $h > 1$ es lo que se conoce como cooperatividad homotrópica positiva y $h < 1$ es cooperatividad homotrópica negativa. En la práctica, se puede obtener un buen ajuste lineal de datos en el intervalo $0.1 < Y < 0.9$ para diferentes proteínas que exhiben cooperatividad. La forma usual de la ecuación de Hill para analizar datos experimentales de velocidad *versus* concentración de ligante es:

$$\frac{v}{V} = \frac{[A]^h}{[A]^h + K_{0.5}^h} \quad (3)$$

donde v es la velocidad inicial, V es la velocidad máxima y $K_{0.5}$ una constante. La ecuación de Hill puede ser empleada para datos cinéticos reemplazando Y por $\frac{v}{V}$.

MODELOS ALOSTÉRICOS CLÁSICOS

La asociación entre la cooperatividad y la regulación alostérica sigue siendo una idea vigente y durante los años del desarrollo de la teoría alostérica fue la idea central. El modelo clásico de Monod, Wyman y Changeux (MWC) expone que la cooperatividad positiva es debida a efectos homotrópicos de los ligantes y la modulación, activación o inhibición, se debe a la afinidad del sitio alostérico por ligantes alostéricos, es decir a efectos heterotrópicos (Monod y col.,1965).

El otro modelo clásico es el propuesto por Koshland, Némethy y Filmer (KNF) (Koshland y col.,1966), el cual es un modelo esencialmente para cooperatividad y mediante el cual se puede explicar la cooperatividad negativa sin embargo, este modelo se vuelve complicado al tratar de describir los efectos heterotrópicos (Neet, 1995).

Modelo concertado MWC

Este modelo presenta una explicación sencilla para la cooperatividad por la unión de ligantes y ha sido extensamente usado para varias proteínas. Este modelo en particular ocupa un lugar importante en la historia de la enzimología, ya que fue la primera explicación general de la cooperatividad que sirvió como base para describir los sistemas K y V , que serán abordados más adelante, las interacciones homotrópicas y heterotrópicas y la conexión entre éstas. Las principales ventajas del modelo son su sencillez conceptual y los pocos parámetros requeridos para realizar un ajuste de datos. Sin embargo, no permite explicar la cooperatividad negativa.

El modelo MWC propone que las transiciones alostéricas son concertadas manteniendo siempre la simetría molecular. Este modelo asume la existencia de dos estados conformacionales en equilibrio, los cuales se definen como conformaciones R (relajada) y T (tensa).

El modelo se basa en los siguientes postulados:

- Las proteínas alostéricas son oligómeros de monómeros que están asociados de tal manera que ocupan posiciones equivalentes. Esto implica que la molécula posee al menos un eje de simetría.
- Cada subunidad en la proteína es capaz de existir en dos estados conformacionales denominados *T* (tenso y menos afín al sustrato) y *R* (relajado y más afín al sustrato), aún antes de que se adicione un compuesto capaz de unirse.
- Todas las subunidades del oligómero de proteína están en la misma conformación, ya sea todas en *T* o todas en *R*. Los estados mixtos no se generan debido a que las subunidades en distintos estados (*T* o *R*) tienen interacciones poco favorables. Las dos formas conformacionales de la proteína están en equilibrio en ausencia de moléculas unidas. Este equilibrio se desplaza hacia la forma *R* en presencia de un efector positivo o hacia la forma *T* en presencia de un efector negativo.
- Las constantes de disociación de un efector alostérico para las formas *T* y *R* son diferentes, porque son estructuralmente distintas.
- Cuando una proteína alostérica va de un estado al otro, se conserva la simetría molecular.

También propone la existencia de tres clases de comportamientos que pueden esperarse en los sistemas alostéricos: A) Sistemas *K*: la unión de un efector a la enzima cambia la constante de afinidad por el sustrato. Ya que tanto el activador como el sustrato tienen diferentes afinidades por las formas *T* o *R*, la presencia del efector modificará la afinidad aparente de la proteína por el sustrato sin afectar la V_{\max} de la reacción. B) Sistemas *V*: el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados. De esta manera, la unión del efector no modifica la afinidad de unión aparente del sustrato, pero produce un cambio en la V_{\max} . Si el efector tiene afinidad máxima por la forma activa (*R*) o por la inactiva (*T*), funcionará como un activador (sistemas *V* positivos) o como inhibidor (sistemas *V* negativos), respectivamente. El sustrato no funciona como activador en

ninguna concentración. C) Sistemas mixto K - V : Todos los sistemas que no son completamente V o K .

La importancia de este modelo radica en que puede explicar la cooperatividad con sólo dos parámetros físicos: la constante de equilibrio o constante alostérica, L , que representa la relación entre los estados T y R en ausencia de cualquier molécula ligable ($L = [T_0] / [R_0]$) y el coeficiente de unión no exclusivo, c , que es la relación entre las constantes de disociación de los estados R y T ($c = K_T / K_R$) (Figura 1).

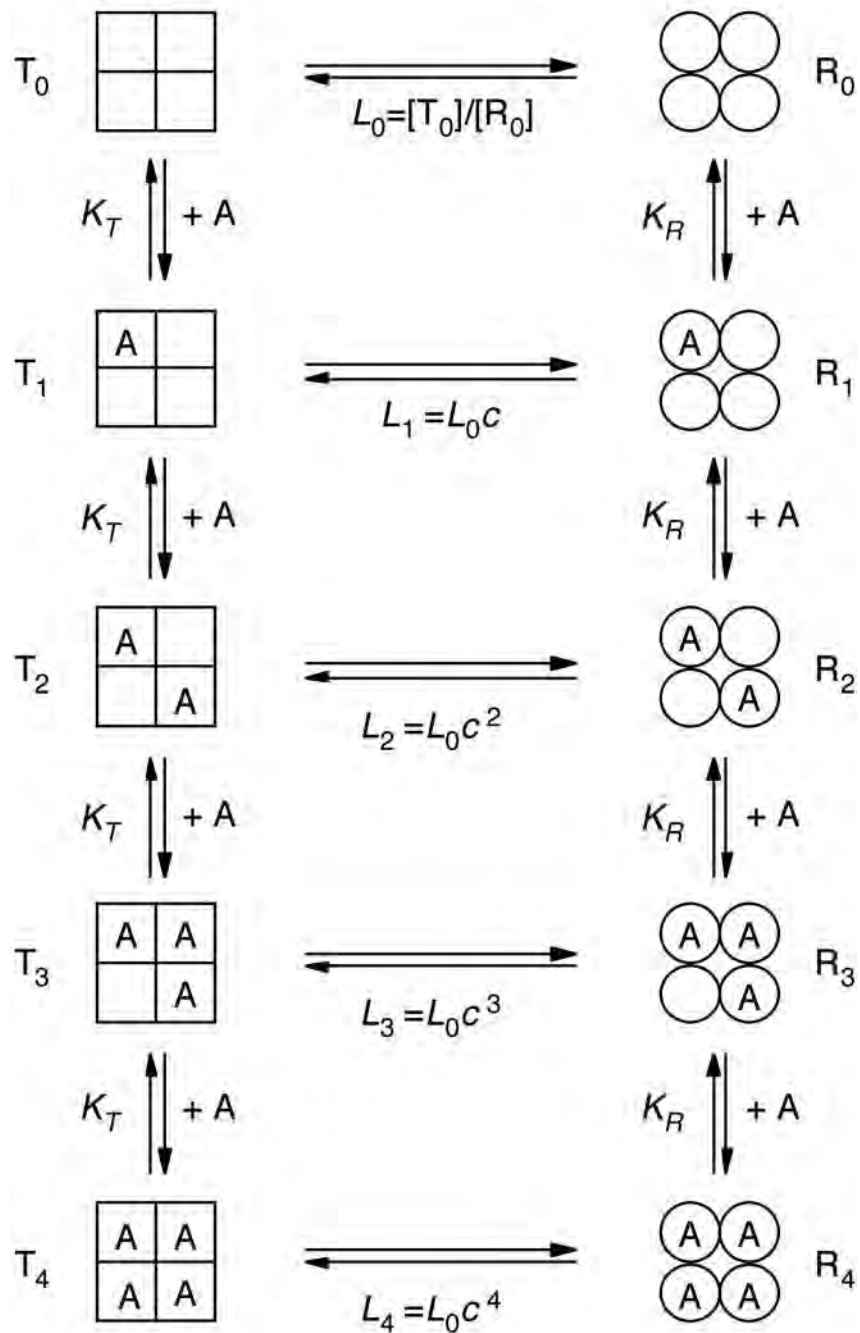


Figura 1 . Representación esquemática de los equilibrios involucrados en el modelo MWC. A representa un ligante.

La ecuación general derivada para el caso de una enzima alostérica en el contexto del modelo de MWC es la siguiente (Segel, 1993):

$$v_0 = \frac{k_{cat} n[E_t] \{L_0 c \alpha (1 + c \alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}\}}{L_0 (1 + c \alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad (3)$$

Donde $\alpha = [A] / K_R$, $L_0 = [T_0] / [R_0]$, $c = K_R / K_T$ y n es el número de sitios de unión.

Cuando $L_0 = 0$ (el estado T no existe) o $c = 1$ ($K_R = K_T$, cuando no hay afinidad diferencial entre estados) la ecuación (3) se simplifica a:

$$v_0 = \frac{k_{cat} n[E_t] \alpha (1 + \alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n} \quad (4)$$

que describe una curva de saturación hiperbólica o de Michaelis-Menten. Cuando $c \rightarrow 0$ el ligante A se une exclusivamente al estado R y la ecuación (3) queda de la siguiente manera:

$$v_0 = \frac{k_{cat} n[E_t] \alpha (1 + \alpha)^{n-1}}{L_0 + (1 + \alpha)^n} \quad (5)$$

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

- Las proteínas alostéricas son oligoméricas.
- Las interacciones alostéricas están relacionadas con alteraciones en la estructura cuaternaria de las proteínas (como alteraciones en la unión entre las subunidades).
- Mientras que los efectos heterotrópicos, pueden ser tanto positivos como negativos (activación o inhibición), los efectos homotrópicos parecen ser siempre positivos.

- Muy pocos sistemas alostéricos presentan solamente efectos heterotrópicos. En otras palabras, los efectos cooperativos homotrópicos se observan invariablemente para al menos una de las moléculas ligables del sistema.
- Las condiciones, los tratamientos o las mutaciones que alteran las interacciones heterotrópicas también pueden alterar a las homotrópicas.

El modelo MWC es esencialmente un modelo de equilibrio y su aplicación a procesos cinéticos es posible asumiendo que la enzima sigue un equilibrio rápido y no una cinética de estado estacionario ya que, bajo condiciones de estado estacionario, las ecuaciones del modelo alostérico adquieren gran complejidad.

Modelo secuencial de KNF

El modelo secuencial o modelo KNF da una explicación más general para la cooperatividad sin embargo, como consecuencia, tiene más parámetros moleculares. Recibe el término de secuencial debido a la sucesión de cambios conformacionales de la subunidad en un oligómero. El modelo de KNF se basa en los cambios conformacionales terciarios inducidos por la unión de ligantes que, en consecuencia, modifican las interacciones subunidad-subunidad en la estructura oligomérica sin necesariamente afectar la conformación de la subunidad vecina, es decir, los contactos interfaciales (Figura 2).

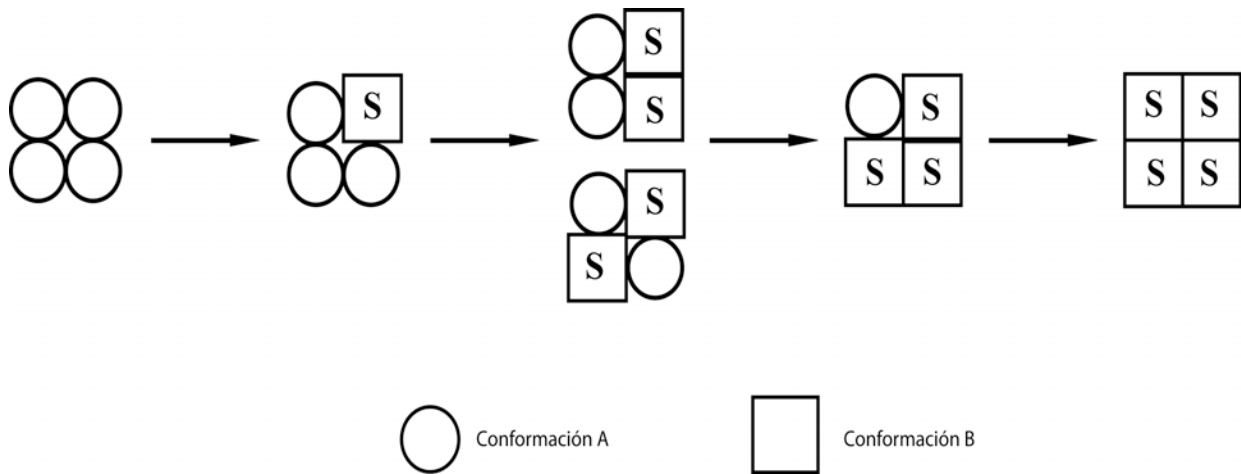


Figura 2.- Modelo secuencial de Koshland-Nemethy-Filmer de cooperatividad para un tetramero. Los círculos indican la conformación A. La conformación B, la única que puede unir S, está representada por cuadrados. El modelo involucra un cambio progresivo en el cual se asume que la conformación B se presenta sólo cuando S está unido a la subunidad. En el modelo concertado todas las subunidades cambian a la conformación B. (Modificado de Koshland y col.,1966).

Las subunidades alcanzan la conformación B debido a la unión de ligante lo cual introduce una restricción con respecto al modelo MWC, en el que ambos estados son capaces de unir ligante. Cabe mencionar que mientras el modelo MWC propone un cambio conformacional a nivel de la estructura cuaternaria (sin excluir los cambios terciarios que esto implica), el modelo KNF propone una serie de cambios sólo a nivel de la estructura terciaria.

De estas premisas, Koshland y col. (1966) dedujeron las ecuaciones para diferentes arreglos cuaternarios para el caso de un tetramero cuadrado o tetraédrico, en las que se requieren tantas constantes como sitios de unión se consideren. Estas constantes son el resultado de diferentes constantes conceptuales que describen el cambio conformacional, la unión del ligante y las interacciones entre subunidades que hacen contacto. La ecuación para una proteína con cuatro sitios y una simetría tetraédrica, es decir, cuando cada una de las subunidades interactúa con las otras tres tiene la siguiente forma (modificado de Bustos-Jaimes y col., 2008 y Koshland y col.,1966):

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha K_t K_i [S] + \beta (K_t K_i [S])^2 + \gamma (K_t K_i [S])^3 + \delta (K_t K_i [S])^4}{1 + 4\alpha K_t K_i [S] + 2\beta (K_t K_i [S])^2 + \frac{4}{3}\gamma (K_t K_i [S])^3 + \delta (K_t K_i [S])^4} \quad (6)$$

En la ecuación (6) α , β , γ y δ son los coeficientes de interacción que resultan de las constantes conceptuales según los postulados del modelo:

$$\begin{aligned} \alpha &= K_{AB}^2 \\ \beta &= 2K_{AB}^2 K_{BB} + K_{AB}^4 \\ \gamma &= 3K_{AB}^2 K_{BB}^2 \\ \delta &= K_{BB}^4 \end{aligned}$$

Donde K_t es la constante de equilibrio para el cambio conformacional de A a B de cada subunidad, $K_t = [B]/[A]$, K_{AB} es la constante de interacción entre subunidades en diferentes estados, y K_{BB} es la constante de interacción cuando ambas subunidades están en el mismo estado. La constante de unión de sustrato, K_s representa la afinidad intrínseca por el ligante S de las subunidades en el estado B. En el modelo KNF, la conformación A de las subunidades no une ligante.

Tanto el modelo KNF como el de MWC permiten realizar buenos ajustes de la curva de unión de oxígeno a la hemoglobina. Sin embargo, para moléculas que tienen una estructura cuaternaria mayor a un tetrámero, las ecuaciones del modelo KNF se tornan complejas ya que el número de constantes que se necesitan son tantas como sitios de unión posea la molécula.

Dado que el modelo KNF puede explicar la cooperatividad negativa, cuando ésta se observa en un sistema se descarta el uso del modelo MWC. Esta es una de las ventajas de este modelo. Sin embargo el tratamiento de datos para los efectos heterotrópicos es sumamente complejo. En la práctica los datos experimentales se analizan empleando el modelo de MWC, si es que se ajusta y se sabe lo suficiente de una proteína, o bien mediante la ecuación de Hill o alguna de sus variantes.

En este trabajo empleamos la enzima alostérica Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* cuyo sustrato es el aminoazúcar glucosamina-6-fosfato.

AMINOAZÚCARES

Los aminoazúcares son componentes de la superficie celular de las bacterias y forman parte del esqueleto estructural del péptidoglicano tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, así como de la capa externa de lipopolisacárido y las cápsulas de bacterias Gram-negativas.

Los aminoazúcares son abundantes en la naturaleza y no son exclusivos de las paredes celulares de la bacterias, también forman parte de diferentes biopolímeros simples o complejos. Son constituyentes de la quitina, que es un homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con uniones β 1-4, y también se encuentran en diversas proteínas glicosiladas. La mayoría de los glicoconjugados (carbohidratos unidos covalentemente a proteínas o lípidos) de las superficies celulares de mamíferos contienen aminoazúcares, incluyendo residuos de ácido siálico. El papel de los carbohidratos en las propiedades de las proteínas es diverso: 1) mantener la conformación estructural de una proteína, 2) limitar el tiempo de vida media de glicoproteínas y células circundantes (Drickamer, 1991), 3) controlar la permeabilidad de la membrana, 4) regular el metabolismo y la división celular (Fermini y Nathan, 1991; Glick y col.,1991) y 5) funcionar como receptores de hormonas y patógenos. La rigidez de la estructura de estos carbohidratos, su solubilidad en agua y su gran variedad de configuraciones los hacen ideales para cumplir estas funciones.

Además de su papel estructural y funcional, los aminoazúcares son utilizados por las bacterias como fuente de energía, dado que proveen a la célula tanto de carbono como de nitrógeno. Los aminoazúcares como la D-glucosamina (GlcN) y la *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) son utilizados como fuente de carbono por *E. coli*. En particular, la GlcNAc promueve velocidades de crecimiento comparables a las generadas por la glucosa. El crecimiento de *E. coli* en un medio con aminoazúcares como única fuente de carbono induce la expresión de las enzimas necesarias para el metabolismo de los aminoazúcares, codificadas en el operón divergente *nag* (Figura 3). La expresión del gen *nagE* genera un transportador específico para la GlcNAc del sistema fosfotransferasa (PTS). Los genes *nagB* y *nagA* codifican para dos enzimas, la glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) y la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa (GlcNAc6P desacetilasa), respectivamente. La expresión de los genes para la desaminasa

y la desacetilasa es controlada por una proteína represora codificada por el gen *nagC*. NagC es un regulador transcripcional que controla la expresión de varios genes del sistema PTS en *E. coli*. NagC controla a los tres grupos de genes del regulón *nag*, el operón divergente *nagE-BACD*, el operón *glmUS* y el operón *manXYZ*. Estos tres grupos de genes están implicados en el metabolismo de los aminoazúcares GlcNAc y GlcN.

En ausencia de aminoazúcares en el medio, la glucosamina-6-fosfato sintasa (GlcN6P sintasa) codificada en el gen *glmS*, es responsable de la síntesis *de novo* aminoazúcares en *E. coli* (Figura 4).

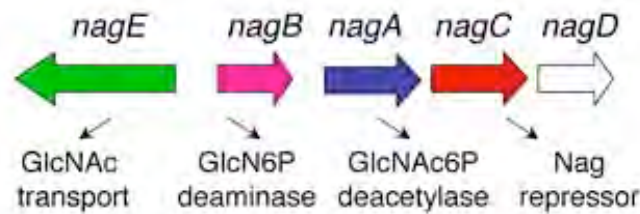


Figura 3. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* (Plumbridge, 2009).

El gen *glmM* codifica para la enzima responsable de la conversión de GlcN6P en glucosamina-1-fosfato (GlcN1P) mientras que el gen *glmU* codifica para la enzima responsable de la acetilación de la GlcN1P formando *N*-acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc1P) y posteriormente se sintetiza UDP-GlcNAc, el cuál se utiliza como donador de aminoazúcares en diversas reacciones de transferencia durante la síntesis de péptidoglicanos. La *N*-acetilmanosamina (ManNAc) entra a la célula por acción del transportador *manXYZ* acoplado al sistema PTS, produciendo *N*-acetilmanosamina-6-fosfato (ManNAc6P). El ácido *N*-acetilneurámico (NANA) entra a la célula por un sistema simporte codificado por *nanT*. Dentro de la célula una aldolasa (*N*-acetilneuraminato liasa, *nanA*) rompe el NANA generando ManNAc y piruvato. Las vías de degradación del NANA, ManNAc y GlcNAc convergen a nivel de la GlcNAc6P. La GlcN6P puede ser generada por cuatro diferentes reacciones: 1) transferencia del grupo amida de la glutamina a la Fru6P; 2) reacción reversa de la GlcN6P desaminasa; 3)

fosforilación de la glucosamina por una hexocinasa y 4) desacetilación de la GlcNAc6P (Plumbridge y Vimr, 1999; Plumbridge, 1989).

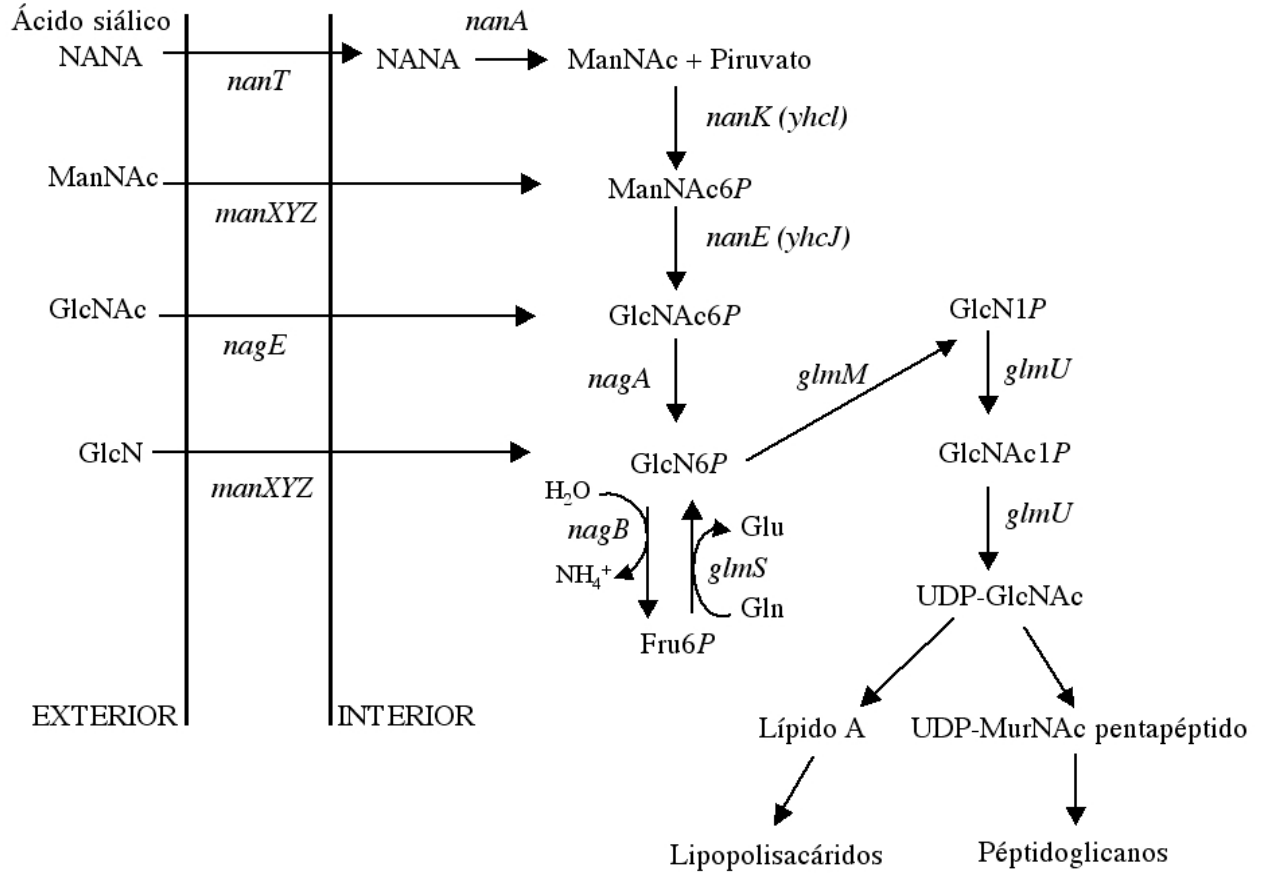


Figura 4. Metabolismo de los aminoazúcares en *E. coli*. Se muestra la vía catabólica (genes *nag*) y la vía biosintética (genes *glm*). (Plumbridge y Vimr, 1999; Mengin-Lecreux y Heijernoort, 1996).

GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa EC 3.5.99.6 antes EC 3.5.1.10) es una enzima alostérica que cataliza la isomerización y posterior desaminación de la glucosamina-6-fosfato generando fructosa-6-fosfato y amonio (Comb y Roseman, 1958; Midelfort y Rose, 1977; Calcagno y col., 1984).

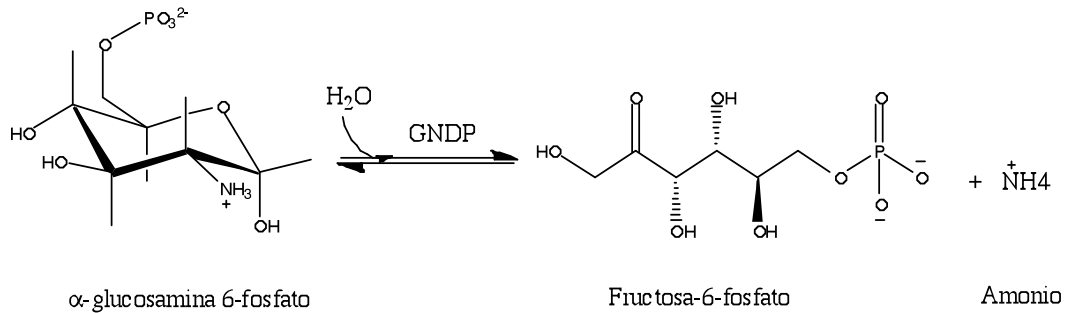


Figura 5. Reacción catalizada por la GlcN6P desaminasa.

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es una proteína homohexamérica (Calcagno y col., 1984), su estructura primaria es conocida por la secuencia de nucleótidos del gen *nagB* (Rogers y col., 1988). Cada subunidad de esta proteína está formada por 266 aminoácidos y tiene un peso de 29.7 kDa por monómero (Figura 6).

A

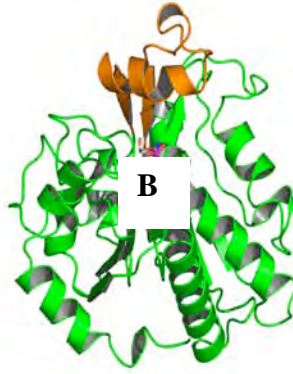


Figura 6. Monómero de GlcN6P desaminasa de *E. coli* en su confórmero R. A) vista lateral del monómero; B) vista frontal del monómero. En color naranja se ve la tapa del sitio activo y bajo esta una molécula del inhibidor competitivo glucitolamina-6-fosfato (GlcN-ol-6P).

El arreglo estructural de la GlcN6P desaminasa es de un dímero de trímeros (Figuras 7 y 8) con ejes cristalográficos de orden 3 y 2, y una simetría interna de 32 (Oliva y col., 1995).

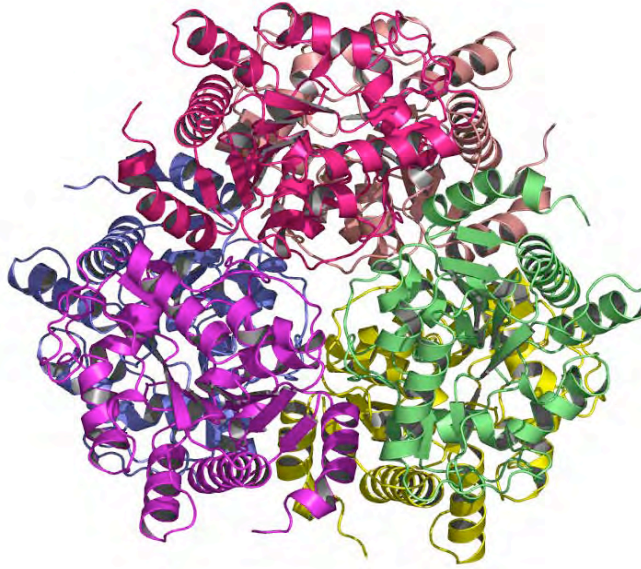


Figura 7. Hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* visto desde el eje de simetría de orden tres.

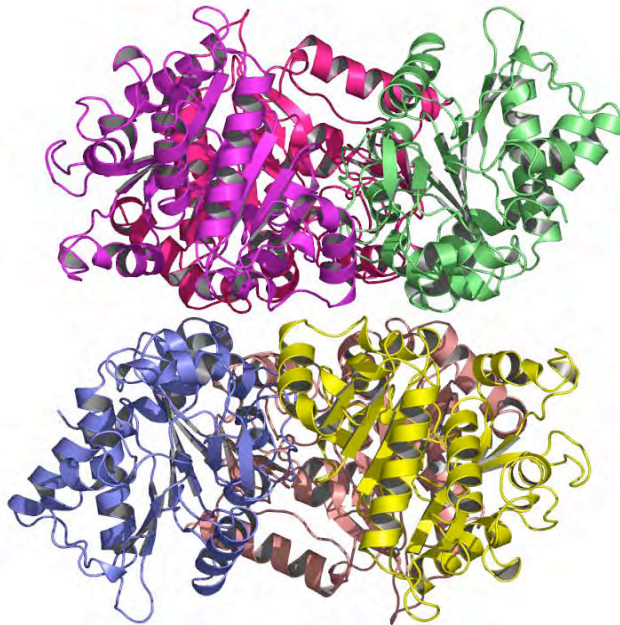


Figura 8. Hexámero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, vista lateral. Arreglo de dímero de trímeros.

La GlcN6P desaminasa ha sido identificada en diferentes especies de animales, protozoarios, hongos y bacterias. Se ha estudiado principalmente en microorganismos

como *Candida albicans* (Natarajan y Datta, 1993) y *Escherichia coli* (Altamirano y col., 1991). También se ha encontrado en tejidos de insectos (Benson y col., 1970; Enhofer y col., 1980) y mamíferos (Leloir y Cardini, 1956) y se ha purificado de la corteza de riñón de perro (Lara-Lemus y col., 1992), bovino (Lara-Lemus, 1991) así como de espermatozoides de *Metacricetus auratus* (Parrington y col., 1996). La GlcN6P desaminasa está presente, en mamíferos, en concentraciones considerables en espermatozoides maduros.

Las GlcN6P desaminasas de humano y hámster poseen 289 residuos de aminoácidos y sus secuencias son homólogas en los primeros 258 residuos con la desaminasa de *E. coli*. Este segmento posee un plegamiento similar y todos los grupos importantes para llevar a cabo la catálisis y los contactos entre subunidades en la enzima bacteriana.

La glucosamina-6-fosfato desaminasa pertenece a la clase (2-R) aldo-cetosa isomerasas. En *E. coli* presenta (cepa ATCC11303) un punto isoeléctrico de 6.0-6.1, una constante de sedimentación de 9.0 S, una k_{cat} por subunidad, en el sentido de formación de Fru6P y amonio, de 158 s^{-1} y de 76 s^{-1} en el sentido inverso (Calcagno y col., 1984). La regulación alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* es el resultado de modificaciones en la afinidad de la enzima por el sustrato sin presentar cambios en su k_{cat} (Calcagno y col., 1984) Este tipo de comportamiento cinético define a un sistema *K* puro. La presencia del activador es suficiente para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato y a su vez, el sustrato modifica la afinidad de la enzima por el activador (Monod y col., 1965).

La GlcN6P desaminasa es activada alostéricamente por la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P), la cual es un efector muy importante en el metabolismo de los amino-azúcares. La GlcNAc6P se une al sitio alostérico de la enzima incrementando la afinidad aparente de ésta por el sustrato, lo que provoca una pérdida de la cooperatividad homotrópica. A concentraciones saturantes de activador, la GlcN6P desaminasa sigue una cinética hiperbólica (Calcagno y col., 1984).

La estructura de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* puede dividirse en una zona interna y otra externa. La zona interna es la responsable de la mayoría de los contactos entre monómeros del hexámero y se encuentra constituida por tres segmentos: un motivo

hélice-asa-hélice (residuos 207-233) que mantiene unido al hexámero en el eje de orden tres, un asa que estabiliza los contactos entre monómeros en el eje de orden dos (residuos 244-253) y un giro que se encuentra unido a este fragmento (residuos 137-143) mediante un puente de hidrógeno. La zona externa, que representa gran parte de cada monómero, se encuentra formada por los residuos restantes, a excepción del asa formada por los residuos 144-154 y los residuos que se encuentran altamente desordenados cuando la enzima se encuentra en su forma T. El asa constituida por los residuos 144-154 constituye el contacto más directo entre el sitio activo y el sitio alostérico, y posee los residuos responsables de la unión del activador y la catálisis. Este segmento es uno de los pocos de la cadena principal que se encuentran altamente ordenados en ambos conformeros. No obstante, esta región presenta una deformación no rígida durante la transición alostérica (Horjales y col.,1999).

i) Transición alostérica

Como se mencionó anteriormente, la regulación en las propiedades de unión de una proteína alostérica puede describirse como un equilibrio entre dos estados conformacionales diferentes: un estado T y un estado R. En la transición de un estado a otro participan cambios conformacionales a nivel de la estructura cuaternaria, que promueven modificaciones locales en la estructura terciaria de la unidad monomérica y alteran las propiedades de unión de ligandos (Altamirano y col.,1991).

La transición de T a R en la desaminasa ocurre cuando la GlcNAc6P se une al sitio alostérico o por la ocupación de los sitios activos del hexámero por el sustrato. La naturaleza estructural de este cambio impide que se trate de un proceso secuencial, lo que ha permitido suponer que cumple con la regla de simetría propuesta por el modelo MWC. En consecuencia la transición cuaternaria es un proceso concertado independiente de la fracción de ocupación del sitio alostérico (Figura 9). Las fuerzas que dirigen la transición están asociadas a la unión del grupo fosfato como consecuencia de la presencia de residuos cargados positivamente que provienen de la zona externa e interna y del asa catalítica que forman la estructura del sitio activo. Por lo que se sugiere que la unión del

grupo fosfato produce un rearrreglo estructural que dispara la transición alostérica (Horjales y col.,1999).

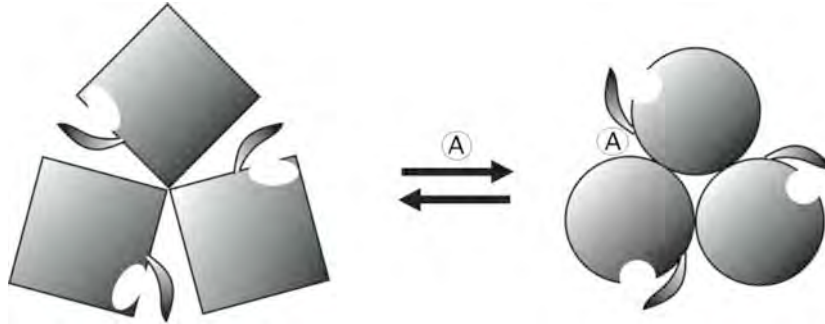


Figura 9. Esquema de la transición alostérica generada por la unión de una molécula de activador.

La transición alostérica de la GlcN6P desaminasa involucra un rearrreglo de la estructura cuaternaria que ha sido descrito como la rotación en bloque de dos regiones de cada subunidad, sobre un eje paralelo al eje de orden 3 del hexámero (Mattevi y col. 1996).

ii) Sitio alostérico

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa posee seis sitios alostéricos, que se localizan en las interfases de los monómeros que conforman cada trímero. De este modo, los sitios de unión del activador alostérico (GlcNAc6P) se encuentran formados por dos monómeros vecinos. Este hecho hace notar que se establecen contactos importantes entre subunidades al unirse este ligante. Se dice que el activador se une exclusivamente a la forma R de la enzima, ya que la enzima se transforma inmediatamente a este estado conformacional al unir el activador. El nitrógeno de la cadena principal del residuo Ser152 y las cargas positivas de los residuos Arg158 y Lys160 de un monómero, junto con el grupo amino terminal de la subunidad vecina, unen al fosfato del activador en la forma R. Por el contrario, en la forma T el grupo amino terminal se encuentra a 10 Å de los grupos cargados de los residuos Arg158 y Lys160 y se encuentra unido mediante un puente de hidrógeno al oxígeno del grupo carbonilo del residuo Ala150 del monómero

vecino (Horjales y col.,1999). La cadena que contiene a los residuos Arg158 y Lys160, también contiene al residuo Thr161 el cual se une al átomo de oxígeno del grupo acetamido del activador alostérico, GlcNAc6P (Oliva y col.,1995). Otro contacto importante entre monómeros que se presenta en esta región involucra al residuo Tyr254. El grupo hidroxilo de la cadena lateral de Tyr254 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de la Thr161 en el conformero R, mientras que en T hace el mismo tipo de interacción pero con la Pro149, por lo que se ha propuesto que la Tyr254 funciona como un interruptor de dos posiciones correspondientes a cada estado alostérico (Montero-Morán y col., 1998).

La interfase entre monómeros del sitio alostérico es más grande en el conformero T que en el conformero R, y en esta región de la proteína se presentan una gran cantidad de cargas positivas, las cuales se neutralizan parcialmente con la unión del activador o de fosfato inorgánico. La repulsión electrostática generada por la presencia de cargas positivas es en parte responsable de favorecer la conformación abierta del sitio alostérico en el estado T (Figura 10).

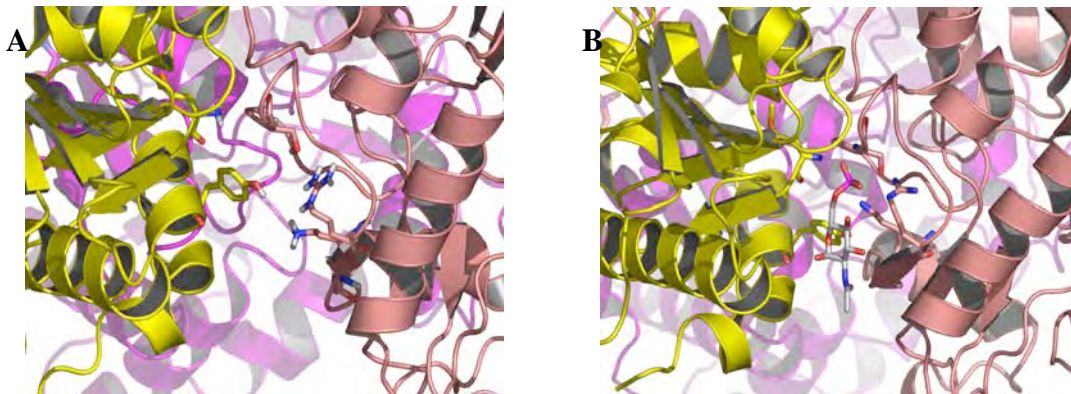


Figura 10. Sitio alostérico de la GlcN6P desaminasa. A) sitio alostérico vacío (estado T); B) sitio alostérico ocupado por GlcNAc6P (estado R).

iii) Sitio Activo

El sitio activo de la glucosamina-6-fosfato desaminasa se encuentra formado por dos asas situadas en el extremo C-terminal de las cadenas B y E (Figuras 11 y 12). Posee una tapa compleja formada por dos hebras β antiparalelas conectadas por el motivo

hélice-asa (residuos 158-187). El segmento (164-182) de este motivo se encuentra conectado al resto de la estructura mediante hebras β a el C y al N terminal del motivo hélice-asa. Estas dos hebras son parte de una pequeña hoja β de tres hebras que contiene el residuo Asp72, que es la base general que cataliza la enolización del sustrato mediante la sustracción de un protón (Oliva y col., 1995; Montero-Morán y col., 2001). En el segmento helicoidal (167-174) posee al residuo Arg172 el cual es uno de los residuos cargados positivamente que unen al grupo fosfato de la glucosamina-6-fosfato y al inhibidor competitivo glucitolamina-6-fosfato, GlcN-ol-6P (Figura 12). Los átomos de oxígeno del grupo fosfato de la glucosamina-6-fosfato se encuentran a una distancia en la que interactúan con el átomo del N η del residuo Arg172 y el átomo del N ζ de la Lys208, así como con dos grupos amino de los residuos de la cadena principal en el loop 41-44. Estos puentes salinos se consideran las interacciones de más importancia para la unión del sustrato. La transición alostérica promueve diferentes cambios en la estructura terciaria principalmente en el asa 136-158 (Horjales y col., 1999), que contiene a los residuos catalíticos. Éstos incluyen la triada Asp141, His143 y Glu148 que participan en la catálisis de la apertura del anillo de la piranosa. Por el contrario, la tapa del sitio activo no sufre ningún cambio geométrico asociado a la transición alostérica.

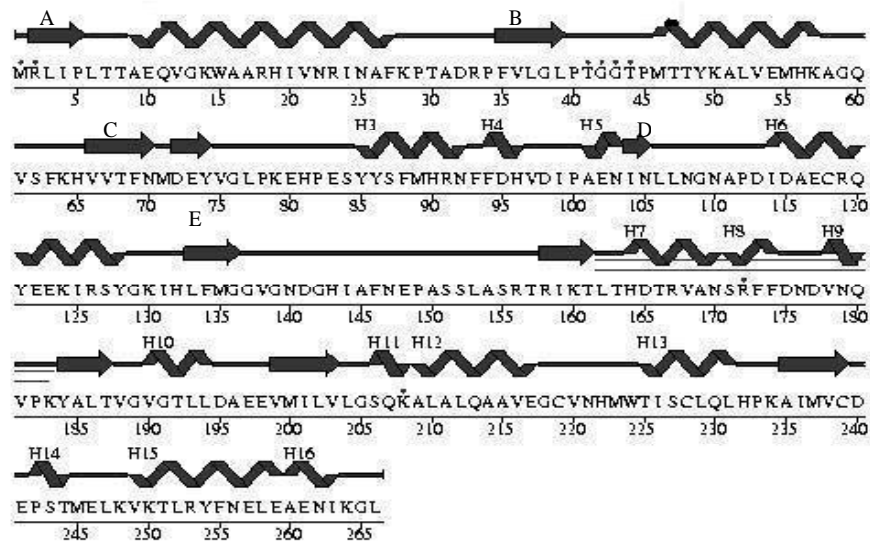


Figura 11. Estructura secundaria de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. El motivo correspondiente a la tapa del sitio activo se muestra subrayado. Los asteriscos señalan aquellos residuos que interactúan con el sustrato.



Figura 12. Sitio activo de la GlcN6P desaminasa ocupado por el inhibidor competitivo GlcN-ol-6P. En anaranjado se muestra la tapa del sitio activo.

iv) Mecanismo

El mecanismo catalítico de la GlcN6P desaminasa fue originalmente propuesto por Midelfort y Rose (1977) el cual se basa en el mecanismo general de las isomerasas cetoaldólicas (Rose, 1975). Con base a la estructura del complejo formado por enzima-inhibidor competitivo (GlcN-ol-6P) se propuso un mecanismo catalítico para esta enzima (Oliva y col., 1995), el cual ha sido completado con datos cinéticos (Montero-Morán y col., 2001) con los que se pone en evidencia la relevancia de los residuos del sitio catalítico, His143 y Glu148 en la apertura del anillo del sustrato, glucosamina- 6-fosfato.

Este mecanismo (Figura 13) comienza con la apertura del anillo de piranosa de la GlcN6P por el residuo His143. En un segundo paso, el carboxilato del residuo de Asp72 sustrae el protón del C2 del azúcar abierto y, de manera concertada, se lleva a cabo la enolización entre C1 y C2 (formación del *cis*-enol-amino).

Posteriormente, este intermediario se convierte en el correspondiente enol-amonio cuando el protón regresa al aminoazúcar en la posición O1. Se han propuesto dos explicaciones sobre cómo puede darse la siguiente etapa. Una de ellas propone que un

protón del grupo amino puede ser tomado de nuevo por Asp72 formándose una *cis*-enol-amina (2-amino-2desoxi-D-*arabino*-hex-2-enitol-6-fosfato), la que posteriormente toma el protón de Asp72 en la posición C1 pro-R que al arreglarse forma la fructosimina-6-fosfato (2-desoxi-2-imino-D-*arabino*-hexitol-6-fosfato). El grupo imino reacciona entonces con una molécula de agua produciendo un carbinol-amonio, un intermediario inestable. La otra forma de llegar a este intermediario es si el enlace π entre C1 y C2 del intermediario *cis*-enol-amonio es atacado por una molécula de agua en la cara *re* del intermediario.

La estructura del intermediario *cis*-enol-amonio es muy similar a la del inhibidor competitivo. Este intermediario se descompone en Fru6P y NH₃. Se ha demostrado que el sustrato para la enzima es el ion amonio, de forma que el amoniaco formado en esta etapa debe tomar un protón. Lo más factible, es que lo tome del carboxilo del Asp72 para liberarse como ión amonio (Oliva y col., 1995).

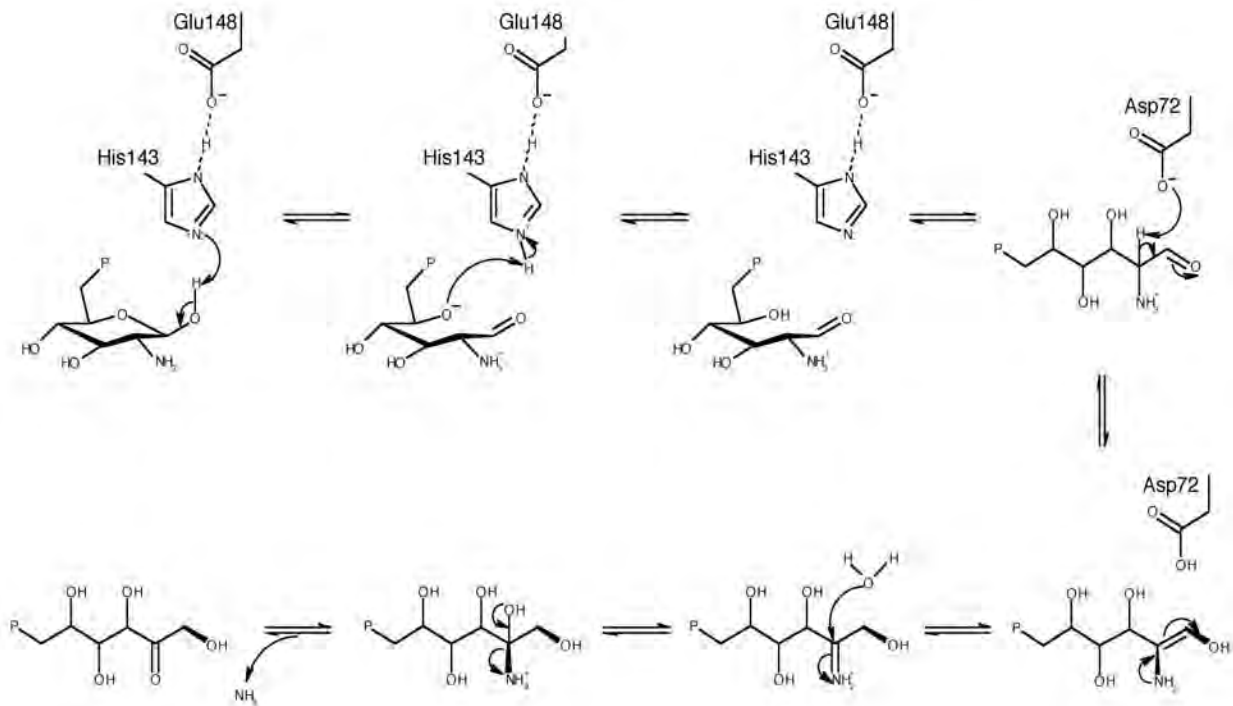


Figura 13. Mecanismo de reacción propuesto para la GlcN6P desaminasa. (Modificado de Montero-Morán y col., 2001).

CONSTRUCCIÓN DE HETEROHEXÁMEROS COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS ALOSTÉRICAS

La formación *in vitro* de heterooligómeros de subunidades silvestres y mutantes, y la producción de quimeras cuaternarias de proteínas alostéricas, ha sido usada como una herramienta para explorar la transmisión intramolecular de señales regulatorias. Los pioneros en este tipo de estudios fueron Tatk Wong-Lau y Fersht (1989) que construyeron heterotetrámeros con dos mutantes de la fosfofructocinasa de *E. coli* y dilucidaron el mecanismo mediante el cual se une el activador alostérico de esta enzima. El grupo de Engel construyó heterooligómeros de la glutamato deshidrogenasa de *Clostridium symbiosum* para estudiar el mecanismo de comunicación entre las subunidades de esta enzima hexámerica, utilizando híbridos 1:5 de dos mutantes (Goyal y col., 2001). Este mismo grupo logró establecer que, para esta misma enzima, las subunidades no necesariamente debían ser catalíticas para que se presentara cooperatividad (Bronagh y col., 2001). Por otro lado Sakash y col. (2000), utilizando una técnica similar, establecieron que sólo dos interacciones de las seis posibles que involucran al residuo Glu239 de la aspartato transcarbamoylase de *E. coli*, eran suficientes para restaurar tanto la transición homotrópica como la heterotrópica de esta enzima. Scoot y col. (2002), usaron híbridos de la fructosa 1,6 bisfosfatasa de hígado de cerdo, para demostrar que en esta enzima existen varias rutas para la inhibición alostérica. Fushinobu y col. (1998) trabajó con híbridos de la lactato deshidrogenasa de la bacteria *Bifidobacterium longum* y comprobó que la enzima mantenía su simetría durante la transición alostérica. Recientemente, el grupo de Reinhart construyó heterotetrámeros de la fosfofructocinasa de *Bacillus stearothermophilus* y describió una red de comunicación alostérica en esta enzima (Ortigosa y col., 2004). Con esta misma herramienta se averiguó el mecanismo de inhibición por sustrato de la fosfofructocinasa de *E. coli*. (Fenton y Reinhart, 2003).

Lucumí-Moreno (2005) planteó una metodología para construcción de hetero-

hexámeros 3:3 mediante la combinación de subunidades de la enzima silvestre con subunidades portadoras de la triple mutación L3I:R172A:K208E. La mutación L3I es una etiqueta marcadora para facilitar la identificación de las cadenas por secuenciación de Edman. Por otra parte, la doble mutación R172A:K208E aparentemente suprime la capacidad del sitio activo para unir sustrato y crea una diferencia de carga que facilita la separación por cromatografía de los heterohexámeros.

La construcción de estas moléculas híbridas ofrece, además de la posibilidad de explorar los mecanismos de comunicación entre subunidades y los cambios locales, la oportunidad de corroborar la hipótesis generada a partir del modelo termodinámico (Bustos-Jaimes y Calcagno, 2001; Bustos-Jaimes y col., 2005), que establece que el equilibrio entre el estado T y R es desplazado hacia la forma R a través de la unión de tres o más ligantes del sitio activo. Sin embargo, lo que hace más interesante el estudio son las especies 1:5 y 5:1 ya que ofrecen la posibilidad de explorar la existencia de subestados conformacionales locales no propagados a todo el hexámero sin la interferencia del cambio cuaternario con métodos directos, como el “disparo en seco” (*futile triggering*) en la forma R descrito por Bustos-Jaimes y col. (2005). Este punto está estrechamente relacionado con la caracterización y propagación de señales conformacionales desde los sitios activos hacia las interfases. El bloqueo total del cambio cuaternario, para poder estudiar los cambios locales, no se ha logrado aún. Otros estudios lo han intentado por medio de la introducción de puentes de disulfuro (González-Andrade, 2006) en donde se encontró que existen la presencia de dos estados conformacionales del estado R, uno cuando el cambio conformacional es originado por la unión de sustrato y otro cuando es originado por la unión de activador alostérico.

II. OBJETIVOS

Construir, expresar y purificar las enzimas mutantes L3I y L3I:R172A:K208E.

Validar cinéticamente las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E para la construcción de heterooligómeros.

Caracterizar fisicoquímicamente las especies heterohexaméricas 3:3 de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, para validarlos como herramienta para el estudio de la propagación de los cambios conformacionales asociados a la transición alostérica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

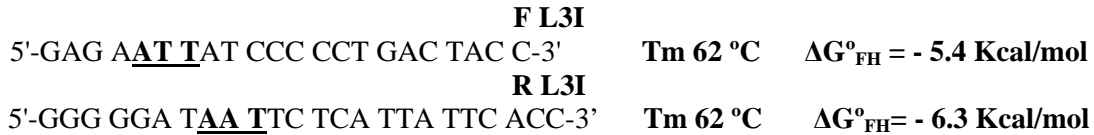
La mayoría de los reactivos químicos fueron comprados en Sigma-Aldrich S.A. de C.V., México. El activador alostérico, GlcNAc6P, fue preparado por acetilación de la GlcN6P con anhídrido acético y se purificó por cromatografía de intercambio iónico como lo describen Leloir y Cardini (1962).

Construcción de las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E

Los modelos cristalográficos de la GlcN6P desaminasa indican que los residuos R172 y K208 participan en la unión del grupo fosfato de la GlcN6P al sitio activo, por lo que se construyó la mutante R172A:K208E (Lucumí-Moreno y Calcagno; 2005) con el propósito tener una enzima incapaz de unir al sustrato y emplearla en la construcción de los heterohexámeros. Asimismo, estas mutaciones generan un cambio del pI con respecto a la enzima silvestre lo que facilitaría la separación de los heterooligómeros por intercambio iónico. Por otra parte, la mutación L3I es un marcador estequiométrico y de intercambio de subunidades en los heterooligómeros, ya que al encontrarse en la región N-terminal de la enzima puede ser secuenciado fácilmente por el método de Edman.

Mutagénesis

Las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E se construyeron por PCR empleando el *kit* de mutagénesis sitioespecífica Quick Change® de Stratagene el cual permite realizar mutaciones sitioespecíficas en cualquier plásmido de doble cadena sin la necesidad de subclonar, tener sitios de restricción específicos o realizar múltiples transformaciones. Para la construcción de la mutante L3I se partió del plásmido pTZ18*RnagB*; la construcción de la mutante L3I:R172A:K208E se realizó a partir del plásmido pTZ18*RnagB* que posee las mutaciones R172A:K208E. Para ambas construcciones se emplearon oligonucleótidos sintéticos. Los oligonucleótidos usados fueron:



En negritas se muestra el codón correspondiente a isoleucina. ΔG°_{FH} : energía libre de formación de heterodúplex en el extremo 3'OH.

El programa de termociclado para ambas PCR se describe a continuación:

Paso	Temperatura (°C) / tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 / 2 min	1
Desnaturalización	94 / 1 min	
Hibridación	50 / 1 min	25
Polimerización	68 / 10 min	
Extensión final	68 / 10 min	1

El producto de la PCR se empleó para transformar células competentes de *E. coli* epicurian XL-blue. Las células transformadas se emplearon para inocular cajas con medio LB adicionadas con $50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de ampicilina. Se seleccionaron las colonias capaces de crecer en presencia de ampicilina y se realizó una purificación de plásmidos. Las mutaciones se verificaron por secuenciación del gen completo dentro de los plásmidos mutantes generados. Posteriormente, los plásmidos mutantes se emplearon para transformar mediante electroporación células competentes IBPC590, cepa que es Δnag y $\Delta lacI$ por lo que la GlcN6P desaminasas recombinantes se expresan de manera constitutiva. Todos los procedimientos se realizaron con ADN purificado con el *kit* QIAprep® de Quiagen.

Expresión de las enzimas mutantes.

Las células de *E. coli* IBPC590 transformadas se inocularon en tubos de 10 mL con medio LB con ampicilina $50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y se incubaron a 37°C con agitación orbital de 200 rpm durante 12 h. Posteriormente se utilizó este cultivo como inóculo para matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio LB y se cultivó en las mismas condiciones

durante 3 h. Este cultivo se empleó para inocular matraces Erlenmeyer de 2 L con 1 L del mismo medio y se cultivó a 30°C durante 6 h a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 1.

Purificación de la mutante L3I

Las células se concentraron por centrifugación y se rompieron con ultrasonido (sonicador Cole Parmer). Se centrifugó a 27,000 x g para retirar restos celulares. Posteriormente, al sobrenadante se le adicionó (NH₄)₂SO₄ hasta alcanzar una saturación de 40%, nuevamente se centrifugó y se adicionó sulfato de amonio al sobrenadante hasta obtener un 55% de saturación. La mutante L3I se purificó por cromatografía de afinidad alostérica como se ha descrito previamente (Montero-Morán y col.,1998), obteniéndose una especie electroforéticamente pura.

Purificación de la mutante L3I:R172A:K208E

Las células rotas por sonicación se centrifugaron para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se saturó al 70% con (NH₄)₂SO₄. Posteriormente, por centrifugación se separó la proteína precipitada. El precipitado se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH= 7.5 y se purificó por cromatografía de afinidad (Montero-Morán y col., 1998). Se obtuvo una especie electroforéticamente pura.

Cuantificación de enzima

La concentración de ambas enzimas mutantes se determinó utilizando el coeficiente de absortividad molar de la GlcN6P desaminasa silvestre $\epsilon_{278} = 20.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Altamirano y col., 1989).

Determinación de los patrones cinéticos de las mutantes L3I y L3I:R172A:K208E.

La determinación de la actividad enzimática se realizó en dirección a la formación de Fru6P en una mezcla de reacción de 200 μL cuya composición fue Tris-HCl 100 mM,

pH 7.7, EDTA 2.5 mM pH 7.7, concentraciones variables de sustrato (GlcN6P) y de activador alostérico (GlcNAc6P). La reacción se interrumpió a los 10 minutos para el caso de la mutante sencilla y a los 30 minutos para la triple mutante. La concentración de Fru6P fue determinada por un método colorimétrico como lo describe Davis y Gander (1967).

Los ensayos se realizaron manteniendo una conversión de sustrato menor al 5% para cumplir los criterios de velocidad inicial. La concentración de enzima empleada en los ensayos de la mutante L3I fue 10 nM en tanto que para la mutante L3I:R172A:K208E fue de 50 nM.

Análisis cinético

Los datos cinéticos se analizaron por regresión no lineal empleando el programa Origin (MicroCal Software, Inc.) y Prism 4 (GraphPad Software, Inc.). Los datos se ajustaron, cuando así fue posible, a las ecuaciones de Hill, Michaelis-Menten y la ecuación general del modelo MWC.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten}$$

$$\frac{v}{V} = \frac{[A]^h}{[A]^h + K_{0.5}^h} \quad \text{Hill}$$

$$v_0 = \frac{k_{cat} n[E_t] \{L_0 c \alpha (1 + c \alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}\}}{L_0 (1 + c \alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad \text{Monod-Wyman-Changeux}$$

Construcción de heterohexámeros

El trabajo previo de Lucumí-Moreno planteó las condiciones para la disociación del hexámero de Glucosamina-6-fosfato desaminasa. Estas condiciones consisten en

emplear una mezcla de enzima silvestre y enzima triple mutante, en las proporciones que generen las especies de interés, e incubarla durante 5 minutos en urea 8 M a temperatura ambiente. Posteriormente esta mezcla se inyecta a una columna de filtración molecular Superdex 200 preparativa a un flujo de 1 mL min⁻¹. El pico correspondiente a los hexámeros se colecta e inyecta a una columna de intercambio iónico para la separación de las diferentes especies heterohexaméricas.

Cromatografía de filtración molecular

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se realizaron en una columna empacada con Superdex 200 grado preparativo (gp) (Amersham Biosciences) y un equipo HPLC (Waters) acoplado a un detector de UV a una longitud fija de 280 nm. La matriz empleada es estable ante la presencia de urea 8 M y el intervalo de separación de proteínas globulares es de 1 x 10⁴ a 6 x 10⁵ Da.

Caracterización hidrodinámica de la Glucosamina-6P-desaminasa silvestre y la mutante L3I:R172A:K208E

Se calibró la columna de filtración molecular Superdex 200 gp, previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.7, empleando proteínas con radios de Stokes conocidos en condiciones nativas: ferritina, catalasa, seroalbúmina, hemoglobina y ovoalbúmina. Se inyectó 1 mL de una mezcla de los estándares (24-30 mg/mL). A partir de la gráfica de la rapidez de migración (1000/V_{el} ; donde V_{el} es el volumen de elución) *versus* radio de Stokes (R_S) (Uversky,1993) se obtuvieron los valores la curva de calibración:

$$1000/V_{el} = m R_S + b$$

Los perfiles cromatográficos de las enzimas silvestre y triple mutante, en condiciones nativas y después del tratamiento con urea 8 M durante 5 minutos, se generaron empleando una concentración final de proteína de 5 µM, Tris-HCl 50 mM pH 7.7 como amortiguador de elución y un flujo de 1 mL min⁻¹. Se colectaron las fracciones

correspondientes al pico del hexámero y se concentraron con polietilenglicol 35000 a una temperatura de 4°C. Se determinó el rendimiento estimando la relación de concentraciones entre la enzima aplicada y la enzima obtenida después de la filtración en gel; asimismo se evaluó la actividad específica de la enzima silvestre obtenida después de la cromatografía de filtración, tanto en condiciones nativas como después del tratamiento con urea 8 M.

Construcción de heterohexámeros

Para la construcción de los heterooligómeros 3:3, se empleó una mezcla de enzima silvestre y triple mutante en una proporción 1:1 con una concentración final de proteína de 5 µM, subsecuentemente se adicionó urea a una concentración final de 8 M y Tris-HCl 50 mM pH 7.7 para completar un volumen final de 2 mL. Esta preparación se mezcló suavemente de forma manual con una micropipeta durante 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se inyectó a una columna de filtración molecular Superdex 200, a un flujo de 1 mL min⁻¹. Se colectaron las fracciones correspondientes al pico del hexámero y se concentraron a una temperatura de 4°C con polietilenglicol 35000 para posteriormente separar las posibles especies heterohexaméricas que se hubiesen generado.

Separación de heterohexámeros

Las especies híbridas que teóricamente se pueden formar son 11, además de los correspondientes homohexámeros silvestre y mutante. La diferencia de pI entre ambas enzimas permite la separación de las diferentes especies híbridas mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico. Se calibró una columna preempacada de intercambio iónico Protein-Pack^T Q 8HR previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 7.7; como proteínas de referencia se emplearon la enzima silvestre y triple mutante en estado nativo. Se obtuvieron los cromatogramas de una mezcla de enzima silvestre y triple mutante en condiciones nativas, y después del tratamiento con urea 8 M. En todos los casos se empleó una concentración final de enzima de 5 µM, un flujo de 1 mL min⁻¹ y se eluyó con un gradiente lineal de KCl de 0 a 200 mM durante una hora.

Para la separación de los probables heterohexámeros, las fracciones se colectaron y dializaron contra 100 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH= 7.7. posteriormente se concentraron a 4°C con polietilenglicol 35000 para su posterior identificación.

Identificación de heterohexámeros

Para identificar las posibles especies híbridas se realizó una secuenciación del amino terminal por el método de Edman. La mutación L3I presente en la mutante L3I:R178A:K208E puede ser empleada como un marcador de intercambio y estequiometría de subunidades en los heterooligómeros.

Comparación del comportamiento cinético de la enzima silvestre en condiciones nativas, después del tratamiento con urea y de los posibles heterohexámeros 3:3

Se realizó un estudio cinético comparativo entre la enzima silvestre nativa, enzima silvestre tratada con urea 8 M y la fracción cromatográfica del intercambio iónico que aparentemente correspondía a los heterooligómeros 3:3. Los ensayos cinéticos se realizaron en dirección a la formación de Fru6P en ausencia y presencia de GlcNAc6P 1 mM. La composición de la mezcla de reacción fue Tris-HCl 100 mM pH 7.7, EDTA 2.5 mM pH 7.7 y concentraciones variables de sustrato en un intervalo de 0 a 10 mM, con un volumen final de reacción de 200 µL. La reacción se interrumpió a los 10 min. La concentración de enzima silvestre en condiciones nativas fue de 1 nM, la enzima silvestre tratada con urea y los posibles heterohexámeros 3:3 se usaron a una concentración final 5 nM.

Influencia de la urea 8 M sobre la actividad de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa.

Se determinó a diferentes tiempos la actividad específica de la enzima silvestre después del tratamiento con urea 8 M. Se incubó por 3 horas enzima silvestre en urea 8 M y Tris-HCl 100 mM pH 7.7; cada 5 minutos se tomaron alícuotas de 10 µL de enzima

incubada en urea 8 M y se diluyeron 100 veces en Tris-HCl 1 M pH 7.7 para obtener una concentración final de 3 μM (0.54 mg mL^{-1}) de enzima y 80 mM de urea. Posteriormente, se determinó la actividad específica de cada muestra en dirección a la formación de Fru6P en un volumen de 200 μL , empleando la enzima previamente tratada con urea a una concentración de 0.2 μM , Tris-HCl 100 mM pH= 7.7, EDTA 2.5 mM pH 7.7 y GlcN6P 5 mM. La reacción se interrumpió a los 10 minutos. La concentración de Fru6P fue determinada por el método colorimétrico como se describió anteriormente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción, expresión y purificación de la enzima mutante L3I

Se obtuvo un producto de PCR correspondiente al peso molecular del plásmido pTZ18R*nagB*. El producto de PCR se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* XL1 blue. Se seleccionaron cuatro colonias y se purificaron sus plásmidos los cuales se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. De las cuatro muestras dos presentaron la mutación. Uno de ellos se empleó para transformar células competentes de *E. coli* IBPC590. Posteriormente, la expresión y purificación se llevaron a cabo siguiendo la metodología previamente mencionada. La enzima así obtenida es una especie electroforéticamente pura.

Construcción, expresión y purificación de la enzima mutante L3I:R172A:K208E

Se obtuvo un producto de PCR correspondiente al peso molecular del plásmido pTZ18R*nagB* (figura 14). El producto de PCR se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α .

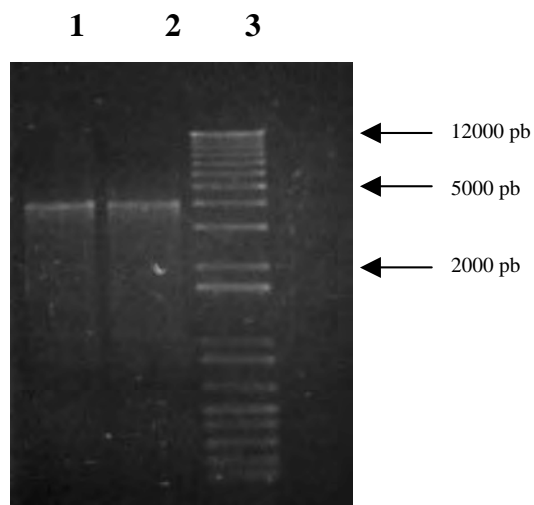


Figura 14. Producto de PCR. Carril 3 marcador de peso molecular (1Kb PLUS); carriles 1 y 2, 5 μ L de mezcla de la reacción de PCR.

Para comprobar la presencia de la mutación, se seleccionaron 3 colonias y se purificaron sus plásmidos los cuales se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. De las tres muestras que se mandaron a secuenciar, se comprobó que la mutación estaba presente en dos de los tres plásmidos. Uno éstos se empleó para transformar células competentes de *E.coli* IBPC590, una cepa Δ nag que no expresa la GlcN6P desaminasa silvestre bajo ninguna condición. La expresión y la purificación se realizaron según la metodología mencionada. La enzima obtenida se comporta como una especie electroforéticamente pura (figura 15).

1 2 3 4



Figura 15. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad. Carriles 2 y 4, enzima silvestre como marcador de peso molecular; carriles 1 y 3 fracciones independientes obtenidas de la cromatografía de afinidad.

Caracterización cinética de la enzima mutante L3I

Los primeros ensayos cinéticos se realizaron en el intervalo de concentración de sustrato de 0 a 12.5 mM con una concentración final de enzima de 1 nM. En estas condiciones la enzima, mostró ser cuatro veces menos catalítica con respecto a la enzima silvestre. El residuo L3 se localiza en la región N-terminal, cerca de la cadena lateral del residuo F255 que se localiza en la hélice alfa que forma parte de la superficie que comprende al sitio alostérico. Esta región está en contacto con la tapa del sitio activo, por lo que probablemente el reemplazo de leucina por isoleucina genere una interacción (figura 16) que altere la conformación del sitio activo y en consecuencia provoque la disminución de la capacidad catalítica. Con el propósito de determinar el efecto de la concentración de proteína sobre la actividad catalítica como control indirecto de la estabilidad de la enzima, se decidió hacer un ensayo a diferentes concentraciones de ésta. Los resultados cinéticos (figura 17, tabla 3) muestran que la mutante L3I es catalíticamente activa a diferentes concentraciones sin embargo, se presentan sutiles cambios en la k_{cat} mostrados en la tabla 3 los cuales pueden estar relacionados con efectos de agregación promovido por el aumento de la probabilidad de choque entre moléculas y que la mutación haya provocado un cambio en la estabilidad de la enzima.

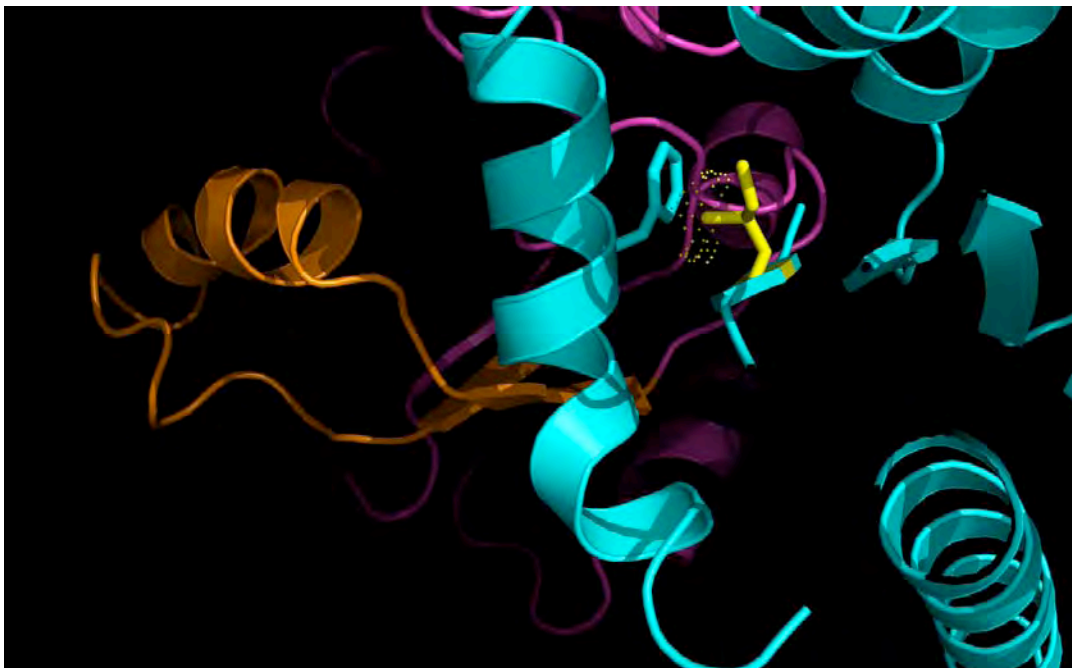


Figura 16. Detalle de la estructura de la mutante L3I generada *in-silico*. La cadena lateral del residuo I3 (amarillo). La alfa hélice que sostiene al residuo F255 es parte de la superficie que forma al sitio alostérico, la cual está en contacto con la tapa del sitio activo de la enzima (anaranjado).

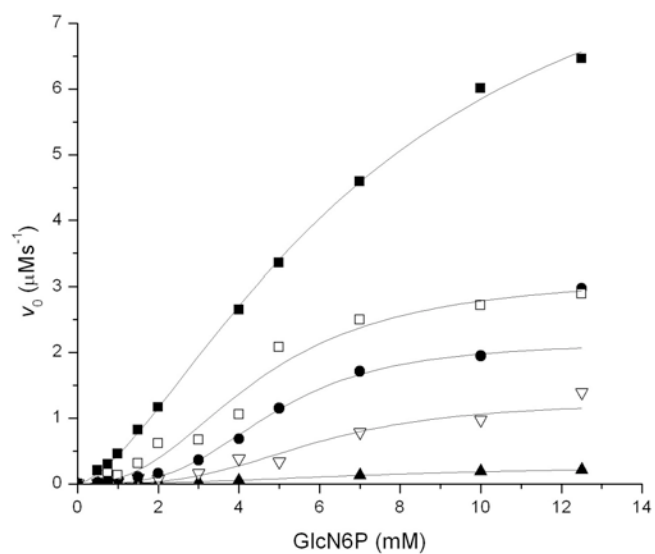


Figura 17. Patrones cinéticos en ausencia de activador alostérico de la enzima mutante L3I a diferentes concentraciones de enzima. (▲) 1 nM; (▽) 5 nM; (●) 10 nM; (□) 20 nM; (■) 50 nM.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la mutante L3I en ausencia de GlcNAc6P a diferentes concentraciones de enzima. Datos obtenidos del ajuste a la ecuación de Hill.

Sin GlcNAc6P			
L3I (nM)	k_{cat} (sitio⁻¹ s⁻¹)	$S_{0.5}$ (mM)	h
1	48.2	7.8 ± 1.6	2.2 ± 0.4
5	41.7	5.9 ± 0.3	3.3 ± 0.6
10	35.9	4.8 ± 0.2	3.3 ± 0.3
20	26.4	4.5 ± 0.5	2.4 ± 0.5
50	28.2	7.3 ± 0.5	1.5 ± 0.1

Ensayos posteriores se realizaron a una concentración 10 nM de enzima, ya que fue en esta condición en la que se obtuvo la mejor señal espectrofotométrica en el ensayo y un mejor ajuste de los datos. Los resultados revelan que la mutante L3I en ausencia de activador alostérico, al igual que la enzima silvestre, presenta cooperatividad homotrópica positiva (figura 18). Por otra parte, los valores de k_{cat} de 37.1 sitio⁻¹s⁻¹ en ausencia de activador, y de 39.5 sitio⁻¹s⁻¹ en presencia de 1 mM de GlcNAc6P, no son significativamente distintos (Tabla 4). En contraste, los valores de $S_{0.5}$ y K_m muestran una diferencia en un orden de magnitud. Lo anterior permite decir que la mutante L3I es esencialmente un sistema alostérico del tipo *K*. Los valores de $S_{0.5}$ y de K_m , para las enzimas L3I y silvestre, son prácticamente iguales, sin embargo el análisis de las propiedades catalíticas de la mutante L3I muestran que es cuatro veces menos activa que la enzima silvestre. En conjunto, esto sugiere que la mutación alteró la conformación de los residuos responsables de la catálisis pero no así los de unión.

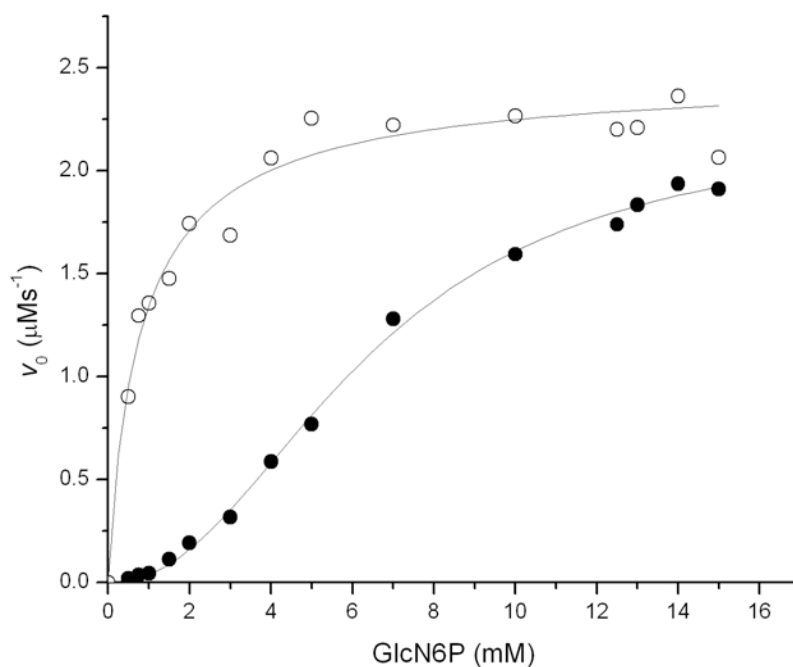


Figura 18. Patrones de velocidad inicial contra concentración de sustrato de la mutante L3I en ausencia de activador (●). Datos ajustados a la ecuación de Hill y a la ecuación de MWC. En presencia de 1 mM de GlcNAc6P (○). Datos ajustados a la ecuación de Hill.

Tabla 4. Comparación de parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación de Hill de la mutante L3I.

Enzima	Sin GlcNAc6P			Con GlcNAc6P	
	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	$S_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	K_M (mM)
Silvestre	158 ± 8	5.5 ± 0.2	2.9 ± 0.1	158 ± 8	0.55 ± 0.09
L3I	37.1 ± 8	6.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	39.5 ± 8	0.83 ± 0.01

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste al modelo MWC.

Enzima	<i>L</i>	<i>c</i>	<i>K_R</i> (mM)	<i>K_T</i> (mM)
Silvestre	$1 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^{-2} \pm 2.0 \times 10^{-4}$	0.55 ± 0.05	22.0 ± 2
L3I	85541.8 ± 11813	0	0.83 ± 0.01	∞

El valor de la constante alostérica, *L*, de la mutante L3I con respecto al de la enzima silvestre, muestra que el equilibrio T-R se encuentra desplazado hacia la forma R con respecto a la enzima silvestre. Por otra parte, el valor del coeficiente de unión no exclusiva indica que la afinidad del estado T por el sustrato se encuentra enormemente reducida, por lo que con estos datos podemos afirmar que la enzima se comporta como de fijación exclusiva por el sustrato. Sin embargo, conserva un comportamiento semejante al de la enzima silvestre por lo que esta mutante es adecuada para emplearla como marcador estequiométrico en el intercambio de subunidades en la triple mutante.

Caracterización cinética de la mutante L3I:R172A:K208E

La parte inicial del estudio cinético se enfocó a evaluar el efecto conjunto de las mutaciones R172A y K208E sobre la mutante L3I. Las mutaciones R172A y K208E fueron diseñadas con la intención de suprimir la capacidad de la enzima de unir sustrato y en consecuencia, abolir la activación homotrópica con lo cual se eliminarían los cambios estructurales a nivel cuaternario dejando la posibilidad de examinar los cambios locales a nivel terciario que desencadenan la transición. El análisis cinético para la mutante R172A:K208E (Lucumí-Moreno y col., 2005) mostró que la enzima es inactiva en

ausencia de activador alostérico sin embargo la actividad se restablece en presencia de éste. Este comportamiento la hace adecuada para la construcción de los heterooligómeros, ya que además de cumplir con la condición de no unir sustrato en ausencia de activador, genera una diferencia de pI con respecto a la enzima silvestre lo que facilita su separación por electroforesis, isoelectroenfoque nativo o por cromatografía de intercambio iónico.

El estudio cinético de la mutante L3I:R172A:K208E, en ausencia de activador alostérico (GlcNAc6P) y a concentraciones variables de sustrato, muestra que las mutaciones realizadas en la enzima no eliminan del todo la capacidad de unir sustrato y generan un comportamiento cinético complejo consistente en dos fases (Figura 19 A). La primera parte (Figura 19 B) describe una cinética de saturación, la cual aparentemente posee una velocidad máxima a una concentración de 1.5 mM de GlcNAc6P; posteriormente a una concentración de 2.5 mM de sustrato, comienza a presentarse una segunda fase en la cual se observa cooperatividad positiva y una velocidad máxima un orden de magnitud mayor que la que se presenta en la primera fase. Este comportamiento sugiere la presencia de dos tipos de sitios activos. El origen de estos sitios puede ser diverso; por ejemplo que los dos tipos de sitio activo estén presentes en cada hexámero o bien que existan dos tipos de hexámeros cuya única diferencia sean sus sitios activos. En el primer caso estaríamos frente a una asimetría preexistente del hexámero. Esta asimetría podría provenir de una distorsión del sitio alostérico, que como se describió previamente, se encuentra en las interfases entre monómeros. Bajo esta hipótesis, la distorsión de la interfase provocaría un acomodo del hexámero tal que sus sitios activos no fueran equivalentes. Por otra parte, la segunda hipótesis sugiere la existencia de dos tipos de hexámeros con sitios activos distintos. La única forma en que esto puede ocurrir es postulando que en la vía de plegamiento de estos hexámeros existe un estado conformacional cuya energía es tan baja que resulta imposible escapar de él y que, sin embargo, no es obligatorio ser visitado. En consecuencia aquellas moléculas que visiten este estado conformacional constituyen uno de los tipos de sitio activo mientras que aquellas que no lo visiten constituyen el otro tipo de sitios activos.

Evidentemente cualquiera de las dos hipótesis requiere de pruebas experimentales. No obstante, cualquiera de las dos hipótesis produciría un

comportamiento cinético resultante de la combinación de los comportamientos cinéticos de cada tipo de sitios activos. Al margen de esta posibilidad, se pensó en realizar un ajuste de los datos cinéticos a una ecuación compuesta por la expresión que describe al modelo de Michaelis-Menten, para la primera fase de la cinética, y la expresión que describe al modelo de MWC, para la segunda fase. Sin embargo, los valores de los parámetros cinéticos que se generaron para la segunda fase no fueron coherentes, por lo que se intentó otro ajuste con una ecuación compuesta por la expresión del modelo de Michaelis-Menten y la ecuación de Hill (tabla 6). La expresión empleada fue la siguiente:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]^h}{K_{0.5}^h + [S]^h} + \frac{V_{\max 2} [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

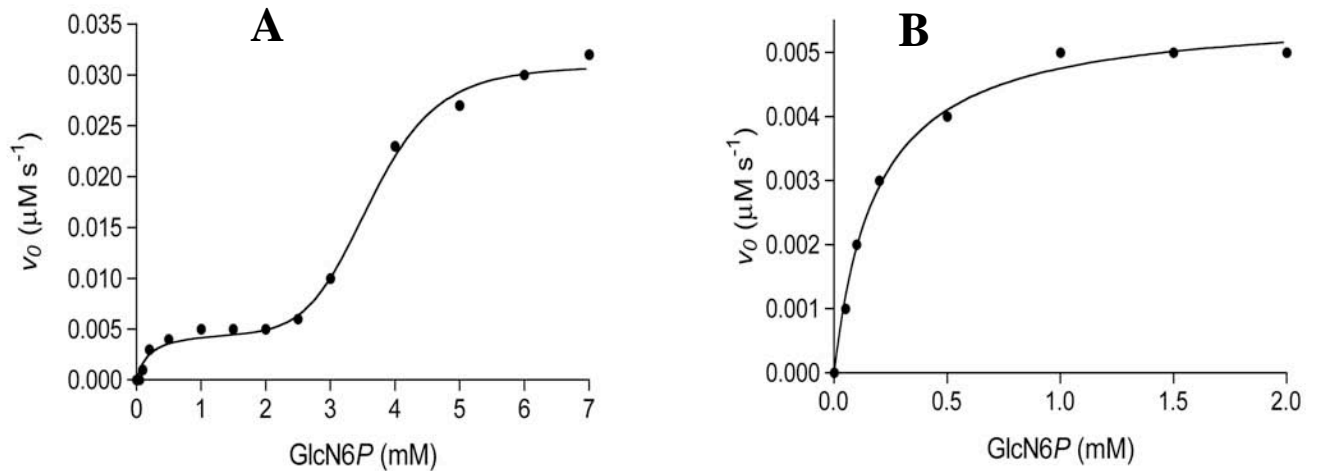


Figura 19. A) Patrón de velocidad inicial contra concentración de sustrato de la enzima triple mutante en ausencia de activador alostérico, GlcNAc6P. B) Primera fase de la Curva mostrada en A. Datos ajustados a la ecuación ecuación 7.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación 7.

Enzima	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (sitio $^{-1}$ s $^{-1}$)	K_M (μM)	K_s (μM)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ (sitio $^{-1}$ s $^{-1}$)	h
--------	---	----------------------------	----------------------------	---	-----

L3I:R172A:K208E	0.02 ± 0.001	0.187 ± 0.070	3.44 ± 0.057	0.106 ± 0.007	4.96 ± 0.51
------------------------	------------------	-------------------	------------------	-------------------	-----------------

El ajuste de los datos muestra que el comportamiento que describe la cinética de la triple mutante puede ser descrito por la ecuación 7, la cual es un enfoque empírico, libre de modelo. Al margen de la posibilidad de que en solución se tienen isoformas de la enzima, la primera fase describe a una población que presenta un valor de K_M $0.187 \mu\text{M}$ el cual es dos mil veces menor que el valor de la K_M en la enzima silvestre, mientras que la capacidad catalítica para esta conformación es mínima con un valor de V_{max} de $0.006 \mu\text{M s}^{-1}$. Considerando que la concentración de enzima en el ensayo fue de 50 nM de hexámero y la presencia de 6 sitios catalíticos por hexámero, calculamos la constante catalítica aparente, $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$, para el primer sitio, la cual fue de 0.02 s^{-1} . La segunda fase presenta un comportamiento aparentemente es muy cooperativo, con un valor de h casi de 5. La constante de disociación para esta conformación presenta un valor aproximadamente veinte veces mayor que el de la primera fase pero con una catálisis cinco veces mayor, correspondiente a una $k_{\text{cat}}^{\text{app}} = 0.106 \text{ s}^{-1}$.

La segunda parte de la caracterización cinética estudió el efecto del activador alostérico, GlcNAc6P (Figura 20). Los datos experimentales obtenidos a diferentes concentraciones de GlcNAc6P mostraron que el activador origina un comportamiento no menos complejo que es coherente con las hipótesis planteadas anteriormente. En el ajuste de los datos se empleó la misma ecuación que en el caso de ausencia de activador; aun cuando el ajuste fue bueno, en algunos casos los valores presentan un error mayor del 10 %. Sin embargo, se observa para ambas fases que la presencia de GlcNAc6P genera una activación de tipo mixto $K-V$ al disminuir las constantes de afinidad de ambas poblaciones de sitios activos y generar un aumento en la catálisis (Tabla 7)

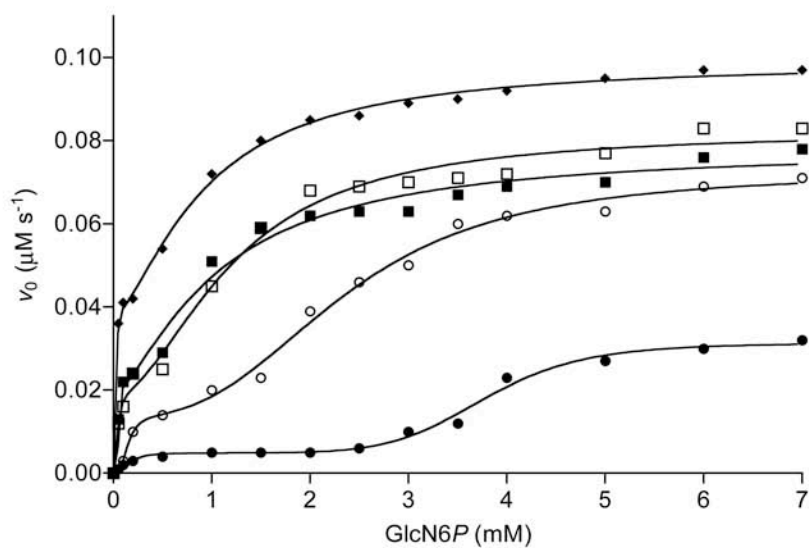
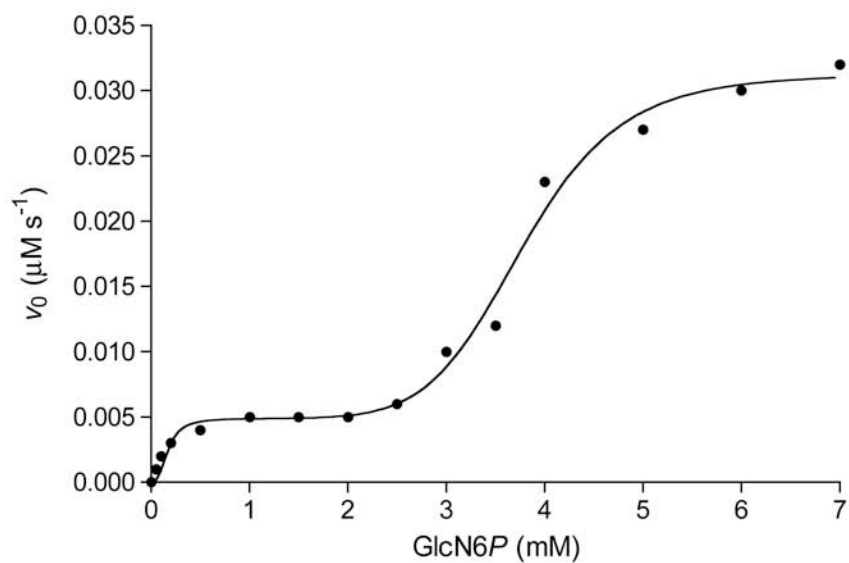


Figura 20. Patrones de velocidad inicial contra concentración de sustrato de la enzima L3I:R172A:K208E en ausencia y presencia del activador alostérico GlcNAc6P. (●) 0 mM, (○) 0.5 mM, (■) 1 mM, (□) 2.5 mM, (◆) 5 mM GlcNAc6P.

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación 7.

Concentración GlcNAc6P (mM)	V_{\max} ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_M (μM)	K_s (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M s}^{-1}$)	h
0	0.006 ± 0.002	0.187±0.07	3.44±0.06	0.032±0.001	4.96 ± 0.51
0.5	0.023 ± 0.01	0.364 ± 0.33	2.463 ± 0.18	0.050 ± 0.011	3.20 ± 0.81
1	0.025 ± 0.007	0.037 ± 0.031	1.01 ± 0.13	0.046 ± 0.01	2.13 ± 0.50
2.5	0.026 ± 0.003	0.027 ± 0.02	1.23 ± 0.147	0.068 ± 0.01	1.60 ± 0.32
5	0.032 ± 0.002	0.02 ± 0.01	0.9 ± 0.163	0.075 ± 0.002	1.02 ± 0.20

Aun cuando los resultados sugirieron que las hipótesis de la presencia de isoformas o de la asimetría preexistente de sitios activos pueden ser plausibles, no son contundentes y no se pueden descartar otras posibilidades. También es necesario discutir el hecho de que si bien la mutación R172A:K208E originaba que la enzima perdiera la capacidad de unir sustrato y en consecuencia fuera inactiva, en presencia del activador la actividad se reestablecía. En consecuencia, lo que se observa en la cinética de la triple mutante en ausencia y en presencia de activador alostérico, es el efecto cooperativo de las tres mutaciones.

Caracterización hidrodinámica de la Glucosamina-6P-desaminasa silvestre y la mutante L3I:R172A:K208E .

Aún cuando la caracterización cinética de la enzima L3I:R172A:K208E muestra un comportamiento atípico con respecto a la enzima silvestre y, no parece ser la más adecuada para el estudio de la propagación de cambios mediante la construcción de heterooligómeros, se probó aplicar la metodología que planteó Lucumí–Moreno para la construcción de especies híbridas explotando la mutación L3I contenida en la triple

mutante como marcador estequiométrico de intercambio de subunidades. Las especies híbridas que teóricamente se pueden formar son 11, además de los correspondientes homohexámeros silvestre y mutante. La estructura entrecruzada de la matriz de filtración molecular ofrece un entorno propicio para el replegamiento de proteínas, además de que hace más eficaz este proceso (Batas y Chaudhuri, 1996); la cromatografía de filtración molecular permite, al mismo tiempo de retirar las especies caotrópicas, separar la fracción que posee los hexámeros de las fracciones que contienen agregados y monómeros (Batas y col., 1997). Para desarrollar la formación de heterooligómeros es requisito indispensable que el proceso de desnaturalización por urea sea reversible, es decir que esté en equilibrio y que las concentraciones de todas las especies moleculares estén determinadas por la termodinámica y no por la cinética (Cooper, 1999).

La columna de filtración molecular Superdex 200 preparativa se calibró (Figuras 21 y 22; tabla 8) de acuerdo a la sección de *Materiales y métodos*; la ecuación que describe a la curva de calibración es la siguiente:

$$1000 / V_{el} = 0.1488 R_s + 4.5285$$

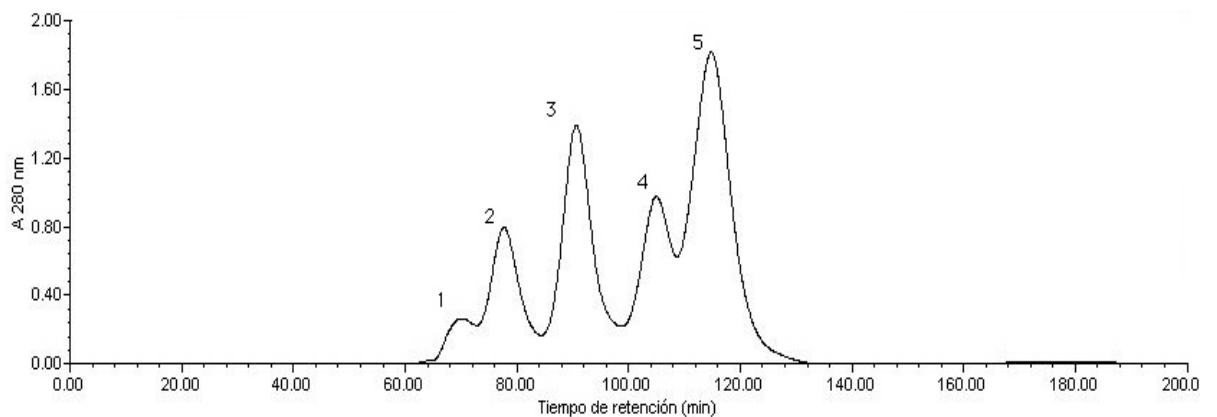


Figura 21. Cromatograma de la calibración de la columna Superdex 200 con proteínas de radio de Stokes conocido. Pico 1: ferritina; pico 2: catalasa; pico 3: seroalbúmina; pico 4: hemoglobina; pico 5: ovoalbúmina. Detección por absorbancia a 280 nm.

Tabla 8. Radios de Stokes para proteínas en estado nativo.

Proteína	Peso molecular (kDa)	R_s (Å) ^a	Volumen elución (mL) ^b
Ferritina	440	67.9	70.057
Catalasa	240	52	77.668
Seroalbúmina	67	33.9	90.665
Hemoglobina	64	33.2	104.977
Ovoalbúmina	43	30.2	114.788

^a Uversky,1993.

^bValores obtenidos de la cromatografía de filtración molecular para la calibración de la columna SUPERDEX 200.

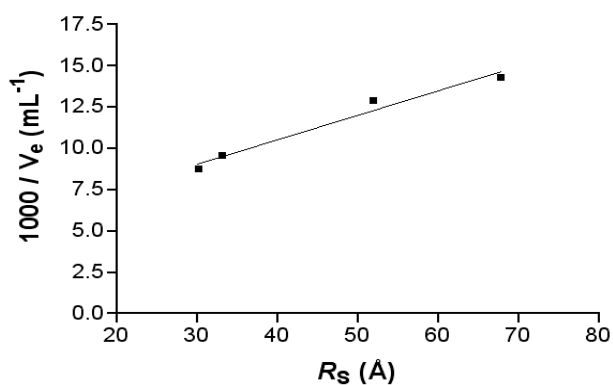


Figura 22. Curva de calibración para la columna Superdex 200.

La construcción de heterohexámeros 3:3 consiste en combinar proporciones iguales de enzima silvestre y triple mutante en urea 8 M durante 5 minutos y posteriormente pasar esta mezcla por una columna de filtración molecular (Lucumí-Moreno, 2005). Antes de iniciar la elaboración de los heterooligómeros fue conveniente conocer las características hidrodinámicas tanto de la enzima silvestre (Figura 23) como de la mutante L3I:R172A:K208E (Figura 24) en condiciones nativas y después de ser tratadas con urea 8 M, para ello se realizaron experimentos de cromatografía de filtración molecular.

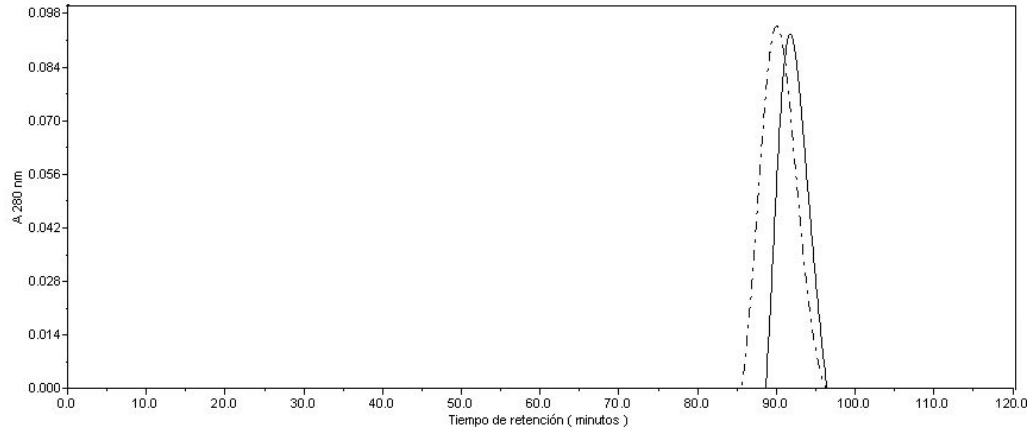


Figura 23. Perfil cromatográfico de la GlcN6P desaminasa silvestre en filtración molecular. (- -) enzima silvestre en condiciones nativas; (—) enzima silvestre después del tratamiento con urea 8M.

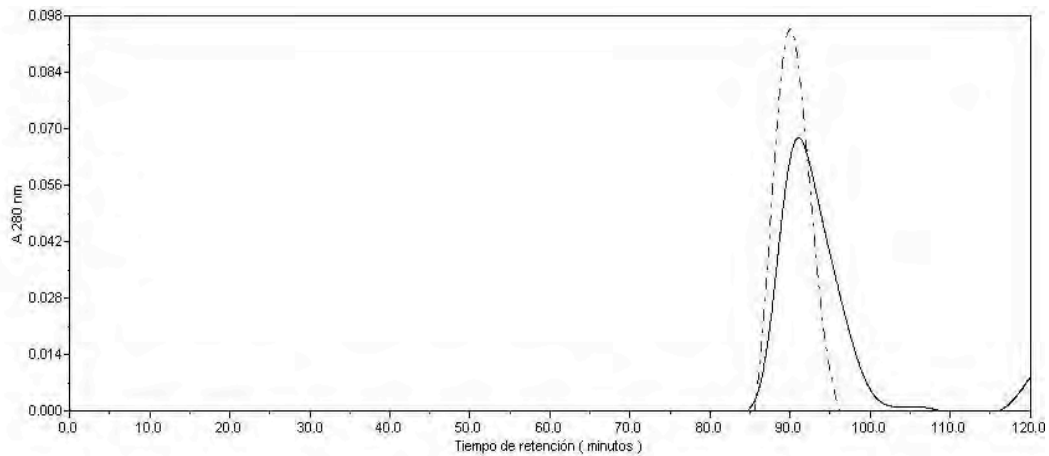


Figura 24. Perfiles cromatográficos de la GlcN6P desaminasa triple mutante en filtración molecular. (- -) enzima triple mutante en condiciones nativas; (—) enzima triple mutante después del tratamiento con urea 8 M.

La Figura 23 muestra el perfil de elución representativo de la enzima silvestre en estado nativo, en el cual se observa un único pico que corresponde a la enzima hexamérica. El volumen de elución, de acuerdo a la curva de calibración, corresponde a una especie con un radio de 42.8 \AA cercano al reportado para el hexámero nativo, 45.3 \AA (Blancas-Mejía, 2003). El perfil cromatográfico de la enzima silvestre tratada con urea 8 M presenta un pico único cuyo volumen de elución es diferente al obtenido en el estado nativo, el cual corresponde a una especie hexamérica con un radio de Stokes de 42 \AA . Por otra parte, el perfil de la enzima triple mutante (Figura 24) en condiciones nativas

presenta un solo pico con un volumen de elución que corresponde a una especie con un radio de Stokes de 44 Å, el cual es diferente al valor obtenido para la GlcN6P desaminasa silvestre-nativa, sin embargo, muy cercano al reportado. El perfil de la triple mutante tratada con urea 8 M muestra dos picos, el primero de ellos corresponde a una especie hexamérica, la cual presenta un cambio en el volumen de elución así como en su radio de Stokes con respecto al de la enzima en condiciones nativas (Tabla 8) y que al igual a lo que ocurre con en la enzima silvestre tratada con urea 8M, se tiene una especie hexamérica. El segundo pico se presenta a un volumen de elución que corresponde a una especie con radio de Stokes de 24.6 Å, que de acuerdo a lo reportado concuerda con un monómero plegado. Estos resultados sugieren que en ambos casos, el tratamiento con urea 8 M genera una especie con un plegamiento diferente que da lugar a una conformación ligeramente más compacta con respecto al estado nativo, como se ha reportado en otros casos (Li y Su, 2003), lo cual se refleja en volúmenes de elución ligeramente mayores a los obtenidos para cada enzima en estado nativo. Por otra parte, se observa que el volumen de elución de la triple mutante con respecto al de la enzima silvestre es menor. Esto sugeriría que las mutaciones habrían alterado la conformación de la enzima. Sin embargo, la diferencia de los volúmenes no es tan importante para sostener que las mutaciones hayan generado una estructura más laxa con respecto a la enzima silvestre, además que si se cuenta con una especie más pequeña, difícilmente es más laxa. En ocasiones, en la cromatografía de filtración molecular se puede presentar el retraso del pico de elución de una proteína debido a la baja concentración de iones en el amortiguador de elución (Corbett y Roche, 1984); de acuerdo a las propiedades cromatográficas de la matriz, las interacciones no específicas que se establecen entre las proteínas y la matriz son despreciables siempre que la fuerza iónica se encuentre en un intervalo de 0.15 a 1.5 M. La verificación posterior de la fuerza iónica del amortiguador de elución arrojó un valor de 0.033 M, por lo que es muy factible que esta diferencia en los tiempos de retención se deba a interacciones de la triple mutante con la matriz.

Una forma de evaluar el efecto del tratamiento con urea 8 M sobre la enzima silvestre y la eficacia de esta metodología para la obtención de proteínas reasociadas con un estado semejante al nativo y activas, fue la determinación de la actividad específica de

la especie hexamérica obtenida en la filtración molecular después del tratamiento con urea (Tabla 8).

Tabla 8. Cambios en la actividad específica y parámetros cromatográficos de la GlcN6P desaminasa silvestre y triple mutante, después del tratamiento con urea 8 M.

Espece	Concentración aplicada mg/mL	Concentración recuperada mg/mL (%)	Actividad específica $\mu\text{moles mL}^{-1} \text{s}^{-1}$ mg de proteína ⁻¹	Volumen de elución (mL)	Radio de Stokes (Å) ^a
GlcN6P desaminasa silvestre nativa	0.9	0.72 (80%)	2890.83	92	43
GlcN6P desaminasa silvestre tratada con urea 8 M	0.9	0.54 (60%)	180.79	93	42
GlcN6P desaminasa triple mutante nativa	0.9	0.70 (77%)	3.33	90	44
GlcN6P desaminasa triple mutante tratada con urea 8 M	0.9	0.68 (75%)	-	91	43

^a Valores calculados a partir de la ecuación $1000/V_{el} = 0.1488 + 4.5285$.

Los resultados obtenidos (Tabla 8) muestran que la enzima silvestre tratada con urea 8 M y pasada por la columna de filtración molecular conserva sólo el 8% de su actividad específica, lo que sugiere que el uso de cromatografía de filtración molecular no es un método que permita la reasociación de la GlcN6P desaminasa. Es difícil saber si el decremento en la actividad se deba a 1) los sitios catalíticos de la enzima reasociada no quedaron del todo funcionales o 2) es la actividad residual de una población de enzima silvestre, cuya conformación no resultó alterada con el tratamiento con urea 8 M por 5 minutos. Como parte de la caracterización hidrodinámica, se examinó el comportamiento tanto de la enzima silvestre como de la triple mutante, en condiciones nativas en cromatografía de intercambio iónico. La figura 25 muestra los perfiles cromatográficos de la enzima silvestre y la triple mutante en intercambio iónico, en condiciones nativas.

Se observan dos picos, que de acuerdo a las características electrostáticas de cada enzima, el pico con un tiempo de retención de 28 minutos corresponde a la enzima silvestre mientras que el pico que eluye a los 33 minutos corresponde a la enzima triple mutante, debido a que la sustitución de aminoácidos genera una diferencia, con respecto a la enzima silvestre, de 3 cargas. De esta forma, la enzima silvestre y la enzima triple mutante eluyen a una concentración de 200 mM y 230 mM de KCl respectivamente; el perfil muestra que en una mezcla de enzima silvestre y triple mutante, en condiciones nativas, cada enzima se comporta de forma independiente a diferencia de lo que sucede en la filtración molecular (datos no mostrados), en donde ambas enzimas se comportan como una sola especie cromatográfica. La diferencia de absorbancia probablemente sea un efecto de la pérdida de proteína en la columna.

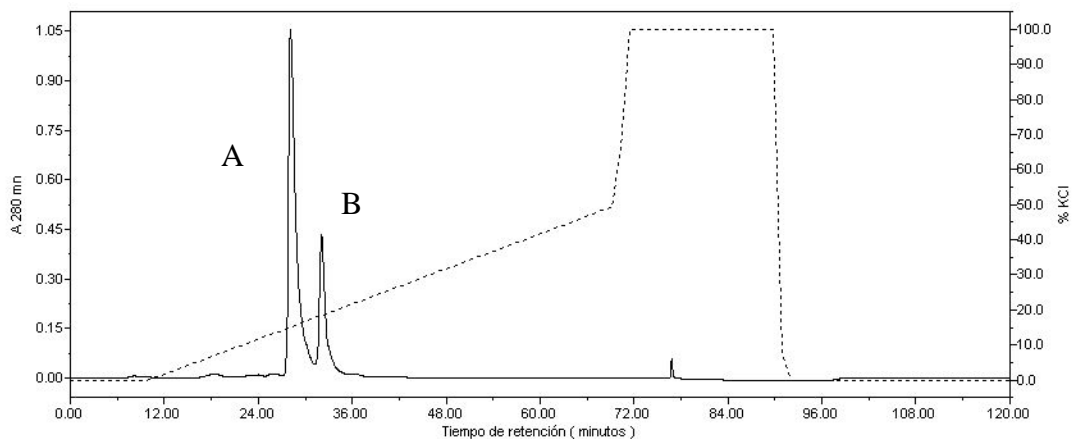


Figura 25. Cromatografía de intercambio iónico de una mezcla de enzima silvestre (A) y enzima triple mutante (B) en condiciones nativas; pH = 7.7, concentración final de proteína 5 μ M (0.9 mg/mL) ; flujo 1mL min⁻¹; gradiente lineal de KCl de 0 a 500 mM.

Construcción de heterooligómeros.

La construcción de heterooligómeros se ensayó de acuerdo a la metodología propuesta por Lucumí-Moreno (2005). El patrón cromatográfico que se obtuvo se muestra en la figura 27. En éste se observa una sola especie con un comportamiento similar al de las enzimas silvestre y triple mutante en sus formas hexaméricas. Se determinó la actividad específica de la fracción obtenida y se comparó con la de la enzima silvestre. La actividad específica de esta fracción, 160 μ moles mL⁻¹ s⁻¹ mg de

proteína⁻¹, resultó ser 21 veces menor que la actividad específica de la enzima silvestre, 2744.4 $\mu\text{moles mL}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, valores semejantes a los obtenidos en la caracterización de la GlcN6P desaminasa silvestre en presencia de urea 8 M. Lo anterior sugirió la presencia de especies de heterohexámeros o bien, la presencia de una o varias especies de la enzima silvestre con estados de plegamiento diferentes al nativo.

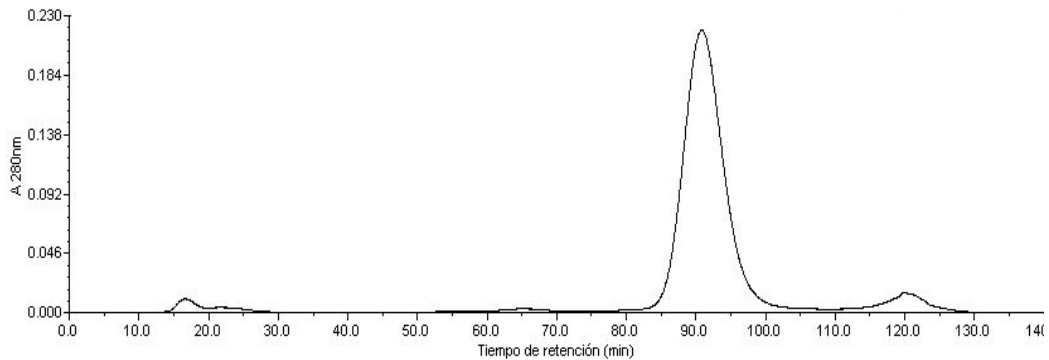


Figura 26. Perfil de elución en cromatografía de filtración molecular de la mezcla de enzima silvestre y triple mutante incubadas por 5 minutos en Tris-HCl 50 mM pH 7.7 con urea 8 M.

Una técnica basada en la diferencia de cargas de las proteínas nos permitiría corroborar la presencia de heterohexámeros. Lucumí-Moreno sugirió el uso de cromatografía de intercambio iónico como herramienta para separar los heterohexámeros generados, explotando la diferencia de cargas que presentarían los heterooligómeros debido a la combinación de subunidades silvestres y mutantes. La cromatografía de intercambio iónico se realizó en una columna Protein-Pack^T Q 8HR, a un flujo de 1 mL min⁻¹ y se eluyó con un gradiente lineal de KCl de 0 a 500 mM durante una hora. En la figura 27 se muestra el perfil de la fracción obtenida de la filtración molecular, en él se observan tres picos principales, dos de ellos mal resueltos. Por este motivo se modificó el gradiente, de tal forma que se alcanzara el 20% de KCl en una hora, y el flujo se redujo a 0.5 mL min⁻¹ (figura 28 A). Al modificar estos parámetros se logró la separación de tres picos sin embargo, al comparar este cromatograma con el perfil de la mezcla de enzima silvestre y triple mutante en estado nativo se observó que los tiempos de retención de los picos mayoritarios, 28.3 y 31.6 minutos, son semejantes a los tiempos de elución de las enzimas silvestre y triple mutante en su estado nativo figura 28 B.

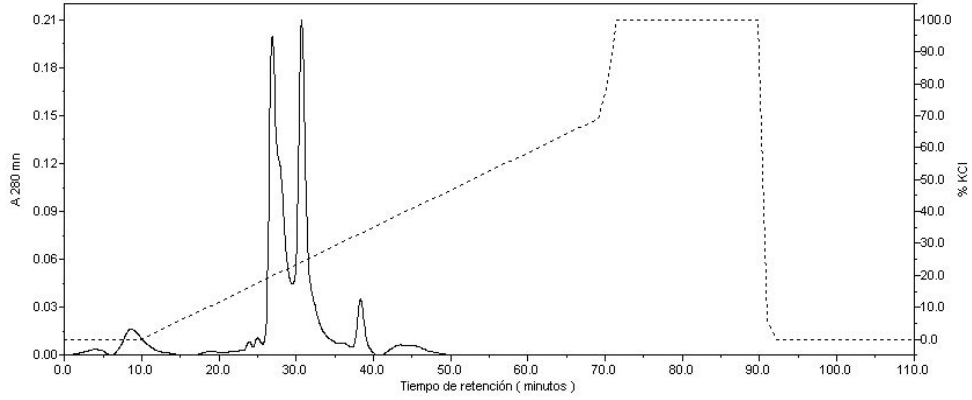


Figura 27. Perfil cromatográfico de intercambio iónico de la fracción de cromatografía de filtración molecular que correspondería a una especie hexamérica. Gradiente lineal de 0 a 500 mM en una hora; flujo 1 mL min⁻¹. Detección por absorbancia a 280 nm.

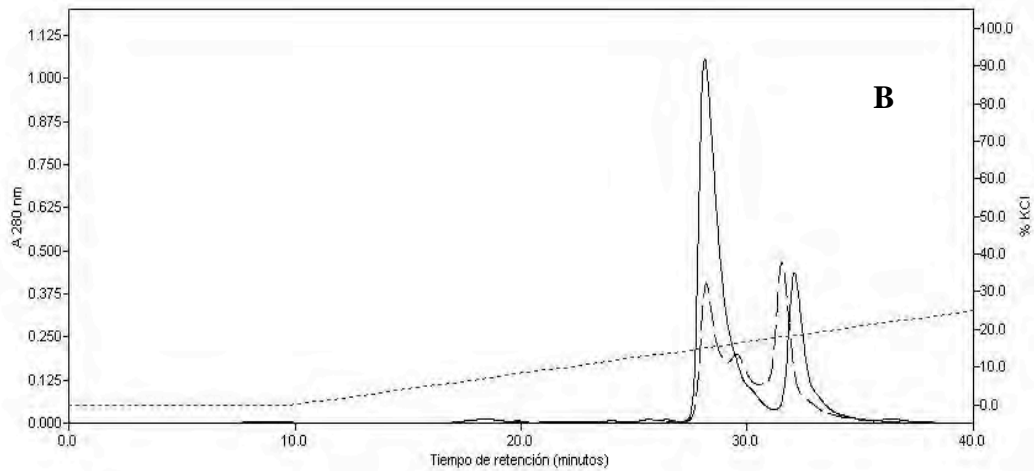
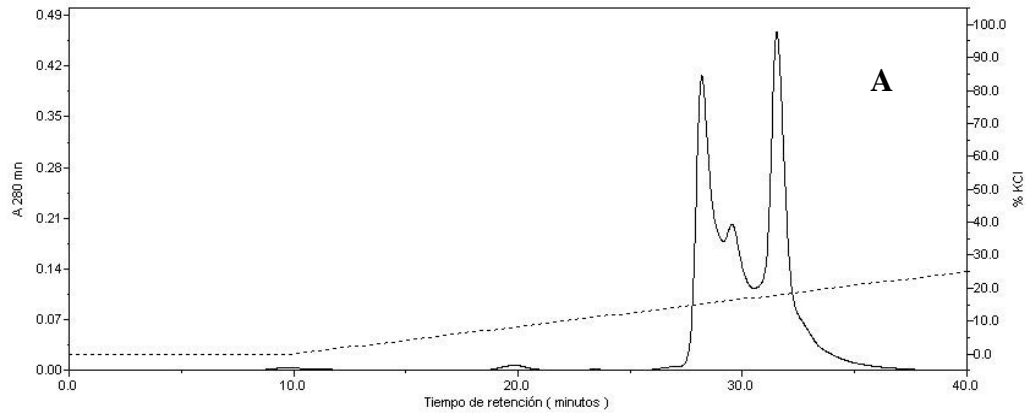


Figura 28. Perfil de elución en cromatografía de intercambio iónico de la fracción de cromatografía de filtración molecular que corresponde a una especie hexamérica. Gradiente lineal de 0 a 200 mM de KCl en una hora. Velocidad de flujo 0.5 mL min⁻¹. B)

Comparación de los perfiles cromatográficos de la mezcla para la construcción de heterooligómeros (--) y la mezcla de enzimas silvestre y triple mutante en estado nativo (—).

Este resultado sugirió que la formación de heterooligómeros estaba limitada por difusión por lo que se empleó agitación constante y moderada, por uno y tres minutos. En cromatografía de filtración molecular no se presentaron cambios en el comportamiento hidrodinámico hasta este punto observado sin embargo, los perfiles en intercambio iónico mostraron la influencia de la agitación en la formación de diferentes especies (figura 29).

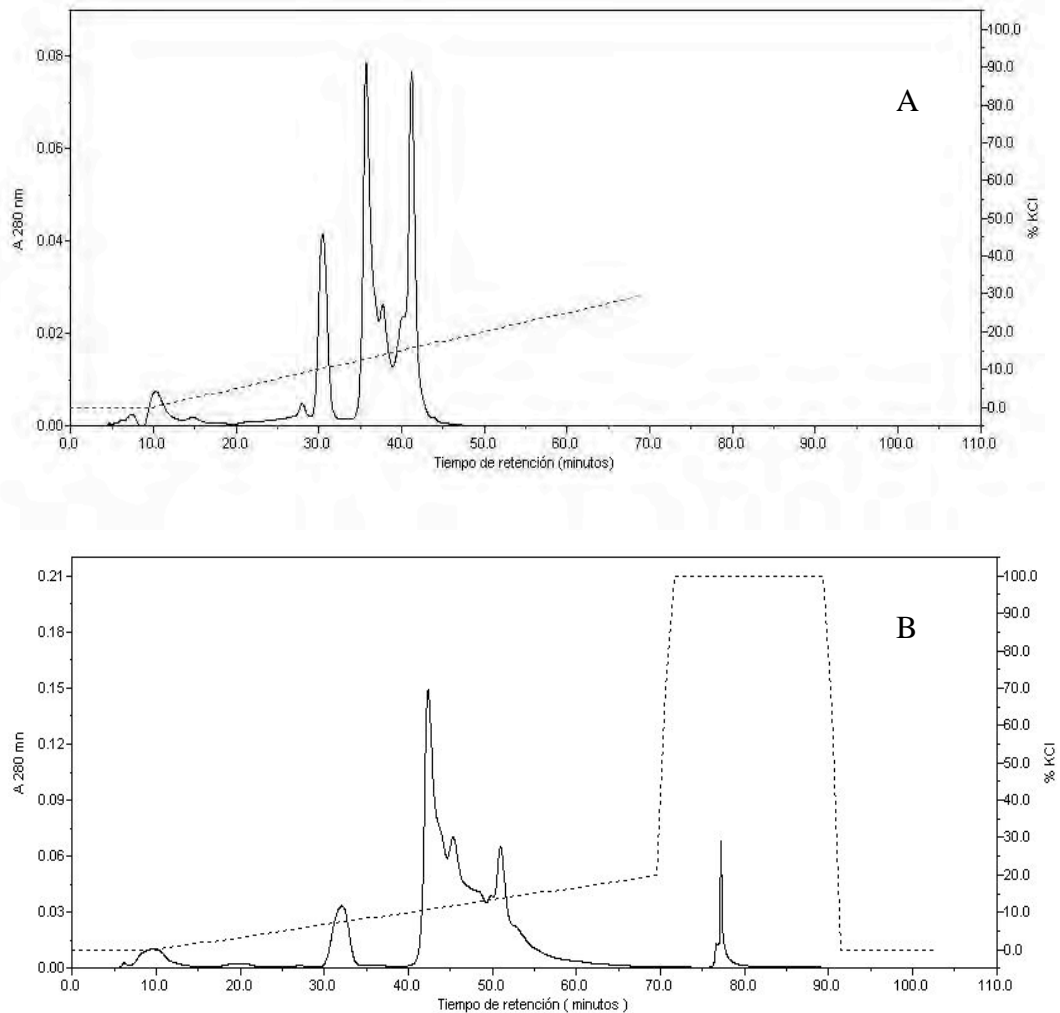


Figura 29. Perfiles de elución en cromatografía de intercambio iónico de cromatografía de filtración molecular que corresponde a una especie hexamérica. Gradiente lineal de 0 a 200 mM de KCl en una hora. Velocidad de flujo 0.5 mL min⁻¹. A) Tiempo de agitación 1 minuto; B) tiempo de agitación 3 minutos.

En ambos casos se presentan seis especies, una primera que no interactúa con la matriz y eluye antes de comenzar el gradiente, una especie que eluye al minuto 30 y dos especies que se encuentran a los 36 y 43 minutos las cuales, aparentemente, corresponden a las fracciones de enzima silvestre y triple mutante en sus formas homooligoméricas, siendo las especies intermedias los heterohexámeros. Para corroborar este hecho, se realizó un nuevo experimento con el fin de obtener muestras para su posterior secuenciación del amino terminal. Se seleccionaron las fracciones que corresponden a los cinco picos mostrados en el perfil cromatográfico de la figura 30.

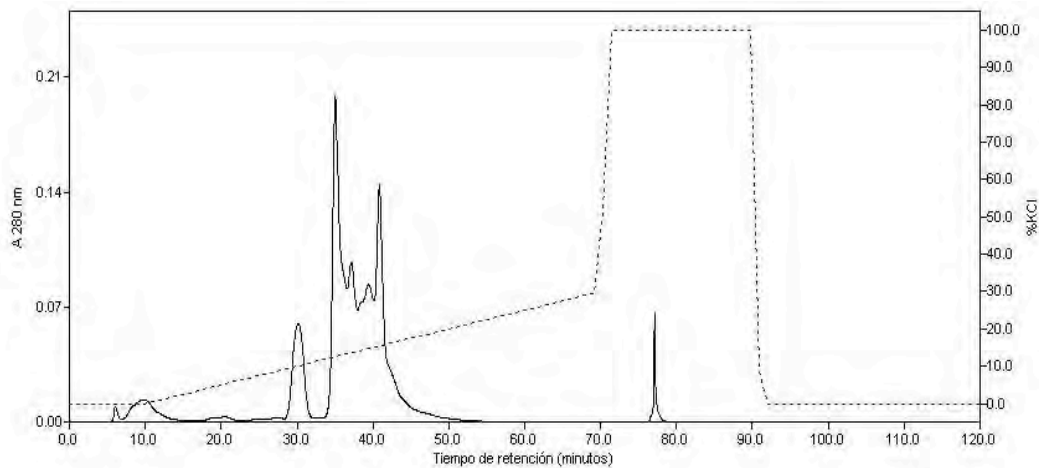


Figura 30. Perfil de elución en intercambio iónico de la mezcla para a construcción de heterooligómeros y posterior secuenciación del extremo N-terminal.

Los resultados de la secuenciación del extremo N-terminal mostraron que las fracciones intermedias, las cuales se esperaban que contuvieran a las especies heterooligoméricas, contenían únicamente de enzima silvestre. Para descartar que el perfil obtenido de la cromatografía de intercambio iónico para la construcción de heterohexámeros fuera el conjunto de isoformas de los homohexámeros generadas por el tratamiento con urea, se realizaron experimentos en los que se trató por separado a las enzimas silvestre y triple mutante, en las mismas condiciones en las que se probó la construcción de heterohexámeros. Los cromatogramas que se obtuvieron se muestran en la figura 31.

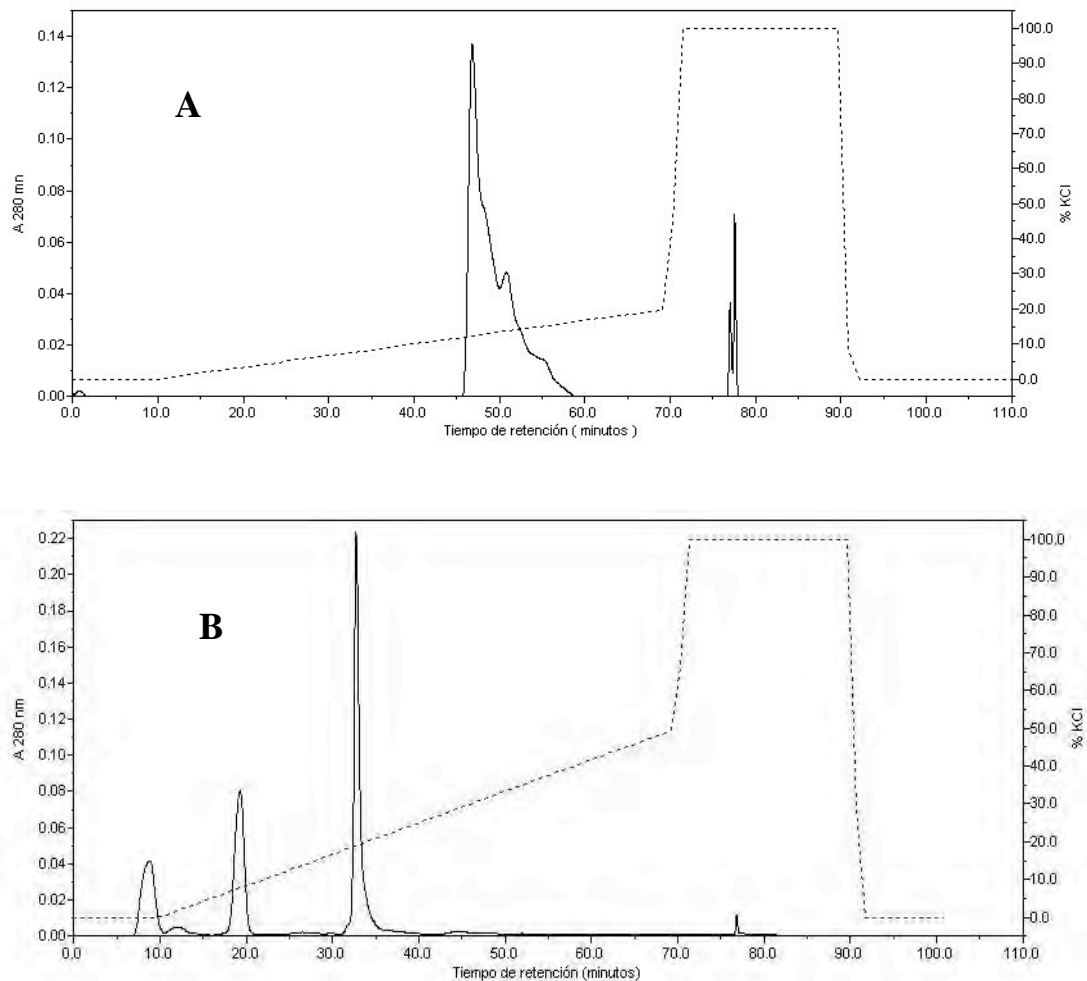


Figura 31. Cromatogramas de las enzimas en intercambio iónico después del tratamiento con urea 8 M; pH = 7.7, concentración final de proteína 5 μ M; flujo 1 mL min⁻¹. A) GlcN6P desaminasa silvestre; gradiente lineal de KCl de 0 a 200 mM B) GlcN6P desaminasa triple mutante; gradiente lineal de KCl de 0 a 500 mM.

La figura 31 muestra los perfiles cromatográficos de cada una de las enzimas después del tratamiento con urea 8 M. En cada caso es evidente la presencia de más de una especie después de emplear el método para la preparación de heterooligómeros. El perfil que describe la enzima silvestre en estas condiciones es complejo y claramente distinto al trazado en condiciones nativas; en el cromatograma obtenido para la triple mutante se observa la generación de tres especies fácilmente distinguibles, que eluyen en intervalo de 100 a 200 mM de KCl. Este comportamiento en ambas enzimas, apunta a

dos aspectos importantes, el primero es que si bien la filtración en gel cumple la función de retirar el agente desnaturante, evitar la agregación y replegar a la enzima (Batas y Chaudhuri, 1996), no excluye la generación de especies con un plegamiento anómalo que modifique sus propiedades hidrodinámicas y catalíticas. El segundo, y más relevante, es que el proceso de desnaturación para ambas enzimas, al menos con esta metodología, no es reversible. Si se analizan los cromatogramas en conjunto, es posible ver que dan lugar a un patrón semejante al cromatograma de intercambio iónico para la construcción de heterooligómeros (figuras 29 y 30). Los tiempos de elución no corresponden exactamente pero probablemente esto es debido a la interacción que se establece entre las enzimas, pequeños cambios en la temperatura ambiente y que el sistema se encuentre lejos de su equilibrio. En conjunto todos estos factores pueden modificar su comportamiento electrostático. Lo anterior hace pensar que, con esta metodología no necesariamente se está llevado a cabo el intercambio de subunidades. Es plausible suponer que el patrón observado en la cromatografía de intercambio iónico (figura 30) corresponde al comportamiento de las especies replegadas de cada uno de los homohexámeros.

Se realizó un estudio cinético de la fracción de la cromatografía de intercambio iónico que se pensó podría corresponder a los posibles heterooligómeros 3:3 y se comparó con los datos cinéticos previamente obtenidos para la enzima silvestre tratada con urea 8 M y pasada por la columna de filtración molecular. Los ensayos cinéticos se realizaron en ausencia y presencia de activador alostérico (GlcNAc6P) 1 mM. Como se mencionó anteriormente, los resultados (figura 31; tabla 9) muestran que la enzima silvestre tratada con urea y pasada por la columna de filtración molecular perdió actividad catalítica en un orden de magnitud con respecto a la enzima silvestre nativa y la afinidad por el sustrato se incrementó. Por otra parte, el comportamiento cinético de la fracción de los posibles heterooligómeros muestra cooperatividad homotrópica con un $h = 2.45$, así como activación heterotrópica, comportamiento que difiere del reportado por Lucumi-Moreno. Llama la atención que la k_{cat} para esta fracción tiene un valor de 32 s^{-1} que es 3.5 veces mayor que el de la enzima silvestre tratada con urea. Es probable que el hecho de pasar por una columna de intercambio iónico la fracción obtenida de la cromatografía de filtración molecular, aumente el rendimiento de la reasociación (Li y

Su; 2003) y que dé lugar a especies del tipo nativo. También es probable que la separación de especies realizada con la cromatografía de intercambio iónico sea responsable del aumento en la k_{cat} debido a la remoción de moléculas con plegamientos anómalos.

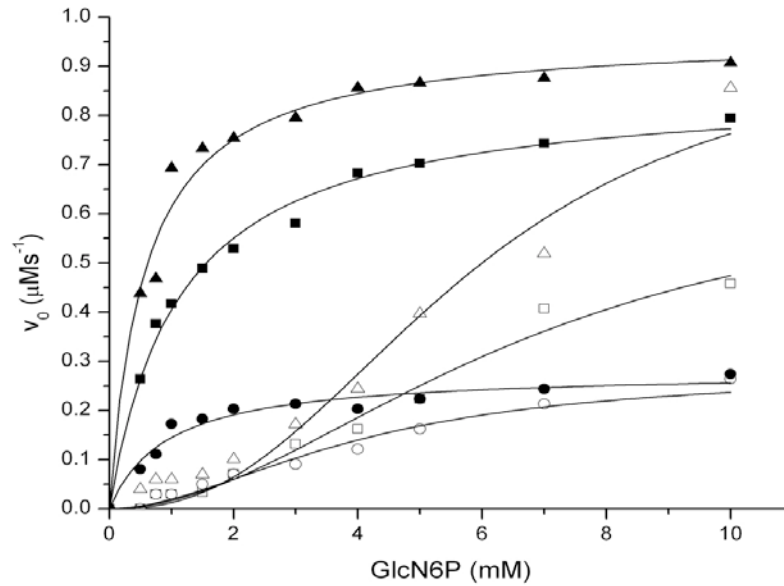


Figura 31. Patrones cinéticos ajustados a la ecuación de Hill. (□) enzima silvestre nativa sin activador; (■) enzima silvestre nativa, GlcNAc6P 1 mM; (○) enzima silvestre tratada con urea sin activador; (●) enzima silvestre tratada con urea, GlcNAc6P 1 mM; (△) posibles heterooligómeros sin activador; (▲) posibles heterooligómeros, GlcNAc6P 1 mM.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la enzima silvestre nativa, enzima silvestre tratada con urea y posibles heterooligómeros.

Especie	Sin GlcNAc6P			Con GlcNAc6P	
	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	$S_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (sitio ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mM)
Silvestre	158 ± 8	5.5 ± 0.2	2.9 ± 0.1	158 ± 8	0.55 ± 0.05
Silvestre tratada con urea	9.3	4.0 ± 0.2	2.4 ± 0.2	9.31	0.92 ± 0.17
HT	32.2	5.8 ± 0.3	2.5 ± 0.3	32.2	0.57 ± 0.08

HT. Fracción de cromatografía de intercambio iónico que aparentemente eran heterooligómeros.

Los resultados previos muestran que en nuestras manos, el método de formación de heterooligómeros, tal como está descrito por Lucumí-Moreno, no generó especies heterooligoméricas.

Influencia de la urea en la actividad enzimática de la Glucosamina-6P-desaminasa.

El trabajo previo de Lucumí-Moreno planteó las condiciones para disociar el hexámero de glucosamina-6-fosfato desaminasa. Estas condiciones consisten en incubar a la enzima silvestre y triple mutante en urea 8 M por 5 minutos. Aparentemente esto genera monómeros plegados y solubles. La pérdida de actividad se asocia a la disociación del hexámero de la GlcN6P desaminasa, ya que se parte de la premisa de que la enzima sólo es activa en su forma hexamérica. Sin embargo, se observó una pérdida de actividad específica en un tiempo menor de 5 minutos y no mostró cambios con el tiempo (Figura 32). El hecho de que no siga ocurriendo la desnaturalización de la enzima, hasta la inactivación total, sugiere que se alcanzó un equilibrio. Sin embargo, ya sea que ocurra la disociación del hexámero o bien la desnaturalización global del mismo, el proceso es irreversible. Aun en el mínimo tiempo de incubación no se recupera la actividad después de diluir la urea a una concentración final de 80 mM e incubar a temperatura ambiente por 24 horas (datos no mostrados). Esta metodología es insuficiente para determinar si la pérdida de actividad se debe a que se logra un estado disociado de la enzima o debido a que está ocurriendo la desnaturalización de la misma, por lo que es necesario el empleo de otras técnicas para determinar las condiciones en las cuales se obtienen monómeros plegados y que en éstas el proceso sea reversible.

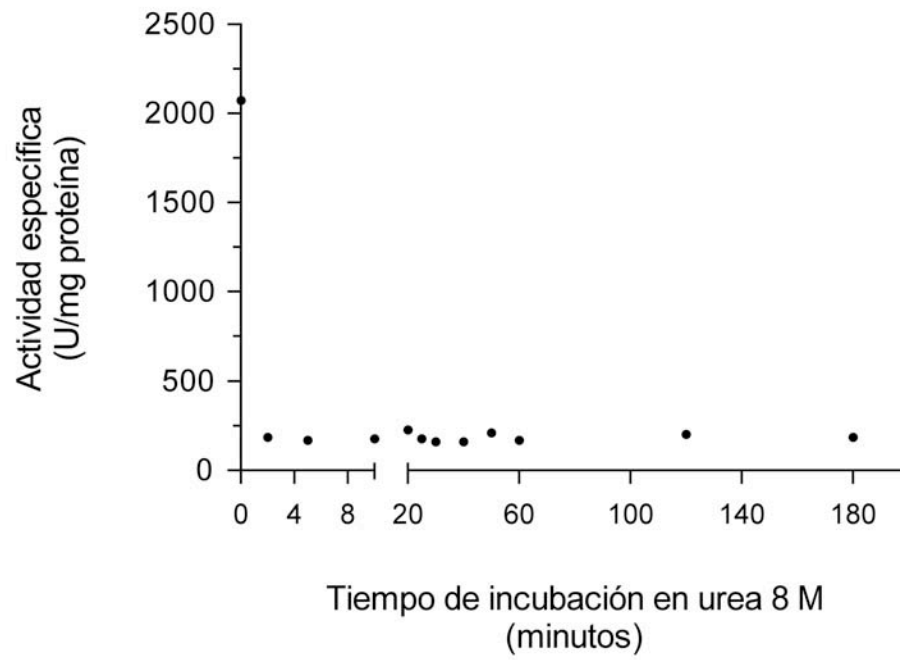


Figura 32. Patrón de pérdida de actividad específica de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa con respecto al tiempo de exposición a urea 8 M.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se logró construcción, expresión y purificación de las enzimas mutantes L3I y L3I:R172A:K208E.

La caracterización cinética de la mutante L3I mostró que es cuatro veces menos activa que la enzima silvestre, y que el equilibrio T a R se encuentra desplazado hacia el estado R. También encontramos que la afinidad del estado T por el sustrato es mucho menor que en su contraparte silvestre. No obstante, sigue siendo un sistema alostérico del tipo K que podría representar a la enzima silvestre.

La mutante L3I podría ser empleada como un marcador de intercambio y estequiometría de subunidades en heterooligómeros.

La caracterización cinética de la mutante L3I:R172A:K208E mostró un comportamiento complejo el cual sugiere las hipótesis de la presencia de isoformas y del desacoplamiento de los cambios terciarios de la transición alostérica debidas a las mutaciones que se realizaron.

La mutante L3I:R172A:K208E no es el mejor modelo para la formación de heterooligómeros ya que su sitio activo une con gran afinidad al sustrato a pesar del comportamiento cinético observado.

La mutante L3I:R172A:K208E y la enzima silvestre, en cromatografía de filtración molecular, se comportan como hexámeros después del tratamiento con urea 8 M. Sin embargo, en cromatografía de intercambio iónico se observa la presencia de más de una especie aun al estar en forma separada.

La determinación de la pérdida de actividad específica de la enzima silvestre con respecto al tiempo de incubación en urea 8 M, no permite conocer si en estas condiciones el hexámero se encuentra disociado o bien, desnaturalizado.

No fue posible detectar la generación de especies heterooligoméricas.

PERSPECTIVAS

Continuar la caracterización estructural de la mutante L3I:R172A:K208E para determinar si su comportamiento cinético se debe a la presencia de isoformas, a la preexistencia de heterogeneidad de los sitios activos o bien, a la modificación del estado de oligomerización de la enzima por la unión de ligante. Para ello se sugiere el uso de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, cristalización y rayos X, y espectroscopía de dicroísmo circular entre otras.

Encontrar las condiciones en las cuales se garantice la disociación del hexámero así como la reversibilidad del proceso, para generar monómeros plegados. Para lo cual se requiere un estudio formal de plegamiento utilizando distintos agentes caotrópicos, como detergentes, temperatura y cloruro de guanidinio, además de la urea usada en el presente trabajo.

En el caso de que la Glucosamina-6-fosfato desaminasa necesite de asistencia para su plegamiento (presencia de chaperonas), se podría probar la construcción de los genes silvestre y mutante en tándem, para la expresión sucesiva de éstos dentro de la célula bacteriana. De este modo se podría emplear la maquinaria de plegamiento de las células para favorecer la formación de especies heterooligoméricas *in vivo*.

El nanoencapsulamiento de la enzima L3I:R172A:K208E en geles de sílice podría ser una herramienta para descartar que el comportamiento bifásico cinético obedece al desacoplamiento de los cambios terciarios de los cambios a nivel cuaternario y no a la presencia de isoformas en solución.

REFERENCIAS

- Abbruzzetti S., Viappiani C., Bruno S, Bettati S., Bonaccio M. y Mozzarelli A. (2001). Functional characterization of heme proteins encapsulated in wet nanoporous silica gels. *J Nanosci Nanotechnol.* **1**(4):407-15.
- Acerenza, L. y Mizraji, E. (1997). Cooperativity: a unified view. *Biochim Biophys Acta* **1339**(1): 155-66.
- Altamirano, M.M., Libreros-Minotta, C.A., Lara-Lemus, R. y Calcagno, M. (1989). *Arch Biochem Biophys.* **269** (2):555-561.
- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 266-272.
- Batas, B. y Chaudhuri, J. B. (1996). Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng.* **50**(1):16-23.
- Batas, B., Jones, H. R. y Chaudhuri, J. B. (1997). Studies of the hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A.* **766** (1-2) 109-19.
- Blancas-Mejia, L.M. (2003). Caracterización de los estados de asociación en la desnaturalización de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura, FES Zaragoza, UNAM.
- Bronagh, M. H. y Engel P.C., (2001). Construction, separation and properties of hybrid hexamers of glutamate dehydrogenase in which five of the six subunits are contributed by the catalytically inert D165S. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1173-1180.
- Bustos, I. (2001). Estudio de la flexibilidad en el motivo $\alpha\text{A}/\beta\text{B}'/\text{helice5}/\alpha\text{A}/\beta\text{C}'$ (158-187) en la regulación de la glucosamina-6-fosfato de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM.
- Bustos-Jaimes, I. and Calcagno, M. (2001). Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**(2):156-60.
- Bustos-Jaimes, I., Sosa-Peinado, A., Rudino-Piñera, E., Horjales, E., Calcagno, M.L. (2002). On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase. *J. Mol. Biol.* **319**, 183-189. Errata en *J. Mol. Biol.* **322**, 903.

Bustos-Jaimes, I., Ramírez-Costa, M., De Anda-Aguilar, L., Hinojosa-Ocaña, P. y 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.

Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. y Suástegui R. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.

Chaudhuri, J.B., Batas B. and Guise A.D. (1996). Improving protein refolding yields by minimizing aggregation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**:495-505.

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

Cooper, A. y Dryden, D.T. (1984) Allostery without conformational change. A plausible model. *Eur Biophys J.* **11**(2):103-9.

Corbett, R. J. y Roche, R.S. (1984). Use of high-speed size-exclusion chromatography for the study of protein folding and stability. *Biochemistry* **23**(8):1888-94

Davis, J.S., y Gander, J.E. (1967). A reevaluation of the procedure of Roe for determination of fructose. *Anal. Biochem.* **19**, 72-79.

Dalziel, K. (1968) A kinetic interpretation of the allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. *FEBS Lett.* **1**, 346-348.

Drickamer, K. (1991). Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* **67**, 1029-1032.

Enghofer, E.; Kress, H.; Linzen, B.(1978) Glucosamine metabolism in *Drosophila* salivary glands. Separation of metabolites and some characteristics of three enzymes involved. *Biochim. Biophys. Acta* **544**, 245-261.

Fenton A.W and Reinhart G.D. (2003). Mechanism of substrate inhibition in *Escherichia coli* phosphofrutokinase. *Biochemistry.* **42**, 12676-12681

Fermini, B. y Nathan, R.D. (1991). Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology* **260**, H735-H743.

Friedman, S. y Benson, R.L. (1975) Glucosaminephosphate isomerase from house flies. *Methods Enzymol.* **41**:400-407.

Fushinobu S., Ohta T., y Matsuzawa H., (1998). Homotropic activation via the subunit interaction and allosteric symmetry revealed on analysis of hybrid enzymes of lactate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry.* **273**: 2971-2976

Glick, G. D., Toogood, P. L., Wiley, D.C., Skehel, J.J. and Knowles, J. r: (1991) Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. *Journal of biological Chemistry* **266**, 23660-23669.

Goyal A., Wang X., Engel P.C., (2001) Allosteric behaviour of 1:5 hybrids of mutant subunits of *Clostridium symbiosum* glutamate dehydrogenase differing in their amino acid specificity. *Biochem. J.* **360**: 651-656.

Gunasekaran K, Ma B, Nussinov R., (2004) Is allosteric an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins.* **57**(3):433-43. Review.

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

Inobe T., Kikushima K., Makio T., Arai M. y Kuwajima K. (2003) The allosteric transition of GroEL induced by metal fluoride-ADP complexes. *J Mol Biol.* **329**(1):121-34.

Jaffe, E. K. (2005) Morpheesins: a new structural paradigm for allosteric regulation. *Trends Biochem Sci.* **30** (9):490-7. Review.

Koshland, D.E., Némethy G. y Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* **5** (1), 365-385.

Lara-Lemus, R. (1991). Estudio cinetico y caracterizacion molecular de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de corteza renal de bovino. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.

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

Lau, F.T. y Fersht, A.R. (1989). Dissection of the effector-binding site and complementation studies of *Escherichia coli* phosphofructokinase using site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* **28**(17):6841-7.

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

Li, M. and Su, Z. (2003). Separation and identification of different refolding components. *J. Biotechnol.* **103**, 119-127.

Lindsley J. E. y Rutter J., (2006) Whence cometh the allosterome? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**(28):10533-5.

Lucumí-Moreno, A. y Calcagno M. (2005) On the functional role of Arg 172 in substrate binding and allosteric transition in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Arch. Biochem. Biophys.* **442**:41-48.

Mattevi, A., Rizzi, M. y Bolognesi, M. New structures of allosteric proteins revealing remarkable conformational changes. *Curr Opin Struct Biol.* **6**(6):824-9

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

Monod, J., Wyman J. y Changeux, J.P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **2**, 88-118.

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

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

Natarajan, K., y Datta A. (1993). Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamina-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9206-9214.

Neet, K. E. (1995) Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. *Methods Enzymol.* **249**:519-67. Review.

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

Ortigosa A.D., J.M. Kimmel, Reinhart G.D, (2004). Disentangling the Web of Allosteric Communication in a Homotetramer: Heterotropic Inhibition of Phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **43**, 577-586.

Parrington, J. Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K. y Lai, F.A.(1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* **379**, 364-368.

Plumbridge, J.A. (1989). Sequence of the *nagBACD* operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the *nag* regulon. *Mol. Microbiol.* **3**, 506-515.

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

Ricard, J., Meunier, J.C. y Buc, J. (1974). Regulatory behavior of monomeric enzymes.1. The mnemonical enzyme concept. *Eur J Biochem.* **49**(1):195-208.

Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J. y Söll, D. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* *nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the *N*-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* **62**, 197-207.

Rose, I.A. (1975). Mechanism of the aldose-ketose isomerase reactions. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **43**, 491-517.

Sakash J.B., Chan R.B., Tsuruta H. y Kantrowitz E.R., (2000). Three of the six possible intersubunit stabilizing interactions involving Glu-239 are sufficient for restoration of the homotropic and heterotropic properties of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *The Journal of Biological Chemistry.* **275**: 752-758.

Segel, I.H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. 1993, Wiley-Interscience, N.Y. , U.S.A.

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.

Scott W.N., Honzatko R.B.,y Fromm H.J. (2002). Hybrid tetramers of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase reveal multiple pathways of allosteric inhibition. *Journal of Biological Chemistry.* **277**: 15539-15545

González Andrade, M. (2006). Marcaje sitio específico de proteínas para estudiar cambios conformacionales en solución. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

Tsai C.J., del Sol A. y Nussinov R. Allostery: absence of a change in shape doesn't imply that allostery is not at play. *J Mol Biol.* **378**(1):1-11. Epub 2008 Feb 29. Review.

Uversky, V. N. (1993). Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins wich denature through the moltn globule. *Biochemistry* **32** (48): 13288-98.

Wyman J. and Gill S. J. Binding and linkage: functional chemistry of biological macromolecules. 1990. University Science Books. CA, U.S.A.

Yifrach, O. and Horovitz, A., (1995). Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry*