



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CONVERGENCIA EVOLUTIVA FUNCIONAL DE DOS  
FOSFOGLUCOSAMINA DESAMINASAS  
PERTENECIENTES A DIFERENTES FAMILIAS  
ESTRUCTURALES**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA :

**JORGE ANGEL MARCOS VIQUEZ**



DIRECTOR DE TESIS:

**M. EN C. LAURA ILIANA ALVAREZ AÑORVE**

**(2013)**



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.

## **Dedicatorias**

A mi familia en general, con mucho cariño.

A mi papá, que le ha apostado grandes esfuerzos y sacrificios a mi formación profesional.

A mi mamá, que incansablemente ha trabajado por procurarme en mis necesidades económicas, de salud y emocionales; por levantarme cada mañana y esperarme cada noche.

A mis hermanos, por el cariño. Espero aparecer en sus dedicatorias pronto.

A todos y cada uno de mis profesores, a la Facultad de Ciencias, a la UNAM.

A mi tutora de beca, M. en C. Beatriz Rodarte Murguía.

A los de las rocas, a los parrilleros, a todos mis amigos de la Facultad.

A Adriana, por el cuidado, la paciencia, la supervisión, la motivación, la dedicación, la amistad, la alegría, la locura, el arte y el cariño.

Al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, por ser el lugar en donde me he encontrado a mi mismo; porque aquí he conocido a los grandes profesores, a mis grandes amigos, a la gente que más admiro, que finalmente son los mismos.

A Mario amigo y tutor.

## **Agradecimientos**

Por la revisión de este trabajo y por sus valiosas observaciones a: la Dra. Luisa Alba, el Dr. Bernardo Pérez, la Dra. Alejandra Hernández, el M. en C. José Vilchis, el Dr. Lenin Dominguez, el Dr. Mario Calcagno y a mi tutora la M. en C. Laura Alvarez.

Por su valiosa colaboración en el avance del proyecto a: el Dr. Mario Calcagno, el Dr. Ismael Bustos, la Dra. Adela Rodriguez, el Dr. Lenin Dominguez, la Dra. Sandra Sanchez, el LIBB Sergio Zonszein, el LIBB Diego Alonzo, la Dra. Isabel Velazquez, el M. en C. Sergio Romero y el Pas. de Biol. Tomás Franco.

Por el apoyo económico para el proyecto, al convenio *CONACyT-ANR* 99857-Q.

Por la beca de licenciatura, al PRONABES.

Por la beca de ayudante de investigador, al SNI.

## Resumen

La GlcN6P desaminasa (EC 3.5.99.6), NagBI, es la enzima que convierte la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en fructosa 6-fosfato (Fru6P) y liberando un ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), por lo que juega un papel fundamental en el catabolismo de aminoazúcares. En algunas especies esta enzima es un punto de regulación metabólica ya que es activada alostéricamente por la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Las GlcN6P desaminasas de algunas bacterias y vertebrados terrestres en su mayoría son homohexámeros que tienen un plegamiento derivado del de Rossmann y sus secuencias están relacionadas. No obstante, en el 2006 se encontró que la GlcN6P desaminasa de la bacteria *Shewanella oneidensis* tiene un plegamiento diferente, conocido como SIS. A esta desaminasa análoga de NagBI se le dio el nombre de NagBII, siendo un caso interesante de homoplasia dado que la convergencia no solo es en la función sino también en la regulación alostérica (Yang y col. 2006).

En este trabajo se presenta la sobreexpresión y purificación de la enzima NagBII recombinante en *E. coli*, así como la caracterización de su cinética alostérica en ambos sentidos de la reacción. El estudio cinético nos muestra la detallada convergencia evolutiva funcional con NagBI en la activación alostérica y en la cooperatividad. Sin embargo, NagBII debería presentar una cooperatividad más limitada debido a su carácter dimérico. La paradoja que esto representa se ha explicado parcialmente mediante la existencia de un mecanismo exótico de regulación homotrópica, llamado cooperatividad cinética. Los estudios estructurales de NagBII confirman su carácter exclusivamente dimérico. Se construyó un modelo tridimensional por homología sobre el cuál se empleó acoplamiento molecular para encontrar los sitios de unión con sus ligandos. Se encontró un único sitio posible de unión para el sustrato, que presenta una gran similitud con el sitio activo de NagBI, y que actualmente se busca comprobar resolviendo la estructura por métodos cristalográficos en presencia de ligandos. El sitio alostérico se comprobó por mutagénesis dirigida, y por medidas directas de unión del ligando alostérico se sabe que hay un solo sitio por dímero.

## Abstract

The GlcN6P deaminase (EC 3.5.99.6, NagBI) catalyses the isomerisation-deamination of Glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) releasing Fructose 6-phosphate (Fru6P) and ammonium ( $\text{NH}_3^+$ ). This enzyme plays a key role in aminosugar metabolism and, in some species, is an important metabolic regulatory step, since it's allosterically activated by N-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P). NagBI's sequences are related and all the wild type studied so far are homohexamers where each monomer keep a Rossmann like fold. Nevertheless, in 2006 Yang and coworkers found that GlcN6P deaminase from *Shewanella oneidensis* present the SIS fold. This analogous deaminase of NagBI was given the name of NagBII, being an interesting case of homoplasy since the convergence is not only in function, but also in its allosteric regulation. (Yang *et al.* 2006).

In this work, we show the overexpression and purification of the NagBII from *S. oneidensis* recombinant in *E. coli*, as well as the characterization of its allosteric reversible kinetics. The kinetic analysis shows a detailed convergence in both the function and the allosteric regulation. NagBII is a dimer, unlike NagBI from *E. coli* which is an hexamer, however, both enzymes present a similar cooperativity. This paradoxical behavior can be explained by a exotic molecular mechanism called kinetic cooperativity.

We determined a structural model of NagBII from *S. oneidensis* using the crystallographic structure of a homologue protein. With this model, we applied molecular docking in order to find ligand-binding sites: we found just one putative site for the GlcN6P binding, it is structurally similar to the NagBI's active site; also, we found a unique site at each dimer for the GlcNAc6P binding, which was demonstrated by site-directed mutagenesis and direct binding measures.

*“Insistamos: la invención evolutiva de esos objetos físicos que son las proteínas alostéricas creó las condiciones que permitieron a la Naturaleza materializar esa clase de entidad abstracta que Ashby representó en su teoría de las máquinas adaptativas. En una escala elemental, los seres vivos están gobernados por la física de las macromoléculas, pero en su nivel de complejidad natural (esto es, en el nivel que condiciona las interacciones del organismo -considerado como unidad- con su natural medio ambiente) están gobernados por las leyes de los mecanismos adaptativos. Estas leyes sólo son parcialmente conocidas.”*

Eduardo Mizraji, *El Segundo Secreto de la Vida*.

Editorial Trice, Montevideo, 1999

## Abreviaturas

2VF5 Coordenadas en el PDB para la GFAT de *E. coli*

3HBA Coordenadas en el PDB para la posible fosfoazúcar isomerasa de *S. denitrificans*

$c$  Constante que determina la relación entre las afinidades del conformero R y el conformero T definida como:  $c = K_R / K_T$

BCA Ácido bicinconínico

BLAST Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico.

CD Dicroísmo circular

DLS Dispersión dinámica de luz

EDTA Acido Etilendiamintetracético

Fru6P D-fructosa-6-fosfato

GFAT Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa

GlcN Glucosamina

GlcNAc *N*-acetil-D-glucosamina

GlcNAc6P *N*-acetilglucosamina-6-fosfato

GlcN6P D-glucosamina 6-fosfato

GlcN6P desaminasa glucosamina-6-fosfato desaminasa

$h$  Coeficiente de Hill

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

IF Intensidad de fluorescencia

IPTG Isopropil-tio-  $\beta$ -galactopiranosido

$K_{0.5}$  Constante de disociación de un ligando. En curvas de saturación sigmoides, en las que equivale al valor de la abscisa en el punto de inflexión.

$k_{cat}$  Constante catalítica

kDa Kilodaltones

$K_m$  Constante de Michaelis-Menten

$K_R$  Constante de discociación del conformero R

$K_T$  Constante de discociación del conformero T

L Constante alostérica definida como  $L=T_0/R_0$

LB Luria-Bertani

LIST Transición lenta inducida por el ligando

LGT Transferencia lateral de genes

NAG Vía del catabolismo de aminoazúcares

NagBI Glucosamina-6-fosfato desaminasa con plegamiento derivado de Rossmann

NagBII Glucosamina-6-fosfato desaminasa con plegamiento SIS

NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NH<sub>4</sub> Ion amonio

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Bicarbonato de amonio

NISE Enzimas isofuncionales no-homólogas

MWC modelo alosterico concertado de Monod, Wyman y Changeux

PEG Polietilenglicol

PDB Banco de Datos de Proteínas

PTS Sistema de fosfotransferasas

R Confórmero de la proteína de mayor afinidad por su ligando

SAD Dispersión anómala a una longitud de onda

SIS Tipo de plegamiento común en azúcar isomerasas

T Confórmero de la proteína de menor afinidad por su ligando

Tris Tris(hidroximetil) aminometano

V<sub>max</sub> Velocidad máxima

## Indice

Resumen	3
Abstract	4
Abreviaturas	6
Introducción	10
La GlcN6P desaminasa de <i>Escherichia coli</i>	12
Metabolismo de aminoazúcares en <i>E.coli</i>	15
<i>Shewanella oneidensis</i>	17
Catabolismo de aminoazúcares en <i>S. oneidensis</i>	18
Una nueva GlcN6P desaminasa: NagBII de <i>S. oneidensis</i>	19
Alostería	20
Efectos homotrópicos	21
Cooperatividad cinética.	23
Efectos heterotrópicos	24
Objetivos	26
Justificación	26
Métodos	27
Sobreexpresión	27
Purificación	27
Estado oligomérico	28
Modelo estructural	29
Ensayos cinéticos	29
Transiciones moleculares	30
Resultados y discusión	31
Sobreexpresión	31
Purificación	32
Estabilidad y almacenamiento	36
Estado oligomérico	36
Modelo estructural	39
Sitio activo	43

Sitio alostérico	45
Mutante K59A	46
Mutante k218A	48
Transición alostérica	50
Resultados cinéticos	55
Cinética en sentido reverso	57
La paradoja de la cooperatividad	59
Convergencia evolutiva	64
Conclusiones	67
Perspectivas	68
Bibliografía	70

## Introducción

Las enzimas son, en su mayoría, proteínas extraordinariamente específicas que catalizan la enorme variedad de reacciones que ocurren en la célula, permitiendo que los procesos biológicos se realicen en el intervalo de tiempo adecuado (Copeland, 2000). Las enzimas que en diferentes especies catalizan la misma reacción bioquímica con afinidades por el sustrato comparables usualmente son transcritas por genes homólogos (ortólogos). En ellas la similitud funcional se acompaña típicamente de una similitud estructural (Galperin y col. 1998). No obstante, existen reportados algunos casos de proteínas que tienen la misma función pero no presentan similitud significativa en su secuencia de aminoácidos, por lo que se plantea que carecen de un origen en común y se les ha referido como proteínas análogas o isofuncionales no-homólogas (NISE). Hasta el 2010 se han reportado 105 de estos casos (Omelchenko y col. 2010), 34 de ellos corresponden a proteínas que además de no coincidir en su secuencia tampoco tienen relación estructural, lo que demuestra que son auténticos casos de homoplasia, en particular de convergencia evolutiva funcional.

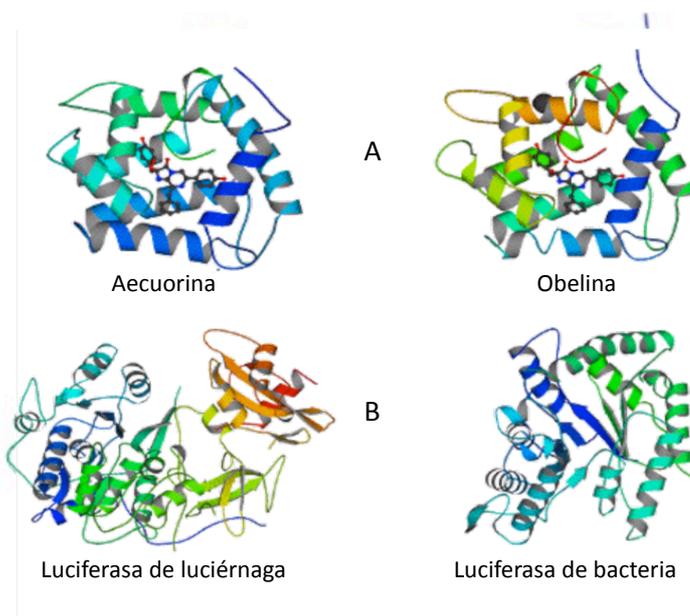


Figura 1. Ejemplos de proteínas no homólogas isofuncionales: A) Aequorina (Head y col. 2000) y obelina (Liu y col. 2000) son proteínas que difieren en secuencia pero presentan semejanza estructural; B) Luciferasa de luciérnaga (Conti y col. 1996) y bacteriana (Fisher y col. 1996) son proteínas que difieren en secuencia y estructura.

La GlcN6P desaminasa (EC. 3.5.99.6, NagBI, 2-amino-2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato aminohidrolasa–cetol isomerasa) es una enzima alostérica clave en la regulación del metabolismo de aminoazúcares por lo que está conservada en gran parte de los organismos. Convierte la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en fructosa 6-fosfato (Fru6P) y liberando un ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y es alostéricamente activada por la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P).

La enzima NagBI ha sido bien estudiada en bacterias (Midelfort C. y Rose I., 1997; Plumbridge J.A. y col. 1993; Calcagno M. y col. 1984; Vincent y col. 2005) y en algunos eucariontes como insectos y mamíferos (Benson R.L. y Friedman S, 1970; Enghofer E. y Kress H. 1980; Leloir L. F. y Cardini C.E. 1956; Pattabiraman T. N. y col. 19 ; Schevchenko V. Y col. 1998; Arreola R. y col. 2003 y Álvarez-Añorve y col. 2011). En estos organismos NagBI presenta un plegamiento derivado del de Rossmann y sus secuencias están relacionadas. Sin embargo en el 2005 Takeshi Takana y colaboradores reportan una GlcN6P desaminasa con plegamiento conocido como SIS (*Sugar Isomerase*) en la arquea *Thermococcus kodakaraensis*; y en el 2006 Yang y colaboradores, en un estudio de genómica comparativa en proteobacterias y del género *Shewanella*, reportan en *Shewanella oneidensis* una GlcN6P desaminasa con este plegamiento que además tiene activación alostérica por la GlcNAc6P. A este tipo de GlcN6P desaminasas, isofuncionales no homólogas de las GlcN6P desaminasas tipo NagBI se les dio el nombre de NagBII.

La convergencia evolutiva funcional entre NagBI y NagBII no solo es en la función sino también en la regulación alostérica. Estas enzimas presentan una detallada similitud en la activación alostérica y en la cooperatividad, sin embargo los mecanismos alostéricos son aparentemente distintos. Este caso excepcional de homoplasia puede ser debido a las estrictas presiones de selección de estas enzimas alostéricas dadas por su función en la regulación metabólica.

Las enzimas alostéricas, en general, tienen un papel indispensable en la regulación de las vías metabólicas, ya que pueden responder a sutiles variaciones en la concentración de algún metabolito con cambios en la afinidad por sus ligandos. Este cambio en la afinidad va acompañado de una transición conformacional lo que ha hecho a las enzimas alostéricas un modelo de estudio interesante no solo desde el punto de vista metabólico, sino también en la cinética enzimática y en la biología estructural.

### La GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli*

La GlcN6P desaminasa (NagBI) de *E. coli* es la desaminasa más estudiada. Su estructura, mecanismo catalítico y cinética alostérica han sido ampliamente analizados mediante química de proteínas, cinética enzimática, espectrometría y métodos cristalográficos (Calcagno y col. 1984; Altamirano y col. 1987,1991,1994 y 1995; Horjales y col. 1999; Oliva y col. 1995; Montero Morán y col. 1998 y 2001; Lara González y col. 2000 y 2001; Bustos-Jaimes y col. 2001, 2002 y 2005; Cisneros A. y col. 2004; Sosa-Peinado A. y col. 2002 y 2005; y Rudiño-Piñera, 2002).

La enzima NagBI es la única enzima alostérica en el catabolismo de los aminoazúcares en *E. coli* por lo que juega un papel regulatorio muy importante (Plumbridge y col. 1992). Cataliza la desaminación e isomerización reversible de la D-glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en D-fructosa 6-fosfato (Fru6P) y un ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Fig. 2), y es alostéricamente activada por la N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P).

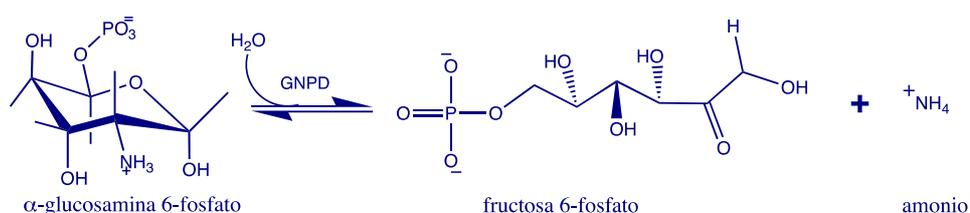


Figura 2 . Reacción catalizada por NagB de *E. coli*. Modificada de Diego Alonzo, 2012.

El mecanismo de reacción inicia con la apertura del anillo piranósico de la GlcN6P, paso que es llevado a cabo con la participación de la His143 que cede un hidrógeno al O en el C1 para romper el enlace hemiacetal; La His143 se estabiliza mediante interacciones con los grupos carboxilo del Glu148 y el Asp141 (Montero-Morán, 2001). El Asp72 participa en la enolización que procede a través de la formación de una *cis*-enolamina y su imina tautomérica. El grupo imino reacciona con una molécula de agua dando una carbonilamina inestable que finalmente se descompone en la forma carbonílica de la Fru6P y NH<sub>3</sub> (Montero-Morán y col. 1998) (Fig. 3).

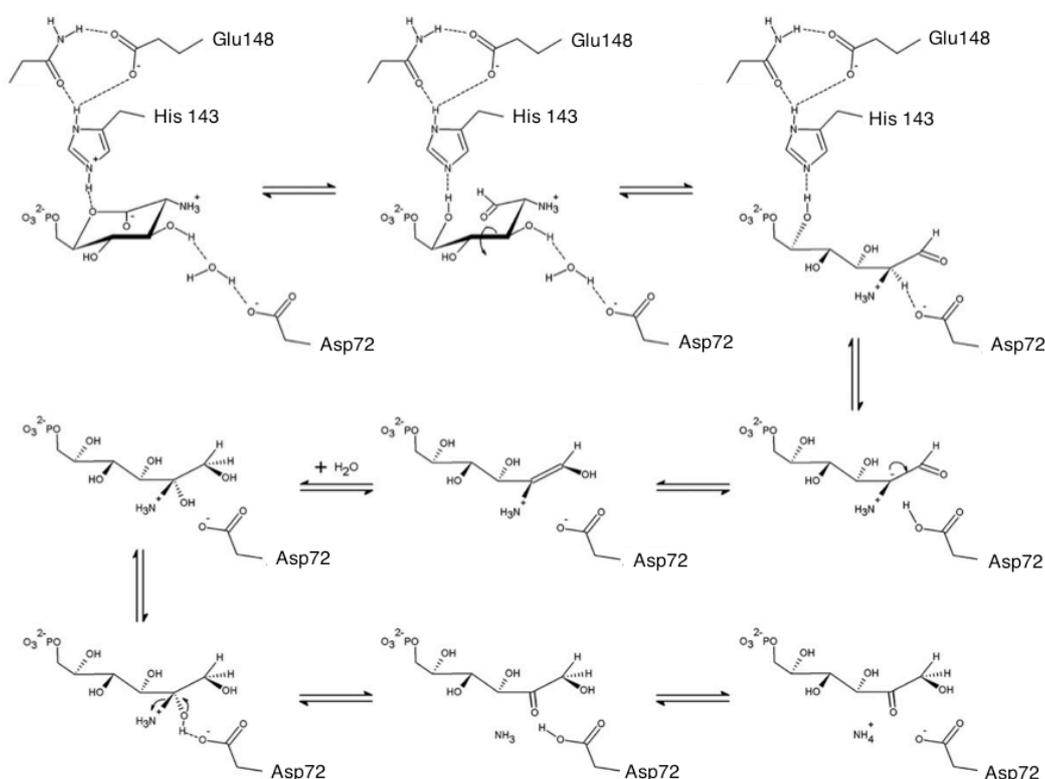


Figura 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por NagB. (Modificado de Liu C. et al., 2008).

NagBI de *E. coli* es un sistema alostérico que se puede explicar con el modelo alostérico de Monod Wyman y Changeux (Calcagno y col. 1984). Presenta cooperatividad homotrópica positiva con respecto a la concentración de la GlcN6P, lo que se puede ver en la forma sigmoide de las curvas de velocidad inicial de la catalisis. En presencia de GlcNAc6P presenta activación heterotrópica que se manifiesta como un aumento en la

afinidad por la GlcN6P (Calcagno y col. 1984). Este sistema es de tipo *K* (Fig. 14) ya que la  $V_{max}$  se mantiene constante mientras que la afinidad de la enzima por el sustrato aumenta conforme la concentración de GlcNAc6P aumenta (Fig. 4).

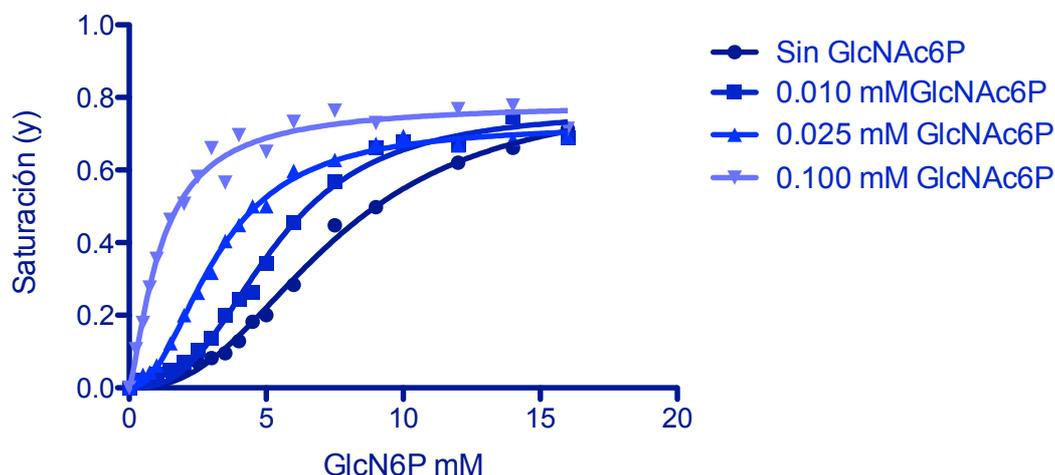


Figura 4. Cinética de la reacción de la NagB de *E. coli*. Es un sistema alostérico tipo *K* ya que la afinidad por la GlcN6P aumenta a medida que aumenta la concentración de GlcNAc6P, mientras que la  $V_{max}$  no cambia. Modificado de Calcagno y col. 1984.

La enzima NagB de *E. coli* presenta un plegamiento derivado del de Rossmann y su unidad biológica es un homohexámero formado por seis subunidades idénticas de 266 aminoácidos con un peso de 29.7 kDa. Se puede considerar como un dímero de trímeros, cada dímero desde el eje cristalográfico de orden tres; o como un trímero de dímeros desde el eje de orden dos (Fig. 5), teniendo una simetría interna 32 (Oliva y col. 1995). La enzima cuenta con 6 sitios catalíticos, uno en cada subunidad; y 6 alostéricos que se forman en las interfaces entre monómeros contiguos en el eje de orden tres.

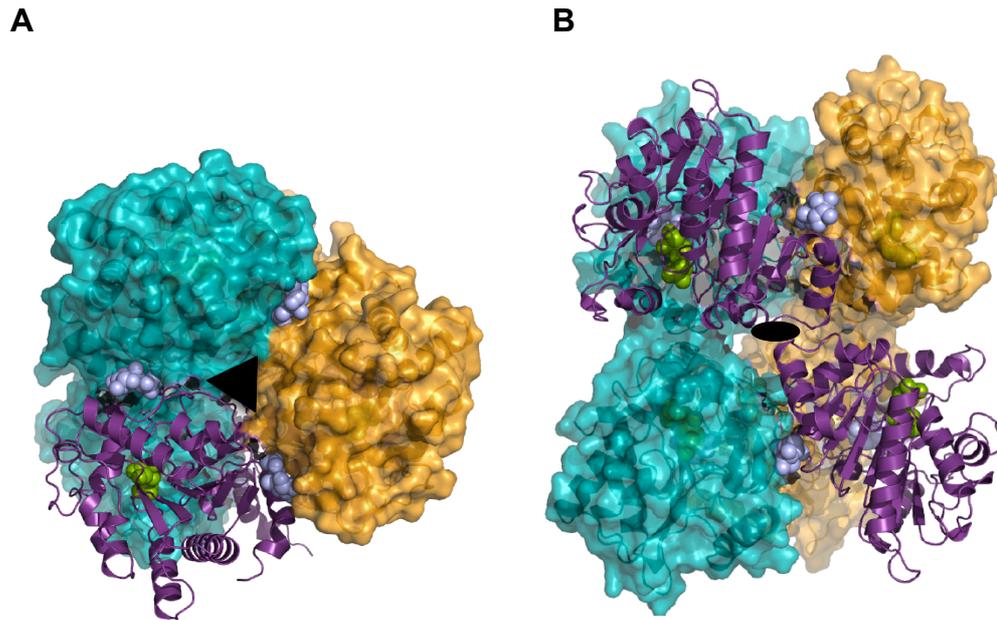


Figura 5. NagBI de *E. coli*. (A) Vista de la estructura desde el eje de simetría de orden tres. (B) Vista de la estructura desde el eje de simetría de orden dos, se pueden ver tres dímeros marcados en colores morado, amarillo y turquesa. Las esferas azules representan los ligandos del sitio alostérico (GlcNAc6P) y las esferas verdes representan a los ligandos del sitio activo (GlcN6P). (Tomado de Diego Alonzo, 2011).

### Metabolismo de aminoazúcares en *E.coli*

*E. coli* es una especie no quitinolítica ya que no es una bacteria ambiental, se le encuentra en el intestino de organismos homeotermos en donde encuentra su fuente de aminoazúcares para el catabolismo o para la síntesis de la capa externa de los lipopolisacáridos. Las enzimas que participan en la parte catabólica (vía NAG) son codificadas por el sistema de operones divergentes *nagE-nagBACD*, mientras que los genes *glm* son los que codifican para las enzimas que participan en la parte biosintética (Fig. 6).

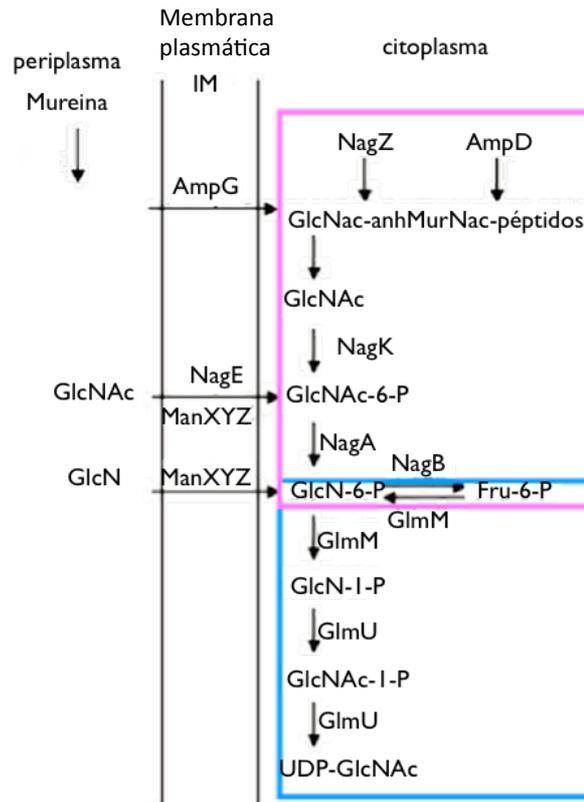


Figura 6. Metabolismo de aminoazúcares en *E. coli*. En rosa se muestra la vía NAG (genes *nag*) y en azul la vía biosintética (genes *glm*) (Modificado de Plumbridge y Vimr, 1999).

Los operones divergentes *nagE-nagBACD* están bajo el control del regulón *NagC* (*nag-glm*) (Fig. 7). Los genes *nagB* y *nagA* codifican para la GlcN6P desaminasa y la GlcNAc6P desacetilasa respectivamente. El gen *nagC* codifica para una proteína tipo ROK (*Repressor, ORF, Kinase*) que es represora del operón *nag*. El gen *nagE* es un componente del sistema de fosfotransferasa (PTS) que permite importar la GlcNAc y el gen *nagD* codifica para una fosfatasa de la que no se tiene clara su función (Fig. 7) (Plumbridge J. A., 1991 y 1992).

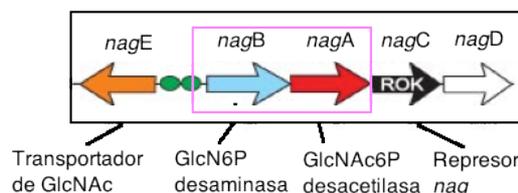


Figura 7. Regulón *NagC* en *E. coli*. En rosa se encierran los genes que participan en la vía NAG (Modificado de Plumbridge J. A., 1992).

El catabolismo de aminoazúcares en *E. coli* tiene entonces dos mecanismos de regulación: el primero a nivel genético dado por el operón *Nag* al cual se le une la proteína represora NagC impidiendo la síntesis de las enzimas codificadas por el operón *Nag*; en presencia de GlcNAc6P, NagC se separa del operador dando lugar a la síntesis. El segundo está dado por la enzima NagB, que adquiere un estado de alta afinidad por su sustrato, la GlcN6P, a altas concentraciones de ésta o en presencia de GlcNAc6P. En ambos casos la GlcNAc6P promueve la eficiencia del catabolismo de aminoazúcares a tal grado que *E. coli* puede crecer en GlcNAc con velocidades comparables a su crecimiento en glucosa (Álvarez-Añorve y col. 2005).

### ***Shewanella oneidensis***

El género *Shewanella*, descrito desde 1931, incluye un número de especies y cepas caracterizadas por ser proteobacterias Gram negativas. Su estudio ha sido relevante desde entonces en microbiología ambiental debido a que cuenta con una gran versatilidad respiratoria, la cual le confiere un papel importante en el ciclo del carbono orgánico, así como en la geobiología y ecología de ambientes sedimentarios. Recientemente ha sido objeto de interés en la biorremediación (Fredrickson y col. 2008) y en la producción de combustibles (Hau y Gralnick, 2007).

*Shewanella oneidensis* (*S. oneidensis*), especie descrita recientemente, fue aislada del lago Oneida, Nueva York, U.S.A., siendo de las pocas especies del género que habitan en agua dulce (Kasthuri y col. 1999), aunque se cree que divergió hace menos de 150 años del hábitat marino (Hau y Gralnick, 2007). Esta especie participa en el eficiente aprovechamiento de la quitina en ambientes acuáticos, introduciéndola a la glucólisis como Fru6P por medio de la vía NAG.

## Catabolismo de aminoazúcares en *S. oneidensis*

En el 2006 Yang y colaboradores, en un estudio de genómica comparativa describen la regulación genética del metabolismo de aminoazúcares en 11 especies del género *Shewanella*. En la cepa MR-1 de *S. oneidensis* se encontró una nueva variante funcional del catabolismo de aminoazúcares a la que se le dio el nombre de regulón *NagR*. El regulón *NagC* de *E. coli* y el regulón *NagR* de *S. oneidensis* solo tienen en común el gen *nagA* que codifica para la GlcNAc desacetilasa (*NagA*).

El regulón *NagR* fue identificado junto con los genes *nag*; tiene un regulador transcripcional tipo *Lacl* y se le asocian genes involucrados en la degradación de la quitina (*chiA*, *cbp*, *cdxA* y *hex*), así como algunos genes nuevos implicados en el consumo de la GlcNAc (*nagX* y *nagP*) (Fig. 8).

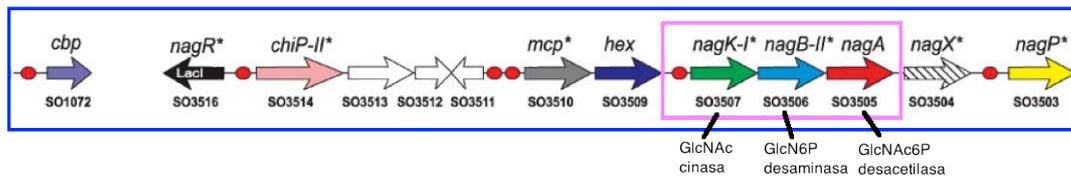


Figura 8. Regulón *NagR* en *S. oneidensis*. En rosa se encierran los genes que participan en la vía NAG (Modificado de Yang y col. 2006).

La vía NAG es conservada en gran parte de los organismos independientemente de su fuente de aminoazúcares. Las bacterias *S. oneidensis* una especie quitinolítica, y *E. coli* una especie comensal, son un ejemplo de ello. A pesar de que difieren en la regulación génica de la vía NAG y que algunas de sus enzimas *nag* no son ortólogas, ambas especies cuentan con la maquinaria molecular que permite la obtención de Fru6P, un intermediario metabólico común, a partir de GlcNAc o GlcN (Fig. 9).

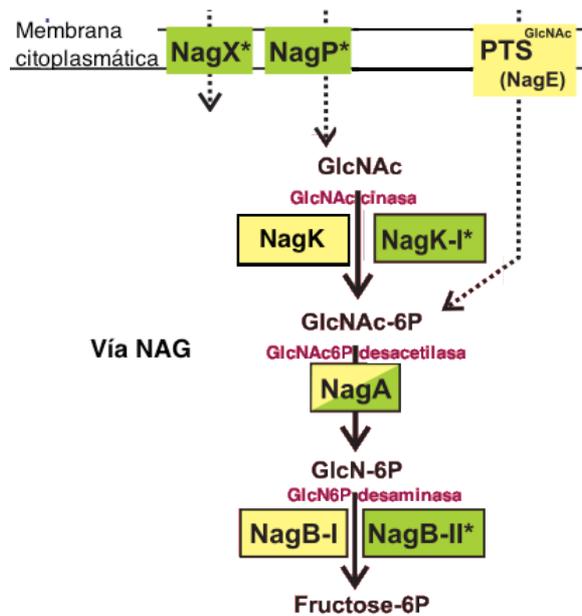


Figura 9. Comparación entre la vía NAG en *E. coli* y *S. oneidensis*. En amarillo se muestran las enzimas de la vía NAG en *E. coli* y en verde las de *S. oneidensis*. Se puede ver que solo comparten la GlcNAc6P desacetilasa (NagA). El sistema de transporte a través de la membrana es distinto; y las enzimas GlcNAc cinasa (NagK) y GlcN6P desaminasa (NagB) no son ortólogos (Modificado de Yang y col. 2006).

### Una nueva GlcN6P desaminasa: NagBII de *S. oneidensis*

El gen NagBII de *S. oneidensis* se encontró en un sitio equivalente al gen *nagB* en *E. coli* y está bajo la regulación del regulón *NagR* al igual que los demás genes *nag*, sin embargo no es ortólogo y pertenece a otra familia estructural conocida como SIS. Se comprobó que efectivamente su producto funciona como GlcN6P desaminasa y que también presenta una activación tipo *K* con la GlcNAc6P. A esta enzima isofuncional no homóloga de NagB se le dió el nombre de NagBII (Yang y col. 2006).

La convergencia evolutiva funcional entre NagBI y NagBII es muy interesante ya que además de catalizar la misma reacción con afinidades por el sustrato comparables, ambas enzimas están reguladas alostéricamente por la GlcNAc6P. Este caso excepcional de homoplasia puede ser debido a las estrictas presiones de selección que actúan fijando la función regulatoria de las enzimas alostéricas en el metabolismo.

## **Alostería**

Novick y Szilard (1950) expusieron que las enzimas que catalizan la primera etapa de una vía metabólica a menudo pueden ser inhibidas por el producto final de la misma, fenómeno conocido como inhibición por retroalimentación. Tomando en cuenta que el producto final de la vía y el sustrato de la enzima inhibida son de forma distinta (alo-estéricos), Monod, Jacob y Changeux le llamaron efector alostérico al inhibidor e introducen el término de alostería (Monod y col. 1963) que a 50 años se mantiene vigente.

La alostería no solo explicaba la inhibición por retroalimentación sino también la acción hormonal y la función del represor del operón *lac* recién descrito por Monod. Las ventajas adaptativas de la alostería ejemplifican el concepto de teleonomía; para Monod las proteínas alostéricas serían la conexión entre el inmutable mundo de la fisicoquímica y el creativo mundo evolutivo de los seres vivos, por lo cual llamó a la alostería el segundo secreto de la vida (Mizraji, 1999). Monod publicó el primer modelo alostérico junto con Changeux y Wyman en 1965, al que se le refiere como modelo MWC.

La alostería fue definida como el mecanismo de regulación de una proteína que permite cambios en la afinidad por un ligando en presencia de otro. Si ambos ligandos son iso-estéricos (de la misma forma) y se unen en sitios equivalentes en una proteína oligomérica, el efecto es homotrópico. Si ambos ligandos son alo-estéricos (de forma distinta) y se unen a sitios no equivalentes de la proteína el efecto se denomina heterotrópico. Los sitios equivalentes y no equivalentes entre subunidades están termodinámicamente acoplados, y los cambios de afinidad van acompañados de una transición molecular (Monod y col.1965).

## Efectos homotrópicos

La asistencia mutua de ligandos idénticos para unirse a sitios equivalentes en una proteína oligomérica se llama cooperatividad homotrópica (Wyman y Gill, 1990). Antes del modelo de MWC ya se habían propuesto ecuaciones que describían el carácter cooperativo de las curvas de saturación de la hemoglobina. La ecuación de Hill (Ec.1), propuesta por A. V. Hill en 1910, fue una de las primeras descripciones empíricas de la unión cooperativa del oxígeno a esta proteína.

La ecuación de Hill permite obtener un valor de la  $V_{\max}$  y de una constante de afinidad por un ligando llamada  $K_{0.5}$ , la cual no es equivalente a la  $K_m$  ya que las ecuaciones de las que se obtienen no son equivalentes. La  $K_{0.5}$  además tiene la desventaja de que se da en unidades de sustrato elevadas a un exponente, llamado coeficiente de Hill ( $h$ ), y son de difícil interpretación física.

(1)

$$v = \frac{VA^h}{K_{0.5}^h + A^h}$$

El coeficiente  $h$  sin embargo, es un parámetro experimental ampliamente utilizado para caracterizar la unión cooperativa entre una macromolécula y un ligando (Wyman y Gill, 1990). La razón es que  $h$  es un índice de cooperatividad, pues cuando  $h=1$  la ecuación de Hill (Ec. 1) describe curvas hiperbólicas ya que se convierte en la ecuación de Michaelis-Menten, es decir que no hay cooperatividad, cuando  $h>1$  señala cooperatividad positiva y cuando  $h<1$  señala cooperatividad negativa.

La Ec. 1 puede ser reordenada como:

$$\frac{y}{1-y} = \frac{v}{V-v} = \frac{A^h}{K_{0.5}^h}$$

Entonces  $y/(1-y)$  puede ser considerado como una medida de  $[EA]/[E]$ . Usando logaritmos tenemos:  $\log [y/(1-y)] = h \log A - h \log K_{0.5}$ ; y graficando  $\log[y/(1-y)]$  contra  $\log A$  se tiene una curva sigmoide que tiende a la linealidad entre el 10% y el 90% de la saturación; la pendiente de esta recta es el

coeficiente  $h$ . Este método gráfico para obtener el coeficiente  $h$  es llamado el gráfico de Hill (Fig. 10).

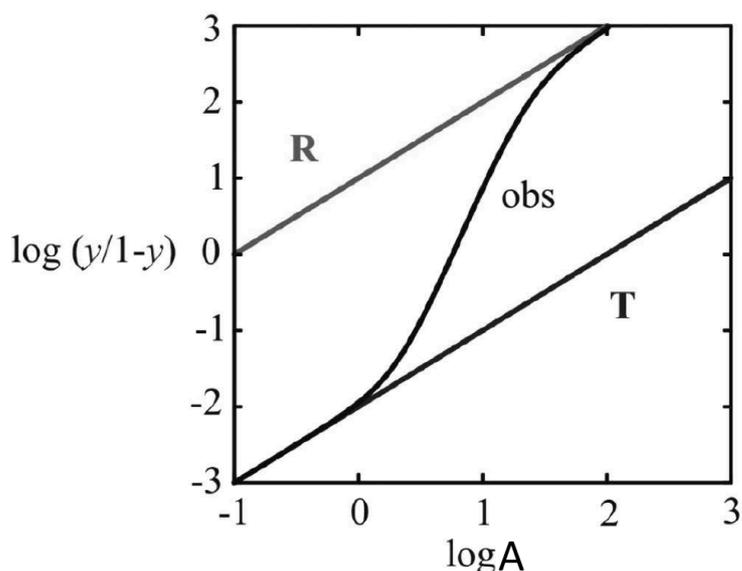


Figura 10. Gráfico de Hill (Tomado de Eaton y col. 2007).

Tanto en valores menores al 10% como mayores al 90% de la saturación el comportamiento de la curva es asintótico y  $h$  tiende a 1. Estas asintotas representan los límites de  $[A] \rightarrow 0$  y  $[A] \rightarrow \infty$  respectivamente. De esta manera el gráfico de Hill explora también la diferencia en el potencial químico entre la proteína in ligandos ( $[A] \rightarrow 0$ ) y la proteína saturada ( $[A] \rightarrow \infty$ ).

Wyman deduce que las asintotas del gráfico de Hill corresponden a la unión del ligando en el primero y en el último sitio de la proteína, y que la extrapolación al eje de las abscisas permite calcular las constantes aparentes  $K_1$  y  $K_n$  respectivamente. Si  $K_n$  limita la curva de saturación del gráfico de Hill y a su vez está definida por el número de sitios ( $n$ ), existe una correlación directa del coeficiente  $h$  y el número  $n$ , esta es:  $h \leq n$  (Wyman y Gill, 1990). El número  $n$  es el factor que determina la amplificación de la sensibilidad al sustrato (Monod y col. 1965).

## Cooperatividad cinética.

Las proteínas alostéricas, según los modelos basados en postulados termodinámicos, deben ser oligoméricas. No obstante, algunas proteínas monoméricas presentan curvas de saturación sigmoideas, en ellas se ha demostrado que la cooperatividad homotrópica no depende del equilibrio entre estados de distinta afinidad, sino que se produce en intervalos de tiempo en los que no se ha llegado al equilibrio (Cornish-Bowden, 2002). Estos intervalos de tiempo, sin embargo, resultan fisiológicamente relevantes. A este tipo de cooperatividad se le ha referido como cooperatividad cinética, y es poco común en la naturaleza.

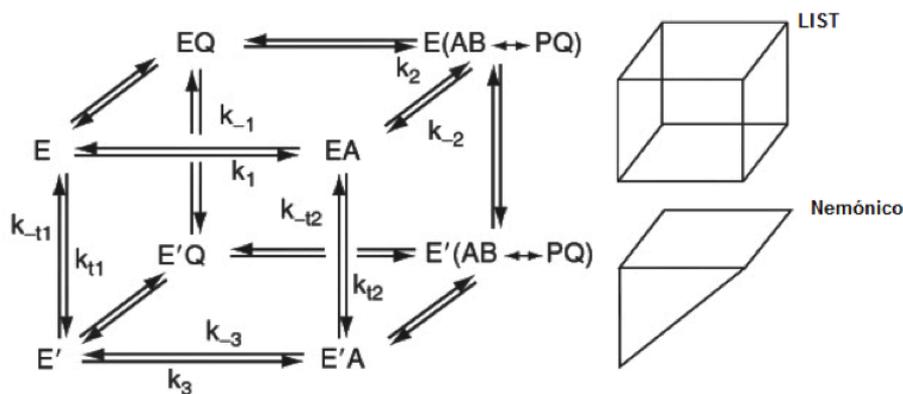


Figura 11. Modelos de cooperatividad cinética para la Glucocinasa. El cubo completo es el modelo LIST y el modelo nemónico es la mitad del cubo. E y E' son los dos estados de la enzima con distinta afinidad por la glucosa; A es glucosa; B es MgATP; P es MgADP y Q es glucosa 6-fosfato;  $k_{t1}$  y  $k_{t2}$  son los pasos lentos. Tomado de Neet K., 2009.

El caso mejor estudiado es el de la Hexocinasa IV o Glucocinasa, que cataliza la reacción:  $\text{glucosa} + \text{MgATP} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + \text{MgADP}$ . Su carácter cooperativo ( $h=1.5$ ) se ha explicado principalmente con dos modelos, ambos incorporan cambios conformacionales lentos: el modelo mnemónico, en el cual la enzima tiene una única conformación funcional con la capacidad de mantener (*recordar*) su estado activo después de la catálisis; y el modelo de Transición Lenta Inducida por el Ligando (LIST), en el cual son posibles dos conformaciones funcionales con distinta tasa de reacción (Fig.11) (Purich, 1995).

Evidencias estructurales indican que el mecanismo es ordenado: la unión de su sustrato, la D-glucosa, en un sitio específico de la proteína conduce a una transición conformacional lenta en la proteína. El mecanismo LIST es consistente con efectos de inhibidores de compuestos como la GlcNAc y con la cooperatividad negativa con glucosa y MgATP; sin embargo, no se ha logrado definir claramente el mecanismo de la Glucocinasa (Bourbonais F. y col. 2012; Larion M. y col. 2012) y ambos modelos son capaces de explicar adecuadamente su comportamiento (Cornish-Bowden, 2002).

### **Efectos heterotrópicos**

El efecto heterotrópico se produce en una proteína cuando la afinidad de un ligando en un sitio se altera por la unión de un ligando distinto (ligando alostérico) en un sitio no equivalente (sitio alostérico). En cualquier caso, los sitios están termodinámicamente acoplados tanto en la misma subunidad como en las demás subunidades del oligómero. Del mismo modo que los efectos homotrópicos, los efectos heterotrópicos no afectan directamente la reactividad de la proteína, si no que desplazan el equilibrio entre estados de distinta afinidad por el ligando.

Los efectos homotrópicos y los heterotrópicos están asociados, pero mientras que los efectos homotrópicos siempre son cooperativos, los efectos heterotrópicos pueden además ser activadores o inhibidores. En los efectos heterotrópicos el ligando alostérico tiene su propio sitio de unión en la proteína, es decir que los ligandos alostérico y no alostérico no son mutuamente excluyentes.

Según el modelo de MWC, si el efector alostérico es inhibidor se une preferentemente a la forma de la enzima que presenta baja afinidad por su ligando enriqueciendo su población; y si el efector es un activador se une preferentemente a la forma de la enzima que presenta alta afinidad por su ligando con el mismo efecto. En ambos casos el efector alostérico afecta el equilibrio entre las formas de la enzima con distinta afinidad por su ligando (Fig. 12).

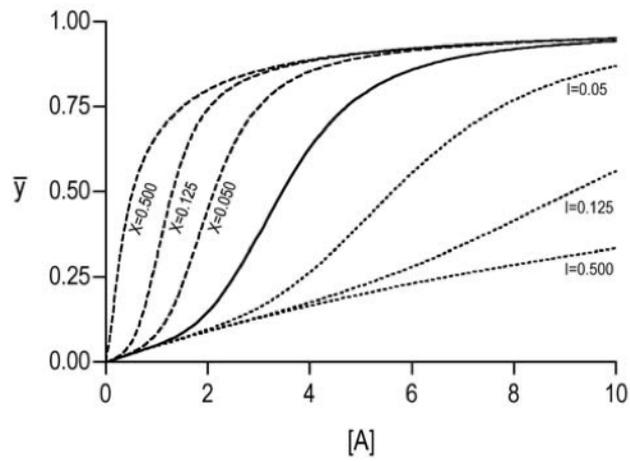


Figura 12. Efectos heterotrópicos de un activador (X) y un inhibidor (I) en un sistema alostérico tipo K. La línea continua corresponde a la curva de saturación en ausencia de X o I. (Tomada de Bustos-Jaimes y col. 2008).

## **Objetivos generales:**

1. Caracterización estructural y cinética de NagBII de *Shewanella oneidensis*.
2. Describir la convergencia evolutiva funcional entre NagB de *E. coli* y NagBII de *S. oneidensis*.

## **Objetivos particulares:**

1. Obtener la enzima NagBII de un sistema de sobreexpresión bacteriano
2. Purificar a la enzima NagBII
3. Caracterizar el estado oligomérico de NagBII
4. Construir un modelo estructural de NagBII
5. Encontrar el sitio activo y alostérico de NagBII
6. Obtener los parámetros cinéticos y caracterizar la cinética alostérica de NagBII

## **Justificación**

Las propiedades funcionales compartidas entre NagB y NagBII las hacen un caso de convergencia evolutiva muy particular debido a que además de catalizar la misma reacción, con secuencias y plegamientos diferentes, ambas enzimas tienen una activación alostérica semejante con transiciones moleculares probablemente muy diferentes, dadas las diferencias estructurales entre ambas proteínas.

Como parte del proyecto GRONAG, en el que participa este laboratorio, en colaboración con el Inst. de Biologie Physico-Chimique, de Paris, Francia, se ha propuesto el estudio integral de la actividad y activación alostérica de la NagBII de *Shewanella oneidensis*, así como su caracterización estructural y propiedades alostéricas, con la finalidad de caracterizar este caso de convergencia evolutiva funcional y su relevancia en la regulación metabólica.

## **Métodos**

### **Sobreexpresión**

El gen nagBII de *S. oneidensis* fue clonado en el vector de expresión pJES 307. Este trabajo fue realizado en el Inst. de Biologie Physico-Chimique, de Paris, Francia, por la Dra. J. Plumbridge con quien se trabaja en colaboración.

Con el fin de encontrar la mejor sobreexpresión de la enzima NagBII se probaron cuatro diferentes cepas de sobreexpresión de *E. coli*, derivadas de BL21, que carecen del gen nagB: BL21 Rosseta  $\Delta$ nag, BL21 star  $\Delta$ nag pCodon(+), BL21 star  $\Delta$ nag pRARE y 590  $\Delta$ nag. De éstas, la cepa 590  $\Delta$ nag es de expresión constitutiva; en las demás el gen está bajo el control del gen *lacI* por lo que son inducibles con IPTG (isopropil-tio-  $\beta$ -galactopiranosido) el cual se añadió al medio de cultivo (LB) en diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 0.8 y 1 mM) y empleando diferentes tiempos de inducción (2, 2.5, 3, 3.5, 5, 7 horas). Las cepas fueron donadas por la Dra. J. Plumbridge.

### **Purificación**

Para llevar a cabo el procedimiento de purificación los cultivos se crecieron a 37°C por 3 hrs; la biomasa se colectó por centrifugación y las células se rompieron por sonicación, separándose los residuos celulares. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad y se intentó precipitar selectivamente la proteína con sulfato de amonio. Se intentó purificar la proteína empleando una columna de 6-aminohecanoil glucosamina 6-P agarosa, una resina de cromatografía de afinidad por el sitio alostérico para la GlcN6P desaminasa sintetizada como describen Montero-Morán y col. (1998).

Se intentó también usar una resina de afinidad por el sitio activo de celulosa fosfato P11, donada por la Dra. J. Plumbridge. Finalmente se optó por realizar cromatografía de intercambio aniónico utilizando la columna *Source15Q* equilibrada con Tris 50 mM a pH 7.5 y empleando un gradiente de elución de 0 a 1 M de NaCl en 1.5 horas a un flujo controlado de 1ml/min. Posteriormente se usó cromatografía de interacción hidrofóbica con la columna *Phenyl Sepharose* equilibrada con Tris 50 mM a pH 7.5 en un gradiente de 0.5 a 0 M de NaCl en 1 hora a un flujo de 1.5 ml/min.

La elección de las fracciones se llevó a cabo empleando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En cada paso de purificación se midió la actividad específica a una concentración de proteína de 200 µg/ml medida con ácido bicinconínico (BCA). La proteína pura se almacenó en glicerol al 50% a -20°C.

### **Estado oligomérico**

Se calculó una absortividad molar experimental de acuerdo a Edelhoch (1967). Se determinó su estado oligomérico por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna *Superdex 75* equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y 0.2 M de NaCl a un flujo de 0.5 ml/min. Con este fin se usaron también geles de gradiente de poro (de 20 a 4% de acrilamida) en condiciones nativas (Calcagno y col. 1984). Se empleó entrecruzamiento molecular utilizando glutaraldehído (Fadouloglou, 2008) a una concentración de proteína de 0.1 mg/ml. Se analizó el estado oligomérico también con Dispersión dinámica de Luz (DLS), con la proteína a una concentración de 0.4 mg/ml y en presencia de sus ligandos: GlcN6P (100mM), GlcNAc6P (1mM), GlcNol6P (1mM) y NH<sub>4</sub> (100mM). Todos los experimentos fueron a pH 7.7, 30°C.

## Modelo estructural

La construcción de modelo estructural se realizó mediante la búsqueda de una proteína homóloga en el *GenBank*, haciendo un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) utilizando *DELTA-BLAST*, que presentara la mas alta identidad de secuencia de aminoácidos y cuya estructura tridimensional estuviera depositada en el *Protein Data Bank* (PDB). A la proteína encontrada se le cambiaron los residuos en los que difiere, y se le llevó a una conformación con un mínimo de energía. Se utilizó el programa *Rosetta design* para la predicción de la estructura terciaria (Rohl C. y col. 2004). El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el programa *Molecular Docking Server* y añadiendo GlcN6P y GlcNAc6P. El sitio de unión a GlcN6P se comparó con el sitio activo de proteínas homólogas. El sitio de unión a GlcNAc6P fue comprobado con la construcción de dos mutantes: K59A y K218A. El programa de visualización y diseño de figuras utilizado fue la version educativa de *PyMOL*.

Para la mutagénesis dirigida los cebadores se mandaron a sintetizar en *Invitrogen*<sup>™</sup>; el producto de PCR se usó para transformar células DH5  $\alpha$  quimiocompetentes; la secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del IFC, UNAM. Los plásmidos con la mutación buscada se usaron para transformar las cepas de sobreexpresión antes mencionadas. Los protocolos de sobreexpresión, purificación y caracterización cinética usados fueron los mismos que para la enzima silvestre.

## Ensayos cinéticos

Los ensayos cinéticos se realizaron empleando una concentración de enzima 200 nM e incubando a tiempo fijo de 10 minutos a temperatura de 30°C y a pH 7.7 en 50 mM de Tris-HCL, 15 mM EDTA. Se añadieron concentraciones variables de GlcNAc6P para evaluar la activación alostérica, la formación del producto se cuantifica mediante el ensayo colorimétrico de Seliwanoff (Calcagno y col. 1984).

La cinética en el sentido reverso se llevó a cabo con una concentración de enzima de 200 nM a tiempo fijo de 20 minutos a 30°C y a pH 7.7 en 50 mM de Tris-HCL y añadiendo concentraciones variables de Fru6P y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, así como de GlcNAc6P en concentraciones saturantes para evaluar la activación alostérica. La formación de producto se cuantifica mediante el método modificado de Morgan-Elson (Calcagno y col. 1984). Para determinar la  $K_d$  de la GlcNAc6P por unión directa se usó <sup>3</sup>H-GlcNAc6P como está descrito por Montero-Moran y col. 1998. Las regresiones no lineales y las simulaciones fueron realizadas en el programa *GraphPad Prism*®.

### **Transiciones moleculares**

Se buscaron señales en la fluorescencia intrínseca de la proteína, así como en dicroísmo circular (CD), con cambio detectable en la transición molecular, esto con el fin de estudiar la interacción enzima-ligandos; Los ensayos fueron realizados a pH 7.7 a 30°C a una concentración de proteína de 0.4 a 1 mg/ml. Con el fin de poder predecir la transición molecular que permite la reducción en el diámetro aparente de NagBII, en base a la información estructural, utilizamos el *Normal Mode Analysis* (NMA) disponible en un servidor en línea (*ElNémo*) (Karsten S. y Sanejouand, 2004). Este análisis se basa en el cálculo de la función de energía potencial asociada al movimiento de una molécula, manteniéndose en conformaciones de mínima energía (Karsten S. y Yves-Henri S., 2004).

Finalmente se inmovilizó la enzima, mediante geles de ortosilicatos, con la finalidad de poder estudiar su cinética en ausencia de transiciones moleculares grandes (Shibayama N. y Satoshi S., 1995). Los ensayos cinéticos fueron realizados como ya se ha descrito.

## Resultados y discusión

### Sobreexpresión

Se logró la sobreexpresión de la proteína en las cepas inducibles probadas: BL21 Rosseta  $\Delta$ nag, BL21 star  $\Delta$ nag pCodon(+) y BL21 star  $\Delta$ nag pRARE. Se esperaban buenos resultados debido a que las cepas derivadas de BL21 se han utilizado en la sobreexpresión de NagBI con gran éxito. La diferencia entre estas cepas radica en la presencia de genes de tRNA para codones poco comunes, sin embargo el gen *nagBII* no los presenta, por lo que las tres cepas inducibles presentan resultados semejantes.

La mejor sobreexpresión se logró en la cepa BL21 Rosseta  $\Delta$ nag a 1mM de IPTG por 3 horas, a 37° C y agitación de 250 rpm ; y en las cepas BL21 star  $\Delta$ nag pCodon(+) y BL21 star  $\Delta$ nag pRARE a 0.5mM de IPTG en las mismas condiciones, de modo que se usaron preferentemente estas últimas (Fig. 13). En la cepa 590  $\Delta$ nag de expresión constitutiva no se obtuvo sobreexpresión apreciable.

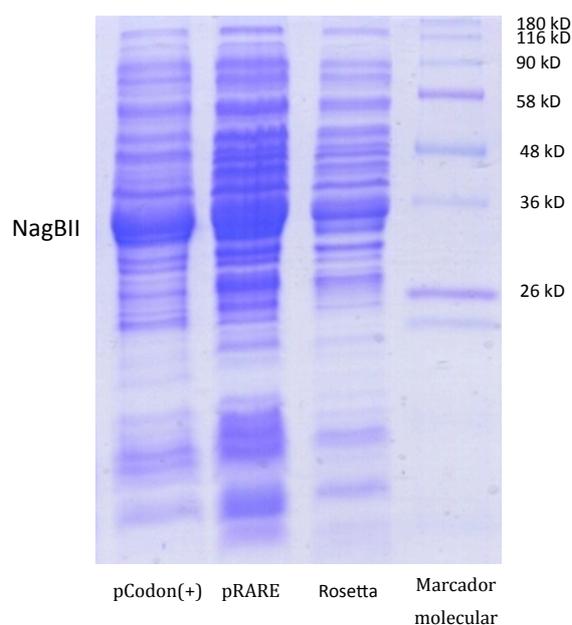


Figura 13. Prueba de sobreexpresión en las cepas BL21 star  $\Delta$ nag pCodon(+) y BL21 star  $\Delta$ nag pRARE y BL21 Rosetta  $\Delta$ nag.

## Purificación

Las tres cepas BL21 inducibles presentaron formación de cuerpos de inclusión y problemas en la lisis ultrasónica. El tiempo de sonicación efectivo para otras variantes de las cepas BL21 (30 min a 30% de amplitud) no fue suficiente, de modo que fue necesario sonicar el doble de tiempo manteniendo la amplitud. Aún así, se pierde el 50% de proteína en las células que no se lisan y en su permanencia en cuerpos de inclusión. No obstante con la proteína soluble se pudo trabajar bien. La proteína no precipitó con sulfato de amonio de manera específica y hasta concentraciones altas de la sal (60% de saturación), por lo que se decidió proseguir la purificación prescindiendo de este paso (Fig. 14).

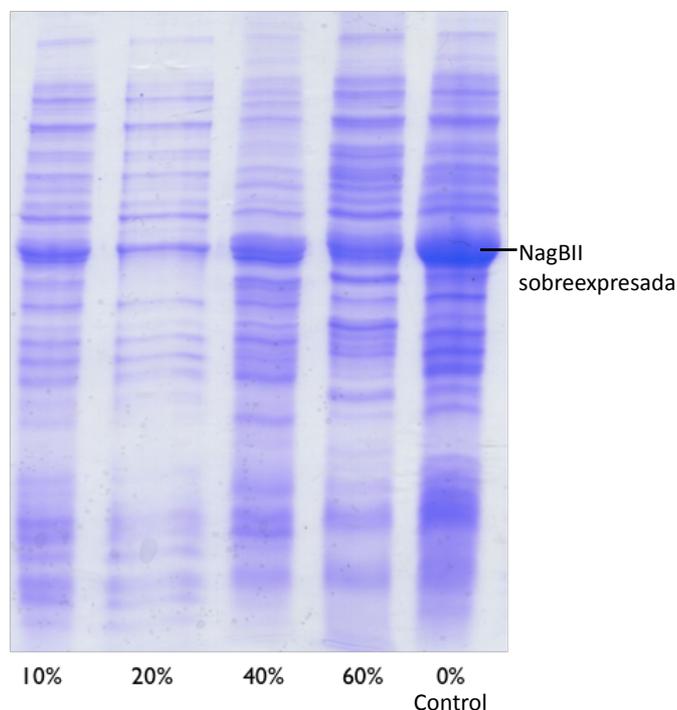


Figura 14. Fracciones precipitadas a diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio. Hasta el 60% de saturación de sulfato de amonio NagBII se sigue presentando en grandes cantidades. Se utilizó el extracto celular con la proteína sobreexpresada como control.

No fue posible purificar NagBII por afinidad al sitio alostérico con la resina de 6-aminohexanoil glucosamina 6-P agarosa. La proteína no se une a la resina y se le encuentra mayoritariamente en el frente de elución, a diferencia de las GlcN6P desaminasas que unen la GlcNAc6P en su sitio alostérico. Los ensayos

cinéticos, como se detalla más adelante, indican que la afinidad de NagBII por el ligando alostérico es similar a la de NagBI, de modo que la explicación no está en la afinidad de la proteína por la matriz, si no en la forma en que se une la GlcNAc6P en el sitio alostérico, como se explica más adelante.

El intento de purificar con una resina de Celulosa fosfato P11 tampoco fue exitoso debido a que no es específico para GlcN6P desaminasa, sino para todas las enzimas en el extracto que unan a azúcares fosforilados. Además NagBII no se une a la resina con suficiente afinidad ya que se le encontró en el volumen de frente de elución. Este paso de purificación puede ser útil para una mezcla con la proteína parcialmente pura, pero no para el extracto crudo.

Finalmente la purificación de NagBII se llevó a cabo usando cromatografía de intercambio aniónico y de interacción hidrofóbica. En un inicio, la purificación por este medio se había logrado con un rendimiento de 5 mg de enzima pura por litro de medio de cultivo a pH 7.8. Se logró optimizar el método hasta aumentar el rendimiento diez veces más usando una columna de intercambio aniónico y una de interacción hidrofóbica, ambas equilibradas a pH 7.5; casi dos unidades de pH por arriba del punto isoelectrico teórico de la enzima que es de 5.6.

En la cromatografía de intercambio aniónico se obtuvieron dos fracciones con picos de absorbancia a 280 nm: la primera eluyó aproximadamente a los 15 minutos de haber iniciado el gradiente y a una concentración aproximada de NaCl de 0.1M; la segunda eluyó 45 minutos después a una concentración de sal de 0.5 a 0.7 M (Fig. 15A). Se realizaron geles en condiciones desnaturizantes con las dos fracciones y se observó una mayor concentración de la enzima de interés en la primera (Fig. 15B) como se esperaba, puesto que la enzima a pH 7.5 está cargada negativamente y no se une a la resina con gran afinidad. No obstante a pH 7.5 la enzima está menos negativamente cargada que a pH 7.8, lo suficiente para retrasarla en la elución y recuperarla con alta pureza en la primera fracción (Fig. 15B).

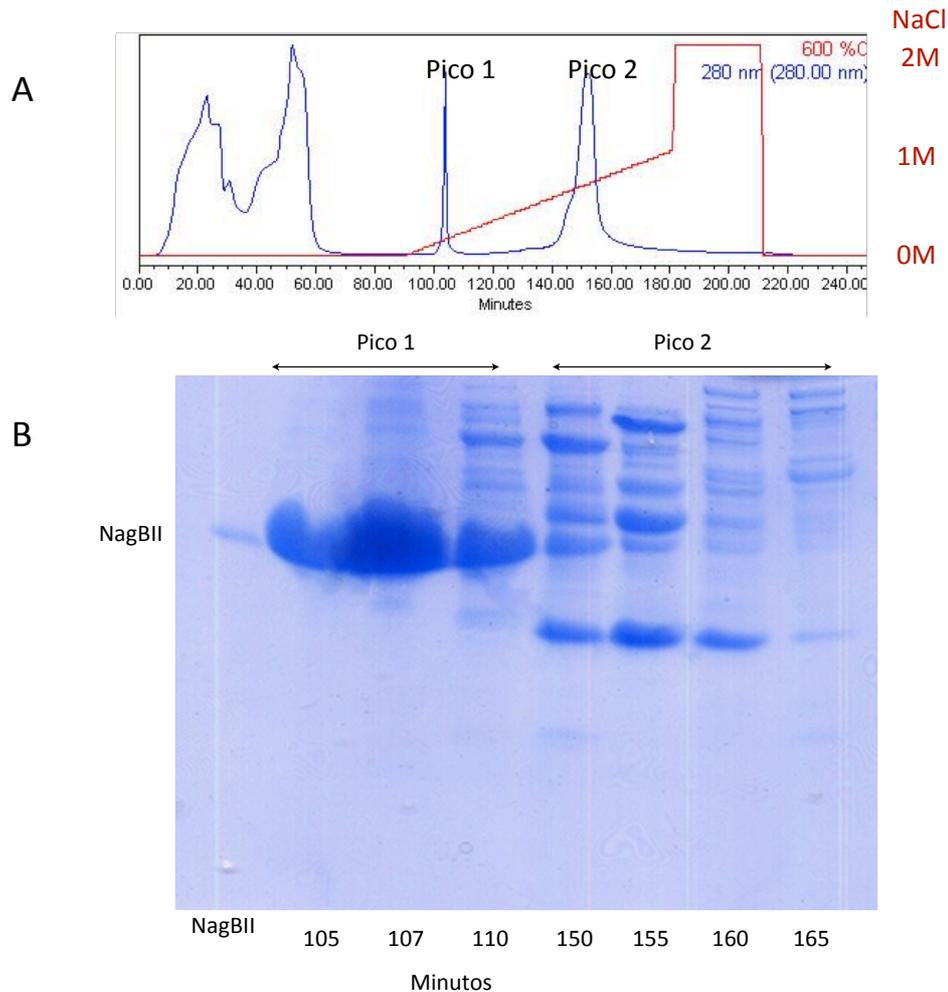


Figura 15. Cromatografía de intercambio aniónico. (A) Cromatograma de elución: en azul se muestra la absorbancia y en rojo la concentración de NaCl. (B) Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de las fracciones eluidas. Se utilizó un lote anterior de proteína pura como marcador de peso molecular.

La fracción correspondiente al pico 1 (Fig. 15), que es la que presenta a la proteína en gran cantidad y pureza aceptable se cargó a una columna de interacción hidrofóbica. Se obtuvieron varias fracciones en el frente de elución y una mas al final del gradiente de NaCl, en todos ellos se encuentra la proteína con un alto grado de impurezas. No obstante, y a pesar de que no se formó un pico de absorbancia, la proteína eluyó en la fracción correspondiente al intervalo de tiempo de 80 a 180 minutos (Fig. 16), que presentan una sola banda en los gels de acrilamida y actividad en el ensayo enzimático.

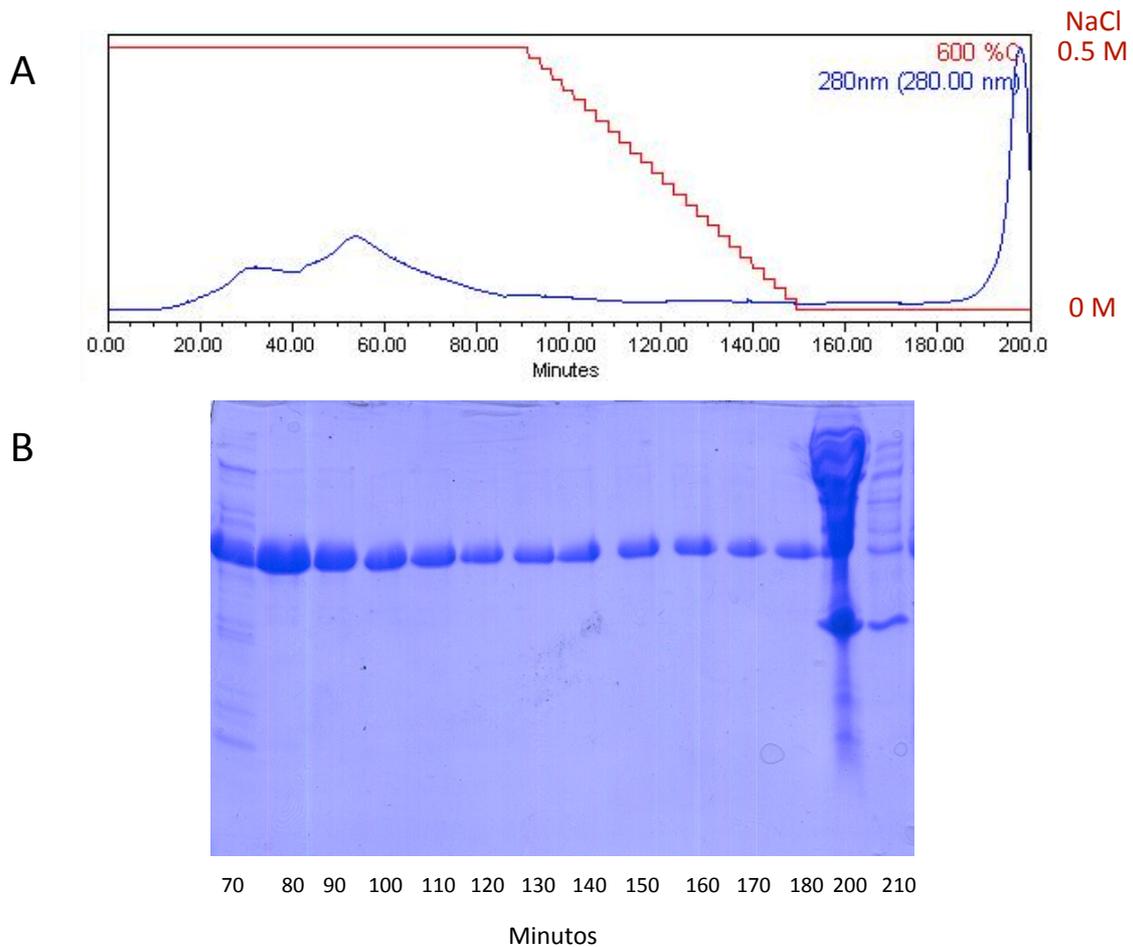


Figura 16. Cromatografía de interacción hidrofóbica. (A) Cromatograma de elución: en azul se muestra la absorbancia y en rojo la concentración de NaCl. (B) Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las fracciones de elución.

La proteína eluyó muy diluida en un gran volumen (140 ml) por lo cual se pudo recuperar en gran cantidad, aproximadamente 50mg de proteína por litro de medio de cultivo, como se detalla en la tabla de purificación (Tabla 1). En la tabla se muestra también que se pierde un poco más de proteína en la cromatografía de intercambio aniónico que en la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Adicionalmente se calculó una absortividad molar por el método descrito por Edelhoch, cuyo valor fue de  $12.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 280nm, con el cual se puede cuantificar la concentración de la enzima pura por una relación directa con su absorbancia.

Tabla 1. Purificación de NagBII de *Shewanella oneidensis* por métodos cromatográficos.

Paso de Purificación	Volumen (ml)	Concentración proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad total (U*)	Actividad específica (U* /mg)	Veces purificada (n)	Rendimiento (%)
Extracto soluble	35	8.3	290.5	2153950.015	7414.63	1	100
Columna Source 15Q	29	4.45	129.05	1367090.53	10593.495	2.25	63.46
Columna Phenyl sepharose	140	0.37	51.52	845262.88	16406.500	5.62	39.24

\*U= Fru6P( $\mu$ mol)/min a 30°C

### Estabilidad y almacenamiento

Con el fin de evaluar la estabilidad de la enzima con respecto a la temperatura, se calculó una Tm aparente para NagBII siguiendo el espectro de Dicroísmo Circular (CD) en un barrido de temperatura de 20 a 80 °C. El valor de la Tm obtenido es de 57.9°C lo que sugiere que la enzima es termoestable. Con este experimento también se pudo ver que su proceso de desnaturalización es irreversible.

La enzima presenta baja solubilidad, principalmente a altas concentraciones, por lo cual se probaron diferentes condiciones de almacenamiento, siendo las mejores en Polietilenglicol (PEG) al 10% a valores de pH de 5 a 8 para concentraciones superiores a 1.5 mg/ml; y glicerol al 50% a -20°C para concentraciones superiores a 3 mg/ml.

### Estado oligomérico

Los estudios del estado oligomérico de NagBII son consistentes con una forma estable de NagBII dimérica en ausencia de ligandos. De la cromatografía de exclusión molecular se obtiene un único pico que corresponde a un peso molecular de 75 kDa según la curva de calibración, exactamente lo calculado para un dímero (Fig. 17).

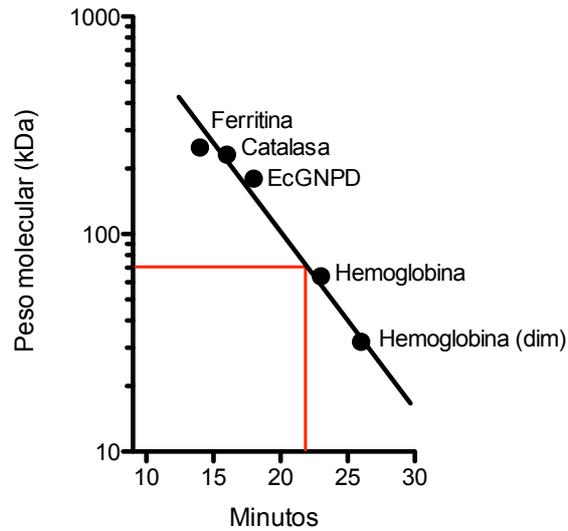


Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular de NagBII. Con línea continua azul se marca la curva de calibración con distintas proteínas de peso molecular conocido, en líneas rojas punteadas se marca el tiempo de elución de NagBII.

En los geles de gradiente de poro (de 20 a 4% de acrilamida) en condiciones nativas obtuvimos una única banda que también corresponde con el peso molecular calculado para el dímero (Fig. 18A). El gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes con NagBII entrecruzada con glutaraldehído, nos muestra la presencia del dímero, así como la del monómero, como se espera para una proteína dimérica (Fig. 18B).

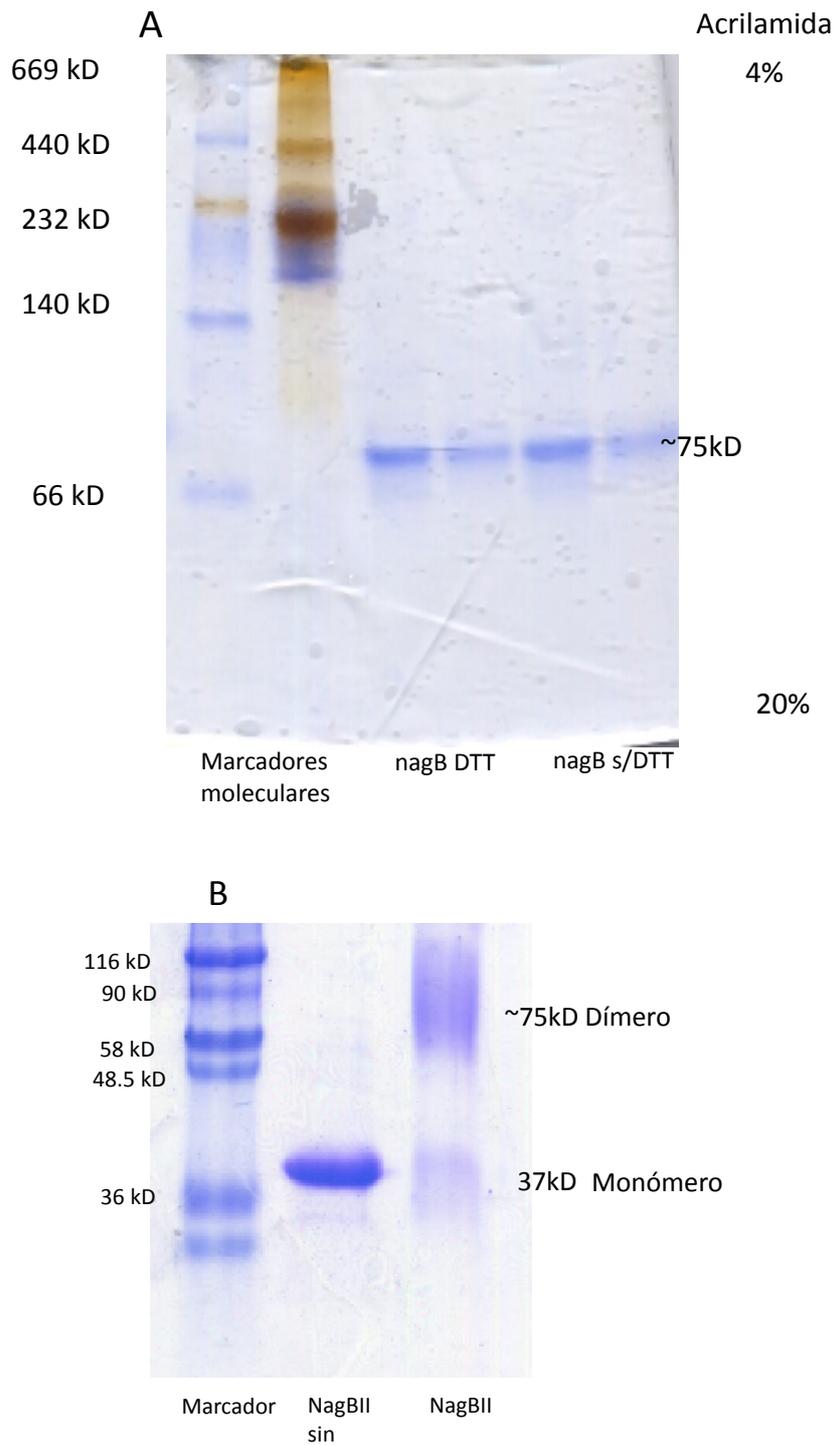


Figura 18. Estudio del estado oligomérico utilizando geles de acrilamida. (A) Gel de gradiente de acrilamida en condiciones nativas. (B) Gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes con la enzima entrecruzada. Se observa al dímero como la forma estable de NagBII en ambos ensayos.

La técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) nos muestra la presencia de un único pico de un diámetro aparente de 7.4 nm (Fig. 19), que corresponde con un dímero, al igual que como se vió con las demás técnicas. Como se explicará posteriormente, el motivo del estudio oligomérico tan detallado deriva del hecho que la cooperatividad homotrópica positiva que presenta NagBII no corresponde con la esperada para un dímero, asumiendo que la cooperatividad se produce en un sistema en equilibrio termodinámico (Wyman y Gill, 1990). Por este motivo se sospechó la existencia de un estado oligomérico mayor en equilibrio con el dímero, lo que fue descartado en ausencia de ligandos.

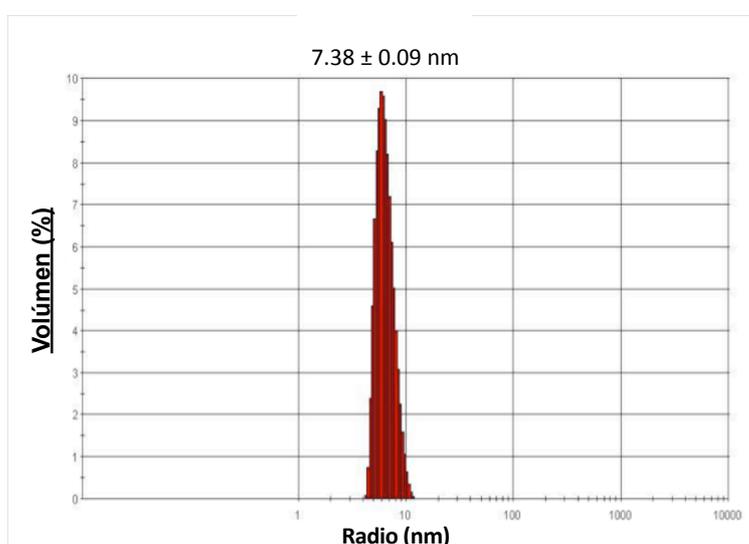


Figura 19. Dispersión dinámica de luz (DLS) para NagBII. Se observa un único pico con un diámetro aparente de 7.4nm que corresponde al valor esperado para la forma dimérica.

### Modelo estructural

NagBII de *S. oneidensis* no cuenta con estructura cristalográfica, por lo que inicialmente se utilizó *Rosetta design* como un primer acercamiento al conocimiento de la estructura nativa. Este programa, desarrollado por David Baker y sus colaboradores, ha demostrado ser el inicio de la solución al problema del plegamiento de las proteínas, cuya interrogante principal es saber si es posible predecir su estructura nativa a partir de su secuencia (Dill K. y col. 2008).

*Rosetta* utiliza un algoritmo de predicción de estructura *de novo* a partir de la búsqueda, en una base de datos, de la conformación de pequeños segmentos de la proteína; el ensamble de estos fragmentos está basado en una estrategia que considera las propiedades y estabilidad de la proteína completa (Rohl C. y col. 2004). La predicción de la estructura nativa para NagBII nos muestra la alta probabilidad de que la secuencia de NagBII sea consistente con el plegamiento SIS (Fig. 20C)

Con la finalidad de tener un modelo estructural de mayor precisión, se construyó uno por homología. En el BLAST, entre las proteínas más parecidas en secuencia a NagBII de *S. oneidensis*, se encontró una proteína reportada como una posible fosfo-azúcar isomerasa de *Shewanella denitrificans*, *Sden\_2705* en el *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), esta proteína presenta una puntuación de 561, un porcentaje de empalme del 99% y un valor E (probabilidad de encontrar una secuencia idéntica por azar en la base de datos) de 0.0, además tiene un 84% de identidad con NagBII. Probablemente también sea una GlcN6P desaminasa del tipo NagBII, aunque no está estudiada desde el punto de vista funcional. Esta proteína cuenta con estructura cristalográfica (Fig. 20A) reportada como 3HBA en el Banco de Datos de Proteínas (PDB), resuelta sin ligandos en un intervalo de resolución de 29.14 a 2.0 Angstroms de resolución; con un valor de R de 0.165 y de  $R_{free}$  de 0.20; y la calidad de los datos es buena (completeness de 99.5%, redundancia de 3.6,  $R_{merge}$  de 0.06). Sin embargo, el valor de  $I/\Sigma$  es de 10.69 lo que indica que esta estructura se pudo resolver a mayor resolución. Las fases fueron resueltas por Dispersión Anómala a una Longitud de Onda (SAD) mediante la sustitución de Met por Se-Met. Adicionalmente se hizo una validación de la estructura en *Mol Probity*, que no señala inconsistencias estereoquímicas.

En el BLAST, la siguiente proteína homóloga de NagBII de *S. oneidensis* con estructura cristalográfica resuelta, presenta menos del 50% de identidad, por lo que se utilizó 3HBA para la construcción de un modelo estructural. Esta estructura a pesar de que pudo ser resuelta a mayor resolución, es de buena calidad y cabe destacar que la unidad asimétrica es un dímero, en simetría

C2, lo que es consistente con el estudio oligomérico antes presentado para NagBII. Se mutaron los residuos según la secuencia de NagBII de *S. oneidensis* utilizando el programa *Coot* y se minimizaron las energías usando el programa *Autodock* para tener un modelo estructural de NagBII (Fig. 20B).

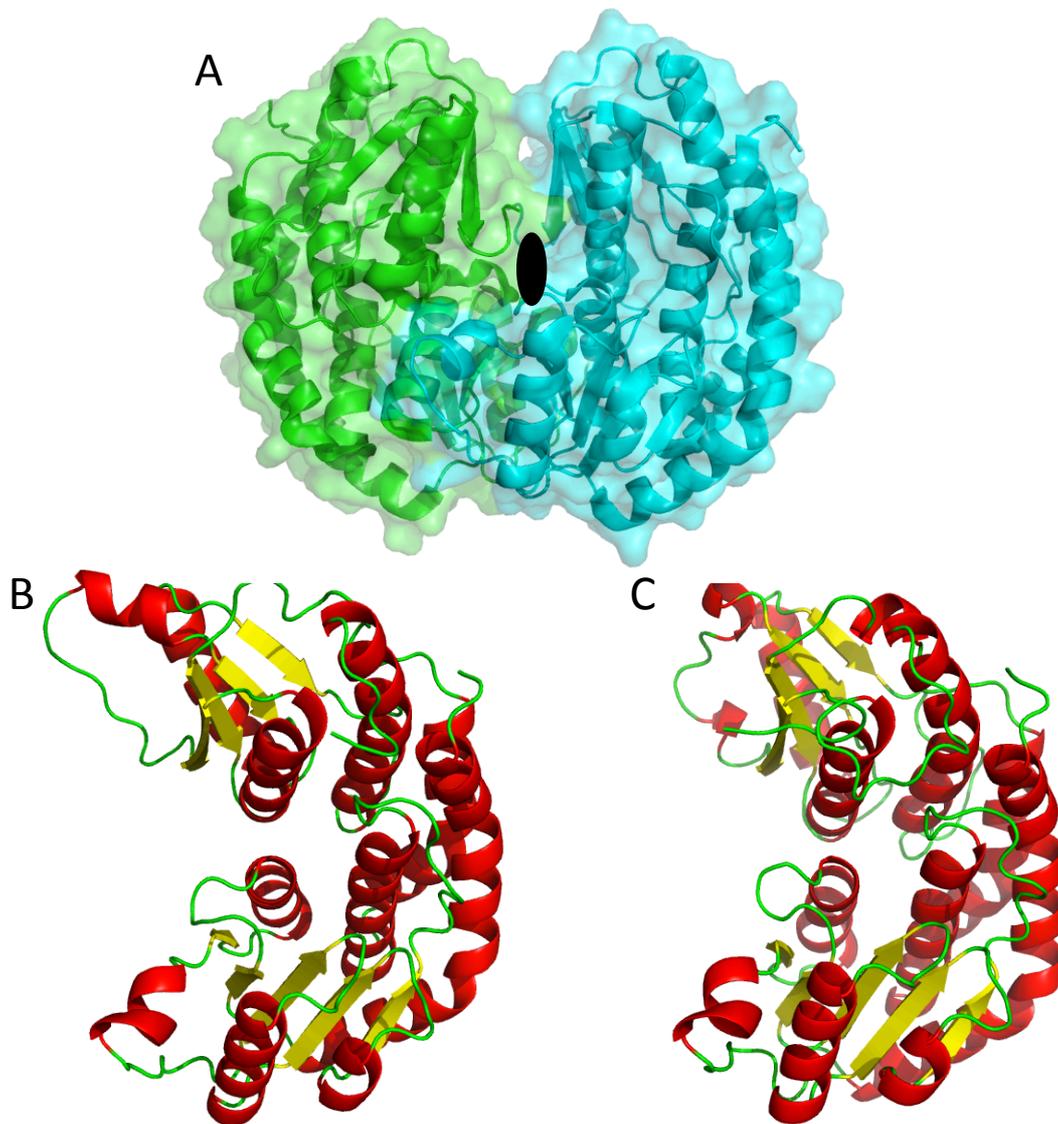


Figura 20. Modelo estructural para NagBII de *S. oneidensis*. (A) Estructura de una proteína ortóloga en *Shewanella denitrificans* (3HBA) en donde la unidad asimétrica es el dímero; (B) Modelo estructural construido en base a la estructura ortóloga; (C) Predicción estructural usando el programa *Rosetta design*.

El diagrama de topología para NagBII (Fig. 21A), nos muestra que esta enzima es estructuralmente distinta a NagBI (Fig. 21B), y que por el contrario, converge con la estructura que presentan la mayoría de las proteínas de la familia SIS. En el diagrama se puede ver que en NagBII hay una duplicación del dominio SIS: el primero va de los residuos 1 al 170, y el segundo va del residuo 171 al final de la secuencia (Fig. 21A).

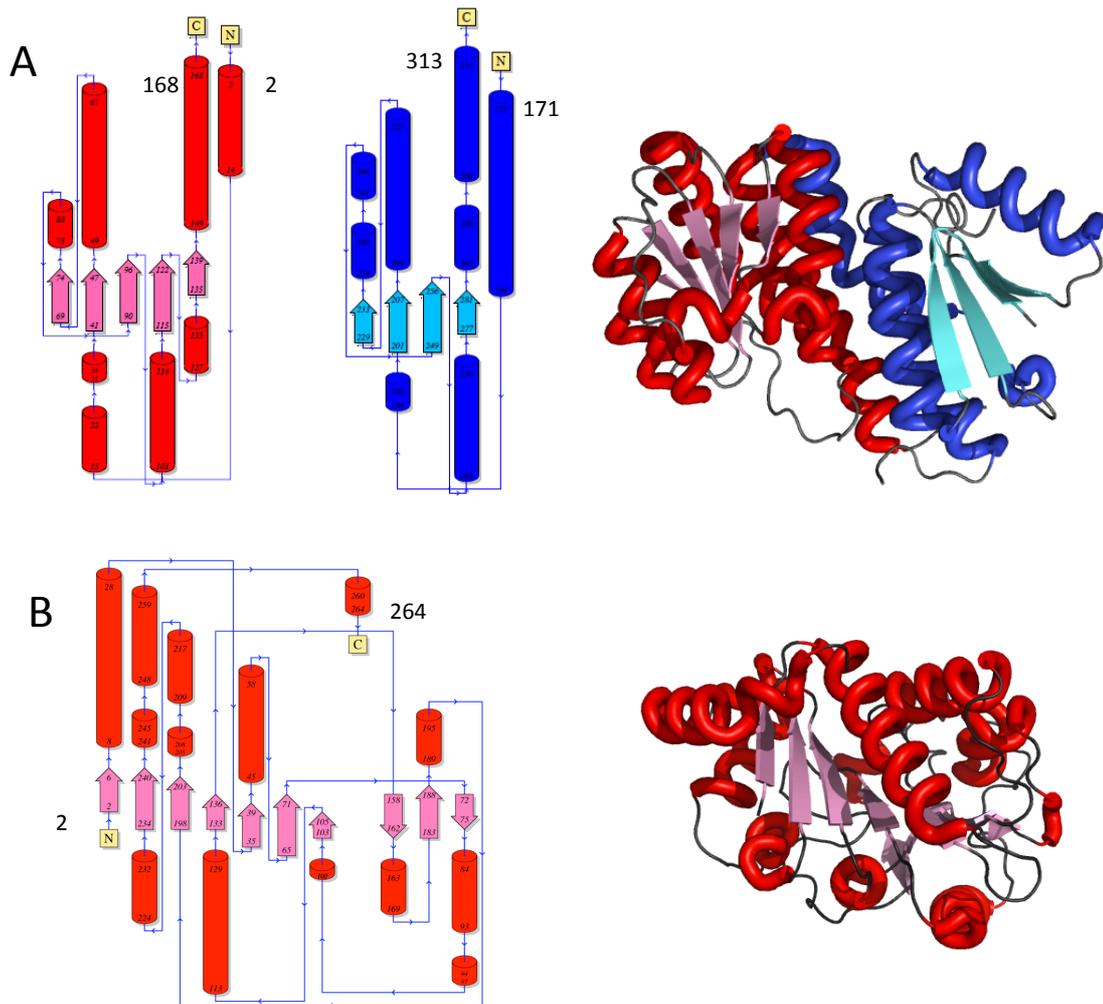


Figura 21. Diagramas de topología (Realizados con el programa *Topol*) y estructura terciaria (Realizados en *pyMOL*) de NagBI y NagBII. (A) NagBII de *Shewanella oneidensis*, en rojo y azul los dominios SIS. (B) NagBI de *E. coli*, muestra un único dominio con plegamiento derivado del de Rossmann

## Sitio activo

Una enzima homóloga de NagBII, la Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT), tiene como producto a la GlcN6P y se ha logrado resolver la estructura cristalográfica en complejo con esta molécula (Fig. 22A). De esta enzima se conoce bien el sitio activo que es semejante al sitio activo de la GlcN6P desaminasa tipo NagBI (Fig. 22D). Siendo la GFAT y NagBII homólogas, se espera que el sitio activo esté conservado estructuralmente.

Usamos la estructura de la GFAT de *E. coli* reportada en el PDB en complejo con la GlcN6P (2VF5) para localizar el posible sitio activo de NagBII por homología. Se superpusieron las estructuras de NagBII de *S. oneidensis* y GFAT de *E. coli* (Fig.22B), que son idénticas en el 26% de su secuencia, y se observó que estructuralmente son muy similares y probablemente el sitio activo se localice en posiciones equivalentes (Fig. 22B).

La GFAT y la GlcN6P desaminasa (NagBI), ambas de *E. coli*, tienen sitios activos muy similares. En NagBI de *E. coli* participan en la catálisis el Asp72, la Arg158 y la His143 (Fig. 22D). En el modelo estructural de NagBII de *S. oneidensis* se encontraron residuos equivalentes en posiciones equivalentes: Glu219, Arg48 e His53 (Fig. 22C). Muy probablemente estos residuos participen en la catálisis. Resultados de acoplamiento molecular confirman la afinidad de este sitio por la GlcN6P (Fig. 23A), solo que el compuesto no presenta los mismos contactos que se generan en el sitio activo de NagBI (Fig 23B).

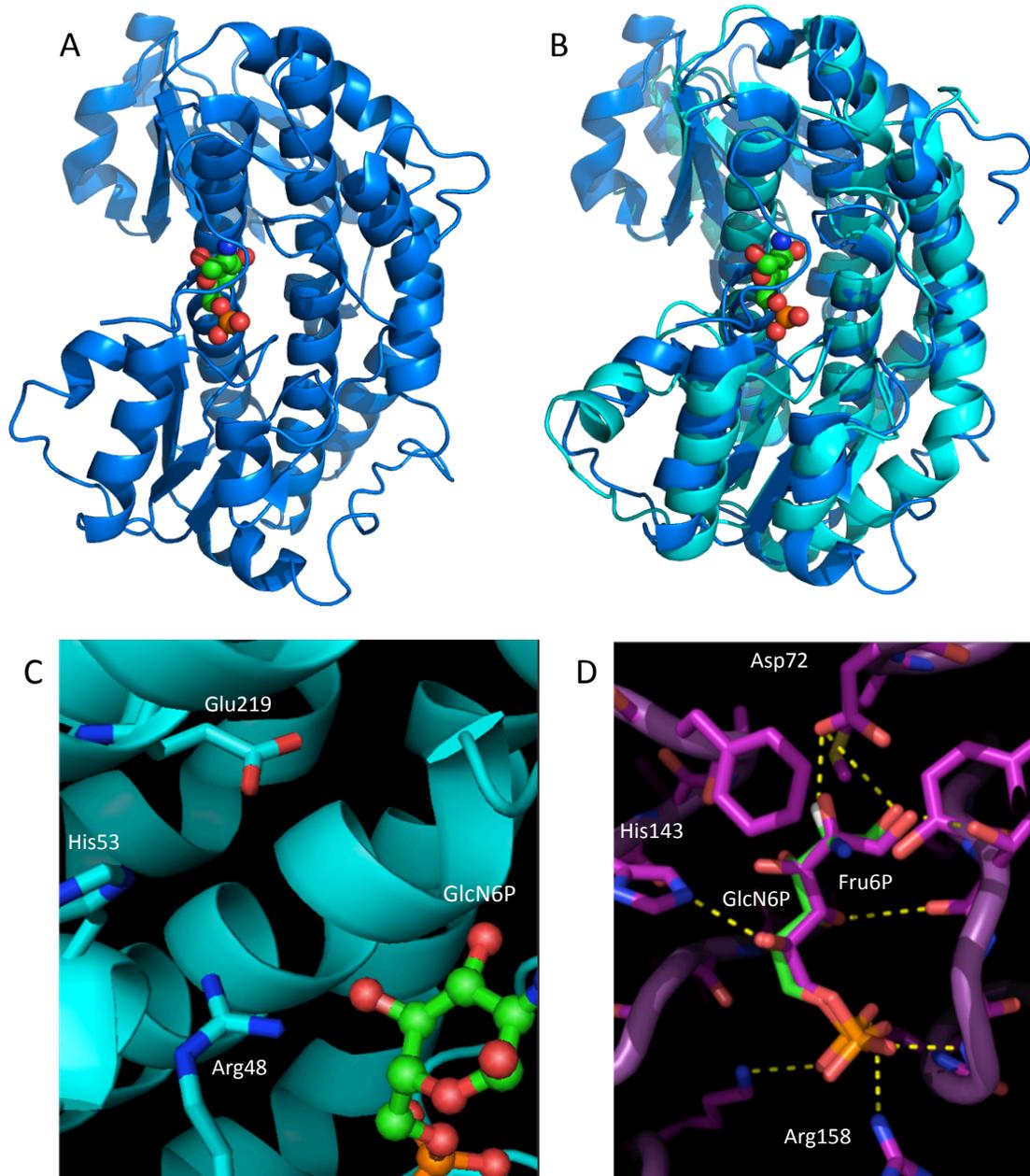


Figura 22. Búsqueda del sitio activo en el modelo estructural de NagBII de *S. oneidensis*. (A) Dominio de isomerasa de la GFAT de *E. coli*, homólogo de NagBII en complejo con GlcN6P (2VF5). (B) Superposición de GFAT con el modelo estructural de NagBII. (C) Residuos de NagBII que posiblemente participan en la catálisis tomando en cuenta la proximidad y semejanza con el sitio activo de la GFAT de *E. coli*. (D) Sitio activo de la NagBI de *E. coli* con sus ligandos, contiene residuos catalíticos equivalentes (Tomado de Diego Alonzo, 2011).

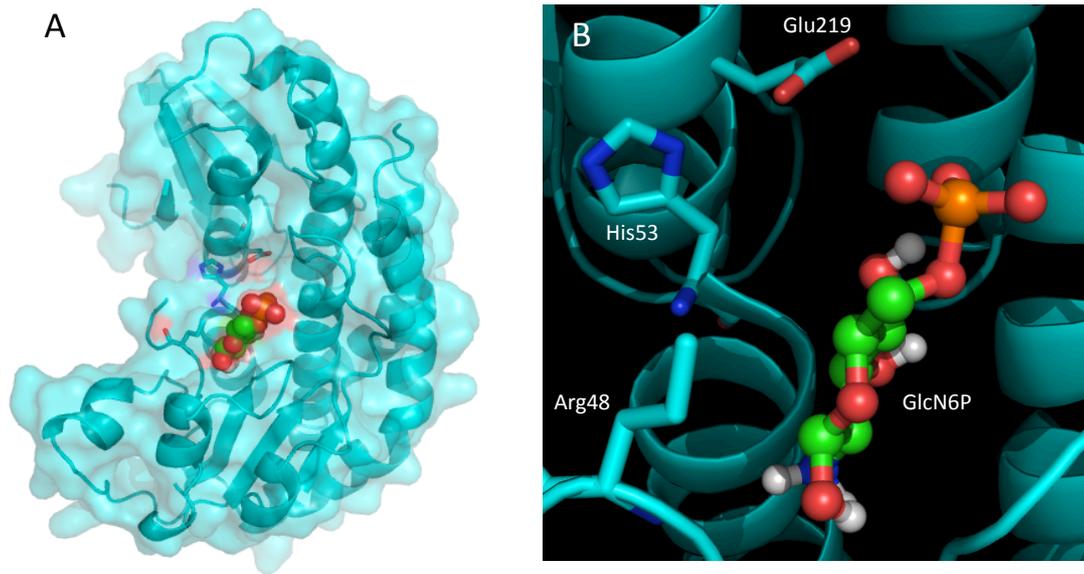


Figura 23. Acoplamiento molecular del sitio activo usando GlcN6P. (A) Probable localización del sitio activo en la superficie de NagBII. (B) En el acoplamiento molecular la GlcN6P se aproxima a los probables residuos catalíticos. Figuras realizadas en *PyMOL*.

### Sitio alostérico

El sitio alostérico se buscó por acoplamiento molecular usando el ligando alostérico, la GlcNAc6P. Los mejores resultados indican que el ligando alostérico se une a la proteína en el centro del dímero, exactamente en el eje de simetría de orden dos (Fig. 24A), haciendo contactos idénticos con ambas subunidades.

De los resultados del acoplamiento molecular, los dos mejores son igualmente probables de acuerdo a la energía libre calculada para la interacción, ambos difieren entre sí en la orientación del ligando alostérico, mas no en la posición relativa en la proteína. En un caso el grupo fosfo de la GlcNAc6P está estabilizado por contactos con las Lys59 de ambas subunidades (Fig. 24B) y en el segundo caso por contactos con las Lys218 (Fig. 24C). En ambos casos participan también las Ser50 de ambas subunidades.

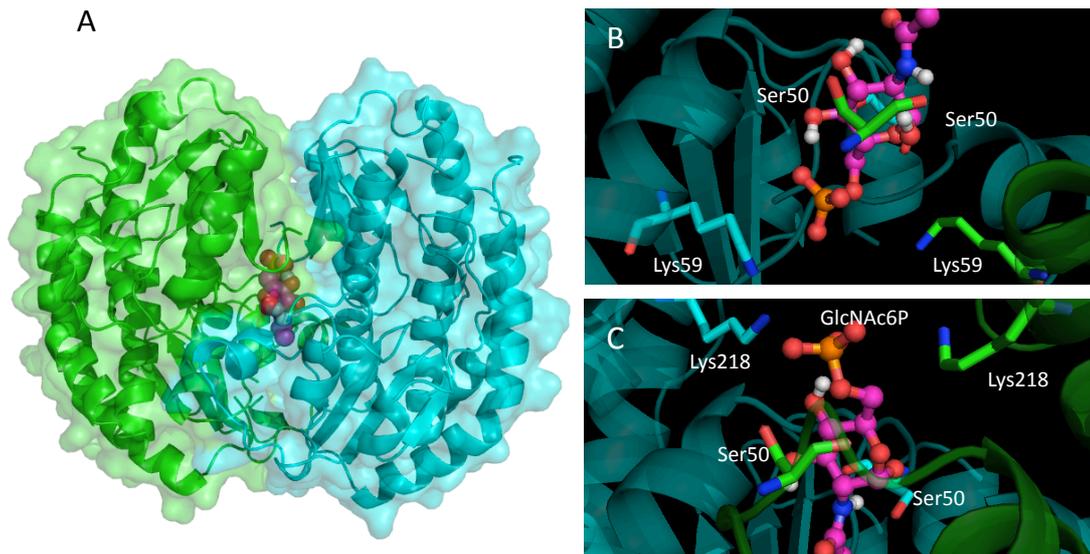


Figura 24. Acoplamiento molecular del sitio alostérico usando GlcNAc6P. (A) El sitio alostérico se encuentra en el centro del dímero; (B) Uno de los resultados más probable indica que el grupo fosfo de la GlcNAc6P se estabiliza por las Lys59 de ambas subunidades; (C) El otro de los resultados más probables indica que el grupo fosfo de la GlcNAc6P se estabiliza por las Lys218 de ambas subunidades. Figuras realizadas en *PyMOL*.

La manera de comprobar los resultados del acoplamiento molecular y discernir entre las dos posiciones más probables fue hacer mutaciones en la Lys59 y en la Lys218. Cada una de las Lys se cambiaron por Ala, y puesto que este residuo no tiene carga, la mutante de la lisina que participa en la unión del ligando alostérico deberá perder la afinidad por él y por lo tanto la activación alostérica.

### **Mutante K59A**

El gen mutado en el que se cambia el codón de Lys por el de Ala en la posición 59 (K59A) fue construido con éxito por mutagénesis dirigida. La secuenciación de este gen nos muestra que únicamente hay cambio en el codón deseado. No obstante esta mutante presentó problemas en la sobreexpresión aún con una serie de modificaciones al protocolo usado para la sobreexpresión de la enzima silvestre (Fig. 25), probablemente la causa sea la inestabilidad de la forma mutante de la enzima.

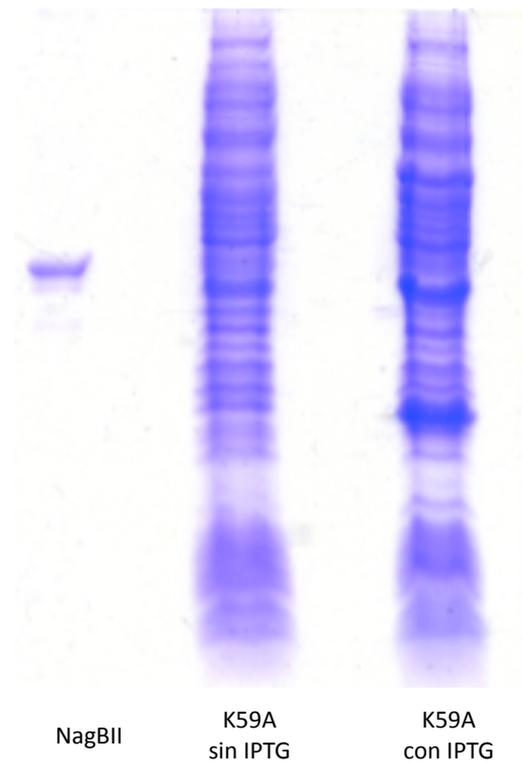


Figura 25. Gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes que muestra que la cepa con el gen mutado (K59A) no sobreexpresa la proteína en presencia del inductor de sobreexpresión (IPTG).

La purificación de cualquier enzima se ve facilitada cuando ésta se encuentra en mayor concentración relativa. Si la proteína no se puede sobreexpresar el rendimiento de purificación es mucho menor, sobre todo cuando no se utilizan métodos de afinidad específicos. Sin la proteína pura no se pueden conocer las propiedades cinéticas, principalmente su  $k_{cat}$  cuyo cálculo requiere del conocer su concentración exacta. Adicionalmente, con la proteína impura, los efectos alostéricos serán de difícil interpretación por la actividad de otras enzimas cuyo sustrato sea la Fru6P, que es el compuesto a medir. Se decidió no hacer estudios cinéticos hasta lograr la sobreexpresión y purificación de la proteína.

## Mutante K218A

El gen mutado con el codón de Ala en el lugar de la Lys218 (K218A) se logró con éxito. La secuenciación del gen nos muestra que presenta solo la mutación deseada. La mutante K218A se pudo sobreexpresar en las cepas usadas para la sobreexpresión de la enzima silvestre (Fig. 26), y se purificó de la misma manera, aunque el rendimiento de purificación fue tres veces menor. La mutante es soluble y se vió por DLS que es dimérica, al igual que la enzima silvestre.

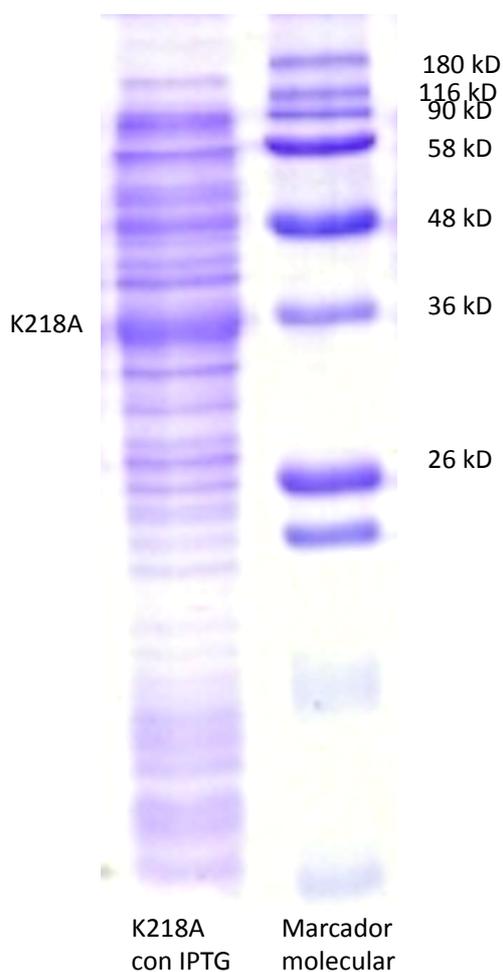


Figura 26. Gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes que muestra que la cepa con el gen mutado (K218A) sobreexpresa la proteína en presencia del inductor de sobreexpresión (IPTG).

Los ensayos cinéticos de la mutante K218A señalan que la  $k_{cat}$  disminuye diez veces con respecto a la enzima silvestre, sin embargo es posible medir su actividad. En presencia de GlcNAc6P, en concentraciones a las que la enzima silvestre es activada, presenta curvas de saturación sigmoides (Fig. 27), lo que nos indica que la lisina 218 es esencial en la unión de este ligando al sitio alostérico, en particular como se ve en el acoplamiento molecular, en la coordinación del grupo fosfo (Fig. 24C).

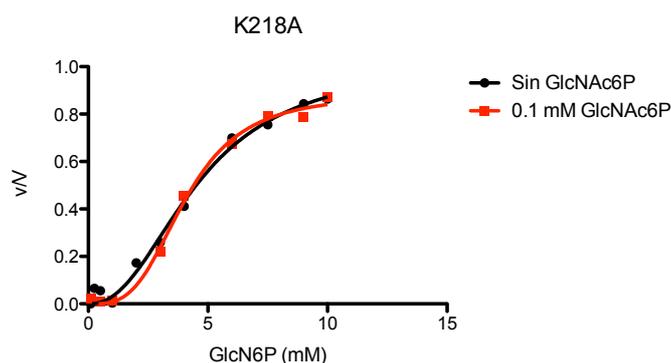


Figura 27. Cinética de reacción de NagBII con la mutación de la Lys 218 por Ala (K218A). No presenta activación alostérica en presencia de GlcNAc6P.

El grupo fosfo de la GlcNAc6P está estabilizado por las Lys218 de ambas subunidades y queda expuesto hacia el disolvente, mientras que el resto de la molécula queda rodeado de la proteína en una cavidad que se forma en el centro del dímero (Fig. 24A). Debido a que el sitio alostérico no está accesible en la superficie de la proteína, NagBII no se pudo purificar por una matriz de afinidad por este sitio. Además, en esta matriz el aminoazúcar está unido desde el amino, que es el grupo que queda dentro en el sitio alostérico.

Los sitios alostéricos de NagBI y NagBII son distintos a pesar de que ambos se forman en la interfase entre dos subunidades. En NagBI la GlcNAc6P se une mediante la formación de contactos distintos con cada subunidad, mientras que en NagBII se une mediante la formación de los mismos contactos con cada una de las subunidades; no obstante, en ambos sitios participan una Lys y una Ser. El grupo fosfo de la GlcNAc6P, en NagBI de *E. coli*, se estabiliza mediante un puente salino con la Lys160 y Arg158, así como por un puente de hidrógeno con la Ser151 (Oliva y col. 1995). En

NagBII estos residuos podrían tener contactos semejantes con la GlcNAc6P pero aún no se pueden definir con precisión.

### Transición alostérica

Conociendo la ubicación de los sitios activos y alostérico en NagBII, se puede ver que están relativamente cercanos: La Arg48 y el Glu219 participan en la unión de la GlcN6P, mientras que la Ser50 y la Lys218 participan en la unión de la GlcNAc6P (Fig.28). El cambio en la afinidad por la GlcN6P inducido por la GlcNAc6P podría generarse a través de cambios conformacionales locales (en la estructura terciaria) y relativamente pequeños.

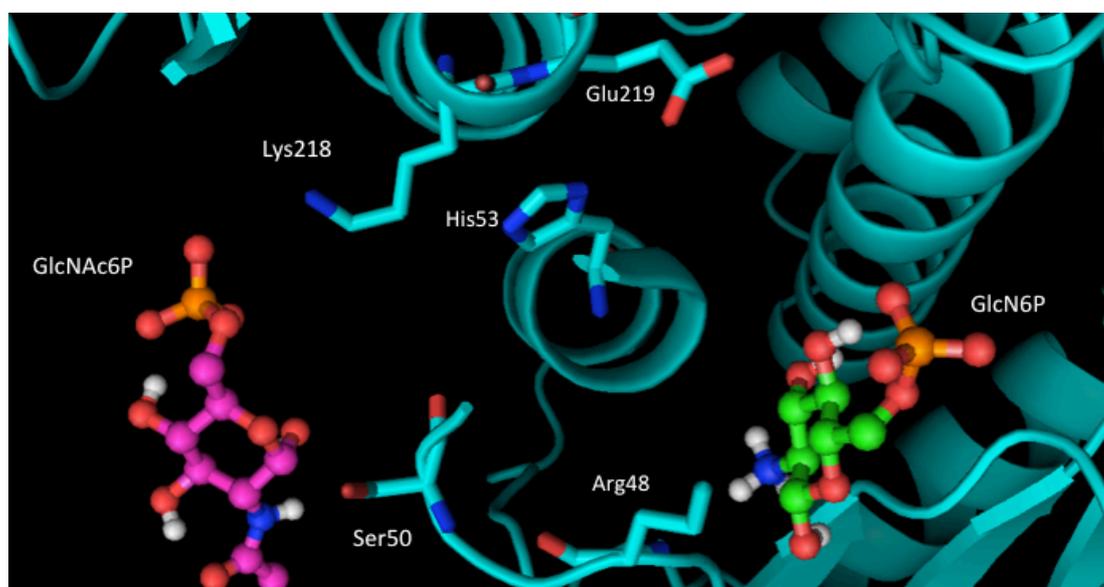


Figura 28. Superposición del acoplamiento molecular del sitio activo con el del sitio alostérico. Se etiquetan los probables residuos que participan en la unión de la GlcNAc6P (Lys218 y Ser 50) y en la catálisis de la GlcN6P (Glu219, His53 y Arg48). No se detallan los contactos.

Empleando técnicas de inmovilización molecular en geles nanoporosos de silicatos confirman que la activación de NagBII depende únicamente de cambios locales. Esta técnica consiste en el uso de un entramado de polisilicatos que se forma alrededor de la proteína impidiéndole cambios

conformacionales a nivel global (en su estructura cuaternaria) mas no a nivel local (Shibayama N. y Satoshi S., 1995). La enzima NagBII inmovilizada por esta técnica es capaz de activarse en presencia de GlcNAc6P (Fig.29) llegando a una afinidad por la GlcN6P, comparable con la afinidad de enzima activada en solución.

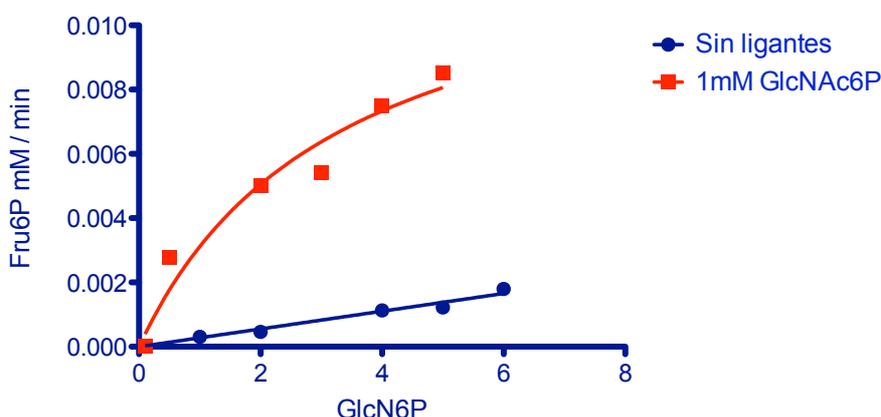


Figura 29. Cinética de NagBII con transiciones impedidas mediante geles nanoporosos de silicatos.

A pesar de la activación alostérica puede depender de cambios locales, se observó por DLS que hay una reducción del diámetro aparente del dímero en presencia de GlcNAc6P (de  $7.4\pm 0.1$  a  $6.5\pm 0.2$ ), lo que indica que existen cambios conformacionales más grandes. Con el *Normal Mode Analysis* (NMA), que se utilizó para predecir *in silico* movimientos en el dímero, se encontró uno que podría explicar el cambio en el radio hidrodinámico visto por DLS. En este movimiento participan las regiones de cada subunidad que presentan menos contactos entre ellas, y que en la estructura cristalográfica usada para construir el modelo presentan los factores B más altos (Fig.30A). El factor de correlación del movimiento predicho con los factores B cristalográficos es de 0.6, lo que le da consistencia al resultado.

El movimiento predicho es simétrico y consiste básicamente en el acercamiento de las zonas más móviles de una subunidad a la cavidad del sitio activo de la otra, disminuyendo así el radio de la molécula (Fig. 30A y B).

En cada subunidad, el asa que contiene a la Ser50, esencial en la unión de la GlcNAc6P, presenta factores B altos (Fig.30B); y la distancia entre las Ser50 de ambas subunidades se modifica en el movimiento predicho, lo que señala que probablemente el ligando alostérico produce un cambio conformacional partiendo de estas asas y modificando directamente al sitio activo para producir un aumento en su afinidad por la GlcN6P; y que el cambio conformacional que produce la reducción en el diámetro aparente de la molécula es solo una consecuencia del cambio local, pero no es indispensable para la activación.

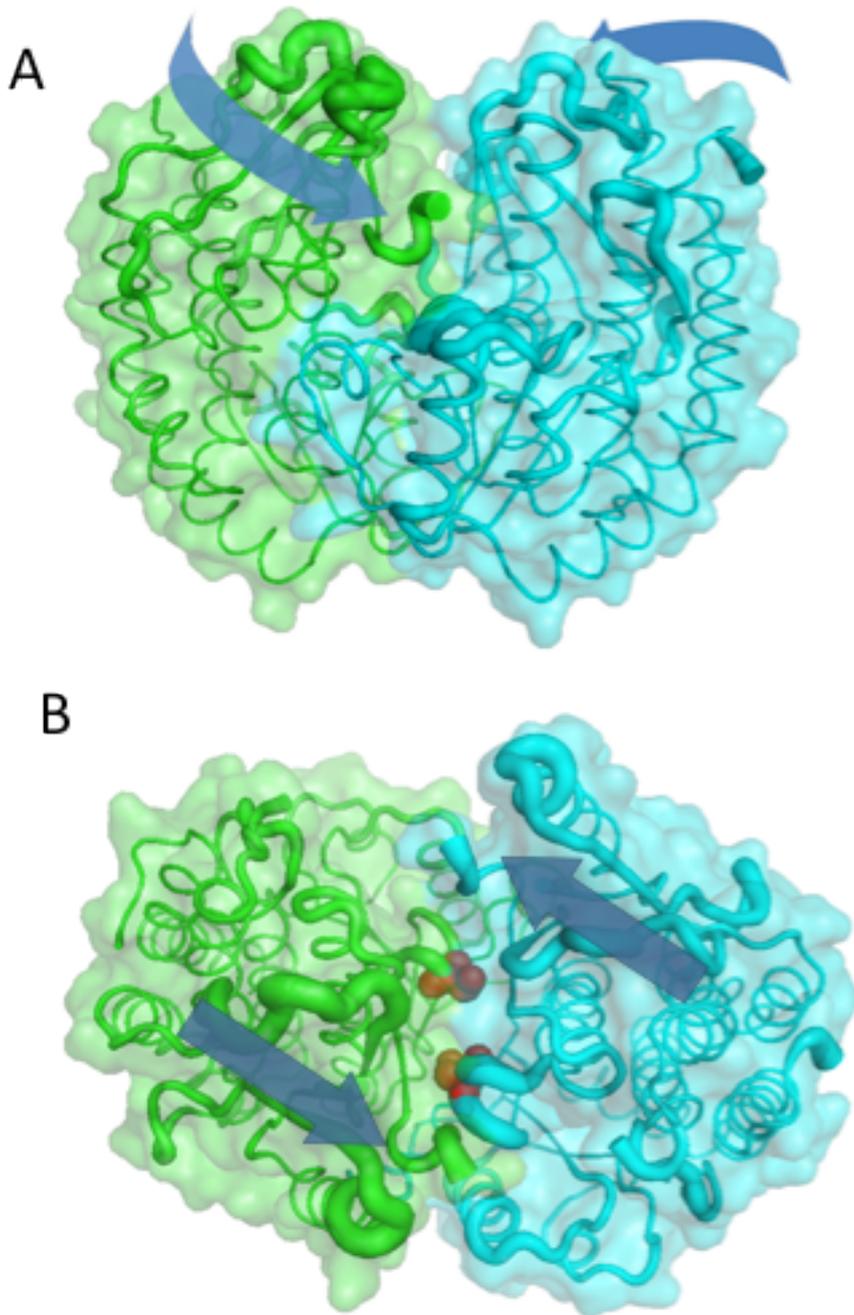


Figura 30. Posible transición molecular de NagBII en presencia de GlcNAc6P. La proteína es vista en superficie y en tubos cuyo radio es proporcional a los factores B de la estructura cristalográfica; las flechas azules señalan el posible movimiento de la molécula. (A) NagBII vista en el eje de simetría de orden 2, donde se ve que los factores B son altos solo en una parte de la molécula; (B) NagBII en vista ortogonal con respecto a la primer figura, en donde se ve el movimiento simétrico de las dos subunidades, en rojo se resalta la Ser50 que participa en la unión de la GlcNAc6P.

En el acoplamiento molecular del sitio alostérico de NagBII se puede observar que únicamente cabe una molécula de GlcNAc6P en el dímero. Experimentos en los que se emplea  $^3\text{H}$ -GlcNAc6P marcada radioactivamente con tritio (solución  $83\mu\text{M}$  con una radiactividad específica de  $5745\text{ cpm nmol}^{-1}$ , equivalente a  $275\text{ kBq nmol}^{-1}$ ) nos permitieron hacer medidas directas de la unión del ligando alostérico a su sitio en la proteína. La forma de la curva de saturación es hiperbólica, como se espera para una proteína con un único sitio de unión (Fig. 31), y el cálculo de la estequiometría confirma que se une únicamente una molécula de GlcNAc6P por cada dímero con una  $K_d$  de  $84 \pm 17\ \mu\text{M}$ .

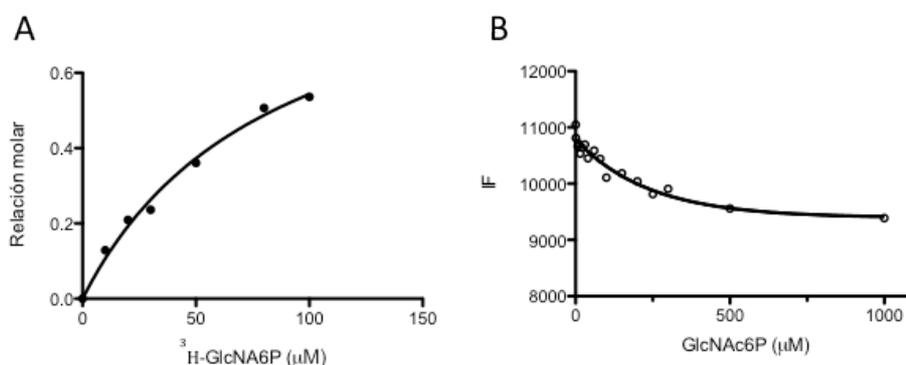


Figura 31. (A) Medida de la unión de  $^3\text{H}$ -GlcNAc6P al sitio alostérico de NagBII. La relación molar está definida como moles de ligando\*moles de enzima (como dímero) $^{-1}$ . (B) Medida de la intensidad de fluorescencia a concentraciones ascendentes de GlcNAc6P.

La intensidad de fluorescencia (IF) intrínseca de la proteína a concentraciones ascendentes de GlcNAc6P permite ver un decaimiento en la señal de su único triptófano (Trp167). La caída de IF tiene forma hiperbólica lo que es consistente con la forma de la curva de saturación de  $^3\text{H}$ -GlcNAc6P marcada radioactivamente (Fig. 31B), y señala que la unión del ligando no es cooperativa, lo que también es consistente con que existe un único sitio alostérico en el dímero. No obstante la vida media calculada es de  $164.7\ \mu\text{M}$  que es el doble de la  $K_d$  calculada por el pegue directo. El Dicroísmo Circular (CD) de NagBII en el UV lejano en ausencia y en presencia de GlcNAc6P no cambia en gran medida, por lo que no es útil para medir la unión de la GlcNAc6P (Fig. 32).

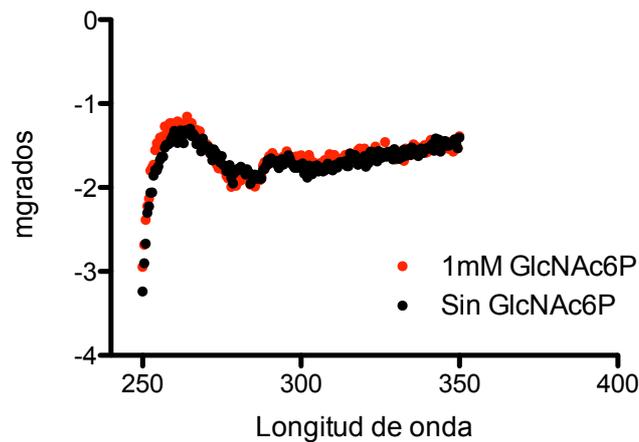


Figura 32. Dicroísmo Circular (CD) de NagBII en la longitud de onda correspondiente a los residuos aromáticos. En ausencia de lignados y GlcNAc6P saturante el espectro es semejante.

El movimiento molecular descrito anteriormente no explica lo que ocurre con el Trp167 en la transición molecular que permite el cambio en la intensidad de fluorescencia, puesto que este residuo no modifica su exposición al solvente y está en una zona con factores B bajos. No es posible entonces explicar a nivel mecanístico el cambio en la intensidad de fluorescencia, ni porque el cálculo de la vida media difiere de la  $K_d$  de la medida directa del ligando alostérico. Esto será posible hasta tener evidencias estructurales de la transición molecular a partir de métodos cristalográficos en presencia de GlcNAc6P.

### Resultados cinéticos.

Nuestros resultados cinéticos señalan que la convergencia evolutiva funcional se genera con gran detalle entre NagBI y NagBII ya que no solo llevan a cabo la misma reacción, con parámetros cinéticos comparables, sino que presentan efectos heterotrópicos y homotrópicos semejantes: NagBII presenta activación heterotrópica con la GlcNAc6P y en ausencia del activador presenta cooperatividad homotrópica, que se ve en la forma sigmoide de las curvas cinéticas (Fig. 33A).

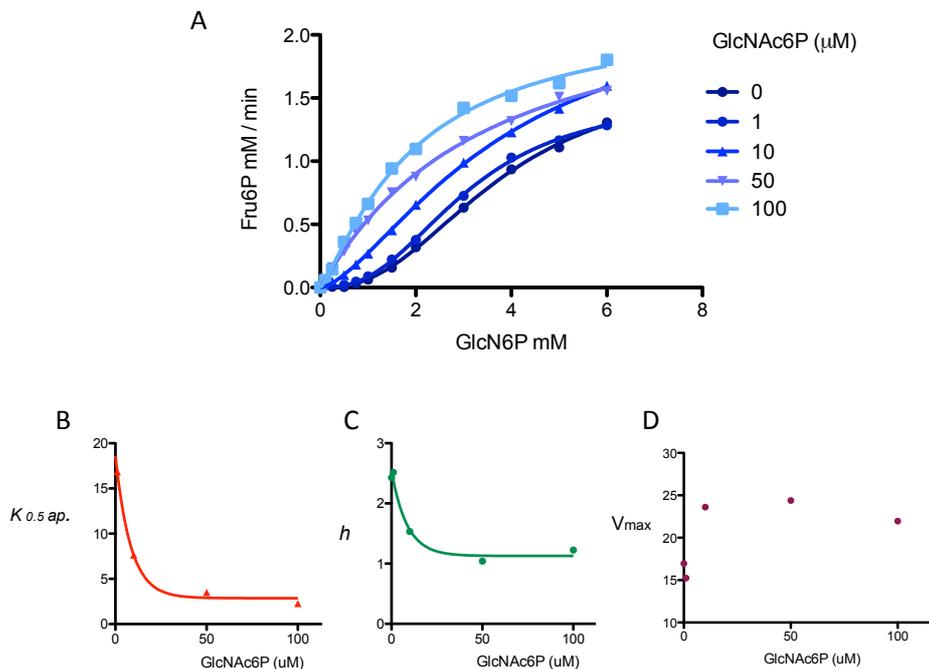


Figura 33. Resultados cinéticos de NagBII. (A) Curvas de velocidades iniciales de la enzima a concentraciones crecientes de GlcNAc6P; (B) Regráfico de las  $K_{0.5}$  ap. por la GlcN6P; (C) Regráfico de los coeficientes  $h$ ; (D) Regráfico de las  $V_{max}$ .

En las curvas de velocidad inicial de NagBII con respecto a la concentración de GlcN6P (Fig. 33A) se puede ver que el efecto heterotrópico (con respecto a la concentración de GlcNAc6P) es sobre la afinidad de la enzima por la GlcN6P (Fig.33B) al igual que en NagBI; sin embargo, la  $V_{max}$  se modifica ligeramente (Fig. 33D) a diferencia de lo que ocurre con un sistema tipo  $K$  puro, como lo es NagBI. NagBI y NagBII también comparten curvas de saturación sigmoideas en ausencia de GlcNAc6P, y el coeficiente  $h$  calculado para ambas es semejante (Tabla 2).

En el regráfico de los coeficientes de Hill ( $h$ ) se puede ver que tienden a 1 (Fig. 33C), es decir, que las curvas de saturación de la enzima se vuelven hiperbólicas a concentraciones altas de activador alostérico (100  $\mu$ M de GlcNAc6P), al igual que en NagBI. Con las curvas hiperbólicas se calculó la  $K_m$  y la  $K_{cat}$  (Tabla 2), que son comparables con los parámetros cinéticos de NagBI.

Tabla 2. Comparación de parámetros cinéticos de NagBII de *S. oneidensis* y NagBI de *E. coli* (Tomados de Bustos-Jaimes y col. 2005).

	$K_m$ (con 100 $\mu$ M de GlcNAc6P)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$h$ (sin GlcNAc6P)	$K_d$ GlcNAc6P
NagBII	$3.7 \pm 0.18$ mM	133.98	$2.9 \pm 0.1$	$0.035 \pm 0.005$ mM
NagBI	$0.55 \pm 0.05$ mM	$157 \pm 6$	$2.5 \pm 0.1$	$0.084 \pm 0.01$ mM

### Cinética en sentido reverso.

En sentido de la síntesis, es decir de Fru6P y  $NH_4$  a GlcN6P, la  $k_{cat}$  de NagBII es de  $1.14 s^{-1}$ . A concentraciones saturantes de GlcNAc6P, NagBII presenta curvas de saturación hiperbólicas (con coeficientes  $h$  cercanos a 1) que se pueden ajustar a la ecuación del mecanismo Bi-Uni; de la regresión no lineal de esta ecuación se calcularon los parámetros  $K_{mA}$  y  $K_{iA}$ , que coinciden ( $K_m = K_i$ ) para cada uno de los sustratos (Tabla3).

La cinética reversa NagBI de *E. coli* también se puede ajustar a la ecuación Bi-Uni y las constantes calculadas están en el mismo orden de magnitud, y los valores de  $K_m = K_i$  para cada uno de los sustratos no son iguales. En este caso el mecanismo al azar fue demostrado por la cinética de inhibición por productos (Mulliert, G., y col. 1987).

Tabla 3. de parámetros para la reacción en sentido reverso de NagBII de *S. oneidensis* y de NagBI de *E. coli* (tomadas de Calcagno y col. 1984).

	$K_m$ Fru6P (mM)	$K_m$ $NH_4$ (mM)
NagBII	$9.84 \pm 2.0$	$12.8 \pm 1.3$
NagBI	$2.2 \pm 0.4$	$31.4 \pm 4.7$

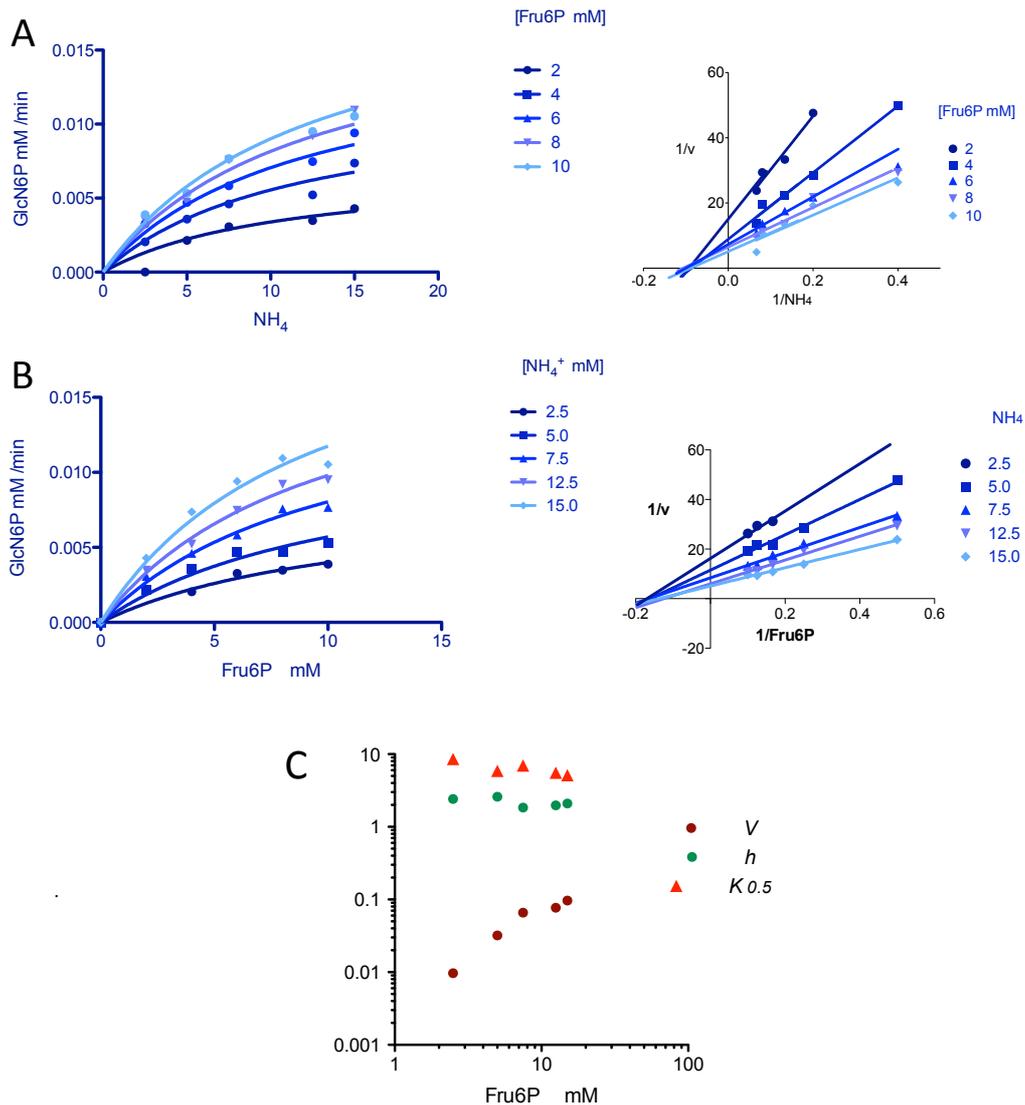


Figura 34. Curvas de velocidades iniciales de la reacción en sentido anabólico de NagBII de *S. oneidensis* para cada uno de los sustratos y su respectivo regráfico de Lineweaver-Burk. (A) a concentraciones variables de Fru6P; (B) a concentraciones variables de  $\text{NH}_4^+$ . (C) Regráficos de las constantes  $V$ ,  $h$  y  $K_{0.5}$ .

Los parámetros cinéticos de NagBI y NagBII permiten ver el alto grado de convergencia que presentan, tanto en la catálisis en ambos sentidos, como en la regulación por ligandos homotrópicos y heterotrópicos. A pesar de esto, y a diferencia de NagBI de *E. coli*, los datos cinéticos de NagBII no se ajustan a la ecuación del modelo de MWC (Ec. 2):

(2)

$$y = \frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha + 1)^{n-1} + Lc\alpha(c\alpha + 1)^{n-1}}{(\alpha + 1)^n + L(c\alpha + 1)^n}$$

En donde:

$$c = \frac{K_R}{K_T} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]} \quad \alpha = \frac{[A]}{K_R}$$

y  $n$  es el número de sitios de unión de A en la proteína, generalmente igual al número de subunidades.

### La paradoja de la cooperatividad de NagBII

Una de las razones por las que los datos cinéticos de NagBII no se pueden ajustar a la ecuación de MWC (Ec.2) es que, ajustando la ecuación para un dímero, la cooperatividad permitida es más baja que la que presenta NagBII. Según los modelos de cooperatividad termodinámica, incluyendo el modelo de MWC, la cooperatividad máxima que puede presentar una proteína alostérica está limitada por el número de subunidades ( $n$ ) (Fig. 35).

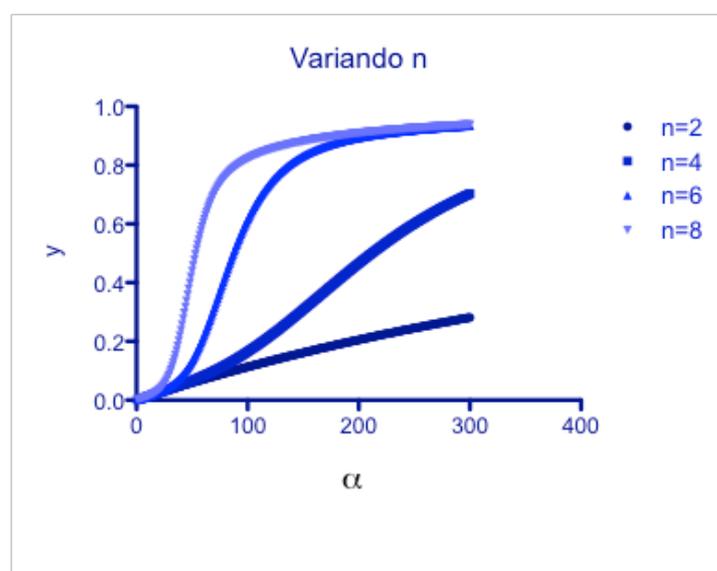


Figura 35. Simulaciones de la ecuación de MWC (Ec.2) para distintos valores de  $n$ . La letra  $\alpha$  es la concentración específica del ligandos A, definida como  $\alpha=[A]/K_A$ ; y la letra  $y$  es la fracción de saturación. Las simulaciones fueron hechas con Prism®.

NagBII que es una enzima dimérica, debería presentar una cooperatividad más limitada que NagBI que es hexamérica, y sin embargo los coeficientes  $h$  de ambas son semejantes (Tabla 2). Más aún, NagBII presenta un coeficiente  $h$  de 2.5 (Fig. 36) y, como se explica en la introducción, este coeficiente no debe ser mayor al número de subunidades de la enzima.

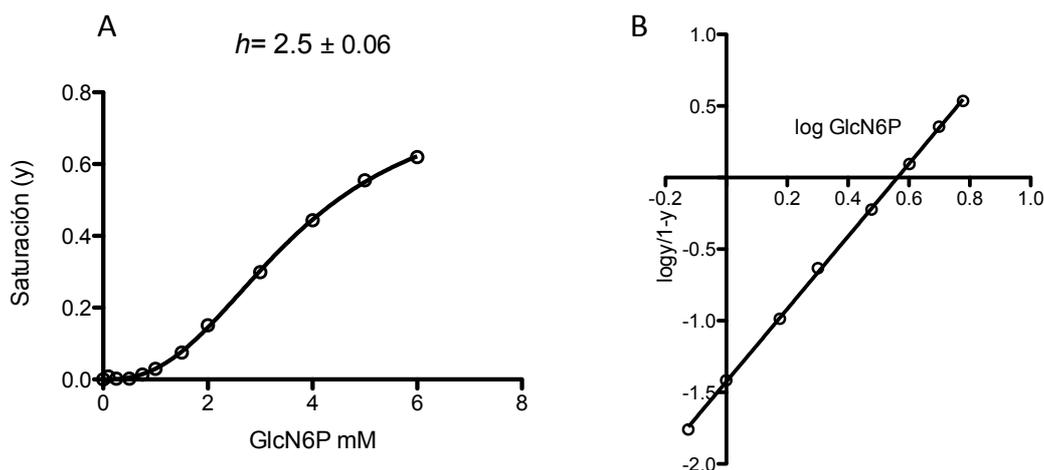


Figura 36. Cooperatividad homotrópica de NagBII con respecto a la GlcN6P. A) Curva de saturación; B) Gráfico de Hill. El coeficiente  $h$  calculado es de 2.5

En sentido reverso y en ausencia de activador alostérico, NagBII presenta curvas de saturación sigmoideas con respecto a la Fru6P al igual que NagBI, sin embargo presenta coeficientes  $h$  de alrededor de 2 (Fig.37A), esto señala nuevamente una alta cooperatividad para un dímero. NagBII, además presenta cooperatividad homotrópica con respecto al  $\text{NH}_4$ , lo que no ocurre en NagBI. El ajuste simultáneo de la ecuación de Michaelis-Menten y la ecuación de Hill, nos permite ver que el ajuste a esta última es mejor, principalmente a 15 mM de  $\text{NH}_4$  (Fig. 37B).

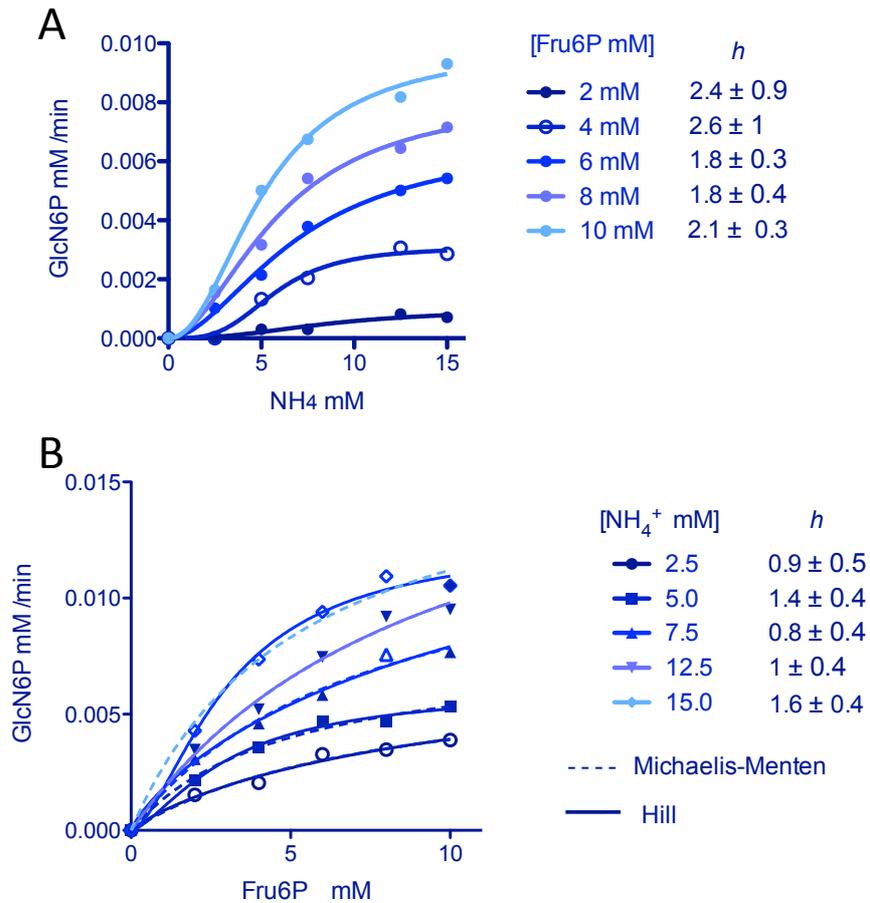


Figura 37. Cinéticas de saturación de la reacción en sentido reverso de NagBII de *S. oneidensis* para cada uno de los sustratos. (A) a concentraciones variables de Fru6P; (B) a concentraciones variables de NH<sub>4</sub>.

La cooperatividad que presenta NagBII en ambos sentidos de la reacción es elevada y difícil de explicar, en términos de cooperatividad termodinámica, según su estado dimérico. Una manera de explicar este paradójico resultado, sería que NagBII presentara cooperatividad por asociación oligomérica, es decir que la enzima dimérica tuviera la capacidad de existir en equilibrio, bajo ciertas condiciones, con un estado oligomérico mayor, como es el caso de la hemoglobina de lamprea (Perutz M., 1990). Si este equilibrio favoreciera al estado dimérico, no habría sido posible detectar el estado oligomérico no favorecido en un estudio oligomérico como el antes presentado.

Con el fin de encontrar las condiciones que desplacen el posible equilibrio hacia el oligómero mayor, se puso a la enzima en contacto con sus ligandos y se monitoreó su diámetro aparente por DLS. Se usaron como ligandos: GlcN6P (en concentraciones necesarias para que quedara un 30% una vez alcanzado el equilibrio de la reacción), GlcNol6P (en concentraciones en las que es inhibidor competitivo de la GFAT y NagBI) y NH<sub>4</sub> (ya que genera una aparente cooperatividad en la reacción reversa).

Tabla 4. Dispersión dinámica de luz (DLS) de NagBII en presencia de distintos ligandos.

Ligando	Diámetro aparente (nm)	Volumen en la muestra (%)	Pico principal
Sin ligandos	7.387 ± 0.09	99.9	Dímero
GlcN6P (100 mM)	4.32 ± 0.83	49.7	Monómero
GlcNol6P (1mM)	3.31 ± 0.721	46.5	Monómero
GlcNol6P + GlcNAc6P	3.488 ± 1.38	47.8	Monómero
NH <sub>4</sub> (100 mM)	7.125 ± 0.64	99.9	Dímero

Con ninguno de los ligandos probados se vio la presencia de un estado oligomérico mayor al dímero, más aún, la enzima se vio en su estado monomérico en presencia del sustrato y del inhibidor competitivo, sin embargo, en estos casos NagBII se presenta como monómero en el 50% del volumen de la muestra y el resto se distribuye en picos que probablemente corresponden a la formación de agregados amorfos, por la variabilidad y dimensiones de sus diámetros (mayores a 100 nm). Probablemente la disociación del dímero y la formación de agregados sea debido a la manipulación excesiva de las muestras o a la alta concentración de los ligandos, muy lejana a concentraciones fisiológicas.

Si NagBII no se presenta en un estado oligomérico mayor a un dímero, y su alta cooperatividad no se puede explicar como cooperatividad termodinámica, entonces el efecto observado no depende de condiciones de equilibrio. Como se ha mencionado en la introducción algunas proteínas presentan cooperatividad independientemente de su estado oligomérico, a la cual se le ha referido como cooperatividad cinética, debido a que depende de componentes cinéticos y no de condiciones en equilibrio.

Se han encontrado pocas proteínas con cooperatividad cinética en la naturaleza, y en ellas los efectos cooperativos se han explicado con la existencia de cambios conformacionales que llevan a la proteína a estados de distinta afinidad y que se producen en intervalos de tiempo mayores a la tasa de reacción. Si la cooperatividad en NagBII depende de cambios conformacionales lentos, las curvas sigmoides de velocidad probablemente no se producirían en condiciones de equilibrio. Se esperaría entonces que en condiciones cercanas al equilibrio la cooperatividad disminuya hasta ser nula o hasta la cooperatividad termodinámica permitida para un dímero.

Con la finalidad de confirmar esta hipótesis, se midió la actividad de la enzima a distintos tiempos de reacción, esperando acercarse a condiciones de equilibrio, y disminuir el efecto de los cambios conformacionales lentos. Para obtener velocidades comparables se mantuvo constante la relación tiempo de incubación por concentración de enzima.

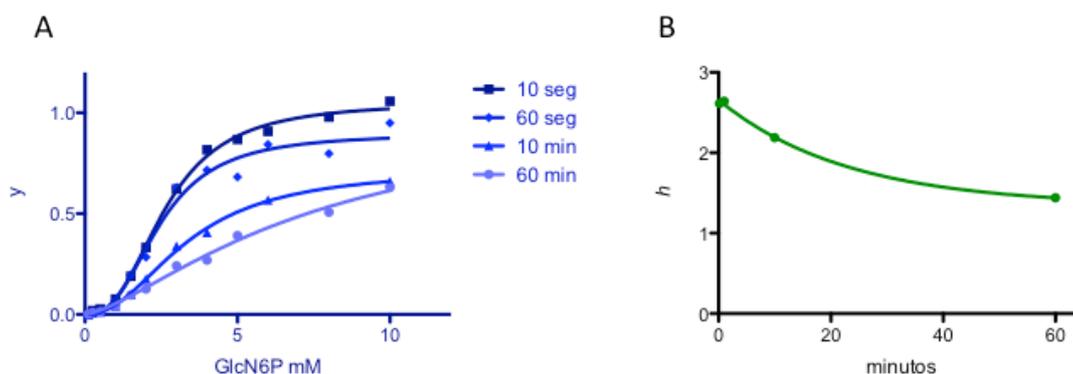


Figura 38. (A) Cinéticas de saturación (y) de NagBII de *S. oneidensis* a diferentes tiempos de incubación con la GlcN6P; (B) Re gráfico de los coeficientes  $h$  ajustados a la ecuación de decaimiento exponencial.

Lo que se observó es que efectivamente la cooperatividad de la enzima disminuye en función del tiempo de reacción (Fig. 38A). Esto revela que la cooperatividad en NagBII tiene un componente cinético y se genera por un cambio conformacional lento, despreciable a tiempos cercanos a una hora. En el regráfico de los coeficientes  $h$  se puede ver que disminuyen aproximándose a  $1.31 \pm 0.09$ , según el ajuste a un decaimiento exponencial

(Fig. 38B). Probablemente la enzima conserve al equilibrio una mínima cooperatividad, correspondiente a la cooperatividad termodinámica del dímero. Esto le conferiría a NagBII un tipo de alostería exótico, como no se ha encontrado ningún otro ejemplo en la literatura y merecerá un estudio más profundo.

La activación alostérica de NagBII de *S. oneidiensis* puede independizarse de la cooperatividad: la mutante Lys218-Ala conserva la cooperatividad cinética y pierde el efecto heterotrópico de la GlcNAc6P. Por otra parte, la enzima nanoencapsulada en gel de sílice, pierde la cooperatividad pero es activada por el efector alostérico. Esto es una diferencia esencial con la desaminasa de *E. coli* en la que el acoplamiento homotrópico-heterotrópico está ligado a la forma de los estados terciarios que modifican la estabilidad de los conformeros cuaternarios (S. Zonzsein, comunicación personal). En nuestro caso, parece que se trata de dos fenómenos independientes que podrán estudiarse por separado. Ya disponemos de una mutante que causa la abolición de la activación alostérica, una mejor comprensión del mecanismo generador de la cooperatividad nos permitirá diseñar mutantes alostéricas y

### **Convergencia evolutiva**

Por las diferencias estructurales anteriormente presentadas entre NagBI y NagBII se podrían esperar diferencias importantes en la función, no obstante las constantes de afinidad para cada uno de los ligandos ( $K_d$ ), así como las constantes de velocidad ( $k_{cat}$ ) en ambos sentidos de la reacción, son comparables entre las dos enzimas, lo que señala un alto grado de convergencia evolutiva funcional. Desde el punto de vista estructural esta convergencia se ve reflejada en la conformación semejante de los sitios de unión a la GlcN6P. Este caso de convergencia es más interesante por el hecho de que los sitios alostéricos de NagBI y NagBII presentan una afinidad semejante para la GlcNAc6P, a pesar de sus diferencias estructurales.

La GlcNAc6P además produce en ambas enzimas una activación semejante de tipo *K*, es decir, que NagBI y NagBII son sensibles a la concentración de GlcNAc6P modificando la afinidad por su sustrato, la GlcN6P. Esto significa que las presiones de selección fijaron, en dos proteínas estructuralmente distintas, las mismas propiedades catalíticas y la capacidad de modificarlas al variar la concentración de un efector alostérico, es decir, que la regulación alostérica se vuelve de gran importancia en la fisiología celular, por lo cual se fijó en la evolución de manera independiente.

La convergencia evolutiva llega hasta los efectos homotrópicos con respecto a la GlcN6P, que son casi idénticos a pesar de que dependen de mecanismos distintos. La cooperatividad termodinámica en NagBI de *E. coli* y la exótica cooperatividad cinética en NagBII de *S. oneidensis*, fueron fijadas por presiones de selección similares a pesar de la diferencia en la biología de ambas especies. La convergencia evolutiva se dió a nivel de regulación heterotrópica y homotrópica, lo que apoya que ambas son complementarias y se seleccionan juntas, como se ha visto en la mayoría de las proteínas alostéricas.

El metabolismo de aminoazúcares es indispensable para un gran número de organismos debido a que estos compuestos forman parte de los lipopolisacáridos y de los peptidoglicanos en bacterias; forman parte de la quitina de las paredes celulares de hongos; y son componentes del humor vítreo y matriz extracelular de cartílago y tendones de mamíferos, entre otras cosas (Álvarez-Añorve, 2005). La GlcN6P desaminasa tiene un papel fundamental en la función y en la regulación del metabolismo de aminoazúcares, y el hecho de que con dos plegamientos diferentes muestre características funcionales y regulatorias semejantes, es prueba de ello. Sin embargo, comúnmente las enzimas isofuncionales son homólogas, sobre todo en especies relativamente cercanas como es el caso de *E. coli* y *S. oneidensis*.

La enzima tipo NagBI tiene plegamiento derivado de Rossmann, compartido únicamente con su paróloga la fosfogluconolactonasa. A pesar de que NagBI se presenta tanto en eucariontes como en bacterias, estudios filogenéticos

han demostrado que su presencia en estos linajes no es regular, es decir, que no se originó de un ancestro común, sino que aparece en eucariontes protistas y se transfirió a algunas bacterias por transferencia lateral de genes (LGT) (Anderson J. y col. 2006; Almeida F.y col. 2008). Entonces, probablemente NagBI haya aparecido en la evolución tardíamente, a partir de un ancestro con plegamiento de Rossmann, y fué adquirida en linajes no cercanos filogenéticamente por LTG.

La enzima tipo NagBII, en cambio, tiene un plegamiento tipo azúcar isomerasa (SIS), que es más común en la naturaleza ya que se encuentra en diversas proteínas del metabolismo central en los tres dominios de la vida. El BLAST que se hizo con la secuencia de nucleótidos de NagBII de *S. oneidensis*, muestra que existe una gran cantidad de proteínas homólogas con una alta identidad (mayor al 50%) en diversos representantes de eubacterias y arqueas; estas proteínas sin embargo, están reportadas como Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasas (GFAT). Probablemente las homólogas mas parecidas sean enzimas NagBII asignadas como enzimas GFAT por falta de estudios funcionales.

Por el número de secuencias homólogas reportadas para cada tipo de GlcN6P desaminasa, podemos suponer un origen más temprano en la evolución para la GlcN6P desaminasa con plegamiento SIS (NagBII) y un origen más tardío para la que tiene plegamiento derivado de Rossmann (NagBI). Origenes distantes pueden ser la causa de que organismos distantes respondieran a las mismas presiones de selección con herramientas distintas.

## Conclusiones

- La enzima NagBII purificada hasta la homogeneidad se presenta en forma dimérica, a diferencia de su análoga de *E. coli* que es un hexámero.
- Cada subunidad del dímero de La enzima NagBII tiene un sitio de unión a sustrato conservado con su homóloga la GFAT y estructuralmente similar al de su análoga la NagBI.
- La enzima posee un solo sitio alostérico por dímero , ubicado en el espacio entre ambas subunidades. En la unión de la GlcNAc6P participan la Lys218 y la Ser50.
- La afinidad por la GlcNAc6P es semejante en NagBI y NagBII, a pesar de que sus sitios alostéricos son estructuralmente diferentes.
- La GlcNAc6P produce activación alostérica de tipo K y lleva a ambas enzimas a afinidades por la GlcN6P comparables.
- NagBI y NagBII comparten respuestas sigmoides con respecto a GlcN6P con coeficientes  $h$  semejantes a 10 minutos y 30°C.
- La enzima NagBII presenta cooperatividad cinética que es causada por una transición conformacional lenta que es producida por la unión del sustrato.
- En la enzima NagBII la cinética de la reacción en sentido biosintético sugiere un mecanismo cinético de equilibrio rápido al azar, como la homóloga de *E. coli*, aunque esto debe confirmarse con experimentos adicionales.
- La  $K_{cat}$  de NagBII observada para la reacción de desaminación es mayor que la que se esperaría si el sustrato de la enzima fuera la forma abierta (aldehído) de la GlcN6P, lo que indica que la enzima cataliza la apertura del anillo piranósico del sustrato.

- Se identificó una señal fluorescente, proveniente del único triptófano de NagBII, que acompaña la unión de la GlcNAc6P a su sitio o al cambio conformacional asociado a esta.
- Los experimentos preliminares con la enzima nanoencapsulada indican que la activación alostérica es independiente de la transición que causa la cooperatividad y parece ser debida a un cambio conformacional local de cada subunidad.

## Perspectivas

Inicialmente, con técnicas cristalográficas en ausencia y presencia de ligandos, podremos conocer el estado inicial y final de las transiciones conformacionales respectivamente. Nuestros resultados indican que en NagBII la cooperatividad y la activación alostérica dependen de transiciones conformacionales distintas, y se podrían estudiar de manera independiente: Ya tenemos una mutante que es cooperativa pero no alostérica y con una mejor comprensión del mecanismo generador de cooperatividad se podrían diseñar mutantes alostéricas y no cooperativas.

Conociendo la estructura de NagBII en presencia de ligandos es posible distinguir los cambios conformacionales esenciales y diseñar estratégicamente mutantes que nos permitan medir las constantes de velocidad mediante la obtención de señales fluorescentes. El estudio estructural también nos permitirá identificar los residuos catalíticos que participan tanto en la abertura de la GlcN6P, como en su enolización; así como detallar los contactos de la enzima con la GlcNAc6P.

Para entender la transición conformacional, además de conocer los estados inicial y final, es necesario conocer en cierta medida el proceso. Puesto que la velocidad de la transición puede estar limitada por las propiedades dinámicas de la enzima en ausencia o presencia de ligandos, el uso de herramientas bioinformáticas, en particular la dinámica molecular, se vuelve un buen complemento para el entendimiento de los mecanismos moleculares.

Es posible estudiar la cinética enzimática de los distintos estados de la transición lenta de manera independiente mediante el empleo de una molécula inductora, que puede ser un análogo del sustrato, y mediante técnicas de inmovilización molecular con geles de silicatos. De esta manera se pueden obtener las constantes de disociación de los ligandos para cada uno de los estados y construir un modelo de integral de la cooperatividad que presenta esta enzima.

## Bibliografía

- Adair, G. S. (1925). A Critical Study of the Direct Method of Measuring the Osmotic Pressure of Haemoglobin. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **98** (692): 523.
- Almeida F.C., Leszczyniecka M., Fisher P. y DeSalle R. (2008). Examining Ancient Inter-domain Horizontal Gene Transfer. *Evolutionary Bioinformatics*. **4**:109-119.
- Alonzo Muñiz Diego A. (2011). La Manosamina 6-P como inhibidor de la Glucosamina 6P desaminasa: efectos alostéricos y competitivos acoplados. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, UNAM.
- Altamirano M.M., Mulliert, G. y Calcagno M.L. (1987). Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **258**: 95-100.
- 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.
- Altamirano M.M., Hernández-Arana A., Tello-Solis, S. y Calcagno M.L. (1994). Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **220**: 409-13.
- Altamirano M. M., Plumbridge J. A., Horjales E. y Calcagno M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* **34**: 6074-6082.
- Alvarez-Añorve L.I., Calcagno M. L. y Plumbridge J. (2005) .Why Does *Escherichia coli* Grow More Slowly on Glucosamine than on *N*-Acetylglucosamine? Effects of Enzyme Levels and Allosteric Activation of GlcN6P Deaminase (Nag B) on Growth Rates. *Journal of Bacteriology* **187**: 2974-2982.
- Alvarez-Añorve L.I., Bustos Jaimes I., Calcagno M.L y Plumbridge J. (2009). Allosteric Regulation of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (NagB) and Growth of *Escherichia coli* on Glucosamine *Journal of Bacteriology* **191**: 6401–6407.
- Anderson J.A., Hirt R., Foster P. y Roger A. (2006). Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: influx of genes into protist genomes. *BMC Evolutionary Biology* **6**:27
- Arreola R., Valderrama B., Morante M.L. y Horjales E. (2003). Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Lett.*, **551**: 63–70
- Benson R.L. y Kress H. (1980). Glucosamine metabolism in *Drosophila virilis* salivary glands: ontogenic changes of enzyme activities and metabolite synthesis. *Dev Biol* (N Y 1985) **78**: 63-75.
- Bourbonais F., Chen J., Huang C., Zhang Y., Pfefferkorn J. y Landro J. (2012). Modulation of glucokinase by glucose, small-molecule activator and gucokinase regulatory protein: steady-state kinetic and cell-based analysis.

*Biochem J.* **441**(3):881-7.

Bustos-Jaimes I. y Calcagno M. L. (2001) Allosteric Transition and Substrate binding Are Entropy Driven in Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **394**.

Bustos-Jaimes I., Sosa Peinado A., Rudiño-Piñera E., Horjales E. and 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.

Bustos-Jaimes I., Ramírez-Costa M., De Anda-Aguilar L., Hinojosa-Ocaña P., 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**:1127-35.

Bustos-Jaimes I., De Anda-Aguilar L. y Calcagno M. L. (2008) Allosterity and cooperativity in protein function. *Advances in Protein Physical Chemistry*. Transworld Research Network, Kerala, India.

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

Cisneros A.D., Montero-Morán G., Lara-González S.y Calcagno M.L. (2004). Inversion of the allosteric response of *Escherichia coli* glucosamine-6-P deaminase to N-acetylglucosamine 6-P, by single amino acid replacements. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **421**: 77-84.

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

Conti E., Franks N., Brick P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**:287–298

Copeland Robert (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Second Edition. Wiley-VCH, Inc. New York, USA.

Cornish-Bowden A. (2002). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Third edition. Portland Press, Ltd, London.

Cornish-Bowden A. y Cárdenas M.L. (2004) Glucokinase: a monomeric enzyme with positive cooperativity. En: Matschinsky F. y col. Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. *Frontiers in diabetes*. Basel: Karger pp. 125-134.

Dill Ken, Ozkan B., Shell S. y Weikl R. (2008). The Protein Folding Problem. *Annu Rev. Biophys.* **37**:289-316.

Eaton W. A., Henry E., Hofrichter J., Bettati S., Viappiani C. y Mozzarelli A. (2007). Evolution of Allosteric Models for Hemoglobin. *IUBMB Life*, **59** (8-9):588-599.

Edelhoch Harold (1967). Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* **6** (7): 1948-1954.

Fadoulglou V., Kokkinidis M. y Glykos N. (2008). Determination of protein oligomerization state: Two approaches based on glutaraldehyde crosslinking. *Analytical Biochemistry* **373**: 404–406.

- Fisher A.J., Thompson T., Thoden J., Baldwin T. y Rayment I. (1996). The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *J Biol Chem.* **36**:21956-68.
- Fredrickson J. K., Romine F., Beliaev A. Auchtung J., Driscoll M., Gardner, Nealson K., Osterman A., Pinchuk G., Reed J., Rodionov D., Rodrigues J., Saffarini D.; Serres M.; Spormann A.; Zhulin I.; Tiedje J. (2008) Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature reviews* **6**:592- 603.
- Galperin Michael., Walker R y Koonin E. (1998). Analogous Enzymes: Independent Inventions in Enzyme Evolution. *Genome Research.* **8**: 779-790.
- Hau Heidi y Gralnick J. (2007) Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:237–58.
- Head, J.F., Inouye, S., Teranishi, K. & Shimomura, O. (2000). The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* **405**, 372-376.
- Horjales E., Altamirano M., Calcagno M., Garrant R. y Oliva (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the state T at 2.3 Å resolution. *Structure* **7**: 527-537.
- Karsten Suhre y Yves-Henri Sanejouand (2004). *ElNémo*: a normal mode web server for protein movement analysis and generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Research* **32**: 610-614.
- Lara-González S., Dixon H.B.F., Mendoza-Hernández G., Altamirano M. M. y Calcagno, M. L. (2000). On the role of the N-terminal group in the allosteric function of Glucosamine-6-phosphate desaminase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**: 219-227.
- Lara Gonzalez S. (2001) Desencadenamiento y propagación de la transición alostérica en la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química UNAM.
- Larion Miora, Salinas RK, Bruschweiler Li L., Miller BG. y Bruschweiler R. (2012) Order-Disorder Transitions Govern Kinetic Cooperativity and Allostery of Monomeric Human Glucokinase. *PLoS Biol* 10(12): *journal.pbio.1001452*
- Leloir L.F. y Cardini C. (1956) Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta*: 33-42.
- Leyn Semen, Gao F., Yang C., Rodionov D. (2012). N-Acetylgalactosamine Utilization Pathway and Regulon in Proteobacteria. Genomic Reconstruction and Experimental Characterization in *Shewanella*. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 28047-28056
- Liu Cong, Li D., Liang Y., Li L. y Su X. (2008). Ring-opening mechanism revealed by crystal structures of NagB and its ES intermediate complex. *J. Mol. Biol.* **379**, 73–81.
- Liu Zhi-Jie, Vysotski E., Chen C., Rose J., Lee J. y Bi-Cheng W. (2008). Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure. *Protein science* **9**: 2085-2093
- Lucumí A. y Calcagno M. L. (2005). On the functional role of Arg 172 in substrate binding and allosteric transition in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **1**: 41-48.

- Midelfort C. F. 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 allosteric transitions. *J. Mol. Biol* **12**: 88-118.
- Monod J., Changeux J.P., Jacob F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol Biol.*; **6**:306-291.
- 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.
- Montero Morán G. M. (2001). Estudio del mecanismo catalítico de la enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química. UNAM.
- Neet Kennet (2009). Cooperativity in Enzyme Function: Equilibrium and Kinetic Aspects. En: Purich Daniel. Contemporary Enzyme Kinetics and Mecanism: Reliable Lab Solutions. pp. 227-262
- Novick A. y Szilard L. (1950). Description of the chemostat. *Science*. **112**(2920):715–716
- Omelchenko Marina., Galperin M., Wolf Y y Koonin E.(2010). Non-homologous isofunctional enzymes : A systematic análisis of alternative Solutions in enzyme evolution. *Biology direct* **5**: 31
- 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.
- Pattabiraman T.N. (1961) Purification of glucosamine-6-phosphate deaminase from human brain. *Biochim. Biophys. Acta*: 273-283.
- Plumbridge J. A. (1991). Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* k-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* **5**: 2053-2062.
- Plumbridge J. A., Cochet O., Souza J.M., Altamirano M.M., Calcagno M.L. & Badet B (1992). Coordinated Regulation of Amino Sugar Synthesizing and Degrading Enzymes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **175**: 4951-4956.
- Plumbridge J.A. y Vimr E. (1999). Convergent phatways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and n-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**: 47-54.
- Rohl Carol A., Strauss M.E., Misura M.S. Baker D. (2004) Protein Structure Prediction Using Rosetta. *Methods in Enzymology* **383**: 66-93.
- Rudiño-Piñera E., Morales A., Trejo-Rojas P. y Horjales E. (2002). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Crystallographica Section D*. **58**, 10-20.
- Serres M. y Riley M. (2006) Genomic Analysis of Carbon Source Metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus Experiments. *Journal of Bacteriology* **188**: 4601–4609

- Schagger H. (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria, *Methods Cell Biol.* **65**: 231–244.
- Shevchenko V., Hogben M., Ekong R. Parrington J. y Lai F. (1998) The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* **216**: 31-38.
- Shibayama Naoya y Saigo S. (1995) Fixation of the Quaternary Structures of Human Adult Haemoglobin by Encapsulation in Transparent Porous Silica Gels. *Journal of Molecular Biology*, **251**: 203–209.
- Sosa-Peinado A. y González- Andrade M. (2005). Site-Directed Fluorescence Labeling Reveals Differences on the R-Conformer of 6-Phosphate Deaminase of *Escherichia coli* Induced by Active or Allosteric Site Ligands at Steady State. *Biochemistry*, Vol. 44. No. 46.
- Takeshi Tanaka, Fumikasu T., Toshiaki F., Shinsuke F., Haruyuki A. y Tadayuki I. (2005). Characterization of a Novel Glucosamine-6-phosphate deaminase from a Hyperthermophilic Archaeon. *J. Bacteriol* **187**: 7038-7044
- Uehara T, Park J. T, (2004) The *N*-Acetyl D-Glucosamine Kinase of *Escherichia coli* and Its Role in Murein Recycling. **186**: 7273-7279.
- Vincent F., Davies G. y Brannigan J. (2005). Structure and kinetics of a monomeric glucosamine-6-phosphate deaminase: missing link of the Nag B Superfamily. *J. Biol Chem.* **280**: 19649-55.
- Yang Chen; Rodionov D.; Li X.; Laikova O.; Gelfand M.; Zgnitko O.; Romine M.; Obraztsova A.; Nealson K. y Ostermn A. (2006) Comparative Genomics and Experimental Characterization of N-Acetylglucosamine Utilization Pathway of *Shewanella oneidensis*. *The Journal of biological chemistry* **40**: 29872-29885.