



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CINÉTICA
ALOSTÉRICA DE LAS DOS ISOENZIMAS DE LA
GLUCOSAMINA 6-FOSFATO DESAMINASA
HUMANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

TOMÁS FRANCO BODEK



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO LUIS CALCAGNO MONTANS
2016**



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.

Índice

Abreviaturas	2
Resumen	4
Introducción	4
- Cooperatividad y alostería.....	4
- Regulación por inhibición por sustrato.....	8
- D-Glucosamina-6-Fosfato Desaminasa.....	9
- GNPDA de <i>Escherichia coli</i>	10
- GNPDA Humana.....	13
- Estructura.....	15
- Cinética.....	17
Objetivos	19
Metodología	19
-Enzima recombinante.....	19
-Experimentos de cinética y elaboración de geles.....	20
Resultados y discusión	21
-Enzima en solución.....	21
-Enzima encapsulada.....	29
Conclusiones y perspectivas	31
Bibliografía	32

Abreviaturas

MWC: Monod-Wyman-Changeux.

TTS: Two tertiary states.

T: Estado cuaternario de baja afinidad. Cuando se refiera al estado cuaternario de una GNPDA se referirá al complejo GNPDA sin GlcNAc6P.

R: Estado cuaternario de alta afinidad. Cuando se refiera al estado cuaternario de una GNPDA se referirá al complejo GNPDA-GlcNAc6P.

t: Estado terciario de baja afinidad. Cuando se refiera al estado terciario de una GNPDA se referirá al complejo GNPDA sin GlcNAc6P.

r: Estado terciario de alta afinidad. Cuando se refiera al estado terciario de una GNPDA se referirá al complejo GNPDA-GlcNAc6P.

GNPDA: D-Glucosamina 6-fosfato desaminasa.

*Ec*GNPDA: D-Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*.

*So*GNPDA: D-Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Shewanella oneidensis*.

*h*GNPDA: D-Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Homo sapiens*.

NagBI: GNPDA con plegamiento de tipo Rossman.

NagBII: GNPDA con plegamiento tipo SIS (azúcar isomerasa sintetasa).

GNPDA1: Gen que codifica la *h*GNPDA-1.

GNPDA2: Gen que codifica la *h*GNPDA-2.

GlcNAc6P: N-acetilglucosamina 6-fosfato

GlcN6P: D-Glucosamina 6-fosfato.

GlcNol6P: 2-amino-2-desoxi-D-glucitol 6-fosfato.

Fru6P: Fructosa 6-fosfato.

NH₄⁺: Amonio.

TH: Tirosina Hidroxilasa.

K_m: Constante de Michaelis.

K_i : Constante de inhibición.

L : Constante alostérica de Monod.

V : Velocidad máxima.

v : Velocidad inicial.

k_{cat} : Constante catalítica.

h : Coeficiente de Hill.

Arg: Arginina.

Asp: Ácido Aspártico.

Phe: Fenilalanina.

Met: Metionina

Ile: Isoleucina.

Gln: Glutamina.

His: Histidina.

Leu: Leucina.

Lys: Lisina.

Ser: Serina.

Thr: Treonina.

Tyr: Tirosina

PDB: Protein Data Bank.

DC: Dicroísmo circular.

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

HCl: Ácido clorhídrico.

NaOH: Hidróxido de sodio.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano. 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EtOH: Etanol.

Resumen

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa (GNPDA, EC 3.5.99.6) o NagB es una enzima esencial en el metabolismo de aminoazúcares y ha sido descrita en diferentes organismos, desde bacterias hasta insectos y vertebrados terrestres, pero se encuentra ausente en plantas verdes. Esta enzima cataliza la conversión reversible de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) a D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) y amonio (NH_4^+) y posee un comportamiento alostérico, utilizando la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P) como su activador alostérico. La forma más estudiada de esta enzima pertenece a *Escherichia coli*, en la cual se encuentra como una proteína hexamérica con una cinética cooperativa en ausencia de su ligante alostérico y una activación K típica cuando se satura con este.

En vertebrados terrestres existen dos genes que codifican dos isoformas distintas de esta enzima, *GNPDA1* y *GNPDA2* dando lugar a cadenas de 289 y 276 residuos respectivamente, de estas dos isoformas *hGNPDA-1* ha sido estudiada cinéticamente y se encontró que poseía una activación alostérica cruzada, llamada antiérgica, de tipo K^V^+ y no posee actividad notable en ausencia de GlcNAc6P.

En este trabajo se estudió la cinética de la *hGNPDA-2* en solución y nanoencapsulada en sol-gel de ortosilicato y se encontró que posee una cinética antiérgica de tipo K^V^+ muy similar a la de *hGNPDA-1* pero con constantes distintas; además parece poseer un efecto de cooperatividad homotrópica por el sustrato a altas concentraciones de GlcNAc6P y una ligera inhibición por sustrato. Al encapsular la enzima encontramos que esta inhibición se encuentra ligada a la transición alostérica cuaternaria.

Introducción

Cooperatividad y Alostiería

La mayoría de las enzimas presentan un comportamiento cinético hiperbólico que obedece la ecuación Michaelis-Menten. Para incrementar la velocidad de una reacción que obedezca el modelo Michaelis-Menten de $0.1V$ a $0.9V$, donde V es la velocidad máxima de esta reacción, se requiere incrementar la concentración del sustrato desde un noveno de su K_m hasta nueve veces su K_m (de $\frac{1}{9}K_m$ a $9K_m$), lo que significa un aumento de 81 veces la concentración del sustrato. De esta misma forma, una reacción sometida a inhibición competitiva necesita un aumento de 81 veces su K_i en la concentración del inhibidor para bajar la actividad de $0.9V$ a $0.1V$ (11, 23).

Al necesitar una variación tan grande en las concentraciones de sustratos e inhibidores, este tipo de control sería insuficiente en un sistema que sostiene la concentración de metabolitos en un rango muy estrecho, esto ha causado la aparición de otros sistemas de regulación en la célula que puedan ser muy sensibles a las variaciones en la concentración de los metabolitos y que no obedezcan el comportamiento de cinética hiperbólica. Uno de estos sistemas de regulación es la *cooperatividad*, llamado así por que deriva de una "cooperación" entre los sitios de unión en las macromoléculas oligoméricas cuyas subunidades actúan de manera no independiente entre ellas. Esto modifica la afinidad aparente de los sitios de unión a un ligante entre mayor sea la saturación de los otros sitios de unión en la misma molécula.

La cooperatividad se encuentra caracterizada por una curva sigmoide cuando se grafica la función de saturación de la macromolécula contra la concentración del ligante. Esto puede describirse de manera conveniente utilizando esta expresión empírica conocida como la **ecuación de Hill** (ecuación 1) (23), donde v corresponde a la velocidad inicial de reacción, V a la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción, $K_{0.5}$ al igual que K_m en la cinética hiperbólica, es definido como el valor de la concentración del sustrato $[S]$ cuando $v = 0.5V$ y S es la concentración inicial del sustrato. El coeficiente de Hill (h) es un coeficiente empírico que describe el grado de cooperatividad de una enzima; una enzima no cooperativa con un comportamiento hiperbólico posee un coeficiente de Hill igual a uno ($h=1$). Se denomina *cooperatividad positiva* a la desviación de la cinética hiperbólica caracterizada por $h > 1$ y *cooperatividad negativa* a la desviación de la cinética hiperbólica caracterizada por $h < 1$ (figura 1). El valor de este coeficiente no puede superar al número de sitios de unión que posee un oligómero (42).

$$v = \frac{V[S]^h}{K_{0.5S}^h + [S]^h}$$

Ecuación 1. Ecuación de Hill.

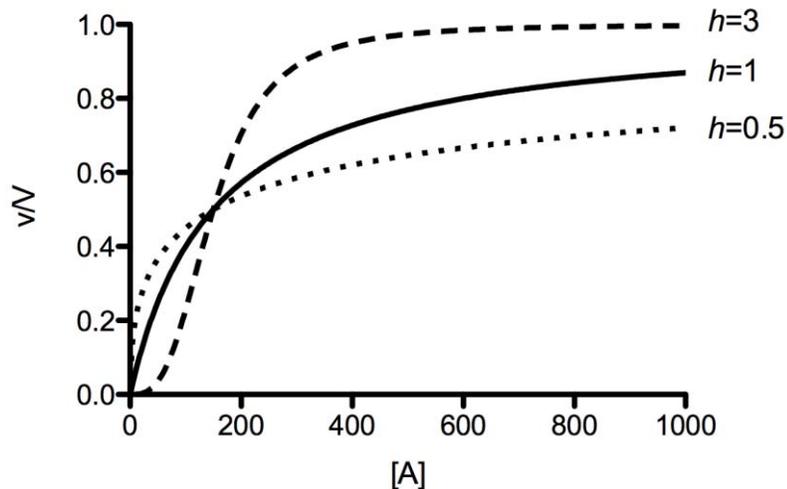


Figura 1. Simulaciones de la ecuación de Hill con diferentes coeficientes de Hill, $K_{0.5}=150$ y $V=1$. Cuando el coeficiente de Hill es 1, la curva de saturación es hiperbólica. Al incrementar el coeficiente de Hill la curva de saturación se torna sigmoide y la afinidad aparente por el sustrato se encuentra en aumento, lo que indica la aparición de cooperatividad. Al disminuir el coeficiente de Hill la afinidad aparente por el sustrato disminuye, lo que es llamado cooperatividad negativa.

Varias enzimas cooperativas son también alostéricas, sin embargo esto no significa que estos dos fenómenos sean causados por el mismo mecanismo ya que expresan dos propiedades distintas de las moléculas. Históricamente se ha considerado cooperatividad al efecto homotrópico, el cual indica el acoplamiento energético de dos ligantes iguales unidos a la macromolécula mientras que alostería ha sido considerado al efecto heterotrópico, el cual indica el acoplamiento energético de dos ligantes distintos uniéndose a la macromolécula (15).

Un sitio alostérico es definido por Aron Fenton como el sitio de unión en la proteína al cual se une el efector alostérico (16). Este efector no es químicamente idéntico al sustrato, produce un cambio en una propiedad funcional de la proteína y además se une a un sitio topográficamente distinto del sitio funcional de la proteína.

Uno de los modelos utilizados para describir la interacción que existe entre una proteína alostérica y su ligante ha sido propuesto por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965 (27). El modelo de MWC postula que una proteína alostérica es un oligómero cuyos protómeros (subunidades idénticas dentro de un oligómero, llamadas así por Monod, Wyman y Changeux) se encuentran asociados en posiciones equivalentes de tal forma que existe al menos un eje de simetría y la conformación de cada protómero se encuentra restringida por su asociación con los otros protómeros. Para cada ligante capaz de formar un complejo estereoespecífico con la proteína solo existe un sitio por protómero al cuál éste se puede unir. También postula que existen al menos dos estados: T (tenso) y R (relajado), diferenciados por la distribución y/o energía de los contactos inter-protoméricos, y también por las constricciones de los protómeros. Este efecto altera la afinidad de uno o más de los sitios estereoespecíficos cuando hay una transición de un estado al otro, confiriéndoles constantes de disociación intrínsecas distintas y provocando así cooperatividad, esta transición no altera la simetría de la molécula. Todas las subunidades del oligómero se encuentran en el mismo estado (T o R), sin que existan estados intermedios. La expresión matemática del modelo (ecuación 2) toma en cuenta las constantes macroscópicas de afinidad a los ligantes del oligómero, el número de subunidades que este posee, la relación entre las constantes intrínsecas de disociación y la proporción inicial que existe entre las formas T y R . Un ligante alostérico es capaz de desplazar el equilibrio T - R , estabilizando la forma R si es activador o la forma T si es inhibidor.

$$\bar{Y} = \frac{L_0 c \alpha (1 + c \alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}}{L_0 (1 + c \alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Ecuación 2. Ecuación de MWC donde n corresponde al número de subunidades que posee la proteína, c corresponde a la relación que existe entre las constantes intrínsecas de disociación entre la forma T y la R y se expresa como $c = K_R/K_T$; donde $K_R = \prod_0^n \{[RA_{n-1}] [A] / [RA_n]\}$ y $K_T = \prod_0^n \{[TA_{n-1}] [A] / [TA_n]\}$, las K son las mismas para cada unión, de 0 a n , $\alpha = [S]/K_R$, L_0 corresponde a la proporción inicial entre la forma T y la R y se expresa como $L_0 = [T_0]/[R_0]$.

Este modelo también supone la existencia de tres tipos de sistemas (11, 38):

- Sistema K : una enzima con un sistema K modifica su afinidad aparente por su sustrato; aumentando la K si se trata de un sistema K^- (disminuye la afinidad de la enzima por su sustrato) o disminuyendo la K si se trata de un sistema K^+ (aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato) mientras la V se mantiene incambiada.

- Sistema V : una enzima con un sistema V modifica su velocidad máxima sin modificar su afinidad aparente por el sustrato. Un sistema V^+ es aquel que aumenta su V mientras que un sistema V^- disminuye su V .
- Sistema mixto $K-V$: un sistema $K-V$ es aquel en el cual existe tanto un cambio K , como uno V . Para el cambio cruzado en el cual la V aumenta mientras que la K_m también aumenta (K^+V^+) o viceversa (K^-V^-), Alvarez Añorve y col. han propuesto para este último caso, que es muy poco frecuente, el nombre de “efecto antiérgico” (1).

Eaton y colaboradores proponen un modelo que, partiendo de los postulados del modelo de MWC, le agregan el concepto de acoplamiento terciario-cuaternario incompleto, este modelo fue denominado TTS (Two Tertiary States) por sus autores. En el modelo clásico, la enzima en R tiene todas sus subunidades en el mismo estado terciario, llamémosle r , y otro tanto sucede en T , llamémosle t . En el modelo TTS, la forma T contiene algunas subunidades en r y la forma R contiene o puede contener algunas subunidades en t , pero se asume que T predispone a las subunidades a adquirir la conformación terciaria t , y R predispone a que las subunidades adquieran la conformación r . Estas conformaciones de alta y baja afinidad por los ligantes, t y r en concordancia con el modelo de MWC, existen en equilibrio con cada estructura cuaternaria. En este modelo la afinidad por los ligantes depende solamente de la conformación terciaria de la subunidad y no de la estructura cuaternaria. Las subunidades experimentan la transición terciaria en forma secuencial debido a que el cambio $t \rightarrow r$ está acoplado al equilibrio de T a R , que implica un cambio conformacional cuaternario el modelo TTS presenta a la transición cuaternaria como causa de la cooperatividad, tal y como se describe en el modelo MWC (46).

Regulación por inhibición por sustrato

La inhibición por sustrato se refiere a un efecto en el cual la curva de velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato alcanza un máximo para después descender a cero o a algún valor asintótico mayor a cero. Este efecto aparece comúnmente en enzimas alostéricas; ya sea con un segundo sitio de unión para su mismo sustrato (complejo sustrato-enzima-sustrato o SES), o algún ligante (efector) distinto (ligante-enzima-sustrato o AES) (34). Este tipo de inhibición puede ser descrito por la ecuación de inhibición por sustrato (ecuación 3), la cual a su vez puede ser modificada para tomar en cuenta una unión cooperativa del sustrato (ecuación 4) (11, 23).

Un ejemplo de inhibición por sustrato como mecanismo de regulación es el de la Tirosina hidroxilasa (TH), la cual cataliza el primer paso en la síntesis de la dopamina (tirosina → L-Dopa) en las neuronas. Debido a que la concentración de tirosina en el cerebro puede llegar a duplicarse después del consumo de alimentos, la inhibición por sustrato ayuda a mantener constante la concentración de dopamina presente, impidiendo que los niveles de dopamina experimenten un brusco aumento postprandial (35).

$$v = \frac{V[S]}{K_{0.5S} + [S](1 + \frac{[S]}{K_I})}$$

Ecuación 3. Ecuación de Inhibición por sustrato.

$$v = \frac{V[S]^h}{K_{0.5S}^h + [S](1 + \frac{[S]^h}{K_I})}$$

Ecuación 4. Ecuación de inhibición por sustrato y cooperatividad.

D-Glucosamina-6-Fosfato Desaminasa

La D-Glucosamina-6-fosfato desaminasa (nombre sistemático 2-amino-2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato cetol isomerasa (desaminante), abreviada como GNPDA, EC 3.5.99.6) es una enzima esencial en el metabolismo de aminoazúcares y ha sido descrita en diferentes organismos, desde arqueas, bacterias, hongos, insectos hasta vertebrados, pero se encuentra ausente en plantas verdes (4, 9, 14, 25, 26, 32, 41).

La GNPDA cataliza la conversión reversible de la D-glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) a D-fructosa-6-fosfato (Fru6P) e ion amonio (NH_4^+) (figura 2).

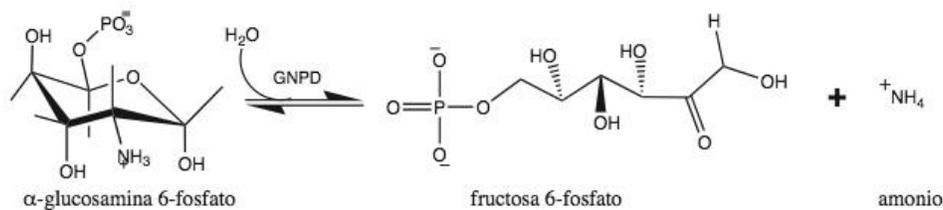


Figura 2. Reacción catalizada por la GNPDA. Modificada de Diego Alonzo 2012.

Esta enzima ha sido encontrada como monómero (41), dímero (20) y hexámero (31, 37) con plegamiento tipo Rossman (NagBI) o como un dímero con plegamiento SIS (NagBII) (40). Además, presenta comportamiento alostérico en sus formas no monoméricas, utilizando la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P) como efector alostérico. Tanto la GlcN6P como la GlcNAc6P son precursores de la mureína de la pared celular y de los lipopolisacáridos la membrana externa de las bacterias (2). También pueden utilizarse como fuentes de carbono (33), haciendo a la GNPDA una enzima importante en el catabolismo de aminoazúcares.

GNPDA de *Escherichia coli*

La forma más estudiada de esta enzima pertenece a *Escherichia coli* (*Ec*GNPDA), en la cual se encuentra como una proteína hexamérica con plegamiento tipo NagBI con una cadena de 266 residuos de aminoácidos y una masa de 29 kDa por monómero. El monómero de la *Ec*GNPDA es una estructura típica α/β abierta formada por 7 hebras β paralelas que constituyen una hoja β central rodeada de 8 hélices α y una hélice de doble vuelta (figura 3). Una segunda hoja β anti-paralela de 3 hebras aparece como continuación de la hebra β C por su C-terminal. La unidad biológica posee un eje cristalográfico de orden tres, y tres ejes de orden dos perpendiculares al de orden tres, que resulta en una simetría interna del tipo 32. El hexámero puede ser descrito como un trímero de dímeros o un trímero de dímeros dependiendo de la orientación del eje de simetría de orden tres con respecto al plano de observación (31, 32). El hexámero tiene seis sitios catalíticos por subunidad, y seis sitios alostéricos formados en las interfases de las subunidades. El plegamiento de cada monómero de la enzima se asemeja a aquél presente en un dominio de unión a NAD (figura 3). Esta enzima posee una cinética cooperativa en ausencia de GlcNAc6P y pierde su cooperatividad en presencia de GlcNAc6P a favor de una activación tipo K (figura 4).

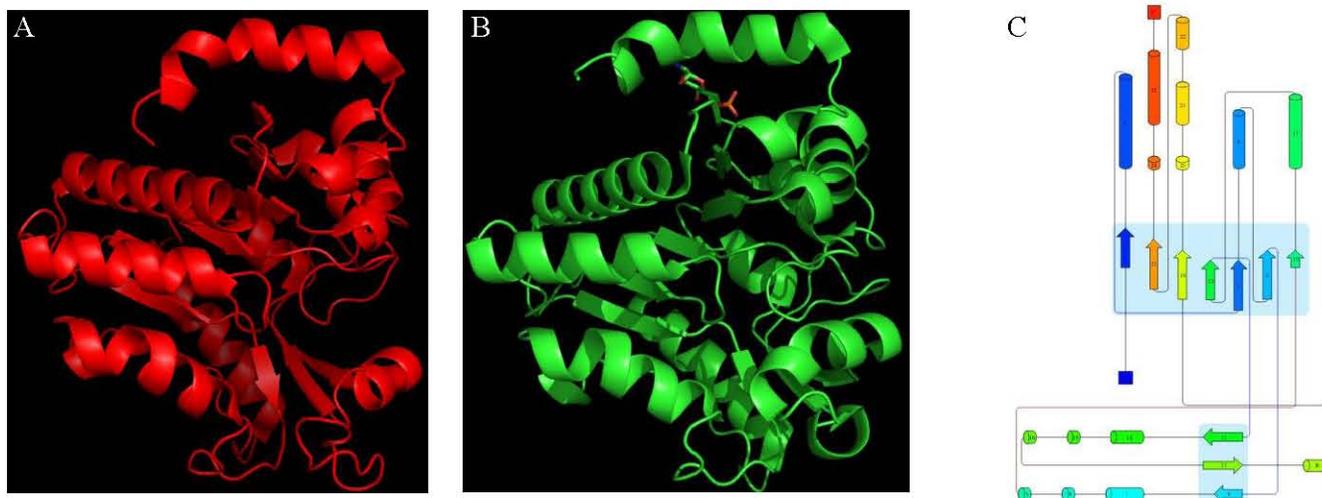
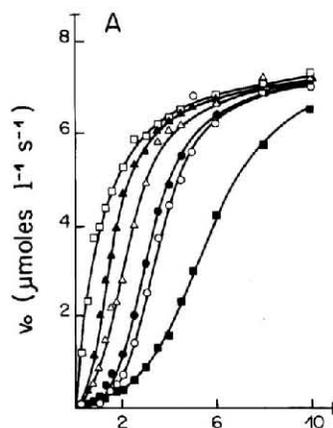


Figura 3. **A.** Monómero de *EeGNPDA* en su estado *T* (PDB 1FSF). **B.** Monómero de *EeGNPDA* en su estado *R* con GlcNAc6P (PDB 1FSZ). **C.** Plegamiento de Rossman característico de de las desaminasas NagBI.



h_{\max}	$k_{\text{cat}}(s^{-1})$	$K_m(\text{mM})$	$K_{AR}(\text{mM})$	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1} \times 10^5$)	c	L_0
3.02 ± 0.09	295 ± 15	2.01 ± 0.05	2.9 ± 0.1	145	0.02	10×10^3

Figura 4. Velocidades iniciales de la reacción de *EeGNPDA* contra concentración de GlcN6P a diferentes concentraciones fijas de GlcNAc6P. Las concentraciones de activador son 0 μM (\blacksquare); 5 μM (\circ); 10 μM (\bullet); 25 μM (Δ); 50 μM (\blacktriangle); 2.5mM (\square). El experimento fue hecho con 2nM de desaminasa final. Los datos se analizaron con la ecuación de MWC (tomado de Altamirano y colaboradores, 1995).

El mecanismo de reacción para la *EcGNPDA* ha sido propuesto por Oliva y colaboradores (31) y profundizado por Montero-Morán y colaboradores (figura 5) (29).

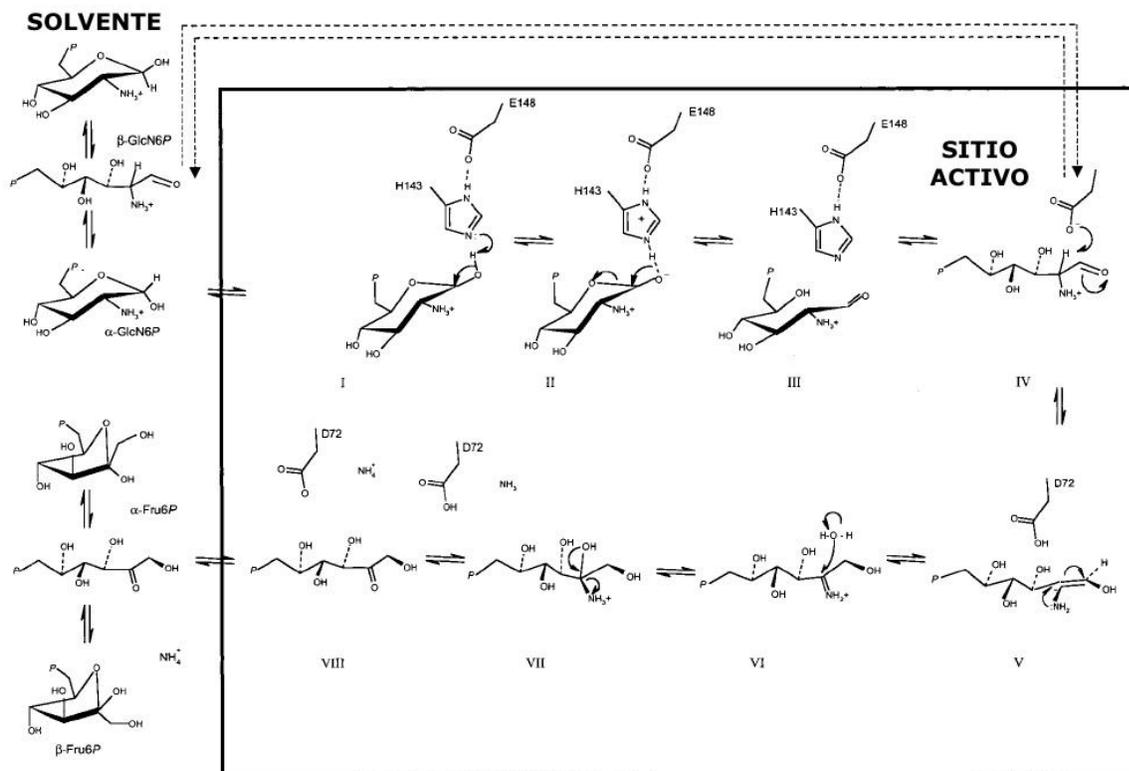


Figura 5. Mecanismo de reacción propuesto para la *EcGNPDA*. Las líneas punteadas corresponden al equilibrio de unión de la forma aldehído del sustrato (modificado de Montero-Morán y col., 2001).

La reacción inicia por la abstracción de un protón en el C₁, lo que causa la apertura del anillo de piranosa. El O₅ de la cadena abierta hace contacto con el Nε2 de la His143, abstrayendo el protón del grupo hidroxilo del carbono anomérico de la piranosa-GlcN6P. El grupo imidazol pierde su carga al O₅, completando así la apertura del anillo (pasos I a III de la figura 5). Esta histidina funciona como la base del rotámero, manteniendo al grupo OPO₃ fijo; esto le permite a la cadena de carbonos girar sobre este grupo (Paso III y IV de la figura 5). Este giro reposiciona el protón del C₂ aproximándolo al carboxilato de Asp72, el cual tiene un pK anormalmente alto (9). El amonio cargado positivamente de la GlcN6P podría estabilizar la carga negativa de este grupo.

El Asp72 cataliza la enolización del aminoazúcar al sustraer un protón del C₂ formando un intermediario *cis*-enolamina. Este protón luego es transferido al O₁ localizado en el C₁ (pasos IV y V de la figura 5).

Una molécula de agua interactúa con el C₂ de la fructosimina-6-fosfato, hidroxilándolo, formando un intermediario inestable. Por medio de un paso concertado el Asp 72 desprotona al hidroxilo formado en el paso anterior y se libera el ion amonio (pasos VI a VIII de la figura 5).

GNPDA Humana

Mientras que bacterias y arqueas generalmente poseen un tipo de desaminasa (algunos como *Bacillus subtilis* pueden poseer dos formas parálogas), en vertebrados terrestres han sido descritas dos isoformas. Éstas han sido encontradas y caracterizadas en bovino (*Bos primigenius taurus*) (21), perro (*Canis lupus familiaris*) (22), hamster (*Metacrycetus auratus*) (45) y humano (*Homo sapiens*) (1, 3, 28).

En humano las dos isoformas que existen de desaminasa, llamadas *hGNPDA-1* y *hGNPDA-2*, se encuentran codificadas en los genes *GNPDA1* y *GNPDA2* respectivamente. *GNPDA1* se encuentra en el cromosoma 5 (banda 5q31) (39) y codifica una cadena de 289 residuos mientras que *GNPDA2* se encuentra en el cromosoma 4 (banda 4p13) (3, 43) y codifica una cadena de 276 residuos. Las dos isoformas poseen una identidad de 87% y una similitud de 94.5% entre sí (figura 6) y se encuentran expresadas en una amplia gama de tejidos con *GNPDA2* siendo prominentemente expresado en testículo y ovario (figura 7).

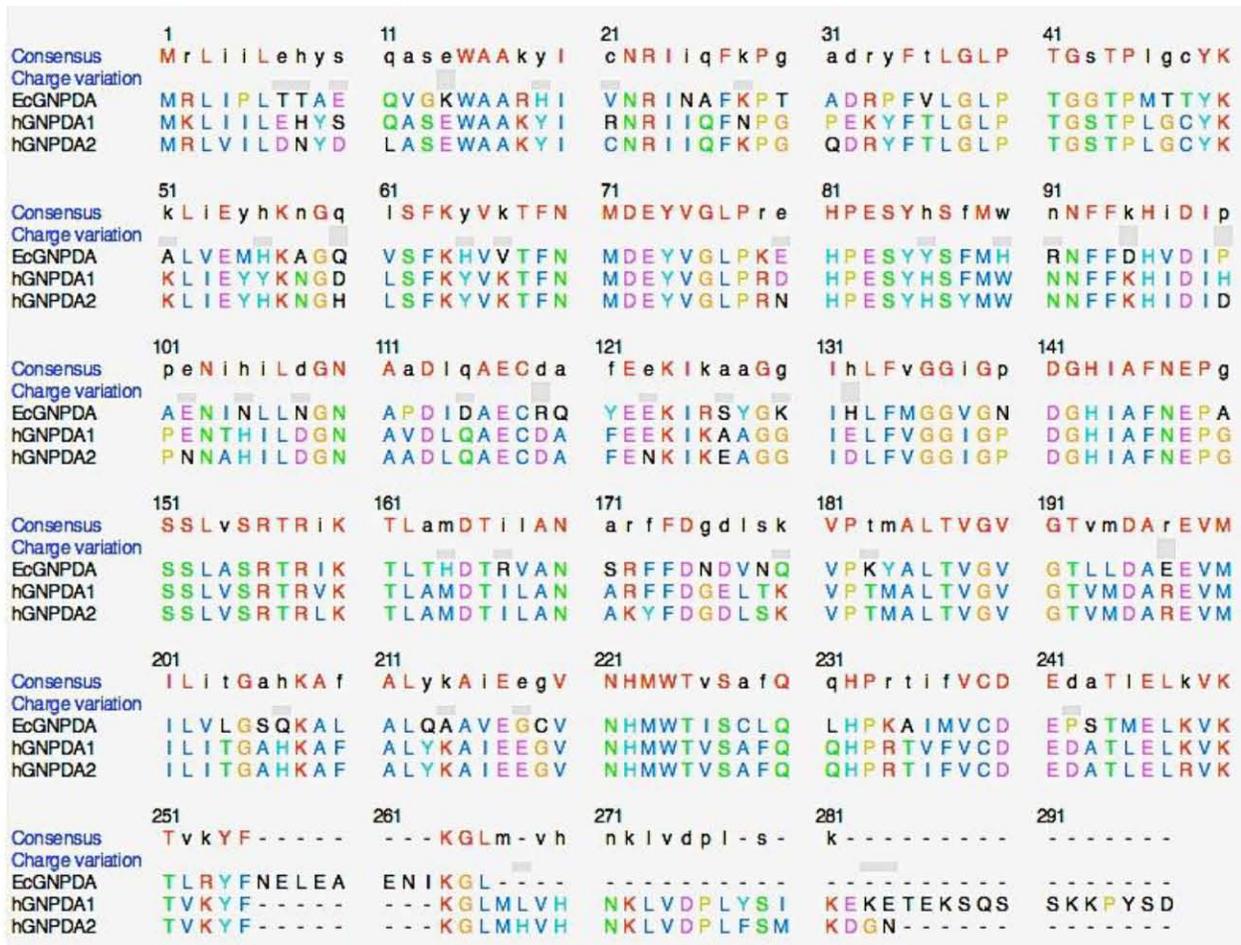


Figura 6. Alineamiento de las secuencias de GNPDA de *E. coli*, GNPDA1 de *H. sapiens* y GNPDA2 de *H. sapiens*. La identidad de *hGNPDA-2* con respecto a su paróloga es de 87.32%. La identidad de *hGNPDA-2* respecto a su ortóloga es de 60.08% (porcentajes de identidad obtenidos con Clustal 2.1).

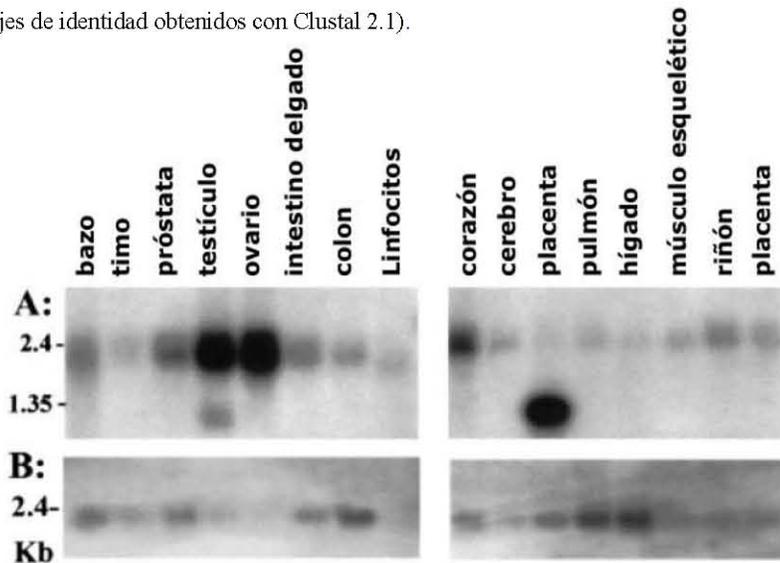


Figura 7. Expresión de mRNA de *GNPDA2* (A) y *GNPDA1* (B) en diferentes tejidos humanos (modificado de Zhang, *et al*, 2003).

Estructura

De las dos enzimas humanas, *hGNPDA-1* es la que ha sido más estudiada tanto cinética como estructuralmente. Su estructura cristalográfica fue resuelta a 1.75 Å (3) (PDB ID: 1NE7) (figura 8) en su conformero *R* únicamente ya que no se logró cristalizar en la forma *T*. La estructura cristalográfica de *hGNPDA-2* fue resuelta a 2.5 Å mas no publicada ni depositada en el PDB debido a la dificultad de afinamiento de la estructura obtenida que consiste en una unidad asimétrica de 12 cadenas polipeptídicas (Y. Pedraza, datos no publicados). Este trabajo inédito se llevó a cabo solamente con la estructura en *R* y utilizando citrato como ligante de unión al sitio activo ya que al igual que *hGNPDA-1* no pudo ser cristalizada en su conformación *T*.

Las proteínas *hGNPDA-1* y *hGNPDA-2* comparten el mismo plegamiento con *EcGNPDA*, sin embargo las desaminasas humanas poseen una cadena más larga de residuos con grandes diferencias en el C-terminal a partir del residuo Leu258. *hGNPDA-1* presenta una hélice entre los residuos 259 y 266 seguida de un asa extendida en los residuos 267 a 274 que no se presentan en *EcGNPDA*. Esta asa ancla la estructura helicoidal (residuos 249-266), que sirve de soporte para el asa formada por los residuos 240-249, que a su vez es responsable de las interacciones intermonoméricas cercanas al eje de simetría de orden dos del hexámero (figura 9). Esta superficie intermonomérica es flexible en *EcGNPDA* y se encuentra asociada a la transición alostérica. Al ser el ancla del C-terminal de *EcGNPDA* mucho más flexible que la encontrada en *hGNPDA-1* Arreola y colaboradores (3) sugieren que esta es una de las propiedades estructurales que generan diferencias entre los comportamientos alostéricos de estas enzimas.

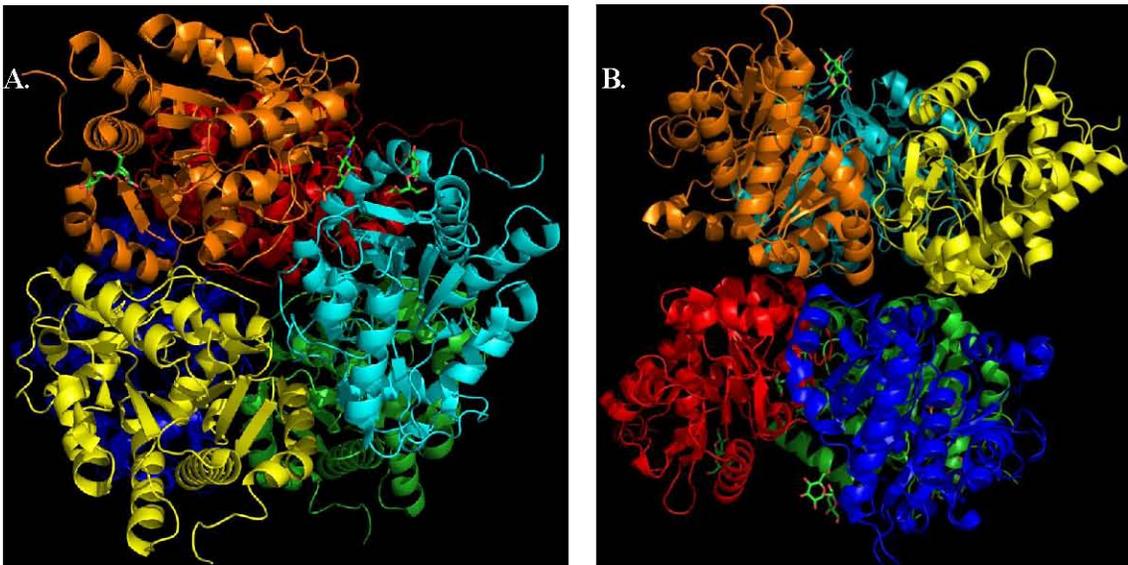


Figura 8. Hexámero de *hGNPDA-1* en su estado *R* unida GlcNA6P (PDB 1NE7). **A.** Observándolo desde su eje de simetría de orden 3. **B.** Vista lateral de la misma molécula.



Figura 9. Sobreposición de los monómeros de *EcGNPDA* (cadena azul) y *hGNPDA-1* (cadena verde) en su estado *R*.

Los residuos del sitio activo en *hGNPDA-1* y *EcGNPDA* se encuentran conservados, sin embargo la geometría de este motivo no es igual en las dos moléculas ya que *hGNPDA-1* muestra conformaciones alternas entre sus monómeros. El grupo fosfo del inhibidor competitivo, 2 amino-2-desoxi-D-glucitol-6-fosfato (GlcNol6P), puede unirse a la Ser43 y la Arg172 en un monómero y en otro monómero sólo a la Arg172. Este fenómeno no ha sido reportado en *EcGNPDA*. *hGNPDA-2* posee dos diferencias en su sitio activo cuando es comparada con *hGNPDA-1* y *EcGNPDA*: mientras que *hGNPDA-1* y *EcGNPDA* poseen una arginina en la posición 172 y fenilalanina en la 173 (Arg172 y Phe173); *hGNPDA-2* posee una lisina y una tirosina en esas posiciones respectivamente (Lys172 y Tyr173) (figura 10).

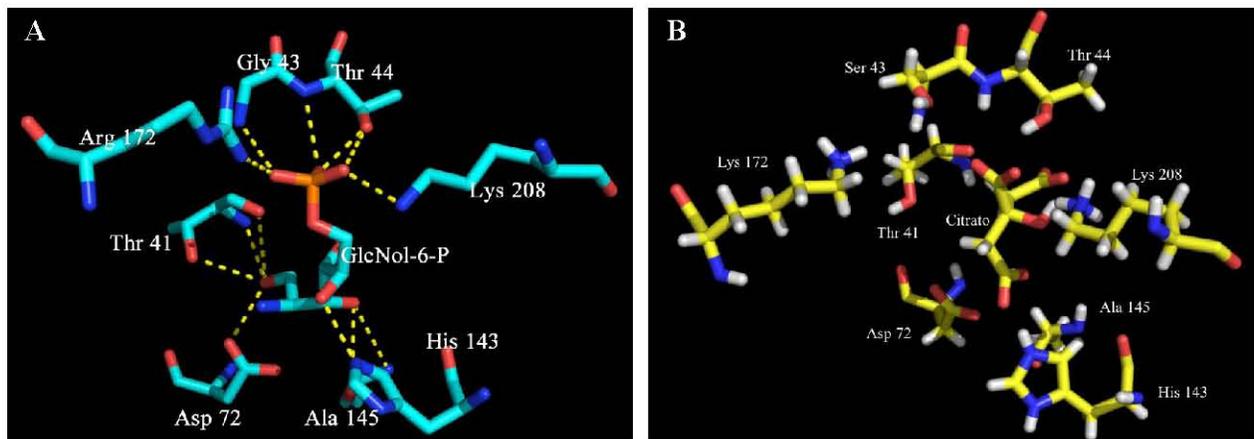


Figura 10. A. Residuos del sitio catalítico en *hGNPDA-1* utilizando como ligante el inhibidor competitivo GlcNol6P con la enzima en su estado *R* (PDB: 1NE7). **B.** Residuos del sitio catalítico de *hGNPDA-2* utilizando citrato como ligante al sitio activo con la enzima en su estado *R* (Y. Pedraza, datos no publicados). A esta estructura se le agregaron los hidrógenos utilizando MolProbity Ver. 4.1.

El sitio alostérico de *hGNPDA-1* y *hGNPDA-2* se encuentra localizado en una hendidura entre dos monómeros (figura 11) al igual que en *EcGNPDA* y es una zona altamente conservada entre las tres enzimas.

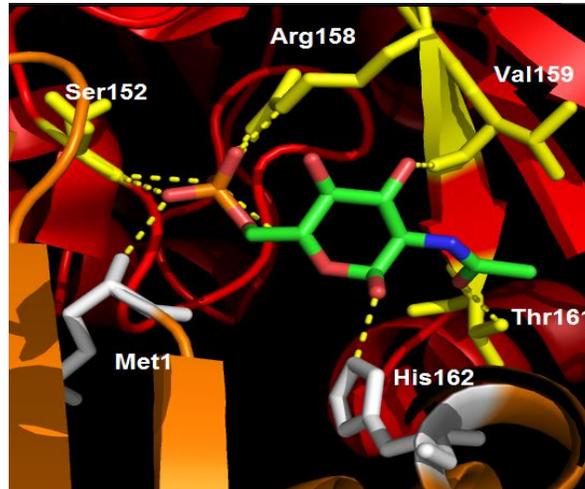


Figura 11. Sitio alostérico de la *hGNPDA-1* con GlcNAc6P unido. Los residuos que rodean a la GlcNAc6P son la Met1, Ser152, Arg158, Val 159, Thr161 e His162.

Cinética

Álvarez-Añorve y colaboradores describieron a la *hGNPDA-1* como un sistema antiérgico de tipo K^-V^+ sin cooperatividad homotrópica por la GlcN6P, en el cual la GlcNAc6P funciona como un activador V y un inhibidor K , esto es, que la k_{cat} aparente aumenta con la concentración de la GlcNAc6P mientras que la afinidad por el sustrato disminuye. En ausencia de GlcNAc6P la k_{cat} aparente de la enzima es tan baja que la GlcNAc6P se comporta como un activador esencial. Además encontraron inhibición por sustrato dependiente de la concentración del activador (figura 12) (1).

Para poder describir este sistema utilizaron una modificación de la ecuación de MWC (ecuación 5) que considera que la forma T es no catalítica ya que su actividad es despreciable a comparación de la actividad de la forma R (tablas 1.1 y 1.2).

$$v = \frac{V[\alpha(1+c)^5]}{L_0 \frac{eA}{K_{AR}} \left(1 + \frac{eA}{K_{AR}}\right)^6 + (1+c\alpha)^6 + (1+\alpha)^6}$$

Ecuación 5. Modificación de la ecuación de MWC en la cual se toma en cuenta que la GlcN6P se une con mayor afinidad al conformero T , pero es solo el conformero R es activo; además la GlcNAc6P se une a ambas formas de la molécula pero tiene una mayor afinidad a la forma R . S y A son las concentraciones de GlcN6P y GlcNAcP respectivamente; K_r y K_{AR} son las constantes de disociación microscópicas de S y A respectivamente para el estado R . L_0 es la constante alostérica de Monod; $c = K_R/K_T$ y $e = K_{AR}/K_{AT}$.

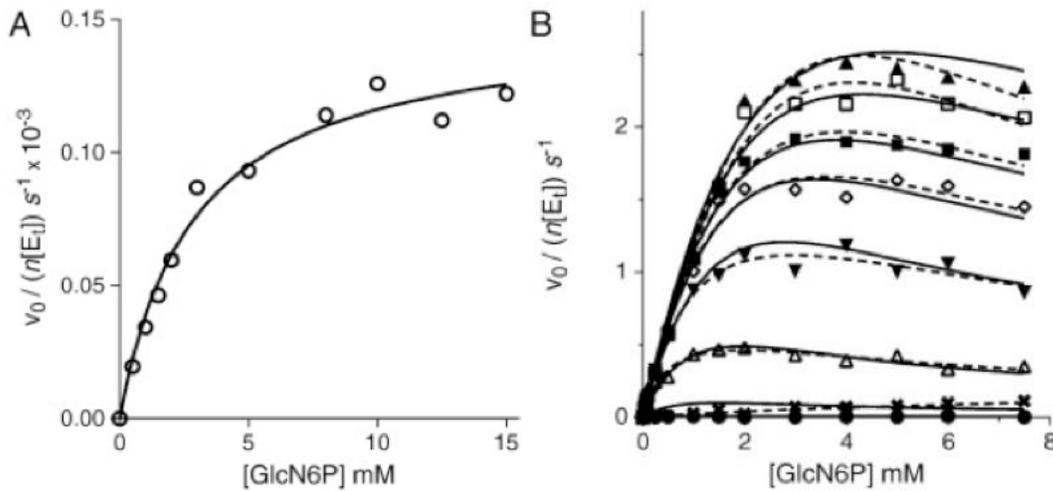


Figura 12. Velocidades iniciales divididas sobre la concentración de subunidades de la enzima (v_0/nE_i) graficadas contra concentración del sustrato en el sentido desaminante de la reacción ($n = 6$ sitios/mol). **A** corresponde a la cinética en ausencia de ligante alostérico con la enzima a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$. **B** corresponde a las cinéticas a concentraciones constantes de GlcNAc6P: 0 mM (\bullet); 0.025 mM (\times); 0.05 mM (Δ); 0.10 mM (∇); 0.15 mM (\diamond); 0.20 mM (\blacksquare); 0.30 mM (\square); 0.50 mM (\blacktriangle). Las líneas punteadas corresponden a un ajuste individual a la ecuación de inhibición por sustrato (ecuación 3), mientras que las líneas ininterrumpidas corresponden a un ajuste global a la ecuación 5. La concentración de enzima utilizada fue de 15 nM (Tomado de Álvarez-Añorve, 2011).

GlcNAc6P (mM)	$k_{\text{cat}} (s^{-1})$	K_M (mM) o $K_{0.5}$ (mM)	K_{IS} (mM)
0	0.14 ± 0.1	0.27 ± 0.1	-
0.5	228 ± 35	16.5 ± 2.8	1.3 ± 0.2

Tabla 1.1 Valores cinéticos de $h\text{GNPDA-1}$ (figura 12) ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten en ausencia de GlcNAc6P y a la ecuación 3 estando saturada de GlcNAc6P.

	$k_{cat}(s^{-1})$	$K_{RS}(mM)$	$K_{AR}(mM)$	e	c	L_0
Ajuste Global	260±40	8±1.9	2.9±0.1	0.09±0.01	2.3±0.1	20x10 ⁴

Tabla 1.2 Valores cinéticos de *h*-GNPDA-1 (figura 12) ajustados a la ecuación 5.

Objetivo

- Estudiar cinéticamente a la D-Glucosamina-6-fosfato Desaminasa humana isoforma II tanto en solución como encapsulada en Sol-Gel de sílice.

Objetivos Particulares

- Realizar experimentos de cinética con la D-Glucosamina-6-fosfato Desaminasa humana isoforma II en presencia y en ausencia de GlcNAc6P en solución.
- Encapsular a la enzima en sol-gel de ortosilicato en su forma T.
- Realizar experimentos de cinética con la enzima encapsulada en T en presencia y ausencia de GlcNAc6P.

Metodología

Los reactivos fueron comprados a Sigma-Aldrich. La GlcNAc6P fue producida en el laboratorio de acuerdo al procedimiento descrito por Montero-Morán y col. (30).

Enzima recombinante

La sobreexpresión de la enzima recombinante fue previamente llevada a cabo por el pasante de la licenciatura de Investigación Biomédica Básica Gilberto R. Rojina en colaboración con el estudiante de doctorado Yagual Pedraza del Instituto de Biotecnología de la UNAM (datos no publicados). El gen fue

mandado a sintetizar y se insertó en un plásmido pET21 (+) entre los sitios de restricción NdeI 5' y HindIII 3'. La enzima fue sobreexpresada en una cepa BL-21 Δ ag de *E. coli* utilizando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y purificada por cromatografía de afinidad alostérica en una columna de 6-aminohexaonil-glucosamina-6-fosfato-agarosa, eluida con GlcNAc6P 0.01 M. La enzima fue precipitada en sulfato de amonio 70% de saturación y guardada a 4°C.

Experimentos de cinética y elaboración de geles

Para llevar a cabo los experimentos de cinética, la enzima fue dializada contra un total de 8×10^9 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8 a 4°C con tres cambios para eliminar el sulfato de amonio en el cual se encontraba precipitada, así como la GlcNAc6P remanente de la elución. Al segundo cambio de amortiguador se le agregó fosfatasa alcalina de bovino y se dejó durante toda la noche para eliminar completamente la GlcNAc6P residual. Después de ser dializada, la enzima fue conservada en 50% glicerol a -20°C. Su concentración final fue determinada por su absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de absortividad molar calculado con el método de Edelhoch ($\epsilon_{M 280}$ de $18.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (13).

Los experimentos de cinética fueron llevados a cabo en el sentido desaminante de la reacción, cuidando que la reacción no avanzara más del 5% (el avance fue menor al 1% en casi todos los casos), esto nos permitió medir las velocidades iniciales de reacción a diferentes concentraciones de ligante alostérico y los datos fueron procesados por regresión no lineal utilizando el programa Prism ver. 5 para MacOS. La reacción se lleva a cabo en un volumen total de 200 μ L que contiene 100 mM de amortiguador Tris-HCl (pH 8) calculando el cambio de pH conforme a la temperatura para obtener un pH final de 7.7 (el coeficiente de temperatura del Tris es de 0.03 unidades de pH por °C) (19), 25 mM de EDTA (pH 7.7), 15 nM de *h*GNPDA-2 y concentraciones variables de GlcN6P y GlcNAc6P en un baño a 30°C durante diez minutos. La reacción es desencadenada con la adición de la enzima a la mezcla y es detenida por la adición de 2 mL de HCl 10 M. La concentración de Fru6P obtenida es medida por el método de Roe (36) de resorcinol-HCl, desarrollando color a 70°C y las lecturas de absorbancia fueron tomadas a 512 nm (9). Las velocidades iniciales fueron calculadas en ausencia y presencia del ligante alostérico GlcNAc6P con ayuda de una curva de calibración utilizando D-fructosa-6-fosfato a concentraciones conocidas.

La enzima también fue nanoencapsulada en sol-gel porosos de sílice utilizando el método de Bettati y colaboradores (5) excepto que el amortiguador de diálisis utilizado fue Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5 (44) y almacenados en amortiguador Tris 10 mM pH 7.0 a 4°C. Estos geles se encontraban listos para ser utilizados 48 horas después de haber sido sintetizados. La *h*GNPDA-2 fue encapsulada en ausencia de

ligandos para producir geles en su forma *T* y se espera que la conformación cuaternaria fuese totalmente en *T*, al igual que en *EcGNPDA* (6). Los monolitos fueron microdisgregados utilizando un sonicador con 3 a 4 pulsos de 5 minutos cada uno a una amplitud de 1%. Una vez molidos, los geles se dejaron sedimentar durante 24 horas y fueron lavados tres veces con amortiguador Tris 10 mM pH 7.0 para eliminar las trazas de enzima que pudieran haberse liberado durante la sonicación. Después de cada lavado se sedimentó el gel durante 24 horas.

La concentración de la enzima encapsulada fue determinada en una alícuota del gel despolimerizada en NaOH 1M a temperatura ambiente bajo agitación, hasta alcanzar una solución clara. Una vez despolimerizado el gel se cuantificó la enzima obteniendo su absorbancia a 290 nm utilizando su coeficiente de absorptividad molar conocido de $27.95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este coeficiente fue obtenido experimentalmente utilizando como referencia una concentración conocida de enzima disuelta en NaOH 1M, después se midió su absorbancia a 290nm y 280nm y utilizando la concentración conocida se obtuvo el coeficiente dividiendo la absorbancia sobre la concentración de la enzima (44).

Los ensayos de cinética con la enzima encapsulada fueron llevados a cabo en un baño mecedor para evitar que los fragmentos de gel sedimentaran y así poder mantener la uniformidad de la suspensión durante todo el experimento, además de optimizar la difusión de los solutos dentro del sol-gel de sílice.

Resultados y Discusión

Enzima en Solución

Los estudios de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato muestran una cinética hiperbólica (figura 13, tabla 2.1) en ausencia de GlcNAc6P la que puede describirse con la ecuación de Michaelis-Menten, al ser ajustada a la ecuación de Hill (figura 13, tabla 2.2) no se ve que exista cooperatividad ya que el coeficiente de Hill es muy cercano a 1. La cinética sin activador posee marcadas diferencias tanto con la cinética de *EcGNPDA*, como con la de *hGNPDA-1*. La *hGNPDA-2* no presenta un efecto de cooperatividad homotrópica en ausencia de GlcNAc6P, mientras que su homóloga de *E. coli* posee una cinética fuertemente cooperativa en ausencia de GlcNAc6P, con un coeficiente de Hill de alrededor de 2.8 (9) (6). Asimismo, mientras que la *hGNPDA-1* requiere GlcNAc6P para obtener una actividad relevante (1) *hGNPDA-2* es activa en su ausencia, aunque su efecto activador es evidente. La k_{cat} de *hGNPDA-2* es menor cuando se le compara con su ortóloga de *E. coli*.

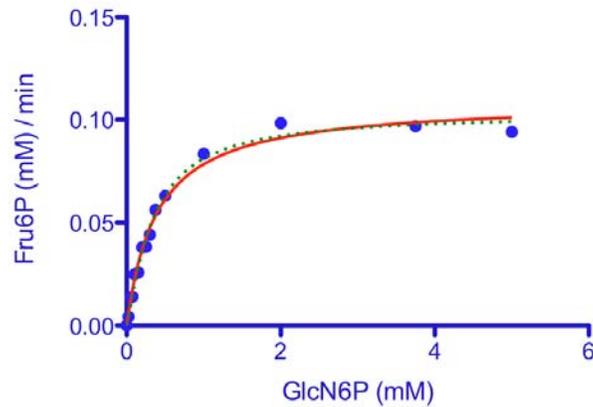


Figura 13. Velocidad inicial de *hGNPDA-2* en solución y en ausencia de GlcNAc6P ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten (línea roja continua) y a la ecuación de Hill (línea verde punteada).

K_m	0.39 ± 0.03 mM
k_{cat}	$2.02s^{-1}$

Tabla 2.1. Parámetros cinéticos de la figura 13 ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten.

$K_{0,5}$	0.33 ± 0.03 mM
k_{cat}	$2.02 s^{-1}$
h	1.195 ± 0.1

Tabla 2.2. Parámetros cinéticos de la figura 13 ajustada a la ecuación de Hill.

Los estudios de velocidades iniciales en presencia de GlcNAc6P muestran una cinética distinta a la de la figura 13 y ya no es posible ajustarla a la ecuación de Michaelis-Menten. Al entrar en contacto con la GlcNAc6P ocurre un cambio alostérico en la enzima al igual que con su homóloga, este cambio es complejo pero puede ajustarse a la ecuación 4 (figura 14).

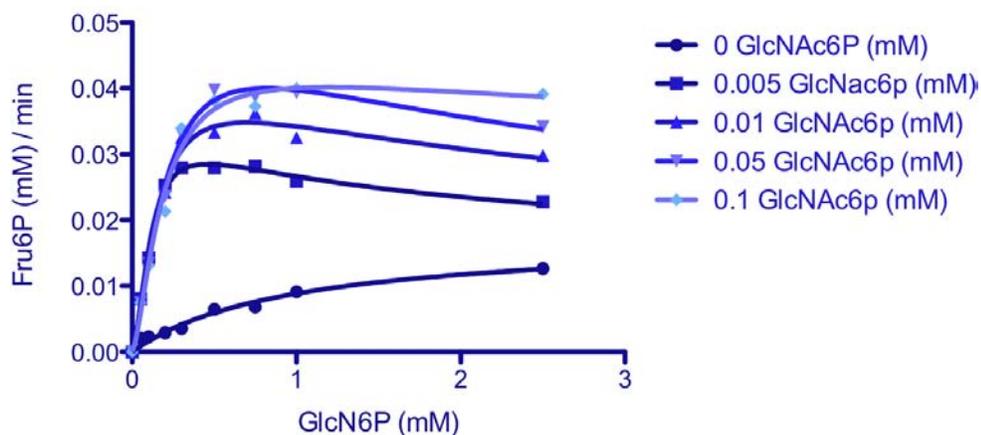


Figura 14. Velocidades iniciales de *hGNPDA-2* a concentraciones constantes de GlcNAc6P. Las concentraciones de GlcNAc6P son 0 mM (círculos), 0.005 mM (cuadrados), 0.01 mM (triángulos), 0.05 mM (triángulos reversos) y 0.1 mM (rombos). Los datos a 0 GlcNAc6P se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que los demás se ajustaron a la ecuación 4.

GlcNAc6P (mM)	K_m (mM) / $K_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (s^{-1})	K_i (mM)
0	0.96 ± 0.19	-	2.05	-
0.005	0.16 ± 0.03	1.62 ± 0.15	10.5	1.5 ± 0.85
0.01	0.18 ± 0.03	1.43 ± 0.2	9.9	3 ± 1.1
0.05	0.26 ± 0.04	1.37 ± 0.15	12.4	2.5 ± 0.77
0.1	0.2 ± 0.05	1.47 ± 0.33	9.4	8.09 ± 7.4

Tabla 3. Los valores cinéticos de la figura 14. En ausencia de GlcNAc6P los valores fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que los valores de 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM y 0.1 mM de GlcNAc6P fueron ajustados a la ecuación 4.

Comparando los valores cinéticos de las dos formas de la enzima se observa una activación mixta de tipo $K^+ V^+$, en la cual la k_{cat} aumenta mientras que la $K_{0.5}$ disminuye a comparación de la forma sin GlcNAc6P. También se aparece inhibición por sustrato y un incremento del coeficiente de Hill, lo cual podría significar la aparición de cooperatividad homotrópica con respecto a la GlcN6P.

Un segundo experimento con mayor cantidad de puntos por debajo de la $K_{0.5}$ nos permite estudiar mejor esta aparente cooperatividad (figura 15). Al regraficar los datos en un gráfico de Hill y de Scatchard (figura 16), los cuales son muy sensibles para detectar cooperatividad, puede verse claramente el aumento

de h en el gráfico de Hill, pero en el gráfico de Scatchard no; esto puede deberse a que aunque exista un incremento en el coeficiente de Hill esto no sea una verdadera "cooperación" entre las subunidades ya que el coeficiente de Hill es un coeficiente determinado empíricamente y su aparición no nos asegura la existencia de una verdadera "cooperación" entre las subunidades. Un regráfico de Lineweaver-Burk (figura 17) muestra claramente la inhibición por sustrato observada en la figura 15.

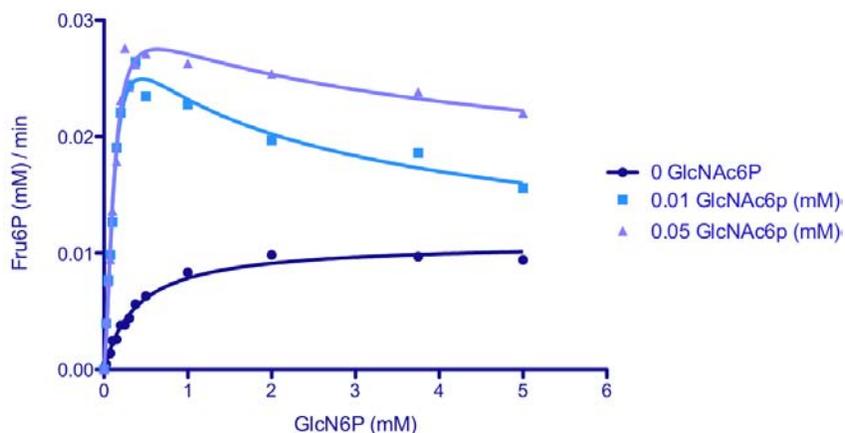


Figura 15. Velocidades iniciales de h GNPDA-2 a concentraciones constantes de GlcNAc6P. Las concentraciones de GlcNAc6P son 0 mM, 0.01 mM y 0.05 mM. 0 mM se encuentra ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que 0.01 mM y 0.05 mM se encuentran ajustadas a la ecuación 4.

GlcNAc6P (mM)	K_m (mM) / $K_{0.5}$ (mM)	h	k_{cat} (s^{-1})	K_i (mM)
0	0.39 ± 0.03	-	2.02	-
0.01	0.15 ± 0.02	1.56 ± 0.13	8.49	1.69 ± 0.77
0.05	0.13 ± 0.01	1.60 ± 0.17	7.15	4.13 ± 1.86

Tabla 4. Los valores cinéticos de la figura 15. En ausencia de GlcNAc6P los valores fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que los valores de 0.01 y 0.05 mM de GlcNAc6P fueron ajustados a la ecuación 4.

A

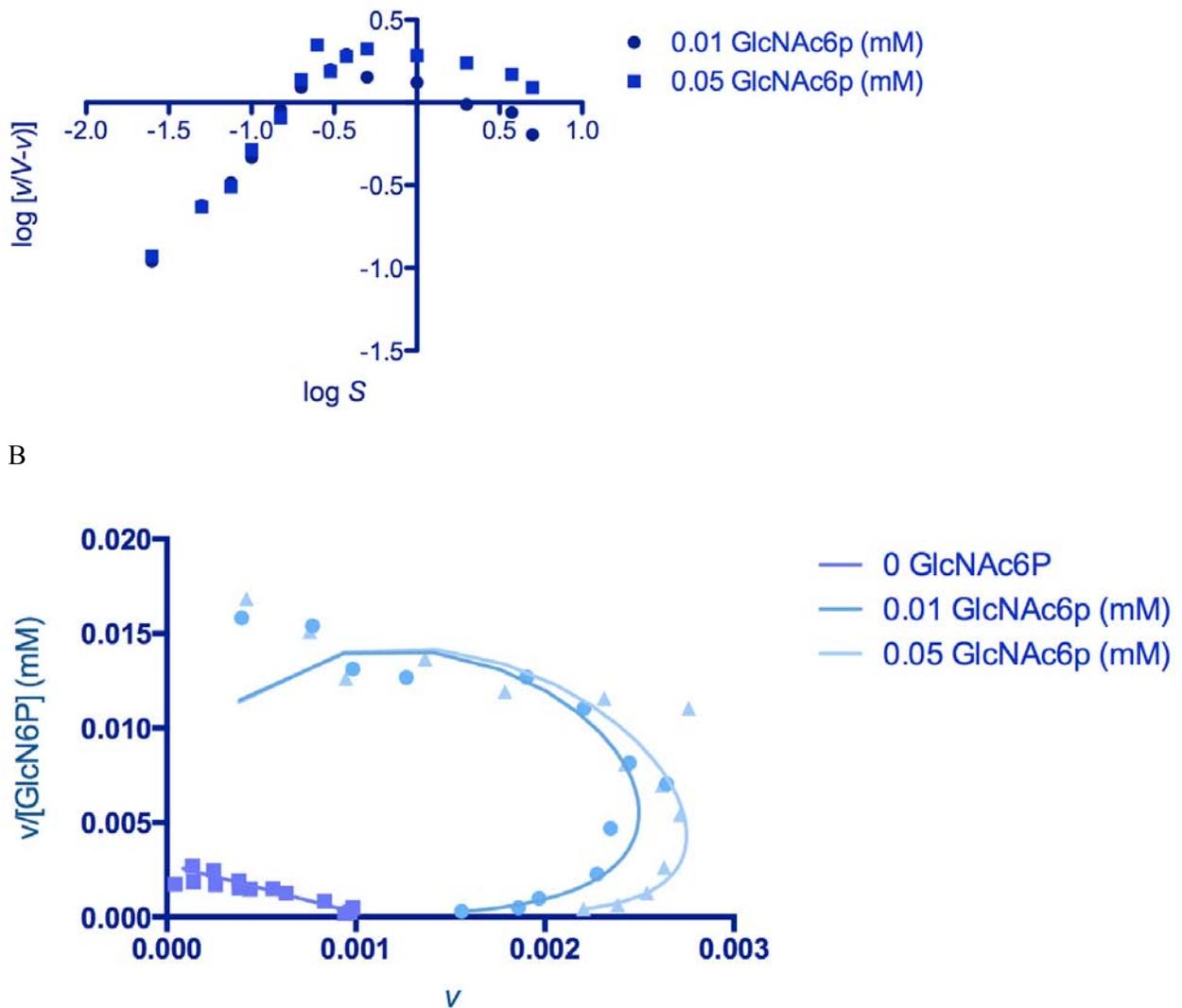


Figura 16. A. Re gráfico de Hill de la figura 15. Se puede apreciar claramente el cambio en el coeficiente de Hill y la inhibición de la cinética. B. Re gráfico de Scatchard para la figura 15. Este re gráfico es muy sensible para buscar cooperatividad, la cual, si existiera, aparecería como una curva cóncava hacia abajo. La ihibición por sustrato se ve resaltada en las concentraciones de 0.01 y 0.05 mM de GlcNAc6P.

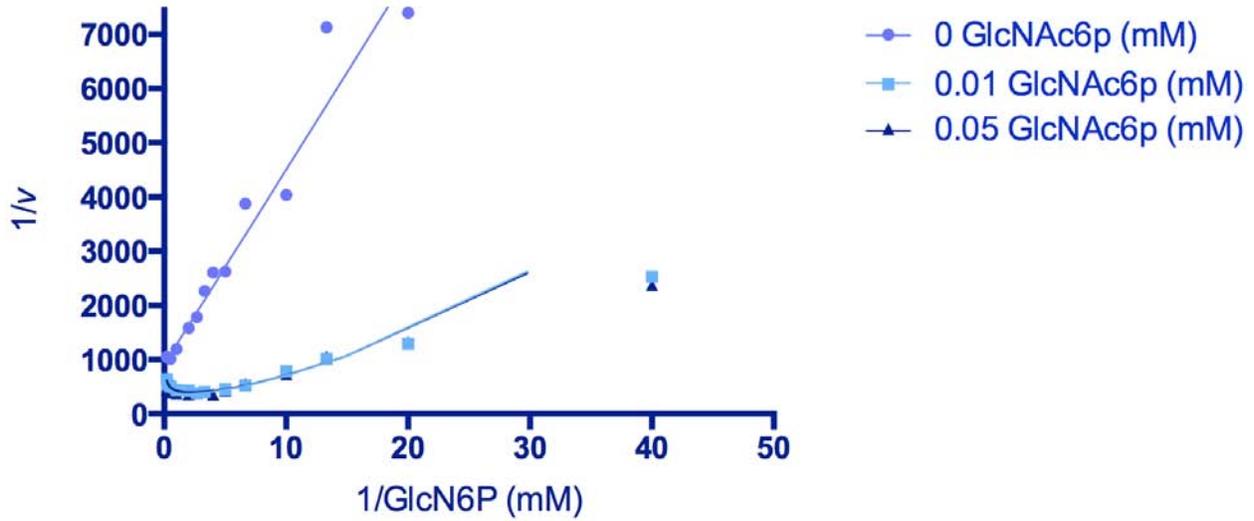


Figura 17. Regráfico de Lineweaver-Burk de la figura 15 que muestra la inhibición por sustrato.

Formalmente la inhibición por sustrato es atribuida a la unión de dos moléculas del sustrato unidas a un mismo sitio activo de una enzima, formando un complejo ES_2 que a su vez es incapaz de llevar a cabo un ciclo de catálisis o la lleva a cabo con una k_{cat} menor y al igual que la ecuación de Hill utiliza una ecuación empírica para describirse. Pero al igual que *hGNPDA-1*, la inhibición de *hGNPDA-2* debe de tener un origen alostérico; en base a esto y basados en la ecuación utilizada para describir la cinética de *hGNPDA-1*, que a su vez se encuentra basada en una modificación de la ecuación de MWC (ecuación 6) (27), proponemos la siguiente ecuación, la cual toma en cuenta la diferencia de afinidades y velocidades de catálisis entre ambos conformeros alostéricos, y teniendo en cuenta que la enzima en ausencia de GlcNAc6P es catalíticamente activa (ecuación 7).

$$\frac{v}{V} = \frac{L_0 \frac{S}{K_a} \left(1 + \frac{S}{K_a}\right)^{n-1}}{L_0 \left(1 + \frac{S}{K_a}\right)^n + \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)^n}$$

Ecuación 6. Modificación de la ecuación de MWC en la cual la forma que posee una mayor afinidad por el sustrato es catalíticamente inactiva mientras que la que posee una afinidad menor por el sustrato es catalíticamente activa donde K_I es la constante de disociación de S con el estado inactivo y K_a es la constante de disociación con el estado activo. $K_I < K_a$.

$$v = \frac{V \left[\left\{ L_0 \frac{(1+e\theta)^6}{(1+\theta)^6} g c \alpha (1 + c\alpha)^5 \right\} + \alpha (1 + \alpha)^5 \right]}{L_0 \frac{(1+e\theta)^6}{(1+\theta)^6} (1 + c\alpha)^6 + (1 + \alpha)^6}$$

Ecuación 7. Modificación de la ecuación de *hGNPDA-1*, en la cual se toma en cuenta la catálisis de la forma en ausencia de GlcNAc6P (*T*) y el pegue de la GlcNAc6P a las dos formas de la enzima. En donde *V* corresponde a la velocidad máxima de reacción, *e* es la relación entre las constantes de afinidad por la GlcNAc6P ($e = K_{AR}/K_{AT}$), α corresponde a la concentración del sustrato sobre la afinidad de R por éste ($\alpha = s/K_{sR}$), *c* es la relación entre las afinidades de las dos formas por el sustrato ($c = K_{sR}/K_{sT}$), θ corresponde a la concentración del ligante alostérico sobre la afinidad de R por este ($\theta = A/K_{AR}$), *L*₀ es la constante alostérica de Monod ($L_0 = [T_0]/[R_0]$) y *g* es el cociente de k_{catT}/k_{catR} .

Al “activar” a la enzima con diferentes concentraciones de GlcNAc6P se puede observar que las velocidades iniciales a bajas concentraciones de GlcN6P se encuentran sobrepuestas hasta llegar a su punto máximo. Esto puede ocurrir por un cambio antiérgico en la enzima, en el cuál la velocidad máxima de la enzima se ve incrementada mientras que la afinidad de esta por su sustrato disminuye, de tal forma que el cambio k_{cat}/K_m es aproximadamente una constante, convirtiéndola en una enzima K^-V^+ y no K^+V^+ . Este es el mismo efecto que ocurre en *hGNPDA-1*; pero en el caso de la isoforma 2 existe una actividad relevante con respecto a la enzima en su estado *T*. Este efecto también puede generar la aparición de inhibición, pero el origen de esta es alostérico, no por la competencia de dos moléculas de sustrato por el mismo sitio activo de una subunidad.

Al ajustar a la ecuación 7 al experimento de la figura 14 es posible obtener un ajuste casi global con la excepción del valor *g*, el cual oscila entre 0.2 y 0.25 (figura 18) (tabla 5). El valor de *c* mayor a 1 significa que el valor de K_{sR} es mayor a K_{sT} , esto significa que la afinidad de la forma *R* de la enzima es menos afin a la GlcN6P que la forma *T*.

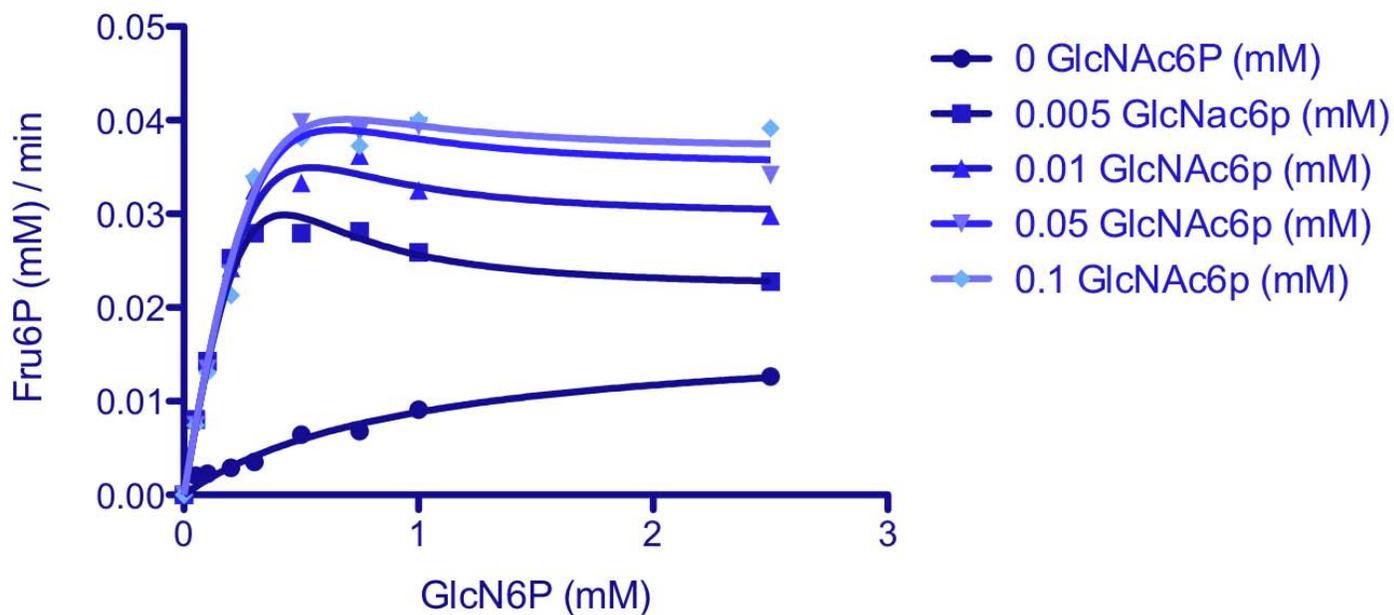


Figura 18. Velocidades iniciales de *hGNPDA-2* a concentraciones constantes de GlcNac6P. Las concentraciones de GlcNac6P son 0 mM (círculo), 0.005 mM (cuadrado), 0.01 mM (triángulo), 0.05 mM (triángulo reverso) y 0.1 mM (rombo). 0 mM se encuentra ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que los datos correspondientes a 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM y 0.1 mM se encuentran ajustadas a la ecuación 7.

	K_{SR} (mM)	K_{AR} (mM)	e	L_0	c	g	V
Ajuste Global	0.86 ± 0.2	$5.47 \times 10^{-5} \pm 2.8 \times 10^{-5}$	0.1	4000	4.91 ± 0.81	0.2/0.24/0.25	0.13 ± 0.02

Tabla 5. Valores del ajuste global de la figura 18 a la ecuación 7.

No nos fue posible lograr un ajuste a esta ecuación con un valor de g constante, esto probablemente se deba a que el modelo utilizado para describir el comportamiento de esta enzima no es suficiente para explicar los cambios que ocurren en la misma. En el modelo MWC requiere la existencia de sólo dos conformeros cuaternarios y terciarios, T o R , con cada subunidad encontrándose en una conformación terciaria igual a la conformación cuaternaria del oligómero; simplificando un proceso muy complejo.

Nanoencapsulación de la enzima

La enzima fue encapsulada en un gel-sol poroso de ortosilicato utilizando el método de Bettati y colaboradores (5), este método nos permite inmovilizar a la enzima y suprimir los cambios cuaternarios, mientras que los cambios terciarios se presentan enlentecidos. (44). Estos geles son porosos y nos permiten llevar a cabo experimentos de cinética.

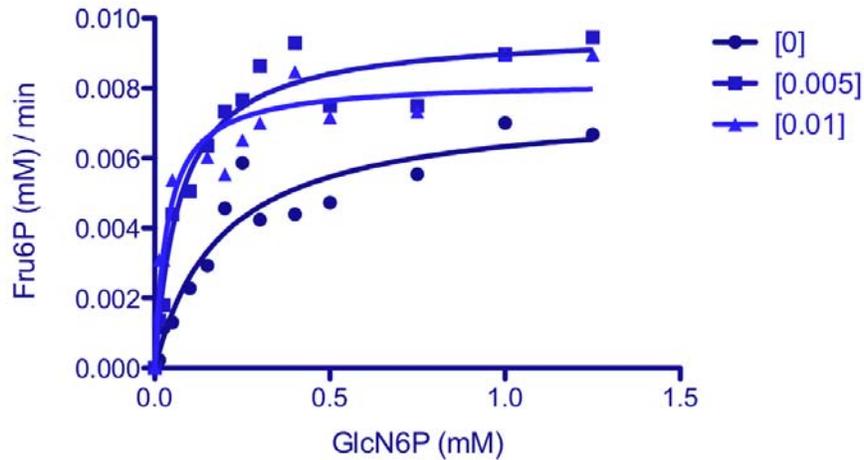


Figura 19. Velocidades iniciales de *hGNPDA-2* encapsulada en un gel de ortosilicato a concentraciones constantes de GlcNAc6P. Las concentraciones son 0 (círculos), 0.005 (cuadrados) y 0.01 (triángulos), todas las curvas se encuentran ajustadas a la ecuación de la hipérbola.

GlcNAc6P (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)
0	1.7	0.18 ± 0.05
0.005	2.2	0.07 ± 0.01
0.01	1.8	0.03 ± 0.01

Tabla 6. Valores del ajuste de la figura 19 a la ecuación de la hipérbola.

Los experimentos de cinética con la enzima encapsulada mostrados en la figura 19 muestran una desaparición del efecto de inhibición encontrados en la enzima soluble (figura 14) cuando esta está en presencia de GlcNAc6P, esto implica que este efecto tiene que estar ligado con la transición alostérica cuaternaria. Asimismo se observa una disminución de los valores de K_m (Tabla 6), clásico de una

activación tipo K; esta activación tiene que ser un producto de la transición terciaria de la enzima ya que la transición cuaternaria tendría que encontrarse inhibida.

En un estudio publicado en 2014 por Zonszein y colaboradores demostraron que el cambio terciario en la enzima se encuentra enlentecido al estar encapsulada (44), y no se puede lograr una activación completa de la enzima con solo estar en contacto con su ligante alostérico durante los diez minutos que dura el experimento, esto también provoca que la proporción $t-r$ no se encuentre en el equilibrio termodinámico. La desaparición del efecto inhibitorio podría también atribuirse al enlentecimiento de las transiciones terciarias; ya que la proporción de subunidades en t sigue siendo mayor a las que se encuentran en r , de ser cierto esto al dejarse incubando la enzima encapsulada en presencia de GlcNAc6P saturante durante suficiente tiempo tendría que presentarse inhibición.

Al incubar previamente a la enzima encapsulada con GlcNAc6P saturante durante 10, 30, 60 y 90 minutos antes de desencadenar la reacción (figura 20) se observa que la $K_{0.5}$ va disminuyendo mientras mayor haya sido el tiempo de incubación mientras que el coeficiente de Hill disminuye para después aumentar (tabla 7), este comportamiento también descrito en *EcGNPDA* (44) y es atribuido a la heterogeneidad de la conformación terciaria de la enzima, provocando una ilusión de cooperatividad negativa por la suma de dos hipérbolas y se va perdiendo conforme las subunidades van pasando de in estado t a un estado r .

Al haber una transición lenta sin considerarse el tiempo de relajación el experimento de la figura 19 fue hecho fuera del equilibrio.

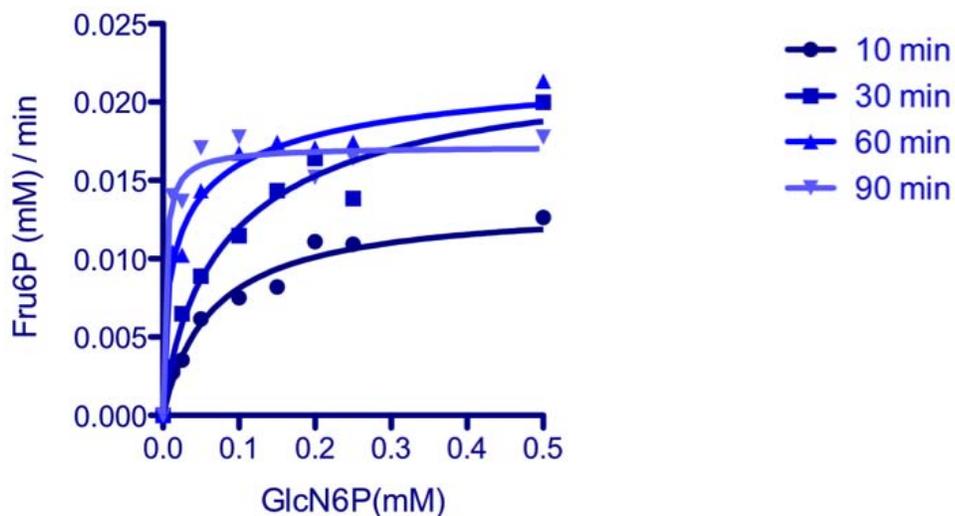


Figura 20. Cinética de *hGNPDA-2* encapsulada, incubada a diferentes tiempos en presencia de GlcNAc6P 0.05 mM a 30°C. Los tiempos de incubación fueron 10 (círculo), 30 (cuadrado), 60 (triángulo) y 90 min. (triángulo reverso).

Tiempo (min)	K_{cat} (s^{-1})	h	$K_{0.5}$ (mM)
10	2.5	0.97±0.19	0.065±0.015
30	4.3	0.83±0.17	0.094±0.031
60	4.4	0.52±0.14	0.028±0.013
90	3.1	0.89±1.08	0.0028±0.004

Tabla 7. Valores cinéticos de la figura 20 ajustados a la ecuación de Hill. La $K_{0.5}$ disminuye al menos unas 10 veces mientras que el coeficiente de Hill es difícil de medir con tan pocos puntos por debajo de la $K_{0.5}$, esto lo hace muy difícil de estudiar ya que las concentraciones de GlcN6P que se tendrían que utilizar para llevar cabo este experimento son muy bajas.

hGNPDA-2 se comporta desde un punto de vista cinético de manera muy similar a *hGNPDA-1*, teniendo una actividad base baja cuando se encuentra en ausencia de la GlcNAc6P y parece sufrir un cambio alostérico antiérgico cuando se encuentra en presencia de ella, el cual induce la aparición de inhibición. De esta forma, las dos enzimas son cinéticamente iguales con la excepción de que poseen constantes cinéticas distintas. Estas similitudes no terminan en los efectos cinéticos, ya que al igual que *hGNPDA-1*, *hGNPDA-2* no pudo ser cristalizada en ausencia de GlcNAc6P; de la misma manera, las dos enzimas no poseen un cambio en el espectro de dicroísmo circular cuando la enzima es titulada con GlcNAc6P como ocurre en *EcGNPDA* pese a que las tres enzimas poseen la tirosina responsable por dicho cambio (datos no presentados).

Conclusiones y Perspectivas

La *hGNPDA-2* posee un patrón de activación antiérgica muy parecido al de *hGNPDA-1* salvo por sus constantes cinéticas distintas. *hGNPDA-2* posee una K_{cat} mayor que *hGNPDA-1* en su estado *T*, pero en su estado *R* la K_{cat} de *hGNPDA-1* mayor por dos órdenes de magnitud; mientras sus $K_{0.5}$ son similares en su estado *T* pero al pasar su estado *R* *hGNPDA-1* tiene un aumento de 2 órdenes de magnitud con respecto a *hGNPDA-2*.

Existe un cambio alostérico tanto terciario como cuaternario y está evidenciado por la desaparición de la inhibición cuando esta enzima es encapsulada en un gel de sílice, esto quiere decir también que la inhibición se encuentra acoplada al cambio cuaternario de la misma y es dependiente de R pero no en r .

Se requieren hacer experimentos de cinética con la enzima encapsulada dentro del equilibrio tanto en geles en T como geles en R , para poder lograr esto es necesario aumentar los tiempos de preincubación de la enzima con la GlcNAc6P y posiblemente el tiempo de reacción. Para podernos asegurar que estos experimentos siguen siendo de velocidades iniciales la concentración de la enzima debe de ser disminuida proporcionalmente al tiempo que se aumenta del experimento. De igual manera se deben explorar concentraciones más altas de sustrato.

Bibliografía

1. Alvarez-Añorve, L., Alonzo, D.A., Mora-Lugo, R., Lara-González, S., Bustos-Jaimes, I., Plumbridge, J., Calcagno, M.L., *Allosteric kinetics of the isoform 1 of human glucosamine-6-phosphate deaminase*, (2011), *Biochimica et Biophysica Acta*. Dic;1814(12):1846-53.
2. Alvarez-Añorve L., Calcagno M.L., Plumbridge J., *Why does Escherichia coli grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates*, (2005), *J. Bacteriol.* May;187(9):2974-82.
3. Arreola, R., Valderrama, B., Morante, M.L., Horjales, E., *Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study*, (2003) *FEBS Letters*, Sep 11;551(1-3):63-70.
4. Benson, R.L. y Friedman, J. *Allosteric Control of Glucosamine Phosphate Isomerase from the Adult Housefly and Its Role in the Synthesis of Glucosamine 6-Phosphate*, (1970), *J. Biol. Chem.*, 245: 2219-2228.
5. Bettati, S., Pioselli, B., Campanini, B., Viappiani, C., Mozzarelli, A. *Protein-doped nanoporous silica gels*, (2004) *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. H. S. Nalwa, editor. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA, USA. 1–23.

6. Bustos-Jaimes I., Calcagno M.L. *Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli*, (2001), Arch Biochem Biophys, Oct 15; 394(2): 156–160.
7. Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hojales, E., Calcagno, M.L., *Asymmetric allosteric activation of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121*, (1995), Biochemistry, May 9; 34(18):6074-82.
8. Bustos-Jaimes, I., Sosa-Peinado, A., Rudiño-Piñera, E., Horjales, E., Calcagno, M.L., *On the Role of the Conformational Flexibility of the Active-site Lid on the Allosteric Kinetics of Glucosamine-6-phosphate Deaminase*, (2002), Journal of Molecular Biology, 319(1), May 24, 183-189
9. Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G., Suástequi, J., *Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from Escherichia coli*, (1984), Biochimica et Biophysica Acta, Jun 14, 787, 165-173.
10. Cárdenas, M. L., *Michaelis and Menten and the long road to the discovery of cooperativity*, (2013), FEBS Letters, Sep 2; 587, 2767-2771.
11. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics 4th edition*, Wiley-Blackwell, Weinheim, (2012), capítulo 12. ISBN: 978-3-527-33074-4.
12. Eaton, W.A., Henry, E.R., Hofrichter, J., Bettati, S., Viappiani, C., Mozzarelli, A., *Evolution of allosteric models for hemoglobin*, (2007), IUBMB Life. Ago-Sep; 59(8-9):586-99.
13. Edelhoch, H., *Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins*, (1967), Biochemistry, Jul; 6(7): 1948-1954.
14. Enghofer, E. y Kress, H., *Glucosamine metabolism in Drosophila virilis salivary glands: Ontogenetic changes of enzyme activities and metabolite synthesis*, (1980), Dev. Biol. Jul; 78(1):63-75.

15. Fenton, Aron, *Allostery: methods and protocols*, (2011), Humana Press, ISBN 1617793337, 9781617793332, P.p. 439.
16. Fenton, A., *Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life'*, (2008), Trends Biochem Sci. Sep, 33(9):420-425.
17. Gill, S.C., von Hippel, P.H., *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*, (1989) Anal. Biochem Nov 1; 182(2):319-26. **Erratum in** Anal. Biochem 1990 Sep 189(2):283.
18. Gutierréz-Aguilar R., Dong-Hoon K., Woods S.C., Seeley R.J., *Expression of new loci associated with obesity in diet-induced obese rats: from genetics to physiology* (2012), Obesity; 20(2), 306-312.
19. Keith J. Ellis, John F. Morrison, *Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes*, (1982) Methods in Enzymology, 87: 405-426.
20. Kwiatkowska-Semrau K., Czarnecka J., Wojciechowski M. y Milewski S., *Heterogeneity of quaternary structure of glucosamine-6-phosphate deaminase from Giardia lamblia*, (2015), Parasitol Res, 114:175–184.
21. Lara-Lemus, R., Calcagno, M.L., *Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type*, (1998) Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, Oct 14;1388(1):1-9.
22. Lara-Lemus R., Libreros-Minotta C.A., Altamirano M.M., Calcagno M.L., *Purification and characterization of glucosamine-6-phosphate deaminase from dog kidney cortex*, Arch Biochem Biophys. 1992 Sep; 297(2):213-20.
23. Leskovac, V., *Comprehensive Enzyme Kinetics*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, P.p. 243.

24. Marcos Víquez, Jorge (2013), *Convergencia evolutiva funcional de dos fosfoglucoamina desaminasas pertenecientes a diferentes familias estructurales*, (tesis de licenciatura), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
25. Midelfort, C.F., Rose, I.A., *Studies on the mechanism of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate isomerase*, (1977), *Biochemistry*, Abr 19; 16(8):1590-6.
26. Milewski, S., Kuszczak, D., Jedrzejczak, R., Smith, R.J., Brown, A. J.P., Gooday, G.W., *Oligomeric Structure and Regulation of Candida albicans Glucosamine-6-phosphate Synthase*, (1999) *J. Biol. Chem.*, Feb 12;274(7):4000-8.
27. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*, (1965), *J. Mol. Biol.* May;12:88-118.
28. Montag, M., Parrington, J., Swann, K., Lai, F.A., Van der Ven, H., *Presence and localization of oscillin in human spermatozoa in relation to the integrity of the sperm membrane*, (1998), *FEBS letters*, Feb 27;423(3):357-61.
29. Montero-Morán, G.M., Lara-Conzálea, S., Álvarez-Añorve, L., Plumbridge, J.A., Calcagno, M.L., *On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of Escherichia coli glucosamine 6-phosphate deaminase*, (2001), *Biochemistry*, Ago 28; 40(34): 10187-96.
30. Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno M.L., Altamirano, M.M., *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*, (1998), *Biochemistry*, May 26; 37(21): 7833-9.
31. Oliva, G., Fontes, M.R., Garratt, R.C., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L., Horjales, E., *Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from Escherichia coli at 2.1 Å resolution*, (1995), *Structure*, Dic 15; 3(12): 1323-1332.
32. Plumbridge, J.A., Calcagno, M.L., Altamirano, M.M., *Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli and*

- a study of their functional role by site-directed mutagenesis*, (1992), *Biochemistry*, Feb 4;31(4):1153-8.
33. Plumbridge, J.A., Cochet. O., Souza, J.M., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L., Badet, B., *Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in Escherichia coli K-12*, (1993), *J. Bacteriol.*, Ago;175(16):4951-6.
34. Reed, M. C., Lieb, A. and Nijhout, H. F. *The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions*, (2010), *Bioessays*, May;32(5):422-9.
35. Reed, M. C., Best, J., Nijhout, H. F., *Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model*, (2009), *Theoretical Biology and Medical Modelling*, Sep 10;6:21.
36. Roe, H. J., *A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine*, (1934) *J. Biol. Chem*, Jul 6, 107: 15-22
37. Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta S., Rojas-Trejo S.P., Horjales, E., *Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase*, (2002), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, Ene; 58: 10-20.
38. Segel, Irwin. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, New York 11670 (1975): 1127.
39. Shevchenko, V., Hogben, M., Ekong, R., Parington, J., Lai, F.A., *The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization*, (1998), *Gene*, Aug 17 and 216(1):31-8.
40. Tanaka, T., Takahashi, F., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H., Imanaka, T., *Characterization of a Novel Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from a Hyperthermophilic Archaeon*, (2005), *J Bacteriol.*, Oct; 187(20): 7038–7044.
41. Vincent, F., Davies, G. J., Brannigan J. A., *Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the NagB superfamily?*, (2005), *J Biol Chem*. and 280(20):19649-55.

42. Wyman, J, Gill, S.J., *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules*, (1990), USA: University Science Books. P.p. 330.
43. Zhang, J., Zhang, W., Zou, D., Chen, G., Wan, T., Li, N., Cao, X., *Cloning and functional characterization of GNPI2, a novel human homolog of glucosamine-6-phosphate isomerase/oscillin*, (2003), *Journal of Cellular Biochemistry* 88:932-940.
44. Zonszein, S., Álvarez-Añorve, L., Vásquez-Núñez, R.J., Calcagno, M.L., *The Tertiary Origin of the Allosteric Activation of E. coli Glucosamine-6-Phosphate Deaminase Studied by Sol-Gel Nanoencapsulation of Its T Conformer*, (2014) *PlosOne*, May 2; 9(5):e96536.
45. Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., Lai, F.A., *Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein*, (1996) *Nature*; Jan 25; 379(6563): 364-8.
46. Henry, E. R.; Bettati, S., Hofrichter, J., Eaton, W., *A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin*, (2002), *Biophysical Chemistry*, Jul 10; 98(1-2): 149-64.