



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Mecanismo de cooperatividad de la glucosamina 6-fosfato
desaminasa de *Shewanella oneidensis* estudiado mediante
mutagénesis dirigida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Andrea Celeste Medina García

TUTOR

Dr. Mario Luis Calcagno Montans

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

■ **Datos del alumno**

Nombre Medina García Andrea Celeste

Teléfono 56498538

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera Biología

Número de cuenta 308258864

■ **Jurado asignado**

Tutor Dr. Mario Luis Calcagno Montans

Presidente Dr. Ismael Bustos Jaimes

Vocal Dr. Menandro Camarillo Cadena

Secretario Dr. Mario Luis Calcagno Montans

1^{er} Suplente: Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez

2^{do} Suplente: Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezno

■ **Datos del trabajo escrito**

Título Mecanismo de cooperatividad de la glucosamina 6-fosfato de *Shewanella oneidensis* estudiado mediante mutagénesis dirigida.

Número de páginas 84 pp.

Año 2016

A Rosa Hernández Aguilar

(1931-2009)

Después de adiestrarla muchos meses, el sabio logró que una pulga obedeciera sus órdenes. Cuando el profesor gritaba "¡Salta!", la pulga daba un salto en el aire. Arrancó las patas a la pulga de una en una, y ésta seguía saltando cuando se le ordenaba pero, a medida que se le iban quitando las patas, sus saltos se hacían cada vez menos espectaculares. Finalmente, después de quitarle la última pata, la pulga permaneció inmóvil. El sabio, entusiasmado, anotó en su cuaderno: Al extirparle las patas a una pulga, esta deja de oír.

Conclusión desmesurada

Agradecimientos

Agradecimientos institucionales

- Al M. en C. Jorge Angel Marcos Viquez, por su invaluable asesoría y guía durante toda la realización e interpretación de este trabajo.
- Al candidato a doctor Haven A. López Sánchez, por su contribución, revisión y discusión del proyecto.
- Al LIBB F. Aarón Cruz Navarrete, por su apoyo experimental, discusión y contribución al trabajo.
- Al Dr. Enrique García Hernández, por su amabilidad al dejarnos utilizar el calorímetro de su laboratorio.
- Al candidato a doctor Alfonso Labra Núñez, por su apoyo técnico en los experimentos de ITC.
- A la M. en C. Laura I. Álvarez Añorve, por la realización de los geles de poliacrilamida utilizados en este trabajo.
- A los miembros del jurado, quienes hicieron una revisión crítica de esta tesis.
- Al CONACYT por el financiamiento al proyecto 99857.
- Al PAPIIT por el apoyo a los proyectos:
 - IN213312
 - IN216615
- Al SNI por la beca de ayudante de investigador durante el periodo de 2014-2015.
- Al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), donde realicé todo el trabajo experimental.

- A la Facultad de Ciencias.
- A la UNAM.

Agradecimientos personales

- A mi mamá. Eres mi mejor maestra, mi confidente, mi apoyo incondicional, mi fan número uno... gracias por estar siempre conmigo, ¡Te amo muchísimo!
- A Danae, mi compañerita incondicional. Gracias por no dejarme ser una hija única odiosa. Eres la mejor hermana, te quiero.
- A mi Abuelito. Siempre has estado a mi lado viéndome crecer y echándome porras.
- A Jorge, por ser mi alfa. Gracias por todo tu apoyo para realizar esta tesis, por tu dedicación, preocupación, paciencia, por adoptarme y compartir conmigo un pedacito del proyecto que tanto quieres, eres un excelente maestro y un mucho mejor amigo.
- A Haven Pusso. Gracias por rescatarme tantas veces, por compartir los misterios de las proteínas, de la vida académica, de la real, por enseñarme que: *Cuando lo tienes, lo tienes*. ¡Eres un amigo increíble!
- A Aaru. Gracias por compartir tantas aventuras conmigo dentro y fuera del laboratorio, estuviste a mi lado en los peores momentos y también en los mejores.
- A mis amigos del LFQIP, gracias por hacer los días más llevaderos, por enseñarme a jugar cartas estilo Las Vegas, por los miércoles de amistad, por hacer de los congresos la mejor época del año, por hacer del lab mi segunda casa.
- A mis amigos de la Facultad: Lili, Dany niña, Dany niño, Wendy, Kika, Sally, Uzmar, Itsalsa, Nancy, Jair Llameante, Javivi. ¡Son los mejores, ñoños!
- A mis maestros de la Facultad de Ciencias. Gracias por mi formación académica y por otorgarme las herramientas necesarias para hacer lo que más me gusta.

Resumen

Las enzimas que catalizan la misma reacción son frecuentemente homólogas ya que poseen una secuencia y un plegamiento similar; sin embargo varias enzimas estructuralmente no relacionadas realizan la misma función y han sido nombradas como enzimas no homólogas isofuncionales. El ejemplo particular que se estudia en este trabajo es el de la GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* (NagBI) y *Shewanella oneidensis* (NagBII), ambas enzimas catalizan la conversión de GlcN6P en Fru6P y amonio; además son alostéricamente activadas por la GlcNAc6P y muestran cooperatividad positiva con respecto a la GlcN6P. Sin embargo estos dos tipos de desaminasas están asociadas a diferentes linajes filogenéticos y no tienen similitud estructural.

A diferencia de NagBI, la cooperatividad de NagBII de *S. oneidensis* no ha podido ser explicada con ninguno de los modelos alostéricos convencionales. Una explicación plausible a este fenómeno es un modelo de activación esencial por el sustrato, el cual plantea dos sitios de unión por subunidad: uno productivo y otro que no lo es. Este trabajo aporta pruebas experimentales que apoyan la hipótesis propuesta y demuestra mediante mutagénesis dirigida y calorimetría de titulación isotérmica, que existen dos sitios de unión de diferente afinidad por el sustrato, el primer sitio estudiado con la mutante H53Q, participa en el reconocimiento del sustrato y el segundo analizado por la mutante H242Q, cataliza la reacción de isomerización.

Finalmente, dada la limitada distribución filogenética de NagBII, se plantea el reclutamiento enzimático como mecanismo más probable para su emergencia. Este proceso juega un papel fundamental para adaptar el metabolismo a nuevos entornos y aún más porque NagBII participa en el eficiente proceso de reciclaje de quitina. Se debe destacar la importancia funcional de la alostería, ya que este mecanismo está conservado en ambas enzimas a pesar de no compartir un ancestro común cercano.

Abstract

Enzymes that catalyze the same reaction often show significant sequence and structural similarity, however several exceptions of unrelated enzymes with the same specificity have been described and referred as non-homologous isofunctional enzymes. This kind of enzymes has been perceived as rare and exceptional. A particular example is GlcN6P deaminase from *Escherichia coli* (NagBI) and from *Shewanella oneidensis* (NagBII), both catalyzes the conversion of GlcN6P into Fru6P and ammonia, they are allosteric activated by GlcNAc6P and even more their catalysis is cooperative, in spite of these proteins are related to different phylogenetic lineages and have not structural similarity.

The cooperative kinetics of NagBII has not been explained for any allosteric model, so the homotropic cooperativity depends on a different molecular mechanism: A model of essential activation by the substrate. This model postulate the emergence of two binding sites for the substrate per subunit: the catalytic site and a regulator non-productive binding site. This work gives experimental evidence that support aforementioned model and demonstrate by site-directed mutagenesis and calorimetry the existence of two binding sites of different affinity for GlcN6P. The first one, studied by the mutation H53Q, is involved in the recognition of substrate and the second one, analyzed by the mutation H424Q, catalyze the isomerization reaction.

Finally it proposed enzymatic recruitment as mechanism of evolutive emergence of NagBII. Also remark the conservation of allosteric regulation in absence of any notable homology in NagBI and NagBII is quite unexpected and argues for the functional importance of this regulatory mechanism.

Abreviaturas

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

2CB0 Coordenadas en el PDB para la NagBII de *P. furiosus*.

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

BCA Ácido bicinconínico.

BLAST Herramienta de búsqueda de alineamiento básico (*Basic Local Alignment Search Tool*).

DIPSO 3-[*N,N*-bis(2-Hidroxietyl)amino]-2-hidroxi propanosulfónico.

DLS Dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*).

EDTA Ácido etilendiamintetracético.

FPLC Cromatografía líquida rápida de proteínas (*Fast protein liquid chromatography*).

Fru6P D-fructosa-6-fosfato.

GFAT Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa.

GlcNAc₂ *N*-Diacetil-glucosamina.

GlcNAc6P *N*-Acetil-glucosamina-6-fosfato.

GlcN6P desaminasa Glucosamina-6-fosfato desaminasa.

h Coeficiente de Hill.

HEPES *N*-(2-Hidroxietyl)piperazina-*N'*-etanosulfónico.

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución (*High performance liquid chromatography*).

IF Intensidad de Fluorescencia.

IPTG Isopropil-tio- β -galactopiranosido.

ITC Calorimetría de titulación isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*).

K_{0.5} Constante de disociación de un ligante. En curvas de saturación sigmoides equivale al valor de la abscisa en el punto de inflexión.

K_{cat} Constante catalítica.

K_i Constante de inhibición.

KNF Modelo alostérico secuencial de Koshland, Nemethy y Filmer.

LB Luria-Bertani.

ML Máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*).

MCMC Cadenas de Markov Monte Carlo (*Markov chain Monte Carlo*).

MOPS Ácido 3-(*N*-Morfolino)propanosulfónico.

MWC Modelo alostérico simétrico de Monod, Wyman y Changeux.

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

NagBII Glucosamina-6-fosfato desaminasa con plegamiento SIS.

NH₄⁺ Ion amonio.

NISE Enzimas isofuncionales no-homólogas (*Non-homologous isofunctional enzymes*).

PDB Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*).

R Confórmero de la proteína de mayor afinidad por su ligante.

SIS Plegamiento común en enzimas azúcar isomerasas.

T Confórmero de la proteína de menor afinidad por su ligante.

Tris Tris(hidroximetil) aminometano.

TTS Modelo alostérico de los estados terciarios (*Tertiary two-state model*).

V_{max} Velocidad máxima.

Índice general

Resumen	V
Abreviaturas	VII
1. Introducción	1
1.1. Proteínas	1
1.2. Enzimas	2
1.2.1. Enzimas alostéricas	2
1.2.1.1. Alostiería	2
1.2.1.2. Cooperatividad	3
1.2.1.3. Modelos alostéricos	5
1.3. La GlcN6P desaminasa	7
1.3.1. NagBI	7
1.3.2. NagBII	8
1.3.3. Convergencia evolutiva	10
1.4. La GlcN6P desaminasa de <i>Shewanella oneidensis</i>	11
1.4.0.1. Estudios estructurales	11
1.4.0.2. Sitio alostérico	13
1.4.0.3. Paradoja de la cooperatividad	13
1.4.0.4. Un nuevo modelo para describir la cooperatividad	13
1.4.0.5. Justificación	18
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	25

3.1. Mutagénesis dirigida	25
3.2. Sobreexpresión	26
3.3. Lisis	26
3.4. Purificación	27
3.5. Determinación de la concentración de proteína	28
3.6. Técnicas espectroscópicas	28
3.6.1. Dicroísmo circular	28
3.6.2. Fluorescencia intrínseca	28
3.7. Dispersión dinámica de luz	29
3.8. Ensayos cinéticos enzimáticos	29
3.8.0.1. Cinéticas exploratorias	29
3.8.1. Cinéticas de la mutante H53Q	29
3.8.2. Cinéticas de la mutante H242Q	29
3.9. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	30
3.10. Inferencia filogenética	31
4. Resultados y Discusión	33
4.1. Construcción de mutantes de la GlcN6P desaminasa de <i>S. oneidensis</i>	33
4.2. Sobreexpresión	33
4.3. Lisis	35
4.4. Purificación	35
4.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico	36
4.5. Cromatografía de interacción hidrofóbica	38
4.6. Cromatografía de exclusión molecular	39
4.7. Rendimiento	39
4.8. Técnicas espectroscópicas	41
4.8.1. Dicroísmo circular	41
4.8.2. Fluorescencia intrínseca	43
4.9. Dispersión dinámica de luz	49
4.10. Ensayos cinéticos enzimáticos	49
4.10.1. Mutante H53Q	52

4.10.2. Mutante H242Q	56
4.11. Calorimetría de titulación isotérmica, ITC	63
4.12. Inferencia filogenética	66
5. Discusión General y Perspectivas	71
6. Conclusiones	77

Introducción

1.1. Proteínas

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes y que más diversidad de funciones realizan en los seres vivos. En una célula se pueden encontrar miles de clases de proteínas diferentes que varían en tamaño desde péptidos pequeños hasta enormes polímeros de gran masa molecular, además son los productos finales en el flujo de información.

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos unidos covalentemente a través de un enlace amida, denominado enlace peptídico. Este enlace está formado por el grupo carboxilo y el grupo amino de dos aminoácidos distintos [35].

Se definen cuatro niveles de estructura de las proteínas. La estructura primaria es la secuencia lineal de aminoácidos. La estructura secundaria se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos que dan lugar a patrones estructurales repetitivos y locales, por ejemplo: las hélices α y las hebras β . La estructura terciaria es el arreglo tridimensional de todos los elementos de estructura secundaria que conforman al polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina estructura cuaternaria [14].

La estructura tridimensional de las proteínas es de vital importancia, ya que la función depende de la estructura. Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de otras moléculas, a las cuales se les conoce como ligantes. Un ligante puede ser cualquier tipo de molécula, desde iones metálicos hasta otras proteínas. Estos se asocian a un lugar de la proteína llamado sitio de unión, que muestra afinidad por el ligante en cuanto a tamaño, forma, carga y otras características fisicoquímicas. Además la interacción es específica: la proteína puede diferenciar entre miles de moléculas diferentes de su entorno y unir selectivamente solo una o unas pocas. Una proteína puede tener diferentes sitios de unión para diferentes ligantes.

1.2. Enzimas

Un tipo especial de proteínas son las enzimas, las cuales se encargan de catalizar (acelerar) las reacciones químicas que conforman el metabolismo de los seres vivos. Sin las enzimas las reacciones químicas no podrían ocurrir en una escala de tiempo biológicamente relevante. Los ligantes sobre los cuales actúan las enzimas se llaman sustratos y el sitio de unión del ligante se llama sitio activo o sitio catalítico.

Desde el punto de vista fisicoquímico, las enzimas disminuyen la energía de activación de las reacciones químicas que catalizan al estabilizar el estado de transición entre el sustrato y el producto.

1.2.1. Enzimas alostéricas

Las enzimas alostéricas o reguladoras son con frecuencia oligoméricas y presentan además de un sitio activo, un sitio alostérico que une distintas moléculas llamadas moduladores o efectores, los cuales son capaces de modificar la velocidad de reacción o la afinidad de la enzima por su sustrato [17].

Las enzimas alostéricas aparecen en puntos clave en las rutas metabólicas, por ejemplo al inicio de las vías o en las intersecciones entre ellas, en las que pueden controlar más eficientemente el flujo de energía y metabolitos [35]. Una enzima que cataliza el primer paso de una ruta biosintética puede ser inhibida por el producto final de la vía o activada por su propio sustrato evitando los ciclos fútiles [13, 18].

Al tratar con enzimas alostéricas, es necesario definir dos conceptos esenciales para su satisfactoria comprensión, estos son: alostería y cooperatividad. Los cuales de forma histórica y práctica han estado asociados como fenómenos complementarios aunque no necesariamente lo esten en términos puramente mecanísticos [10].

1.2.1.1. Alostería

La alostería se define como el mecanismo de regulación en el que una proteína permite cambios de afinidad por su sustrato o su catálisis en presencia de un efector.

De acuerdo con Aron W. Fenton [17], la alostería tiene tres características principales:

1. El efector no es químicamente igual al sustrato.

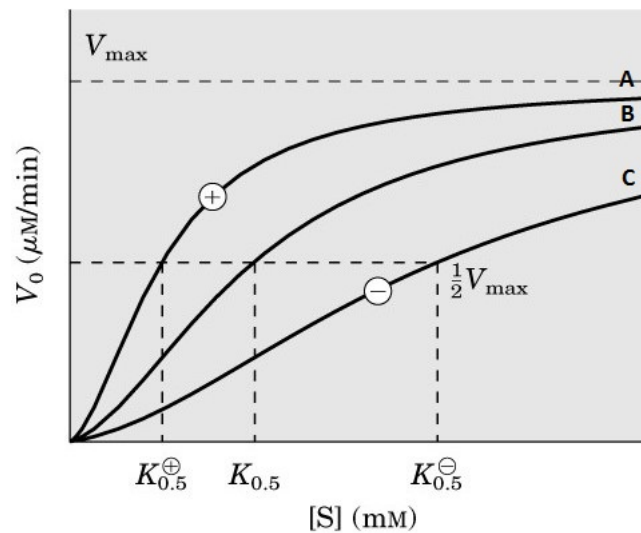


Figura 1.1: La curva A, muestra los efectos de un modulador positivo (Activador +), en la curva C un modulador negativo (inhibidor -) sobre un sistema alostérico tipo K, en el que la $K_{0.5}$ se altera sin cambio en la V_{max} . La curva B muestra la relación sustrato-actividad sin modulador. Modificado de Nelson *et al.* [35]

2. El efector propicia un cambio en las propiedades funcionales de la proteína (la afinidad por un segundo ligante o la modificación de las propiedades catalíticas).
3. El efector se une a un sitio topológicamente diferente (sin superposición) del sitio activo de la proteína.

A la regulación ejercida por efectores alostéricos también se le conoce como efecto heterotrópico [18]. Un ejemplo de ello es la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* que se activa alostéricamente por el compuesto *N*-acetilglucosamina-6-fosfato [9].

Los sistemas alostéricos tipo K son aquellos en los cuales el efector modifica la afinidad de la enzima por el sustrato (Fig.1.1). Por otro lado los sistemas tipo V, son aquellos en los que el efector alostérico influye sobre la constante catalítica de reacción [17, 18].

1.2.1.2. Cooperatividad

Generalmente la cinética de las enzimas no reguladoras se describe mediante la ecuación de Michaelis-Menten, es decir, en un gráfico de velocidad contra sustrato tienen un comportamiento hiperbólico rectangular como resultado de la catálisis del sustrato; sin embargo las enzimas reguladoras suelen tener otro tipo de comportamiento cinético debido a que presentan curvas de saturación sigmoideas. La sigmoidicidad generalmente refleja interacciones cooperativas entre las subunidades, en otras palabras cambios en la estructura de una, se traducen en cambios estructurales en las subunidades

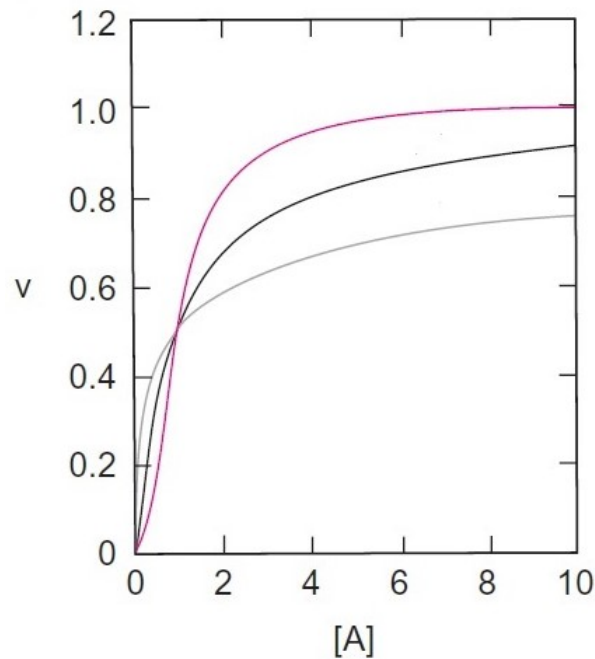


Figura 1.2: Cooperatividad en la cinética de enzimas reguladoras. La curva en azul representa el comportamiento cinético convencional de Michaelis-Menten de las enzimas no reguladoras. La curva roja muestra el comportamiento cinético cooperativo positivo con respecto al sustrato A. La curva gris muestra cooperatividad negativa con respecto al sustrato A. *Imagen modificada de [18].*

adyacentes [24, 31]. La cooperatividad es la asistencia mutua de ligantes idénticos para unirse a sitios equivalentes en una proteína; a este fenómeno también se le conoce como efecto homotrópico [18]. La cooperatividad puede ser positiva o negativa (Fig. 1.2), aunque ambos casos pueden ser observados, la cooperatividad positiva es la más frecuente, probablemente debido a que permite la activación por el sustrato en el metabolismo, lo cual es un mecanismo de control valioso [13, 18], ya que la unión de una molécula de ligante incrementa la afinidad por este mismo. El comportamiento opuesto, la cooperatividad negativa, es poco usual en la naturaleza y se caracteriza por decremento en la capacidad de unión por un ligante [12]. El papel fisiológico del incremento de la sensibilidad como respuesta a una señal es obvio, sin embargo resulta difícil identificar la importancia del comportamiento opuesto en el caso de cooperatividad negativa. Levitzki [27], sugiere que la disminución de la afinidad por el ligante a altas concentraciones podría ser el costo requerido por la obtención de gran sensibilidad al ligante a bajas concentraciones, sin embargo esta explicación no es del todo sostenible, por lo que el rol fisiológico de la cooperatividad negativa sigue siendo un misterio [12]. No obstante, es importante mencionar que la gran mayoría de los casos reportados con este tipo de comportamiento, corresponden a cooperatividad negativa aparente, ya que es causada por heterogeneidad en la afinidad de los sitios [12, 13, 27].

En 1910 A.V. Hill generó una ecuación matemática que describió el carácter cooperativo de las

curvas de saturación de la proteína hemoglobina. La ecuación de Hill (Ec. 1.1) describe de manera muy exacta datos que presentan cooperatividad, sin embargo carece de un modelo físico que le de sustento y significado a cada uno de los parámetros, en particular al coeficiente de Hill h . Por ello es una ecuación fenomenológica empírica.

$$v = \frac{V_{max}S^h}{(K_{0.5})^h + S^h} \quad (1.1)$$

La ecuación de Hill permite tener un valor v de velocidad, un valor de V_{max} es decir, la velocidad teórica en la cual todos los sitios activos están ocupados por el sustrato, y una constante de afinidad por un ligante llamada $K_{0.5}$. La $K_{0.5}$ tiene una desventaja, las unidades de sustrato están elevadas a un exponente llamado coeficiente de Hill h , y es por ello que es de difícil interpretación física [12, 13]. Sin embargo en modelos específicos adquiere sentido físico [46].

Sin embargo, el coeficiente h es un parámetro experimental ampliamente utilizado para caracterizar la cinética cooperativa entre una macromolécula y un ligante, por lo que el coeficiente h es utilizado como un índice de cooperatividad [46]. Cuando $h > 1$ señala cooperatividad positiva y cuando $h < 1$ señala cooperatividad negativa. Particularmente cuando $h = 1$ la ecuación de Hill 1.1 describe curvas hiperbólicas y se convierte en un equivalente de la ecuación de Michaelis-Menten, es decir no existe cooperatividad [12, 13, 18].

1.2.1.3. Modelos alostéricos

Por décadas, los dos modelos dominantes para explicar la alostería fueron el modelo *simétrico* o MWC (Monod-Wyman-Changeux) y el modelo *secuencial* o KNF (Koshland-Nemethy-Filmer). Ambas propuestas fueron influyentes y coincidieron en la importancia del cambio conformacional entre los estados estructurales bien definidos.

Por un lado, el modelo MWC consideraba la preexistencia de dos estados, tenso (T) y relajado (R), cada una con diferente afinidad por el efector alostérico, cuyo equilibrio es desplazado en función del ligante alostérico. Por lo que el ligante alostérico "selecciona", una de las dos conformaciones, generalmente la de más afinidad R. El modelo MWC hace suposiciones que directamente involucran a la geometría:

- En el interior de cada conformación todas las subunidades unen ligandos con afinidad equivalente,

es decir, todas las subunidades tienen la misma afinidad por el efector alostérico.

- Existen imposiciones a la estructura cuaternaria que determinan que la transición alostérica imponga la misma conformación a todas las subunidades del oligómero. En otras palabras, no se admiten oligómeros híbridos, solo pueden existir las conformaciones cuaternarias R y T.

Entonces al asumir la misma afinidad para cada subunidad, se alude a la existencia de arreglos geométricos a nivel de estructura cuaternaria. Es por eso que el modelo postula que la transición alostérica conserva la simetría, desplazando a la macromolécula de una conformación simétrica a otra. Este modelo mostró tener una amplia capacidad explicativa ante fenómenos como la cooperatividad positiva y la inhibición alostérica. La primera se explica suponiendo que el sustrato desvía el equilibrio entre las conformaciones R y T hacia la que tiene más afinidad (R), una vez hecho esto ponía a disposición de los sustratos otros sitios más afines y aún vacíos. La inhibición alostérica se justifica suponiendo que el inhibidor alostérico y el sustrato tienen preferencias conformacionales opuestas, donde el sustrato es más afín a la forma R y el inhibidor alostérico a la forma T; por lo que el inhibidor desplaza el equilibrio hacia la conformación T y reduce la capacidad de la enzima para unir sustratos [31].

Al mismo tiempo, el modelo alternativo KNF proponía la incorporación de la idea del ajuste inducido para explicar la alostería. En este modelo los ligantes imponían transiciones conformacionales en las subunidades oligoméricas, esto es, se asumía que las subunidades cambiaban de conformación solo al unirse el ligante. Además suponía la existencia de oligómeros híbridos, con subunidades en distintos estados conformacionales. Por tanto, el modelo KNF eludía las consideraciones simétricas del modelo MWC. Es importante mencionar que el modelo KNF además de ofrecer una explicación posible para la cooperatividad positiva, también es compatible con la existencia de cooperatividad negativa [24].

Otro modelo alostérico más actual es el TTS (*Tertiary two-state*), el cual fue propuesto por Henry *et al.* en 2002 [20]. En él se resalta la importancia de las transiciones de estructura terciaria provocadas por la unión del ligante con la enzima, y como esas transiciones se transmiten entre subunidades y dan lugar a un cambio cuaternario. El modelo TTS fue propuesto para explicar la cooperatividad de la hemoglobina en condiciones fisiológicas [20], sin embargo parece describir adecuadamente el fenómeno alostérico en otras proteínas tales como la GlcN6P desaminasa de *E. coli* [48].

El modelo TTS fue motivado por los experimentos realizados por Mozzarelli y colaboradores, los primeros conciernen a la estructura cuaternaria de la conformación T y los segundos a la estructura

cuaternaria de R. Dado que los cambios terciarios están estrechamente acoplados a la transición cuaternaria hubo que disociarlos, de esta manera, Mozzarelli estudió la unión de ligantes a la hemoglobina en cristales y describió la unión de las diferentes conformaciones cuaternarias R y T; posteriormente hizo estudios inmovilizando a la proteína a través de la nanoencapsulación en geles porosos de sílice en sus dos estados conformacionales R y T, de donde se concluyó que existen estados terciarios con diferente afinidad por el ligante, un estado t de baja afinidad y un estado r de alta afinidad; estos dos estados terciarios pueden estar presentes en ambos conformeros cuaternarios. Se demostró también que en función del estado conformacional cuaternario hay estados terciarios favorecidos, cuando la proteína está en conformación T, el estado terciario favorecido es el t, mientras que cuando la proteína está en R, el estado terciario favorecido es r. En esencia el modelo TTS es similar al modelo MWC, sin embargo difieren en que el primero da al equilibrio de las conformaciones terciarias un rol fundamental.

Aunque los modelos han sido exitosos en la descripción general del fenómeno alostérico, ha existido un intenso debate acerca de cuál de ellos es más adecuado. Actualmente el punto de discusión ha cambiado, ya no se centra en la adecuación entre ambos modelos, sino en las limitaciones de éstos. Cada vez más científicos se han percatado que estos modelos al ser meramente fenomenológicos no ofrecen una explicación al cuestionamiento fundamental: como la unión de un ligante y su modificación produce el efecto alostérico observado a nivel atómico [12, 33].

1.3. La GlcN6P desaminasa

1.3.1. NagBI

La GlcN6P desaminasa (2-amino-2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato aminohidrolasa-cetol isomerasa, EC 3.5.99.6) es una enzima clave en el metabolismo de aminoazúcares, ya que se encarga de la conversión de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en un ion amonio (NH_4^+) y en fructosa 6-fosfato (Fru6P), la cual es un intermediario primordial en el metabolismo del carbono en muchas especies. La GlcN6P desaminasa ha sido extensamente estudiada en bacterias [9, 30, 39, 45]; y en algunos organismos eucariontes como hongos, insectos y mamíferos [5, 16, 26, 38, 42].

En todos estos organismos mencionados la enzima GlcN6P desaminasa se encuentra codificada por el gen *nagBI*, cuya unidad funcional estructural es un hexámero y posee un plegamiento derivado de Rossman (Fig. 1.3a). La GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* es una de las proteínas alostéricas

más estudiadas tanto en estructura, mecanismo catalítico y cinética alostérica ([1–4, 6–9, 11, 21, 25, 32, 36, 40, 43, 48]). NagBI de *E. coli* es una enzima alostérica que exhibe efectos heterotrópicos por el compuesto *N*-Acetil-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P), el cual al estar en contacto con la proteína modifica la afinidad por la GlcN6P, aumentándola (figura 1.3b). También presenta efectos homotrópicos por su sustrato debido a que presenta curvas de saturación sigmoides (Fig. 1.3b). Ambos efectos están estrechamente acoplados, sin embargo son disocables bajo ciertas condiciones experimentales [48]. Este sistema alostérico fue explicado en términos generales mediante el modelo MWC [9]. La GlcN6P desaminasa tipo NagBI es un sistema tipo K puro porque la afinidad de la proteína por el sustrato aumenta en respuesta al activador, y su V_{max} permanece constante (Fig. 1.3b) [9].

1.3.2. NagBII

En el año 2005, el grupo de Tanaka y colaboradores, reportaron una GlcN6P desaminasa en la arquea *Thermococcus kodakaerensis* [44], la cual difiere totalmente en secuencia y plegamiento a la GlcN6P desaminasa codificada por el gen *nagBI* de *E. coli*. Posteriormente en el año 2007 fue hallada una proteína homóloga en la arquea *Pyrococcus furiosus*. Este nuevo tipo de desaminasas análogas fueron denominadas como NagBII [47]. Las desaminasas tipo NagBII en estas arqueas tienen la misma función, pero a diferencia de las desaminasas NagBI, poseen una cinética hiperbólica sin propiedades alostéricas ni cooperatividad [44].

Las GlcN6P desaminasas tipo NagBII poseen un plegamiento de azúcar isomerasa (SIS, *Sugar Isomerase*) [23, 44, 47] y su unidad estructural es un dímero [23]. A pesar de no compartir similitud en estructura y secuencia con la proteína NagBI, NagBII tiene una alta identidad estructural con el dominio C-terminal de la proteína que realiza una función estrechamente relacionada, la glutamina:fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT) (Fig. 1.4) [23, 44, 47].

La enzima GFAT cataliza la formación irreversible de GlcN6P y glutamato a partir de Fru6P y glutamina. Esta proteína posee un dominio N-terminal de glutamina amino transferasa (GAT) que se encarga de la producción de amonio a partir de la glutamina, el cual es utilizado para la aminación de la Fru6P. El dominio C-terminal SIS se encarga de la isomerización de la GlcN6P [15].

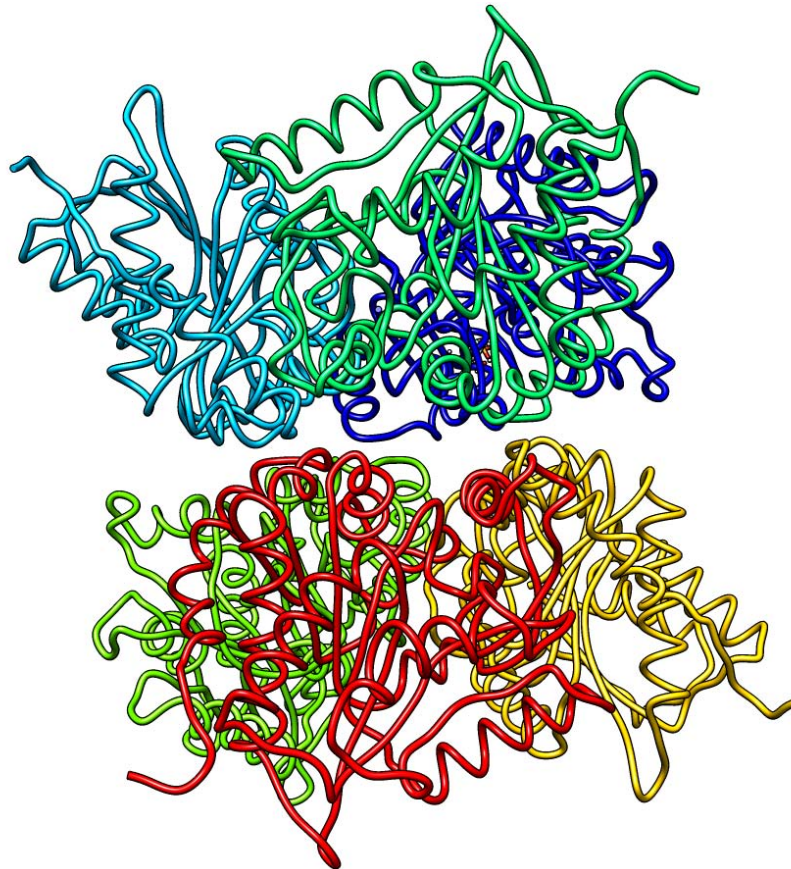
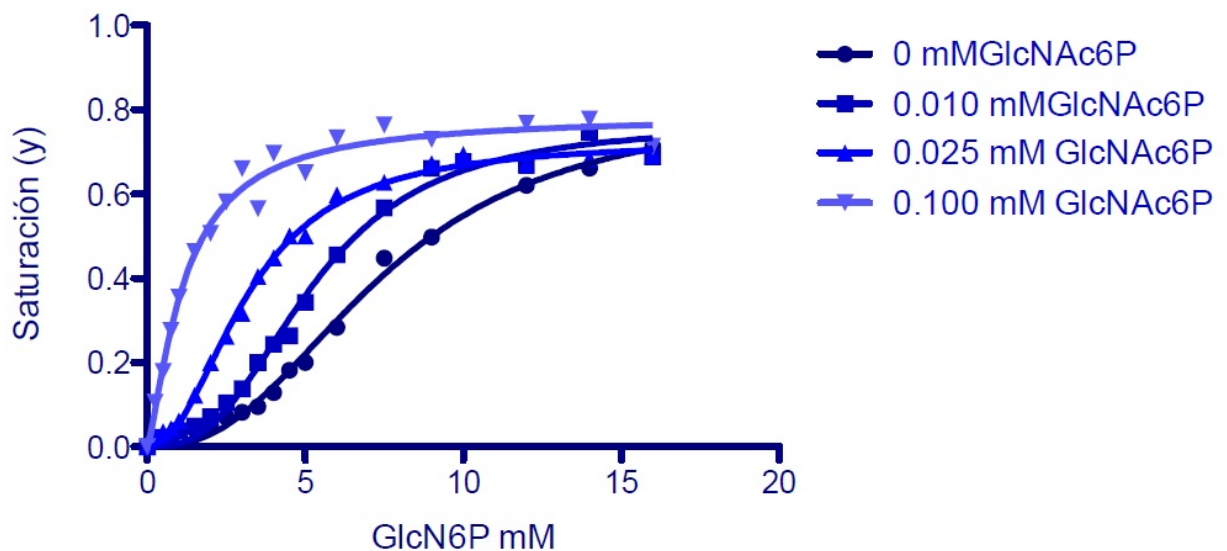
(a) GlcN6P desaminasa de *E. coli* (PDB:1HOT)(b) Cinética de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*

Figura 1.3: La GlcN6P desaminasa de *E. coli*, posee plegamiento derivado de Rossmann y su unidad estructural funcional es un homohexámero, en un color diferente se muestra cada monómero que conforma el oligómero 1.3a (PDB:1HOT). En 1.3b, se muestra una cinética de la reacción de NagBI de *E. coli*, el cual es un sistema alostérico tipo K puro (Imagen modificada de [28]).

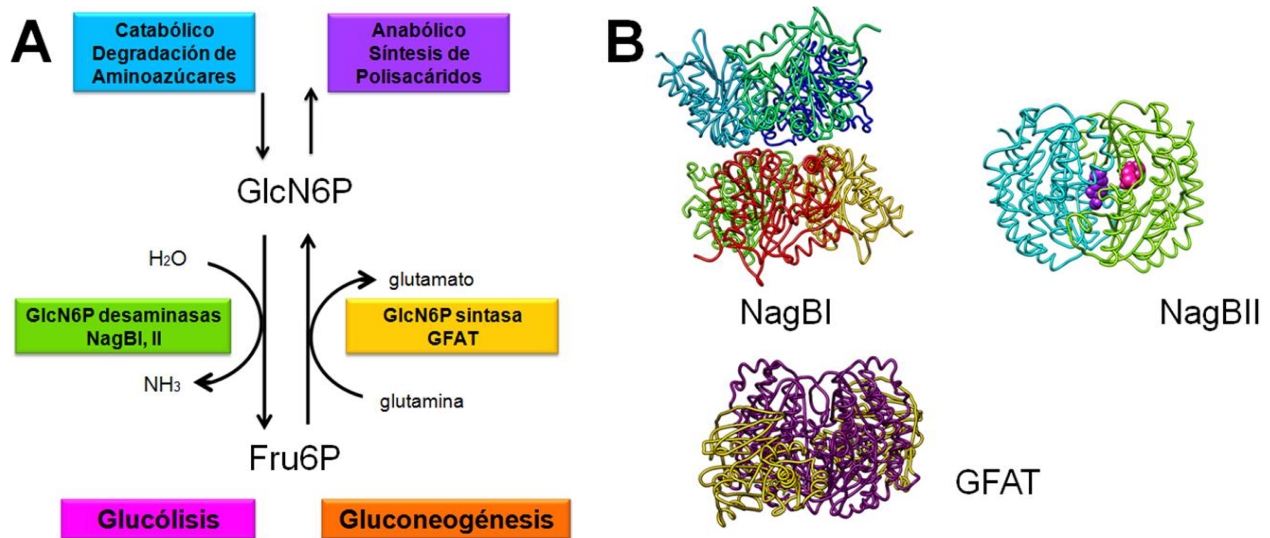


Figura 1.4: (A) Reacciones catalizadas por la GlcN6P desaminasa y GlcN6P sintasa (GFAT). (B) Diferencias estructurales entre NagBI (PDB:1HOT), NagBII(PDB:3HBA) y GFAT (PDB:2VF5).

1.3.3. Convergencia evolutiva

Usualmente las enzimas que catalizan la misma reacción muestran similitud en secuencia y en estructura, sin embargo existen ejemplos en los cuales proteínas no relacionadas tienen la misma especificidad, tal es el caso de la desaminasa tipo NagBI y NagBII presentado en este trabajo. Estas enzimas son análogas porque han evolucionado independientemente una de otra y no comparten un ancestro común cercano; sin embargo Galperin y colaboradores [19, 37] las denominan *NISE* (*Non-homologous Isofunctional Enzymes*), enzimas no homólogas isofuncionales, ya que resulta más adecuado para referirse a este tipo de enzimas.

La sola comparación de secuencias no puede probar que dos proteínas están evolutivamente relacionadas, sin embargo el origen común puede inferirse a partir de la conservación estructural de la proteína, ya que la secuencia puede ser diluida por la divergencia. Por lo tanto la hipótesis de homología puede descartarse solo cuando las proteínas tienen diferentes plegamientos [19, 37]. Es claro que el caso de las proteínas NagB, se trata de un auténtico ejemplo de convergencia evolutiva funcional, ya que NagBI posee plegamiento derivado de Rossmann y NagBII tiene plegamiento SIS.

Las enzimas análogas son consideradas como raras y excepcionales, y el mecanismo más probable por el cual surgen es el reclutamiento enzimático [19, 37], un proceso en el cual una enzima existente se enlista para realizar una nueva función que le provea una ventaja selectiva al organismo huésped [41]. La nueva función a menudo es químicamente similar a la de la enzima ancestral [41]. El reclutamiento enzimático requiere un cambio genético aleatorio que permita la realización de una nueva función y

la posterior fijación del gen que codifica a la nueva enzima dentro de una población dada. En muchos casos, el reclutamiento enzimático representa un evento genético molecular inicial en el que se basa la adquisición de nuevos potenciales metabólicos [41].

1.4. La GlcN6P desaminasa de *Shewanella oneidensis*

En 2006, el grupo de Yang y colaboradores, reportaron en la bacteria *Shewanella oneidensis* una GlcN6P desaminasa que tenía plegamiento SIS que presentaba curvas de saturación sigmoideas y activación alostérica por la GlcNAc6P (Fig. 1.5b), tal como NagBI [47].

En el trabajo de Marcos-Viquez [28] se hizo una caracterización preliminar estructural y de la cinética alostérica de la desaminasa NagBII de *S. oneidensis*.

1.4.0.1. Estudios estructurales

El estado oligomérico de la proteína se determinó por varios métodos: cromatografía de exclusión molecular, geles de poliacrilamida con gradiente de poro en condiciones nativas, geles en condiciones desnaturizantes con el oligómero entrecruzado con glutaraldehído y medidas de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) con la proteína libre y en presencia de ligantes, en este último se observó una compactación en presencia de GlcNAc6P (de 7.4 ± 0.1 a 6.5 ± 0.2 nm). Sin embargo, en todos los casos se identificó al dímero como la forma estable de la proteína en solución [28].

Debido a que no existe una estructura cristalográfica de la proteína, Marcos-Viquez [28] construyó un modelo por homología, tomando como base la estructura de una proteína depositada en el *Protein Data Bank* (PDB) que posee 84 % de identidad con respecto a la proteína de estudio (PDB:3HBA), la cual está reportada como posible fosfoazúcar isomerasa de la bacteria *Shewanella denitrificans*, de la que no hay reportes experimentales acerca de su función. Recientemente se ha comprobado que esta proteína es una GlcN6P desaminasa alostérica con efectos homotrópicos por el sustrato (J. Marcos-Viquez, comunicación personal).

El estado oligomérico de la estructura 3HBA es un dímero, al igual que la estructura de la desaminasa tipo NagBII de *P. furiosus* (2CB0) reportada por Kyung-Jin y cols. [23], lo cual es consistente con lo obtenido por Marcos-Viquez [28].

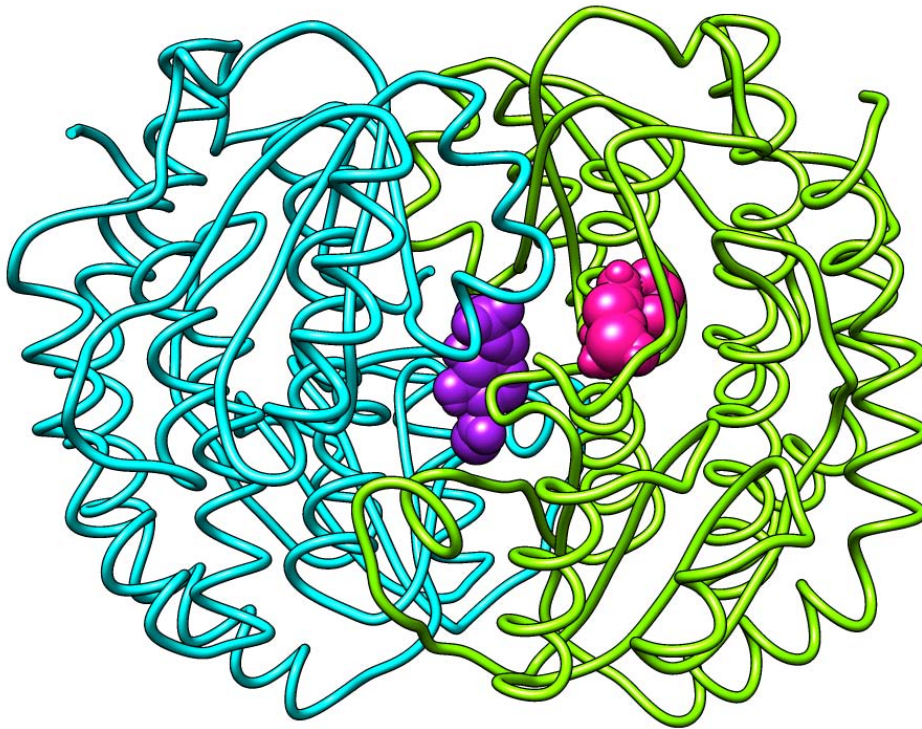
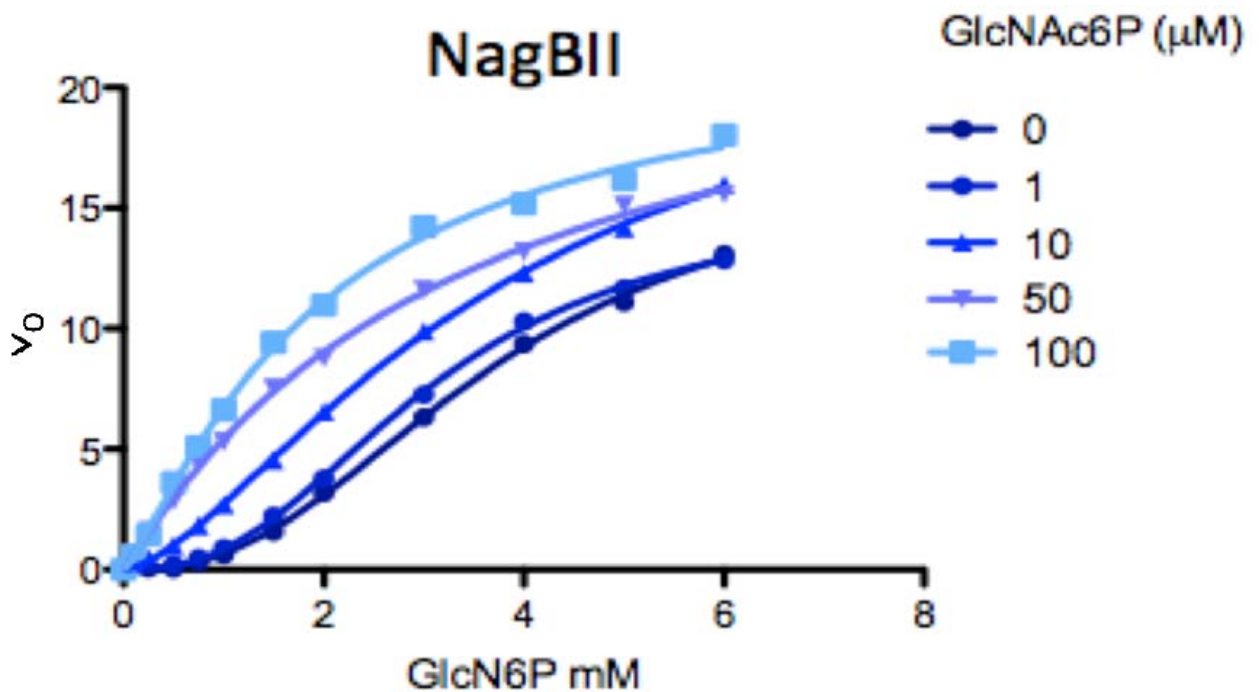
(a) GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* (PDB:3HBA)(b) Cinética de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*

Figura 1.5: La GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*, posee plegamiento de azúcar isomerasa (SIS) y su unidad estructural funcional es un dímero, en un color diferente se muestra cada monómero que conforma el oligómero 1.5a(PDB:3HBA). En 1.5b una cinética de la reacción de NagBII de *S. oneidensis*, el cual es un sistema alostérico tipo K mixto, porque se aprecia un efecto V en la cinética (Imagen modificada de [28]).

1.4.0.2. Sitio alostérico

El sitio alostérico se encontró mediante una simulación de acoplamiento sobre la superficie del modelo estructural, usando como ligante la GlcNAc6P. Los resultados con menor energía libre asociada indican que una sola molécula de GlcNAc6P se une a la proteína, justo en el centro del dímero haciendo contactos idénticos con la Ser51 y Lys218 de cada subunidad [28]. El sitio fue comprobado experimentalmente con la mutante K218A, cuya cinética exhibe pérdida de la activación alostérica, no obstante conserva la unión cooperativa por la GlcN6P. La estequiometría de unión se midió a través de la utilización de activador alostérico marcado radioactivamente ($^3H - GlcNAc6P$), la K_d fue de $85 \pm 17 \mu M$ confirmando que solo una molécula de GlcNAc6P se une al dímero de proteína.

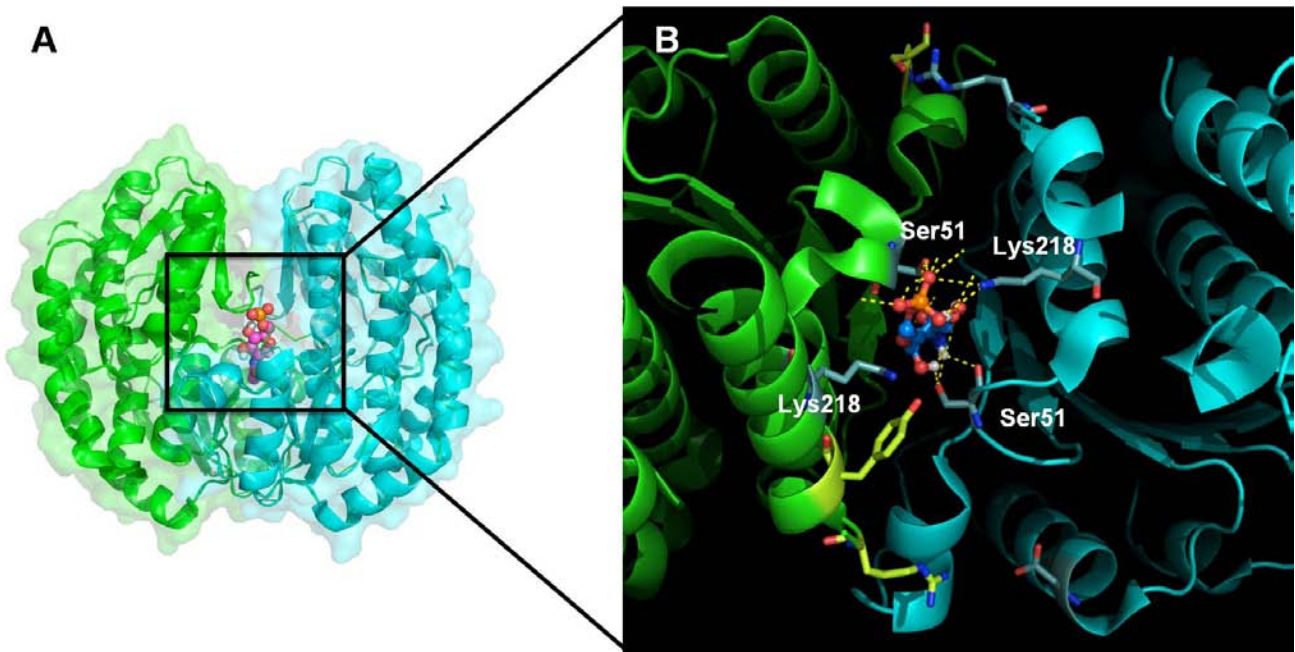
1.4.0.3. Paradoja de la cooperatividad

El comportamiento cooperativo de la enzima NagBII de *S. oneidensis* no fue exitosamente descrito por ningún modelo alostérico, esto debido a las restricciones acerca de la cooperatividad implícitos en ellos. Como ya se detalló en la sección de cooperatividad, la definición de cooperatividad implica una relación estrecha entre el estado oligomérico de la proteína con el grado de sigmoicidad de las curvas de actividad de la enzima, las cuales pueden ser cuantificadas mediante el coeficiente de Hill, h . Dado que la enzima NagBII de *S. oneidensis* posee un $h = 2.6$ [28], contradice uno de los postulados de los modelos alostéricos, ya que de acuerdo con Wyman [46], la cooperatividad máxima que puede presentar una enzima alostérica está limitada por el número de subunidades (n), tal que $h \leq n$.

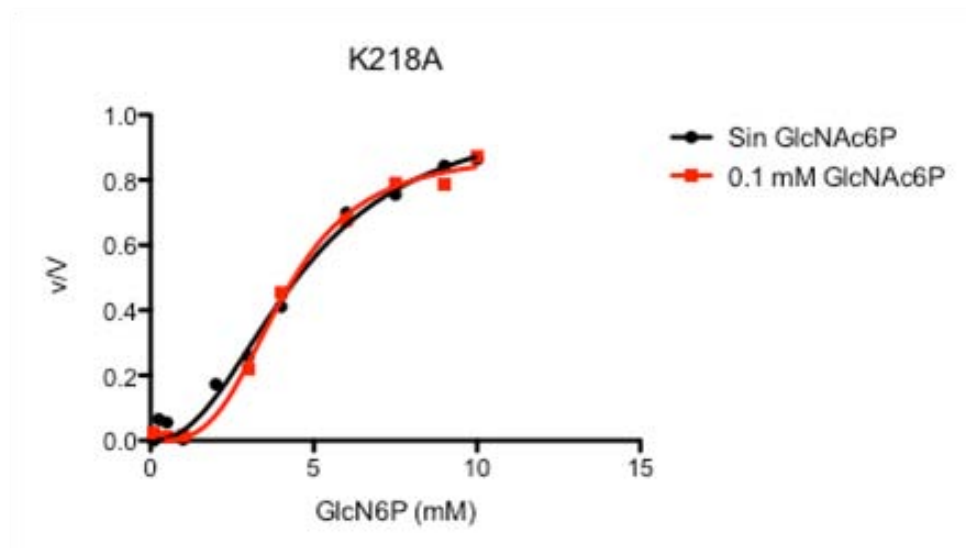
Otro aspecto remarcable es que en esta enzima la activación alostérica y la cooperatividad son efectos disociables, tal como se demostró con la mutante K218A (Fig. 1.6b). Esta característica es única dentro de los sistemas alostéricos, ya que usualmente ambos mecanismos están termodinámicamente acoplados de tal manera que cuando uno es perturbado, el otro también resulta afectado.

1.4.0.4. Un nuevo modelo para describir la cooperatividad

Existen pocas excepciones a los modelos alostéricos que describan cooperatividad y en el trabajo de Marcos-Viquez [29] se descartan cada una de ellas como explicación plausible de las curvas de saturación sigmiodes observadas en la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*. Ninguna de las excepciones (cooperatividad cinética, cambio de estado oligomérico dependiente de la unión de ligantes o la modificación covalente) precisó un comportamiento similar al observado en NagBII.



(a) Sitio alostérico



(b) Cinética de la mutante K218A

Figura 1.6: En 1.6a Se muestra el modelo estructural del dímero, en el que se muestra el sitio de unión de la GlcNAc6P en el centro de la estructura. La GlcNAc6P hace contactos idénticos con los residuos K218 y S51 de cada subunidad. En 1.6b, la cinética de la mutante K218A, en la que se muestra la pérdida de la activación alostérica pero conserva la cooperatividad causada por la GlcN6P. Imagen tomada de Marcos-Viquez, 2013 [28].

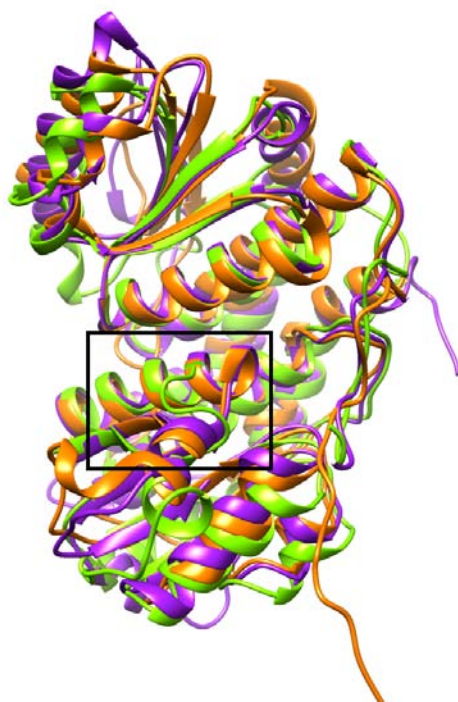
Con base en un criterio estructural, Marcos-Viquez propuso un nuevo modelo en el que en ausencia de activador alostérico, existen dos sitios de unión al sustrato por subunidad, uno productivo que cataliza la isomerización del sustrato y otro no productivo regulador, cuya ocupación es esencial para la formación del sitio productivo; en presencia de activador la enzima se compacta y el sitio regulador se vuelve catalítico.

Un aspecto estructural importante que llevó a la propuesta del nuevo modelo es que las enzimas GFAT y las GlcN6P desaminasas de arqueas tienen altamente conservados los residuos que conforman el sitio de unión por el sustrato (H242, K326, E226), además de que poseen una geometría equivalente. Sin embargo, el segmento encargado del reconocimiento del sustrato (residuo 50-54), posee un diferente arreglo espacial, es decir, posee una estructura secundaria distinta debido a la formación de un asa que abarca del residuo 52 al 65, como se muestra en la Fig. 1.7b. Sobre esta asa se ubica el sitio alostérico (Ser51) y al mismo tiempo esta estructura ocasiona que la cavidad del sitio activo donde se posiciona el sustrato sea más profunda [29].

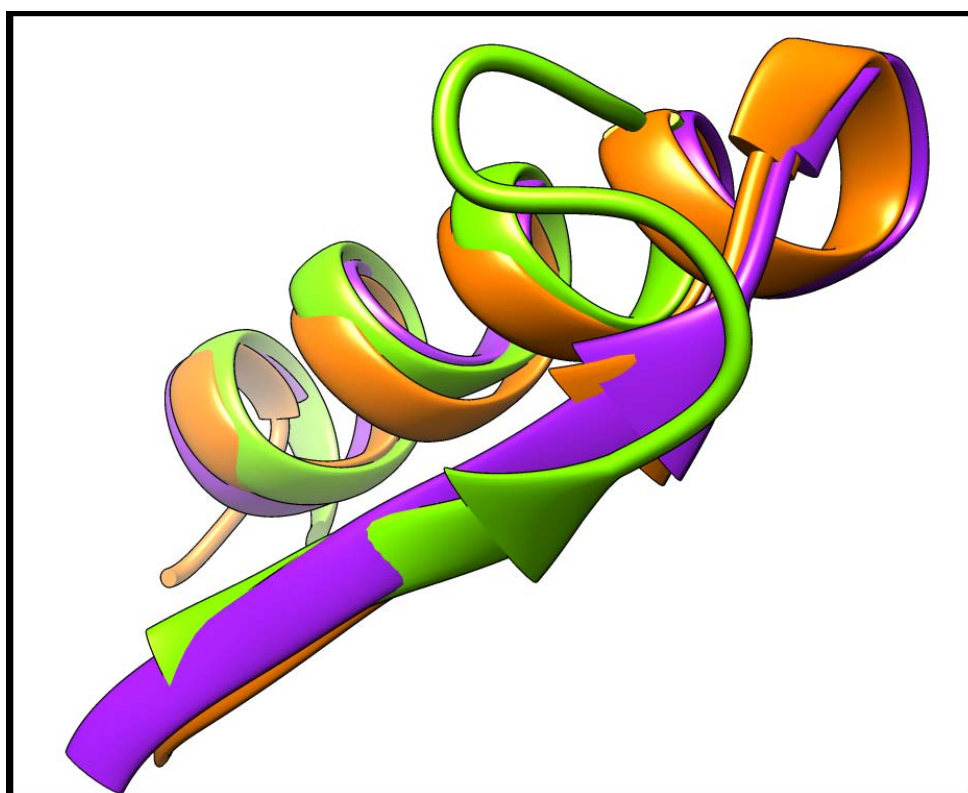
Este cambio en la estructura secundaria del segmento 50-54, puede explicar la aparición del sitio alostérico y podría estar relacionada con el comportamiento cooperativo de la enzima, ya que las enzimas homólogas no presentan ninguna de estas dos características.

Es importante hacer hincapié en el sitio activo de la enzima, ya que este no pudo ser determinado siguiendo la metodología utilizada para identificar el sitio alostérico. Al hacer la simulación de acoplamiento molecular sobre el modelo estructural, utilizando como ligante una molécula de GlcN6P, el resultado de menor energía libre asociada mostró que el sustrato se unía a un sitio distinto al catalítico conservado (Fig. 1.8). Este nuevo sitio se ubica precisamente donde la hélice del asa 52-65 es más corta (figura 1.7b). Este aparente sitio de unión tiene residuos cercanos como la R48, H53 y E219 que podrían tener un rol activo en la catálisis debido a sus propiedades fisicoquímicas y su arreglo geométrico.

Dadas estas observaciones, Marcos-Viquez [29], sugiere un modelo que implica activación esencial por el mismo sustrato (Fig. 1.9), es decir libre de ligantes (Fig. 1.10a), una molécula de GlcN6P se une a la enzima en el sitio regulador encontrado por simulación de acoplamiento (Fig. 1.10b), una vez ocupado, una segunda molécula de sustrato se une al sitio catalítico conservado equivalente en homólogas (Fig. 1.11a), el cual sería el único funcional productivo. Sin embargo, cuando la enzima está ocupada en su sitio alostérico posee una conformación más compacta y el sitio regulador se vuelve catalítico (Fig. 1.11b); esto ocurre porque el sustrato solo puede unirse al sitio regulador y la histidina catalítica, H242 perteneciente al sitio conservado, puede adentrarse a la cavidad y abrir el anillo de



(a) Alineamiento estructural



(b) Asa del segmento 52-65

Figura 1.7: En (a) se muestra un alineamiento estructural de tres enzimas homólogas. En morado la GFAT de *E. coli* (PDB:2VF5), en naranja la GlcN6P desaminasa de *P. furiosus* (PDB:2CB0) y en verde el modelo estructural de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* (PBD:3HBA) RMSD 1.167 Å y 1.190 Å. En (b) se muestra el segmento del residuo 52 al 65 correspondiente al asa que da lugar al sitio alostérico y que presenta una discontinuidad en la estructura secundaria.

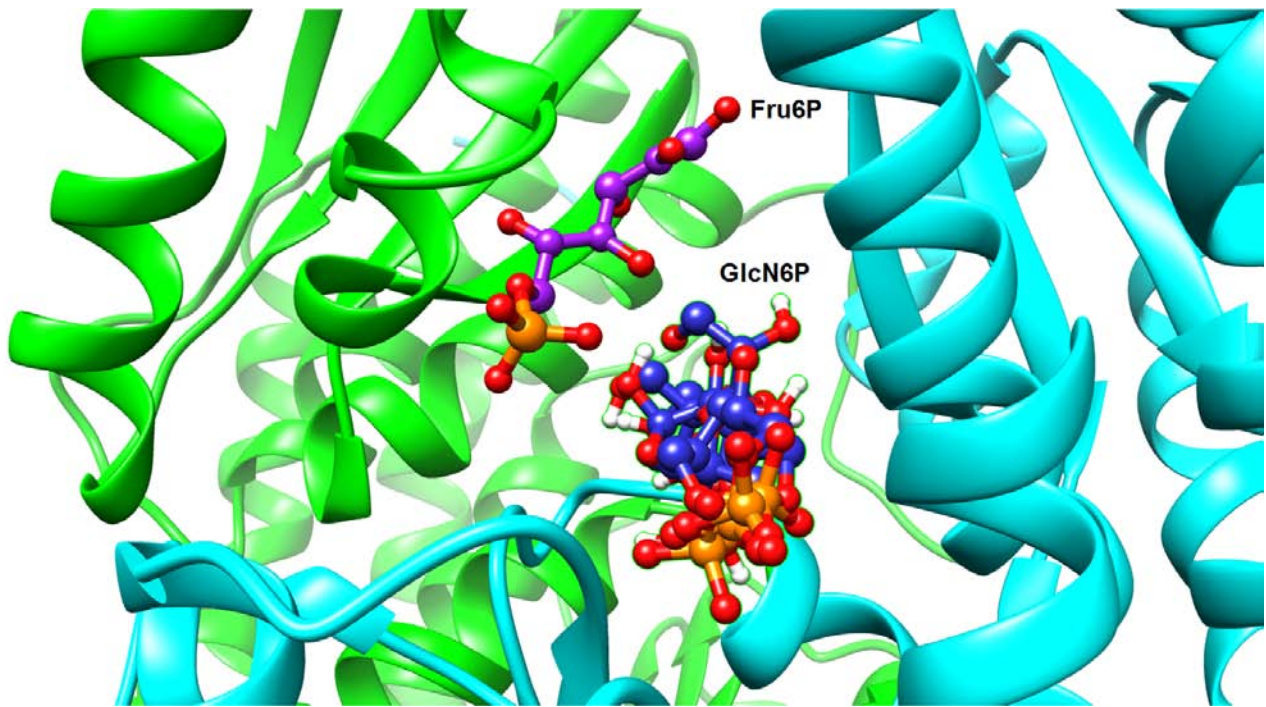


Figura 1.8: Simulación de acoplamiento molecular sobre el modelo estructural utilizando la GlcN6P (azul) como ligante reveló un nuevo sitio de unión, diferente al catalítico conservado en homólogas (Fru6P en morado).

GlcN6P.

En términos estructurales el modelo de activación esencial también permitiría explicar la compactación de la enzima observada por DLS [28] que ocurre al unirse con el activador alostérico. Cuando la enzima está ocupada con activador alostérico y se encuentra en una forma compacta, el sustrato se une al sitio encontrado por simulación de acoplamiento, es decir al sitio más profundo donde se forma la cavidad, entonces la H242 (parte del sitio catalítico conservado) se adentra para mediar la apertura del anillo del sustrato. La H242 solo puede alcanzar este sitio en la conformación compacta. En ausencia de activador alostérico el sustrato ocupa el mismo sitio de la cavidad, pero la H242 no es capaz de alcanzar al sustrato; por tanto Marcos-Viquez [29], plantea que la unión del primer sustrato permite que una segunda molécula de GlcN6P se una al sitio activo conservado, en donde la H242 está lo suficientemente cerca para catalizar la apertura del anillo del azúcar.

Otro aspecto de la enzima que puede ser explicado por este modelo de activación esencial es el efecto de activación V observado en la cinética de la enzima, ya que podría atribuirse a las dos formas catalíticas de la enzima, una propiciada por la activación homotrópica (por el sustrato) y otra por la activación heterotrópica (por el activador alostérico), las cuales poseen diferentes estados catalíticos y conformacionales.

Los dos sitios en cada subunidad podrían estar interconectados con los sitios de la otra subunidad de

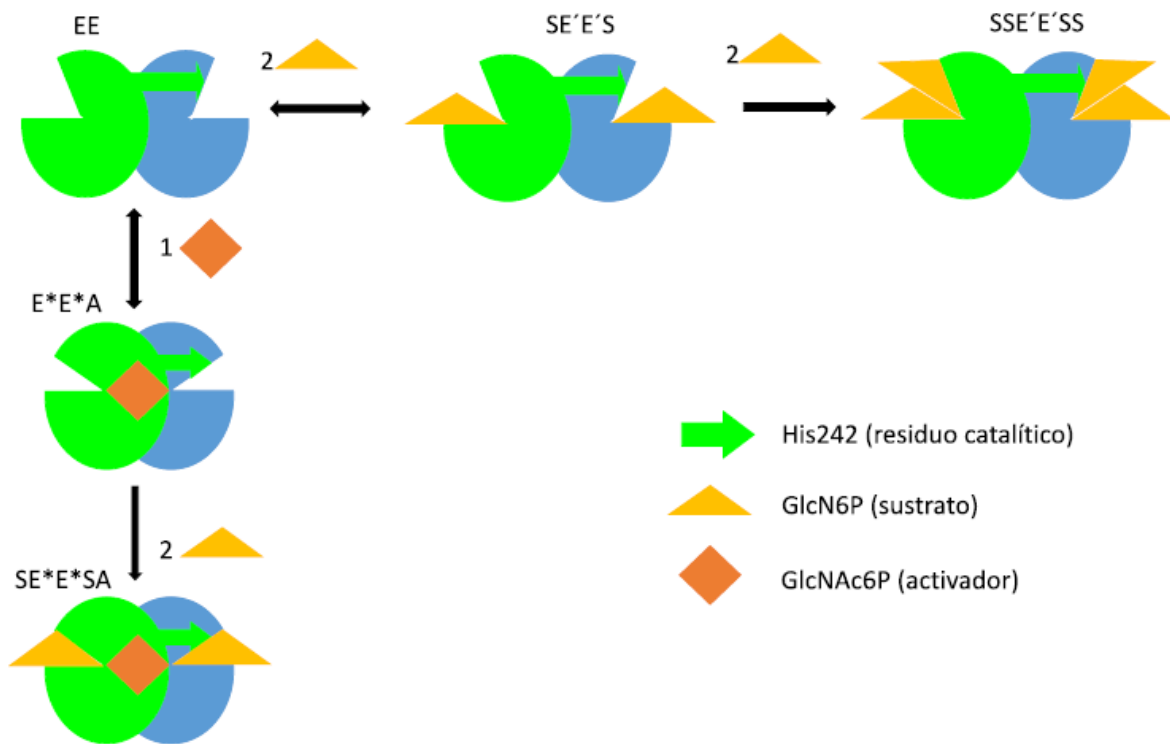


Figura 1.9: Esquema estructural simplificado que muestra los tipos de activación en la enzima. Donde A es el activador alostérico, S el sustrato, E la enzima, E* la enzima con activador y E' enzima con sustrato en el sitio no productivo. *Imagen tomada de [29].*

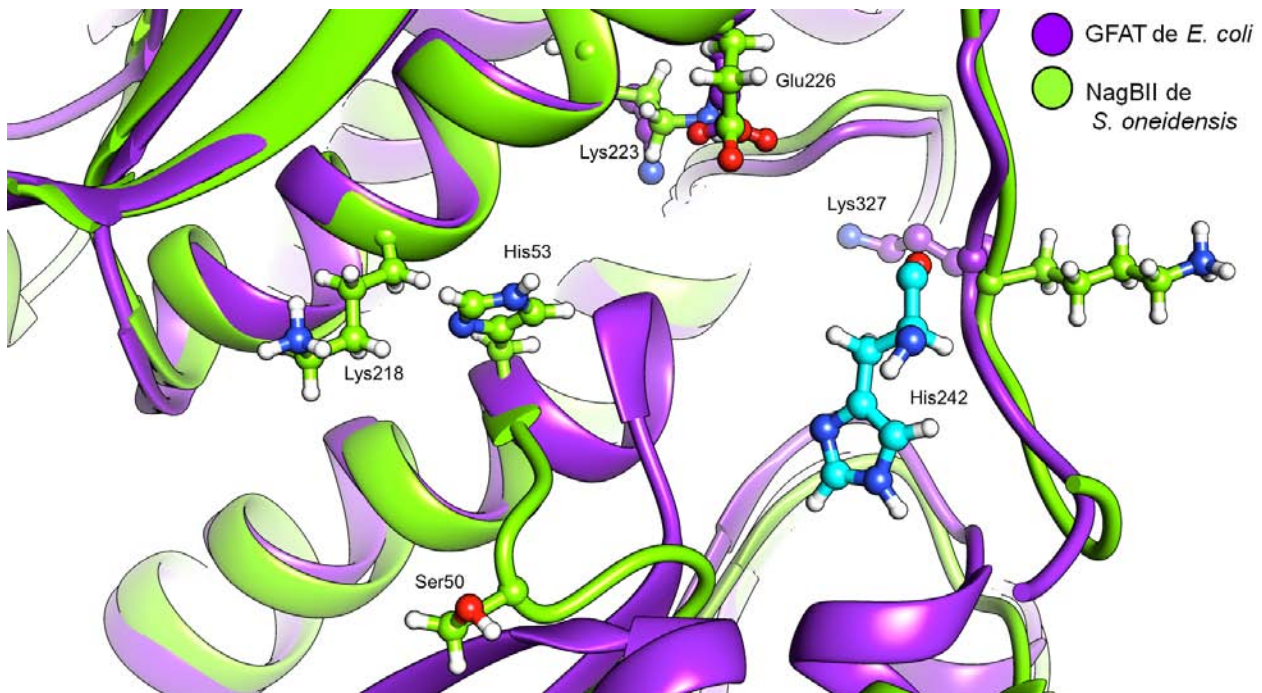
la enzima de tal forma que puede haber hasta cuatro sitios de unión para el sustrato por dímero. Por lo que el número que limite la magnitud de la cooperatividad sería 4 y podría explicarse el alto coeficiente de Hill que presenta esta enzima.

1.4.0.5. Justificación

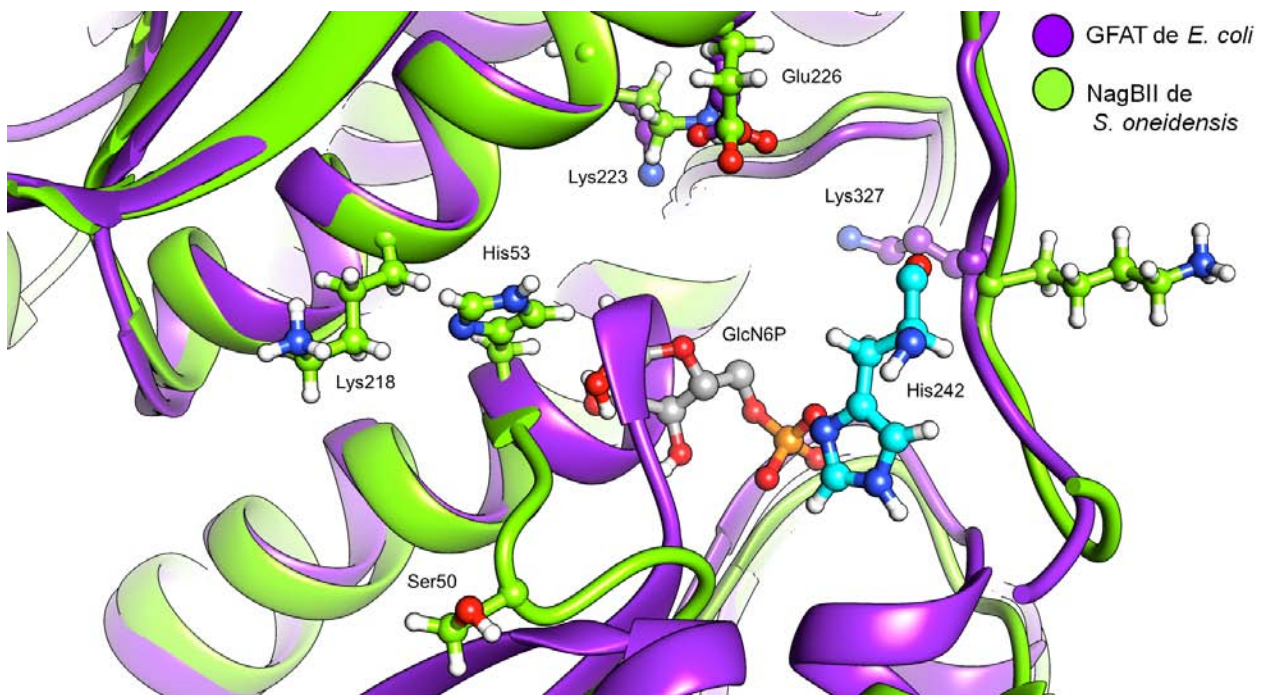
Este trabajo pretende contribuir a la discusión del mecanismo propuesto, mediante el estudio de las histidinas 53 y 242 y su participación en la cooperatividad de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*.

La H242 es el aminoácido conservado equivalente en las enzimas homólogas encargado de la apertura espontánea del anillo del sustrato, por ello es crucial probar si en la enzima NagBII de *S. oneidensis* cumple el mismo rol funcional. Por su parte la H53 forma parte del nuevo sitio de unión encontrado por métodos informáticos en la enzima de estudio, y dadas las propiedades fisicoquímicas del residuo y la cercanía entre la molécula de sustrato es importante comprobar si este aminoácido tiene un rol funcional catalítico o solo actúa a nivel de unión y reconocimiento del sustrato.

Para cumplir este objetivo, se diseñaron dos mutantes puntuales: H53Q e H242Q. La sustitución de cada histidina por su correspondiente amida fue elegida por ser la mutación más conservadora. Esta

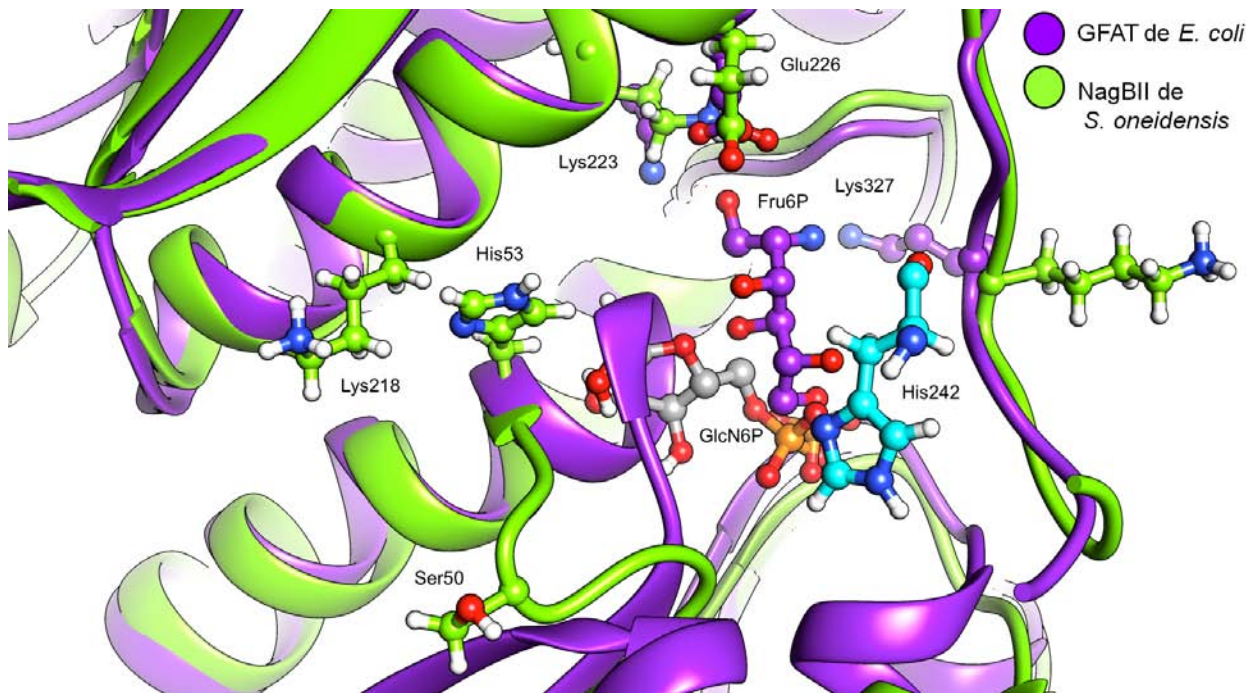


(a) Enzima libre de ligantes

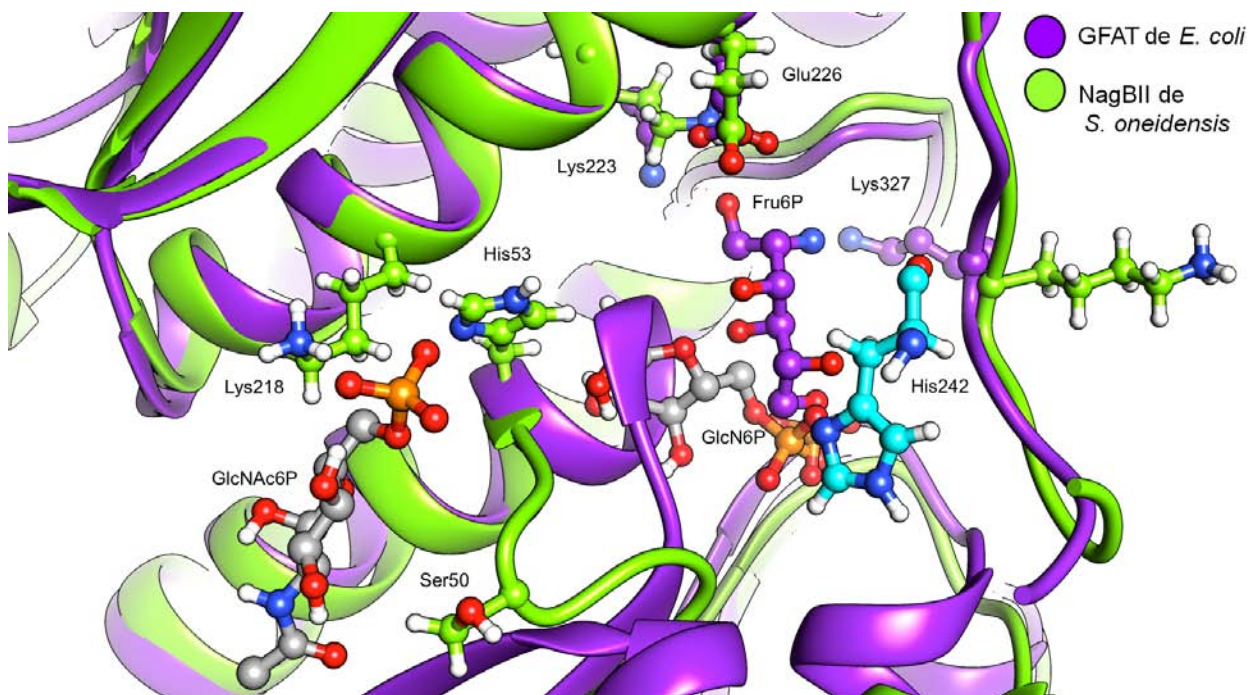


(b) Sitio regulador ocupado

Figura 1.10: En ambas imágenes se observa un alineamiento estructural de la enzima GFAT en morado y el modelo estructural de NagBII (RMSD 1.167 Å). En (a) se muestran los sitios de unión libres de ligantes: el sitio regulador encontrado por una simulación de acoplamiento molecular (His53), el sitio catalítico conservado en homólogas (His242) y el sitio alostérico (Ser50 y Lys218). En (b) el sitio regulador (His53) se encuentra ocupado por una molécula de GlcN6P.



(a) Sitio regulador y sitio catalítico ocupados



(b) Sitio regulador, sitio catalítico y sitio alostérico ocupado

Figura 1.11: En (a) se muestran el sitio regulador encontrado por acoplamiento molecular con una molécula de GlcN6P y el homólogo cristalográfico ocupado por una molécula de Fru6P. En (b) se muestra además el sitio alostérico con GlcNAc6P en contacto con la Ser51 y la Lys218.

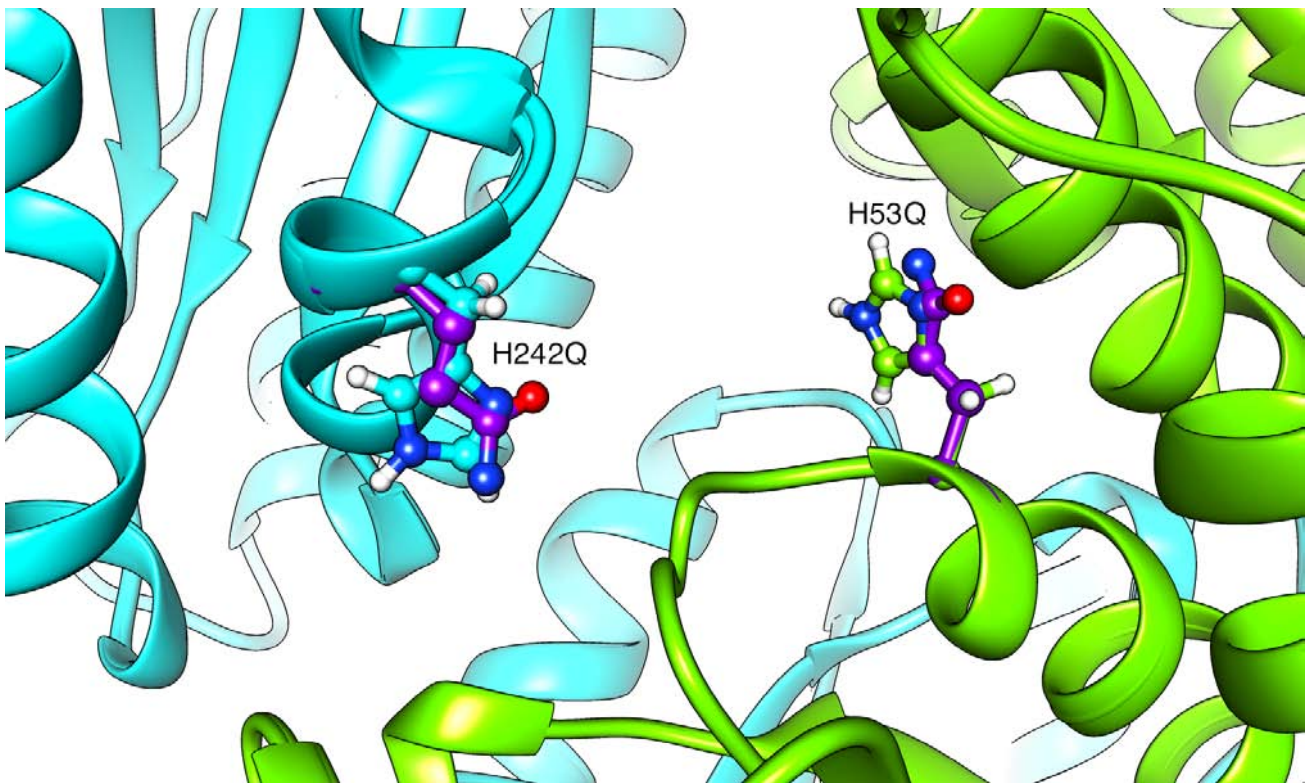


Figura 1.12: Mutaciones puntuales en las que se reemplazó la H53 y la H242 por Q en ambos casos mutación cambia las propiedades electrostáticas dependientes de pH del sitio activo pero mantiene la polaridad de la cadena en función de minimizar cualquier distorsión del sitio activo (Fig. 1.12).

Objetivos

Objetivo general

Realizar mutantes puntuales de la enzima NagBII de *Shewanella oneidensis* de las histidinas en las posiciones 53 y 242, para identificar su rol en la catálisis y en el mecanismo de cooperatividad, así como también la medición de la estequiometría directa de unión de GlcNol6P a la enzima silvestre.

Objetivos particulares

- Diseño, sobreexpresión y purificación de proteínas mutantes.
- Análisis estructural de las enzimas mutantes (Dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, dispersión dinámica de luz).
- Caracterización cinética de las proteínas mutantes.
- Medición de la estequiometría de unión de GlcNol6P a la enzima silvestre mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Hipótesis

- La histidina 53 forma parte de un sitio regulador y su ocupación es necesaria para la formación del sitio catalítico. La mutante His53Gln mostrará una baja afinidad por el sustrato.
- La histidina 242 es la encargada de la apertura del sustrato en la catálisis. La mutante His242Gln presentará una k_{cat} limitada por la apertura espontánea del sustrato.
- La enzima silvestre tiene dos sitios de unión para la GlcN6P por monómero.

Materiales y Métodos

Todos los materiales fueron adquiridos de la marca *Sigma-Aldrich* a menos que se especifique lo contrario. La síntesis de oligonucleótidos se solicitó a la empresa *InvitroGen*. La síntesis de GlcNAc6P y de GlcNol6P fue hecha en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de acuerdo al procedimiento de Leloir y Cardini [26].

Todos los métodos descritos para la caracterización físicoquímica y funcional fueron realizados para la enzima NagBII silvestre (wt) y para las dos enzimas mutantes H53Q, H242Q.

3.1. Mutagénesis dirigida

Las mutaciones sitio dirigidas fueron diseñadas con base en el método de Kunkel [32]; se utilizó el gen *nagBII* insertado en el vector PJES307, el cual posee resistencia a ampicilina y un sistema de expresión inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las mutaciones puntuales fueron H53 (CAT) por Q (CAA) e H242 (CAT) por Q (CAA). En la tabla 3.1 se muestran los distintos oligonucleótidos que se diseñaron y se sintetizaron para la generación de mutantes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando la *Pfu* polimerasa de *Altaenzymes*. Los plásmidos PJES307(*nagBII*) que contenían las mutaciones fueron verificados por secuenciación y usados para transformar cepas quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3).

Nombre del oligo	Secuencia	T _m (°C)
FH53Q	5'-TCCTCGGATCA A GCCGGCGTGTTT-3'	75
RH53Q	5'-AACACGCCGGCT T GATCCGAGGAA-3'	75
FH242Q	5'-AGAGTTTCT C CAAGGTCCAGTGACC-3'	65
RH242Q	5'-GGTCACTGGAC C T T GGAGAACTCT-3'	65

Tabla 3.1: Oligonucleótidos utilizados durante la PCR para la amplificación del gen *nagBII*. En negritas se muestra el codón que contiene la mutación puntual.

Condición	[IPTG mM]	Tiempo de Sobreexpresión (h)	Temperatura (°C)	Condición	[IPTG mM]	Tiempo de Sobreexpresión (h)	Temperatura (°C)
1	0.3	0	30	25	0.3	4	30
2	0.6	0	30	26	0.6	4	30
3	1	0	30	27	1	4	30
4	0.3	0	37	28	0.3	4	37
5	0.6	0	37	29	0.6	4	37
6	1	0	37	30	1	4	37
7	0.3	1	30	31	0.3	5	30
8	0.6	1	30	32	0.6	5	30
9	1	1	30	33	1	5	30
10	0.3	1	37	34	0.3	5	37
11	0.6	1	37	35	0.6	5	37
12	1	1	37	36	1	5	37
13	0.3	2	30	37	0.3	6	30
14	0.6	2	30	38	0.6	6	30
15	1	2	30	39	1	6	30
16	0.3	2	37	40	0.3	6	37
17	0.6	2	37	41	0.6	6	37
18	1	2	37	42	1	6	37
19	0.3	3	30	43	0.3	12	30
20	0.6	3	30	44	0.6	12	30
21	1	3	30	45	1	12	30
22	0.3	3	37	46	0.3	12	37
23	0.6	3	37	47	0.6	12	37
24	1	3	37	48	1	12	37

Figura 3.1: Condiciones de sobreexpresión en las que varía la concentración de IPTG, tiempo de sobreexpresión y temperatura.

3.2. Sobreexpresión

La sobreexpresión de ambas proteínas se hizo utilizando la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Las colonias transformantes se crecieron en placas de Petri con medio sólido Luria-Bertani (LB) adicionado con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, posteriormente utilizando colonias aisladas se inoculó un con 10 mL de medio LB con ampicilina y se incubó con agitación de 200 rpm a 37°C por 12 h. Se usaron 3 mL de este cultivo para inocular un matraz con 1 litro de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, el cual se incubó con agitación de 250 rpm a 37 °C hasta llegar a una densidad óptica de 0.8-1 a 600 nm . Para elegir las mejores condiciones de sobreexpresión se exploró la cinética de inducción manteniendo constante la agitación a 250 rpm, variando la concentración de IPTG y temperatura tal como se muestra en la Fig. 3.1.

La proteína se cuantificó en cada condición por el método colorimétrico del ácido bicinonónico (BCA). Finalmente se optó por añadir a los cultivos 0.3 mM de IPTG para inducir la sobreexpresión y continuar la incubación durante 6 h a 30°C con agitación de 250 rpm.

3.3. Lisis

Una vez concluido el tiempo de sobreexpresión, las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue descartado y el sedimento bacteriano resuspendido en 20

mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 100 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM a pH 7.7) y lisadas por ultrasonificación manteniendo la muestra en hielo para reducir la actividad de las proteasas. La muestra fue clarificada por centrifugación a 18000 rpm durante 15 min a 4°C y dializada contra el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5 por 12 h a 4 °C.

3.4. Purificación

Para ambas proteínas se utilizó una estrategia de purificación de tres pasos: Captura, purificación intermedia y pulido:

1. Captura: Cromatografía de intercambio aniónico.
2. Purificación Intermedia: Cromatografía de interacción hidrofóbica.
3. Pulido: Cromatografía de exclusión molecular.

Primeramente, la muestra previamente dializada, se inyectó a una columna de intercambio aniónico *Source 15Q* acoplada a un sistema HPLC *Waters 600* o FPLC *Äkta General Electric* previamente equilibrada con 50 mM de Tris-HCl pH 7.5. La elución se realizó en un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en 1.5 horas a un flujo de 1 mL min⁻¹. Como paso siguiente se empleó cromatografía de interacción hidrofóbica con una columna *Phenyl Sepharose* acoplada igualmente a un sistema HPLC *Waters 600*, equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM + NaCl 125 mM pH 7.5. La elución se hizo en función de un gradiente inverso de 0.125 a 0 M de NaCl en 1 hora a un flujo de 1 mL min⁻¹. En este paso la proteína eluyó en un gran volumen (aproximadamente 70 mL, por lo que se utilizaron cartuchos de filtración *Amicon Ultra Millipore* con membranas de 10,000 Da de corte para concentrar hasta un volumen de 10 mL. La muestra resultante se dializó contra el amortiguador Tris-HCl 50 mM + NaCl 125 mM pH 7.5 durante 12 h a 4 °C. Como último paso se inyectó la muestra en una columna de exclusión molecular *Sephacryl S-300* acoplada a un sistema FPLC, previamente equilibrada con el amortiguador de corrida a un flujo de 1 mL min⁻¹.

En cada paso la pureza de las enzimas fue verificada a través de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes, empleando el método de Laemli (SDS-PAGE) y teñidos con azul de Coomassie. Debido a que las proteínas tienden a la agregación, se almacenaron con sulfato de amonio al 60% de saturación a 4°C. Para su uso a corto plazo las proteínas se mantuvieron en solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 4 °C.

3.5. Determinación de la concentración de proteína

Las mutaciones inducidas en las proteínas no producen cambios significativos en su absorptividad molar, por lo que se utilizó el coeficiente de absorción molar calculado experimentalmente por Marcos-Viquez [28] para la enzima silvestre para calcular la concentración de las proteínas mutantes a una absorbancia de 280 nm. El valor es $12.3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.6. Técnicas espectroscópicas

3.6.1. Dicroísmo circular

La medición de espectros de dicroísmo circular se realizó en un espectropolarímetro *Jasco J-715 CD* en el UV lejano en un intervalo de 220 a 260 nm. Las proteínas se utilizaron a una concentración de 0.1 mg mL^{-1} en amortiguador Tris-HCl 100 mM en condiciones nativas y en Tris-HCl 100 mM + Urea 6 M en condiciones desnaturizantes. Adicionalmente para la mutante H53Q se midieron espectros con amortiguador MOPS 200 mM en condiciones nativas y MOPS 200 mM + Urea 6 M en condiciones desnaturizantes. Se reporta un promedio de 3 mediciones individuales por espectro. Todos los espectros se realizaron a pH 7.5 a una temperatura de 30 °C.

3.6.2. Fluorescencia intrínseca

Los espectros de fluorescencia intrínseca se determinaron a dos longitudes de onda de excitación (λ_{ex}): 280 y 295 nm, con un intervalo de longitud de onda de emisión (λ_{em}): de 310 a 410 nm con un espectrofluorómetro *ISS PCI*. Las proteínas fueron utilizadas a una concentración de 0.1 mg mL^{-1} en amortiguador Tris-HCl 100 mM en condiciones nativas y Tris-HCl 100 mM + Urea 6 M en condiciones desnaturizantes. Para la mutante H53Q se hicieron mediciones también en amortiguador MOPS 200 mM en condiciones nativas y en MOPS 200 mM + Urea 6 M en condiciones desnaturizantes. Se reporta un promedio de 3 mediciones individuales por espectro. En todas las mediciones el pH fue de 7.5, se mantuvo la temperatura en 30 °C controlada por un equipo peltier *Quantum Northwest Peltier*.

3.7. Dispersión dinámica de luz

Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para analizar el estado oligomérico de las enzimas mutantes. Las muestras se usaron a una concentración de 1.5 mg mL^{-1} a 30°C , y fueron depuradas con filtros *Millipore Millex-GV* de $0.22 \mu\text{ m}$. Las mediciones se hicieron en un equipo *Zetasizer μV Malvern*. Se reporta un promedio de 5 mediciones con 10 repeticiones cada una.

3.8. Ensayos cinéticos enzimáticos

3.8.0.1. Cinéticas exploratorias

Todos los ensayos cinéticos en este trabajo fueron realizados a 30°C . La actividad enzimática de las proteínas se midió determinando la concentración de Fru6P producida en $200 \mu\text{L}$ de mezcla de reacción, la cual contenía amortiguador 100 mM de Tris-HCl pH 7.5, EDTA 15 mM , 1 mM de GlcNAc6P, enzima 200 nM y concentraciones variables de GlcN6P. La reacción era iniciada mediante la adición de enzima y se incubaba durante 10 min . La reacción era detenida al añadir 2 mL de HCl 10 M . La formación de Fru6P se cuantificó mediante un método colorimétrico, el cual consiste en hacer reaccionar el producto con resorcinol y HCl 10 M , siguiendo el principio de la prueba de Seliwanoff, midiendo la absorbancia del producto a 512 nm [9]. Los datos fueron ajustados mediante una regresión no lineal a la ecuación de Hill. Los ajustes y análisis de datos fueron hechos en el programa *GraphPad Prism versión 5*.

3.8.1. Cinéticas de la mutante H53Q

Los ensayos cinéticos en esta mutante fueron realizados en amortiguador MOPS 200 mM y EDTA 15 mM , pH 7.5, debido a que el comportamiento cinético de la mutante requirió que se calcularan las constantes cinéticas a 30 mM de GlcN6P y a una concentración de enzima de $4 \mu\text{M}$.

3.8.2. Cinéticas de la mutante H242Q

Las cinéticas de la mutante H242Q fueron hechas a una concentración de proteína de $200 \mu\text{M}$ debido al comportamiento cinético particular de la mutante.

3.9. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Los experimentos calorimétricos se llevaron a cabo en un calorímetro de alta precisión *VP-ITC Microcal*. La muestra se equilibró con amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7.5 y se desgasificó antes de vertirse en la celda. La concentración de GlcNol6P en la jeringa fue 12 mM. El experimento de titulación se realizó a 30 °C con agitación constante y consistió en inyecciones de 10 μ L cada 120 segundos en una celda de 2 mL que contenía 700 μ L de GlcN6P desaminasa *wt* a una concentración de 44 μ M, el volumen final de la celda fue de 1.44 mL. Los datos fueron analizados en el servidor de *Affinimeter* (<https://www.affinimeter.com/>).

Se asumió un modelo secuencial de cuatro sitios de unión como se muestra en la Fig. 3.2.



Figura 3.2: Esquema de reacción del modelo secuencial de cuatro sitios utilizado. Donde: **M** es la proteína, y **A** es el ligante.

El ajuste de los datos permitió calcular los parámetros termodinámicos de entalpía (ΔH) y la constante de asociación (Ka), para cada uno de los sitios de unión. El cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) y el cambio en la entropía (ΔS) se obtuvieron con las ecuaciones 3.1 y 3.2 respectivamente.

$$\Delta G = -RT \ln Ka \quad (3.1)$$

Donde R es la constante de los gases ideales (1.9871 cal/Kmol), T es la temperatura en K y Ka es la constante de unión.

$$\Delta S = \frac{\Delta G - \Delta H}{-T} \quad (3.2)$$

Donde ΔG es el cambio de energía libre de Gibbs, ΔH el cambio de entalpía y ΔS el cambio de entropía.

3.10. Inferencia filogenética

Para obtener las secuencias se realizó un BLAST en cada dominio de la vida, tomando las primeras 30 secuencias por dominio con más alta identidad, mayor *score* y menor *e value* que resultaran de la búsqueda. Las secuencias semillas utilizadas corresponden al gen NagBII de *S. oneidensis*, *P. furiosus* y el gen de la enzima GFAT de *Candida albicans*, para buscar en el dominio Bacteria, Archaea y Eukarya respectivamente. Además para cada organismo se anexó como marcador el gen que codifica para la proteína *NagA*, una enzima metabólicamente asociada. Los dos grupos de secuencias correspondientes al gen NagBII y al gen NagA se concatenaron utilizando el programa *Mesquite* versión 3.01 con el fin de hacer un análisis simultáneo de ambos genes. El alineamiento se realizó en el programa *MAFFT* versión 7.187. Posteriormente se determinó el esquema de partición óptimo para el alineamiento usando el programa *Partition Finder* versión 1.0.0 que corre sobre *Python* versión 2.7. El análisis filogenético se realizó por máxima verosimilitud (ML), asumiendo un modelo de sustitución *GTR+GAMMA* con el programa *RAxML*; y por Inferencia Bayesiana usando el programa *MrBayes* versión 3.2, al cual se le dieron 10,000,000 de pasos a la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). El soporte de los clados fue evaluado con 1000 réplicas de *bootstrap* y probabilidades posteriores respectivamente.

Resultados y Discusión

4.1. Construcción de mutantes de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*

Ambas mutantes H53Q e H242Q se lograron amplificar exitosamente con el protocolo de PCR, tal como se muestra en la Fig. 4.1, en la que se observan las bandas en el peso esperado. Se comprobó la identidad de las mutantes por medio de una secuenciación completa del gen y el vector a partir del promotor T7. Cada PJES307(*nagBII*) mutante, solo tenía cambiada una base, la adenina en la posición 159 en la mutante H53Q y la adenina 726 para la mutante H242Q, este pequeño cambio produce la sustitución del residuo histidina (H) por uno de glutamina (Q) en ambas mutantes (Fig. 4.2). El producto de la reacción de PCR fue utilizado para transformar la cepa de *E. coli* quimiocompetente BL21 (DE3).

4.2. Sobreexpresión

Preliminarmente al protocolo de sobreexpresión reportado en esta tesis, se siguió el método descrito en [28], sin embargo el rendimiento de las enzimas mutantes era insuficiente para cubrir los requerimientos experimentales de este trabajo. Por ello, se optó por la modificación las condiciones de sobreexpresión de las proteínas para aumentar la producción de las mismas. Los cambios esencialmente consistieron en cambiar la cepa de *E. coli* BL21 Rosetta a la cepa BL21 (DE3) y explorar la cinética de inducción en diferentes condiciones. Las circunstancias en las que se produjeron mejores resultados fueron en las condiciones 37, 38 y 39 de acuerdo con la Fig 3.1 mostrada en la sección de materiales y métodos; la cantidad de proteína producida se muestra en la Fig. 4.3. Las cuales tuvieron seis horas de inducción a 30 °C y con concentraciones de 0.3, 0.6 y 1 mM de IPTG (Fig. 3.1). Finalmente se optó por la condición 37 debido a que utiliza una menor cantidad de inductor. Es importante mencionar que el

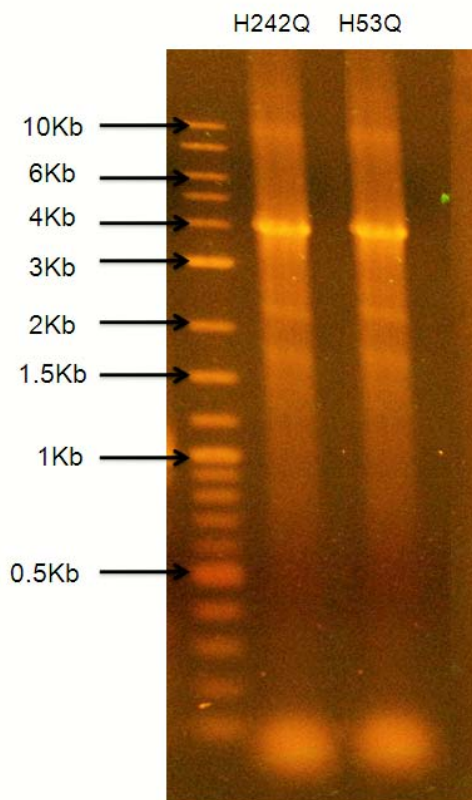
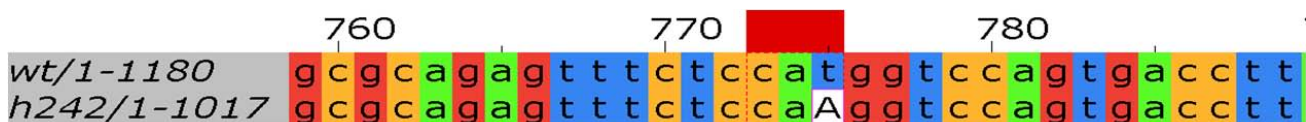


Figura 4.1: Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr al 1% que muestra la elongación del vector PJES307(nagBII) con las mutaciones inducidas



(a) Secuenciación mutante H53Q



(b) Secuenciación mutante H242Q

Figura 4.2: Mutantes H53Q y H242Q

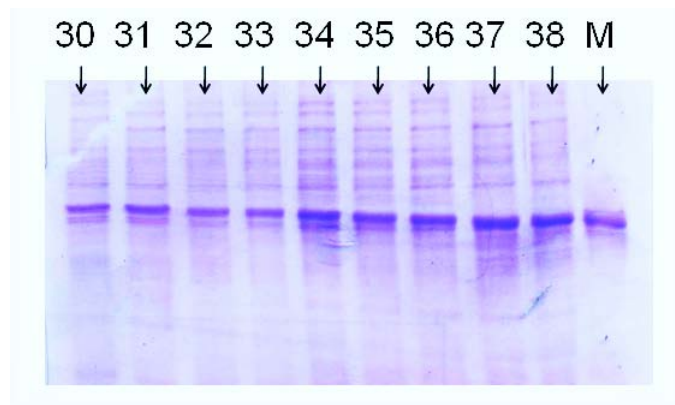


Figura 4.3: Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes donde se muestran las condiciones donde se generó más proteína recombinante. Solo se presentan de las condiciones 30 a la 38, más un pozo (M) con proteína silvestre como marcador.

rendimiento de la purificación aumentó considerablemente.

4.3. Lisis

La lisis bacteriana se realizó mediante ultrasonicación, lo que resultó efectivo ya que una buena cantidad de la proteína recombinante se mantuvo en el extracto soluble luego de la clarificación por centrifugación. La Fig. 4.4 es un gel de poliacrilamida en el que se observa donde se concentra la proteína recombinante luego de la lisis bacteriana. Para ambas mutantes el carril *M* representa una muestra del medio líquido en el que estaban inmersas las bacterias durante su crecimiento, el carril *S* el sobrenadante clarificado luego de la rotura celular y el carril *P*, el precipitado de restos celulares después de la clarificación. En ambos casos una parte considerable de la proteína recombinante se mantiene soluble en el sobrenadante.

4.4. Purificación

Dado que las mutantes H53Q e H242Q no tienen cambios significativos en las propiedades físico-químicas con respecto a la enzima silvestre, se purificaron siguiendo el método desarrollado por Marcos-Viquez [28]. Sin embargo se añadió un paso extra de purificación, introduciendo cromatografía de exclusión molecular para aumentar la pureza de las proteínas.

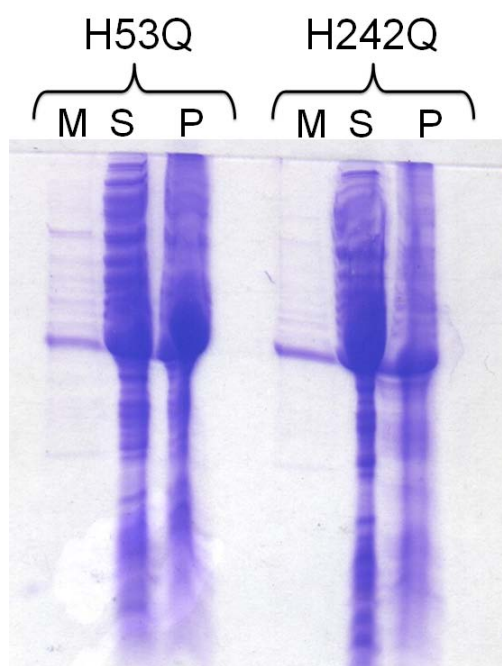
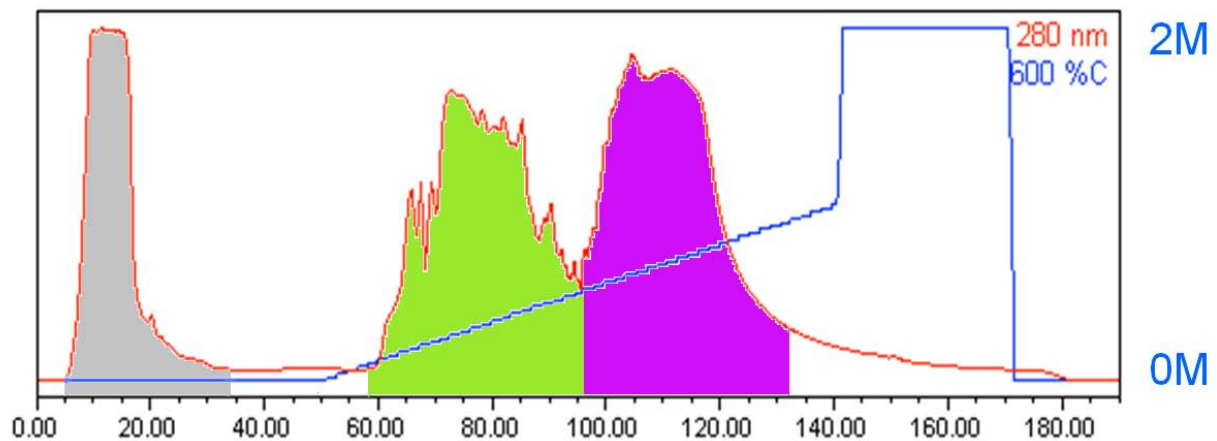


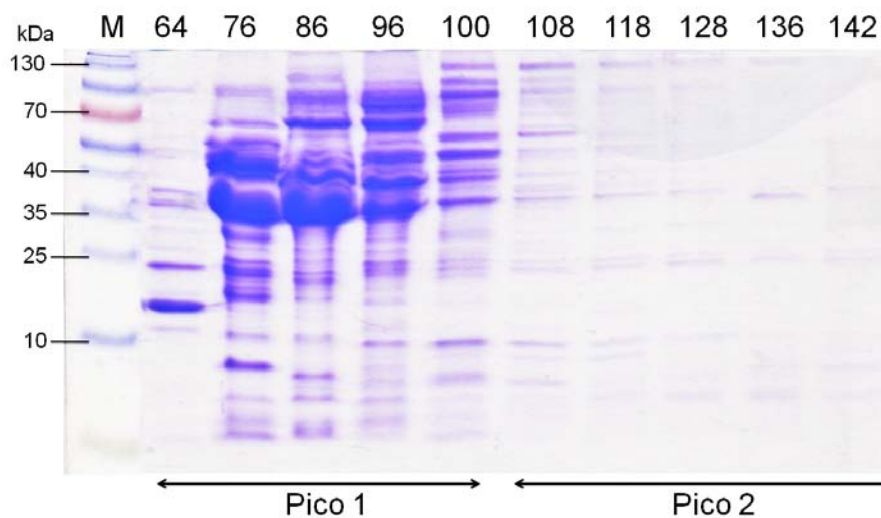
Figura 4.4: Gel de poliacrilamida en el que se expone la lisis bacteriana de dos muestras, las cuales corresponden a las mutantes H53Q y H242Q. Para ambas muestras el carril M representa el medio de cultivo, S sobrenadante y P precipitado de restos celulares, estos últimos dos, luego de la clarificación por centrifugación.

4.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio aniónico es el primer paso de la purificación, y tiene como objetivo la clarificación y captura de la proteína de interés aprovechando las propiedades específicas de la proteína, en este caso, su punto isoeléctrico (pI), dado que el extracto celular inyectado en el sistema HPLC contiene una gran cantidad de contaminantes como lípidos, ácidos nucleicos y otras proteínas que no son de interés. Cabe mencionar que el extracto celular se intentó clarificar utilizando Sulfato de Amonio, sin embargo la proteína no precipitó de manera específica, tal como se reporta en [28]. La cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo a pH 7.5 porque en esta condición las proteínas recombinantes se encuentran con carga negativa (el pI calculado para las dos proteínas mutantes y la enzima *wt* es 5.6), y se adhieren a la columna *SourceQ* cuya matriz posee carga positiva. El cromatograma correspondiente, muestra una numerosa cantidad de picos, pero se pueden agrupar en tres conjuntos principales como se muestra en el perfil de elución (Fig. 4.5a). En la Fig. se coloreó de gris el frente, el cual corresponde a proteínas que no interaccionaron con la matriz de la columna, seguido de dos conjuntos que eluyeron en función del gradiente ascendente de NaCl. El pico 1 coloreado en verde comenzó a eluir al minuto 60 y el pico 2 (magenta) al minuto 100. En conjunto con la Fig. 4.5b donde se muestra un gel de poliacrilamida en el que se explora todo el gradiente de NaCl, es posible



(a) Cromatograma de elución



(b) Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las fracciones eluidas

Figura 4.5: Cromatografía de intercambio aniónico. En 4.5a el perfil de elución donde se presenta en gris el frente, en verde la elución que corresponde a las proteínas, en magenta la elución correspondiente a los ácidos nucleicos. La línea azul representa el gradiente ascendente de NaCl. En 4.5b el gel de poliacrilamida de las fracciones eluidas.

notar que solo el primer conjunto de picos (verde) es el que contiene la proteína recombinante de interés además de otras proteínas que comparten propiedades similares a la nuestra, por ello es que la señal de absorbancia a 280 nm es alta. Sin embargo, el pico 2 (magenta) muestra una señal a 280 nm comparable al pico 1, y en el gel de poliacrilamida la cantidad de proteína observada disminuye considerablemente, por lo que se planteó la posibilidad de que la señal observada correspondiera a los ácidos nucleicos contenidos en la muestra.

Para verificar la hipótesis, se hizo un gel de agarosa al 1 %, cargando las muestras de elución del pico 2 (Fig.4.6). Así se pudo confirmar que la señal se debía a los ácidos nucleicos, los que por su carácter negativo se unen con alta afinidad a la matriz de la columna *SourceQ* y solo pueden ser desprendidos a

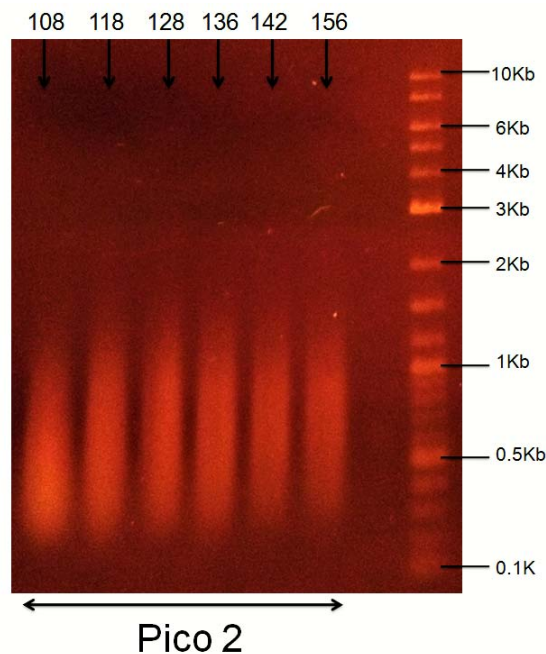


Figura 4.6: Gel de agarosa al 1 % donde se presentan las fracciones correspondientes al pico 2 de elución de la cromatografía de intercambio aniónico.

altas concentraciones de NaCl.

4.5. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Como siguiente paso de purificación se eligió la cromatografía de interacción hidrofóbica porque su principio de separación es complementario al intercambio aniónico, debido a que la muestra proveniente de la cromatografía de intercambio aniónico eluye con 0.125 M de NaCl, y la técnica de interacción hidrofóbica consiste en unir la molécula de interés a la matriz en un entorno altamente hidrofílico con fuerza iónica elevada, y la elución se realiza con gradiente inverso de sal. La unión entre la biomolécula y la resina se da a través de regiones hidrofóbicas expuestas, las cuales están en contacto con un ambiente altamente polar, lo que produce una separación de fases en el medio aumentando la energía libre y disminuyendo la entropía en el entorno, por lo que la forma de disminuir la energía libre del sistema es unir las regiones expuestas a los centros hidrofóbicos de la resina.

En la Fig. 4.7a se presenta un perfil de elución de la columna de interacción hidrofóbica en la que disminuye la concentración de NaCl. En gris se observa un frente que corresponde a la fracción de proteínas que no se unen a la matriz, posterior a él, se presenta una meseta (morado) que se prolonga durante todo el gradiente inverso, lo que corresponde a la elución de la proteína de interés. Finalmente, luego de varios volúmenes de agua eluye un último pico (amarillo) que al ser muestreado con gels de

acrilamida no muestra contenido proteico en el y debido a que eluye al final, se tiene la sospecha que el pico corresponde a lípidos.

De acuerdo con el gel de poliacrilamida de la Fig. 4.7b, la proteína de interés sale esparcida en toda la meseta y aunque no está totalmente pura porque aún se observan algunas bandas de mayor peso molecular (Fig. 4.7b), la columna logró quitarle la mayor parte de los contaminantes.

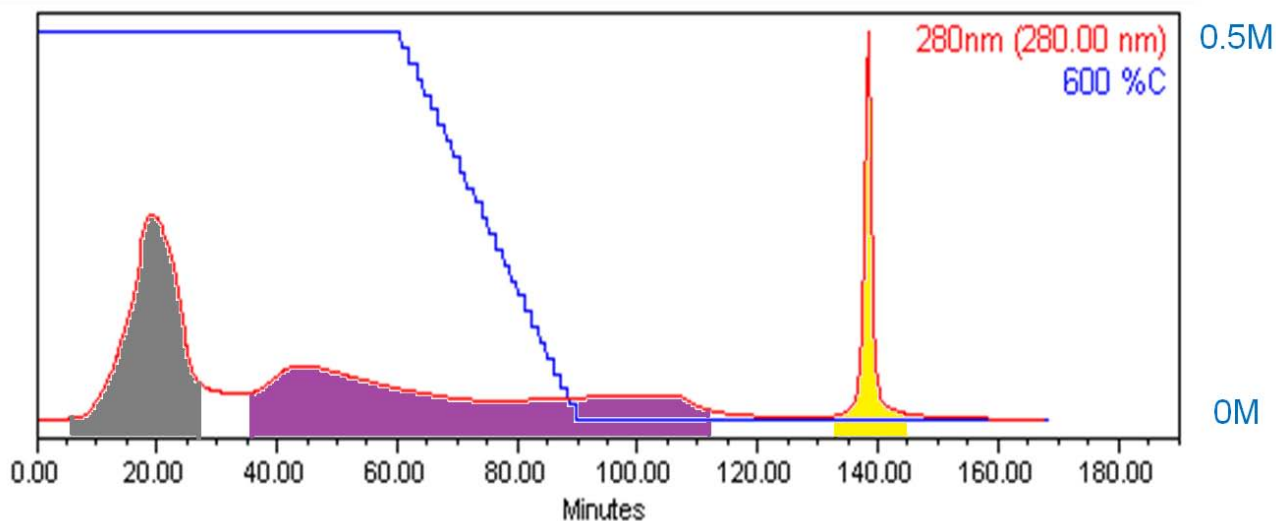
En la Fig. 4.8 se muestra la superficie hidrofóbica de la enzima GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*, donde los parches azules representan las superficies hidrofílicas, los parches blancos las neutrales y los parches naranjas las superficies hidrofóbicas. Es visible que las superficies hidrofóbicas no son abundantes, por lo que es posible que la cantidad de NaCl utilizada para propiciar la unión de la molécula con la matriz hidrofóbica de la columna no haya sido la suficiente y por ello no se adhirió a la columna con una afinidad suficiente.

4.6. Cromatografía de exclusión molecular

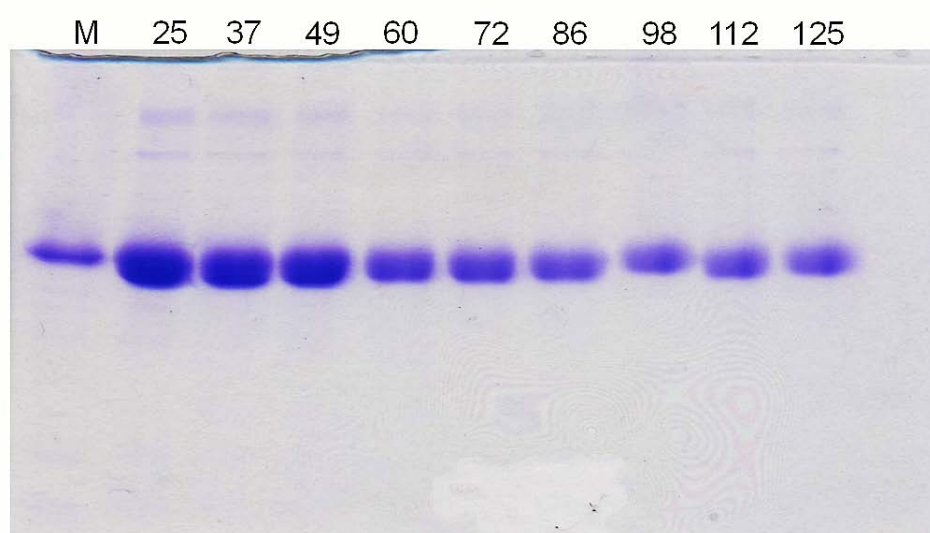
Dado que la proteína aún contenía varias bandas correspondientes a proteínas de más alto peso molecular y las técnicas realizadas en este trabajo requerían un alto grado de pureza de la proteína, se optó por utilizar una columna de exclusión molecular *Sephacryl S-300* para separar las proteínas por tamaño. En la Fig. 4.9b, es posible observar que las proteínas más grandes son separadas de la proteína de interés, y esta queda completamente pura concentrada en una sola banda visible en el gel de poliacrilamida. El perfil de elución (Fig. 4.9a) muestra pequeños picos que corresponden a las proteínas de mayor peso molecular y un pico de mayor tamaño que corresponde a la proteína de interés.

4.7. Rendimiento

El rendimiento final de las tres proteínas purificadas se puede resumir en la Fig. 4.1, donde es importante destacar que la producción de proteína aumentó considerablemente, triplicando al menos lo reportado en el trabajo previo hecho por Marcos-Viquez [28], donde se obtiene 50 mg L^{-1} . Durante las primeras purificaciones siguiendo el protocolo de Marcos-Viquez [28], el rendimiento para las enzimas mutantes fue extremadamente bajo en función de los requerimientos experimentales de esta tesis, para la mutante H53Q fue de 3.6 mg L^{-1} , y para la mutante H242Q fue de 18.6 mg L^{-1} , incluso la proteína total obtenida de la proteína silvestre fue de 50 mg L^{-1} (Tabla 4.1).



(a) Cromatograma de interacción hidrofóbica



(b) Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las fracciones eluídas

Figura 4.7: Cromatografía de interacción hidrofóbica. En 4.7a perfil de elución, donde se presenta en gris el frente, en magenta la proteína eluída a lo largo de todo el gradiente, y en amarillo una fracción de naturaleza desconocida. En 4.7b un gel de poliacrilamida en el que se presentan las fracciones eluídas.

Proteína	mg de proteína ^a L ⁻¹	mg de proteína ^b L ⁻¹
H53Q	3.6	98.7
H242Q	18.6	121.9
Silvestre(wt)	50.0	160.0

Tabla 4.1: Comparación del rendimiento total de las tres proteínas purificadas con: *a* el método de Marcos-Viquez y con *b* el implementado en este trabajo.

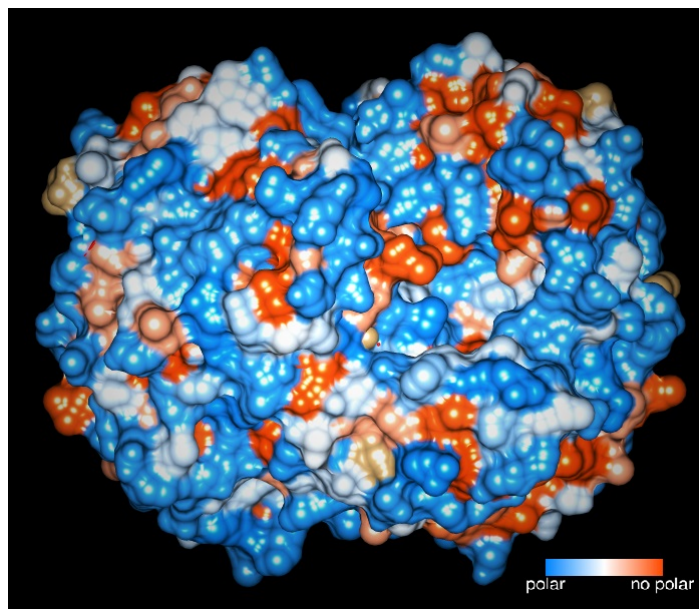


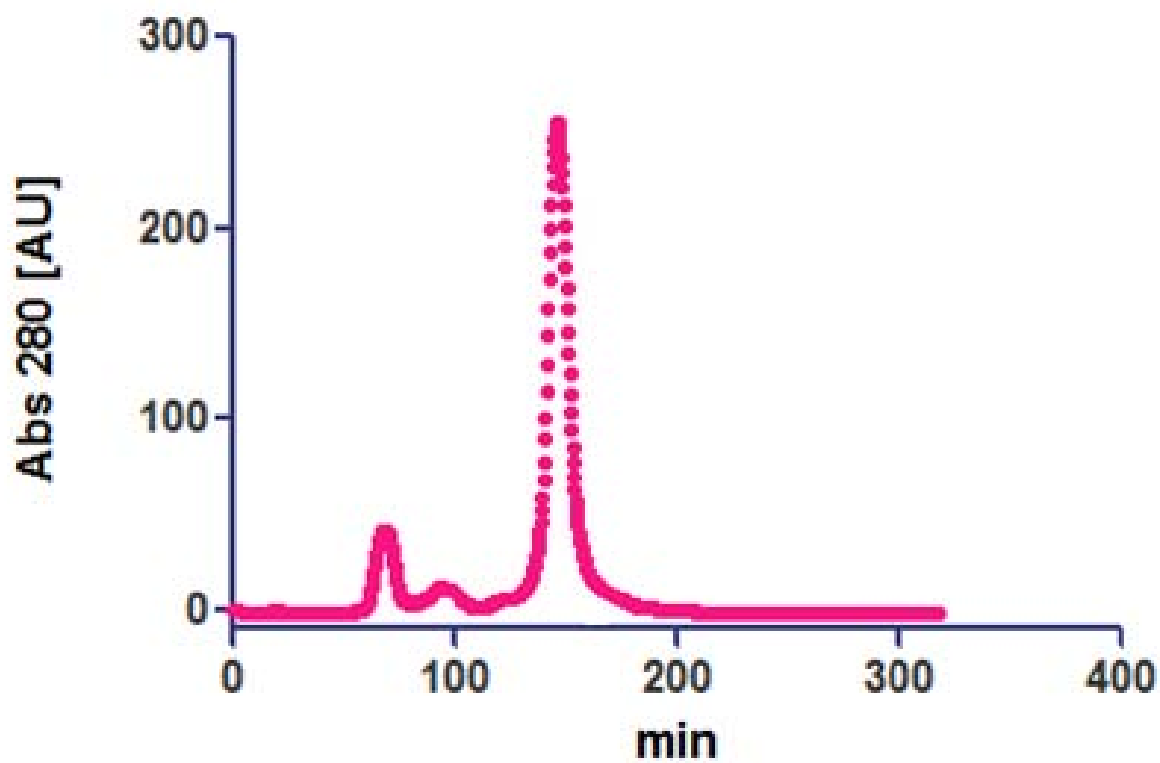
Figura 4.8: Superficie hidrofóbica del modelo estructural de la enzima GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*. El azul representa las partes hidrofílicas, las blancas las neutras y las rosadas hacia el naranja las partes hidrofóbicas. Imagen generada en el programa *UCSF Chimera* versión 1.11.1.

4.8. Técnicas espectroscópicas

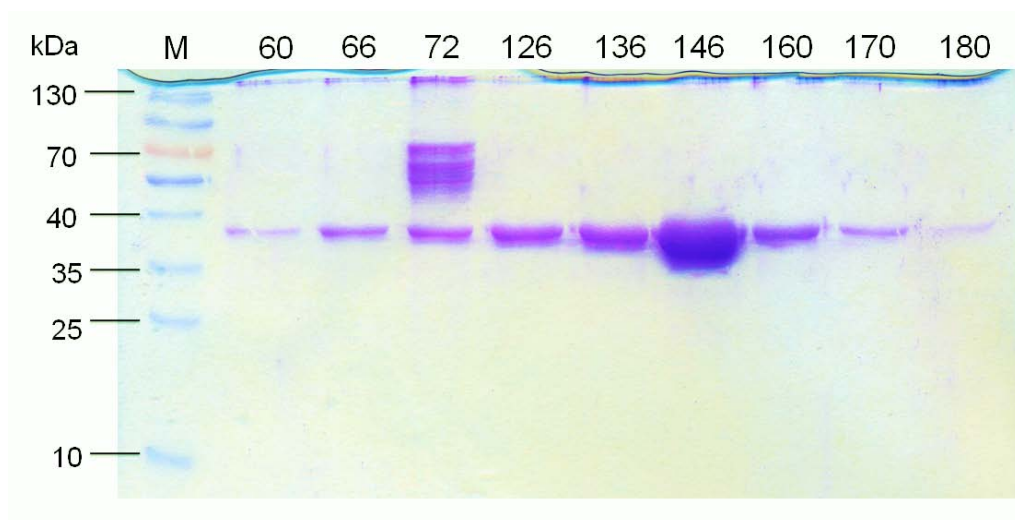
Una vez que se obtuvieron las proteínas puras, lo siguiente fue medir sus espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y de emisión de fluorescencia. Estos fueron hechos para determinar si la mutación en ambas enzimas, H53Q e H242Q, había producido algún efecto en la estructura secundaria, terciaria o en el plegamiento de las proteínas con respecto a la silvestre.

4.8.1. Dicroísmo circular

En los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano, de 200 a 260 nm, se puede apreciar una gran similitud entre la mutante H53Q y la silvestre (wt). Ambas proteínas comparten un mínimo apreciable cerca de los 210 nm y otro con menor elipticidad negativa en 222 nm (Fig. 4.10a), los cuales corresponden a hélices α y hebras β respectivamente. Ésto indica que poseen estructura secundaria y se encuentran plegadas, ya que al comparar con los espectros de las mismas proteínas en condiciones desnaturalizantes con 6 M de urea (Fig. 4.10b), es posible observar que la elipticidad negativa observada en los mínimos escritos anteriormente disminuyen considerablemente. Por otra parte, en el espectro correspondiente a la mutante H242Q, los mínimos a 210 nm y a 222 nm están ausentes y la señal presenta menor elipticidad negativa (Fig. 4.10a), lo cual parece indicar que esta mutante, H242Q posee menor cantidad de estructura secundaria que las otras dos proteínas, sin embargo se encuentra plegada,



(a) Cromatograma de exclusión molecular



(b) Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las fracciones eluidas

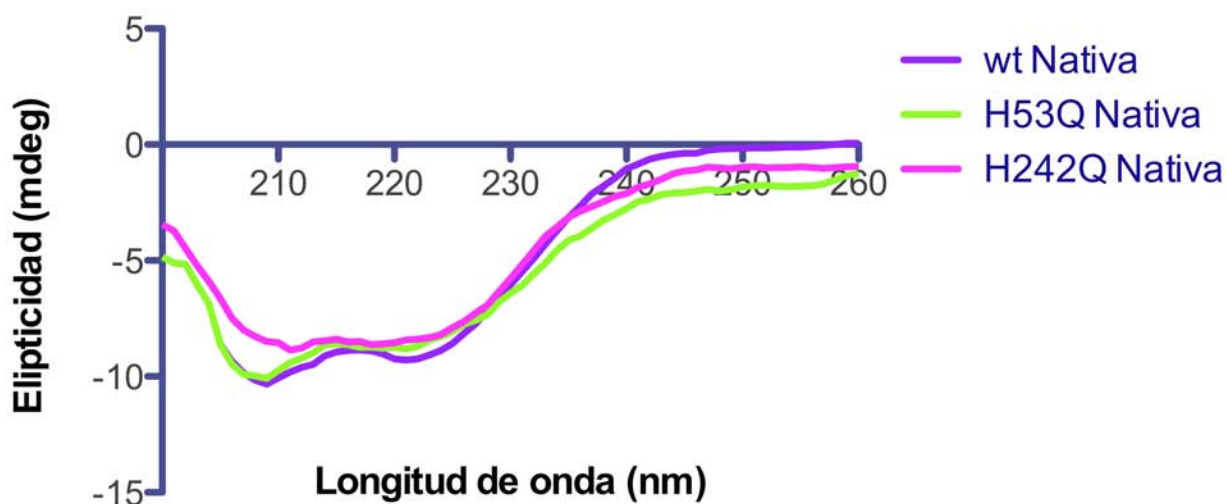
Figura 4.9: Cromatografía de exclusión molecular. En 4.9a el perfil de elución de las fracciones. En 4.9b un gel de poliacrilamida donde se presentan las fracciones eluidas.

ya que al observar el espectro en condiciones desnaturizantes con 6 M de urea, la intensidad de la señal disminuye debido a la pérdida de estructura (Fig. 4.10b).

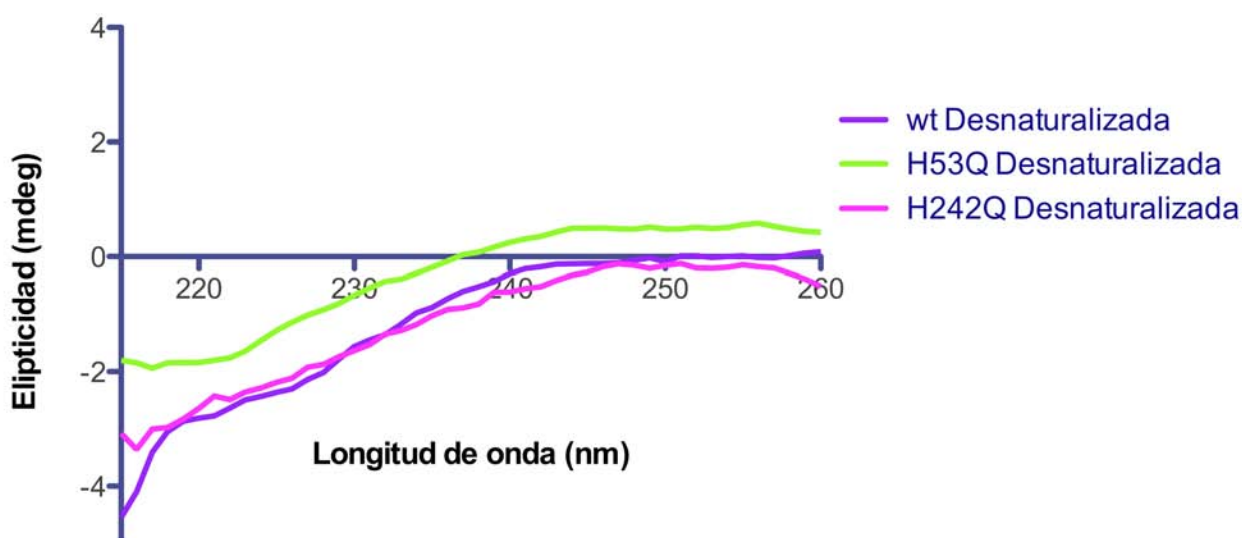
Tal como se mencionó en la sección de métodos, el espectro de dicroísmo circular de la proteína H53Q fue determinado en amortiguador MOPS 200 mM. Esto debido a que algunos ensayos cinéticos se realizaron en esas condiciones. Sin embargo, cabe destacar que el MOPS es un amortiguador basado en un ácido sulfónico de ion híbrido de bases nitrogenadas heterocíclicas, por lo que generalmente absorbe fuertemente a 200 nm o por debajo de esta longitud de onda, lo que es una gran fuente de ruido en mediciones en el UV lejano y aún más, a altas concentraciones como fue utilizado en este trabajo [22]. Debido al ruido generado por el amortiguador MOPS los espectros en condiciones nativas y desnaturizadas son muy similares, aunque es posible observar que el espectro desnaturizado tiene menor elipticidad que el espectro nativo (Fig. 4.11).

4.8.2. Fluorescencia intrínseca

Los espectros a 280 nm muestran la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano y tirosina, por lo que el espectro de emisión resultante contiene información sobre el ambiente y conformación de los dos tipos de residuos (Fig. 4.15a). En la Fig. 4.12 se muestran los espectros de fluorescencia a 280 nm de longitud de onda de excitación en dos diferentes condiciones, Tris-HCl 100 mM (Fig. 4.12a) y MOPS 200 mM (Fig. 4.12b). Se puede observar que los espectros en condiciones nativas, en ambas condiciones, Tris-HCl 100 mM y MOPS 200 mM, de las proteínas wt y H242Q son muy similares y presentan máximos de alrededor de 310 nm. La mutante H53Q emite menor fluorescencia que las otras dos proteínas pero presenta su máximo igualmente alrededor de 310 nm. En condiciones desnaturizantes (6 M de urea), los espectros tienen comportamientos diferentes en cada amortiguador; en Tris-HCl la intensidad de fluorescencia con respecto a las proteínas nativas decrece, además la proteína wt presenta un corrimiento del máximo hacia 330 nm. En las mutantes H53Q y H242Q, no es posible apreciar los máximos en sus espectros ya que tienen forma de meseta, sin embargo es posible apreciar que también muestran un corrimiento hacia la región del rojo (330-340 nm), lo cual ocurre porque el microambiente en el que están situados los residuos aromáticos responsables de la fluorescencia intrínseca cambió. Por otra parte, en MOPS 200 mM, es posible apreciar una gran similitud entre los espectros de la proteína wt y de la mutante H242Q, los cuales muestran un corrimiento hacia 326 nm, sin embargo la fluorescencia emitida por estas proteínas aumentó en lugar de disminuir. De acuerdo con los espectros descritos, se



(a) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano en condiciones nativas.



(b) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano en condiciones desnaturantes.

Figura 4.10: Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano en 100 mM de Tris-HCl pH 7.5 a 30 °C. En morado se muestra la proteína silvestre (wt), en verde la mutante H53Q y en rosa la mutante H242Q. Las curvas fueron suavizadas con el programa *GraphPad Prism 5*.

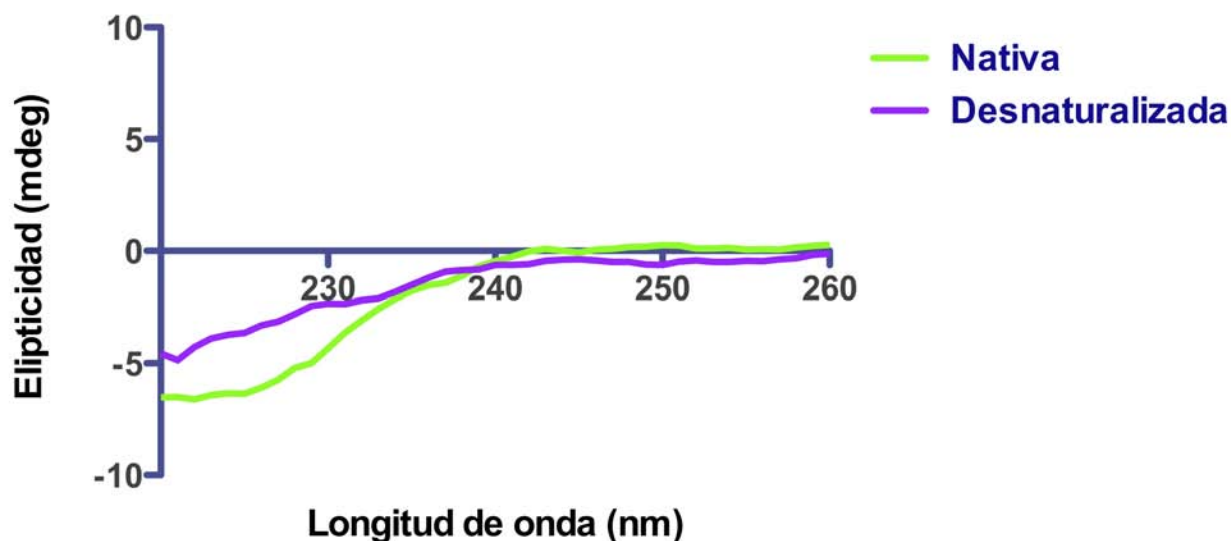
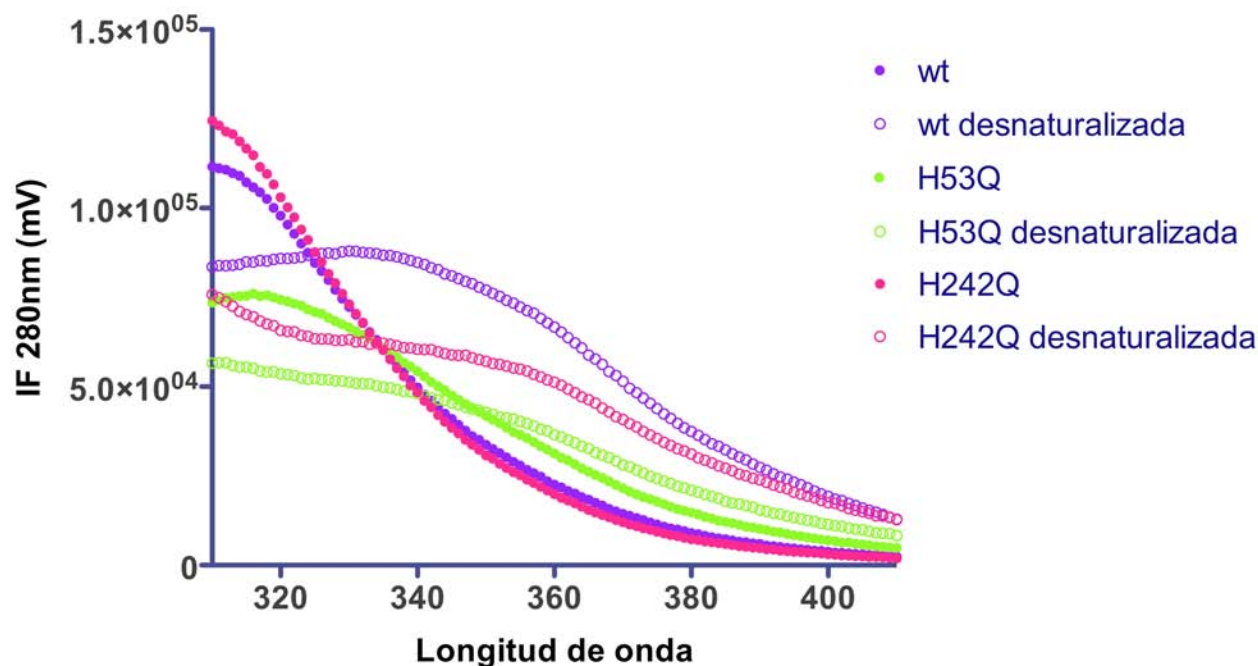


Figura 4.11: Espectro de dicroísmo circular con de la enzima H53Q en el UV lejano en MOPS 200 mM pH 7.5 a 30°C. Los espectros fueron suavizados con el programa *GraphPad Prism 5*

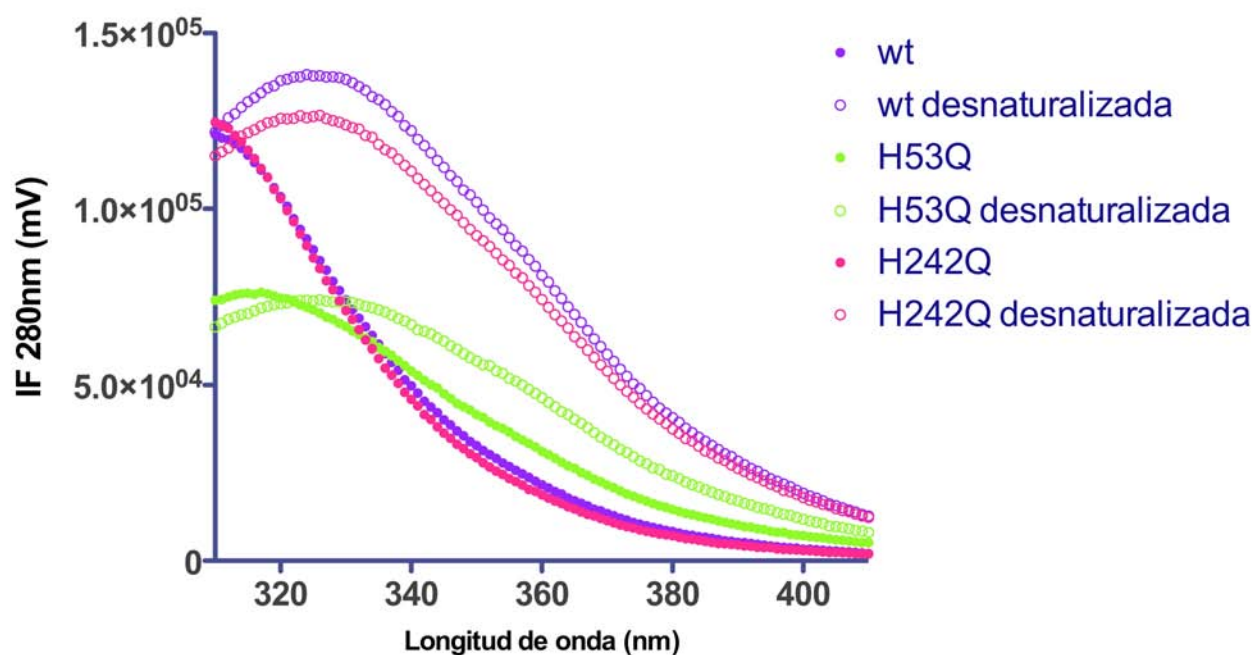
puede decir que los residuos de Y y W están envueltos en un ambiente hidrofóbico, que puede ser modificado luego de someter a las proteínas condiciones desnaturalizantes, por lo que poseen estructura terciaria.

Los espectros a 295 nm nos ofrecen una visión más detallada de los triptófanos, ya que estos son los principales responsables de la emisión de fluorescencia a esta longitud de onda, lo cual resulta conveniente para el estudio particular de estas proteínas debido a que poseen un único residuo de triptófano por monómero, por lo que se puede obtener una señal clara (Fig. 4.15b). En las Figs. 4.13a y 4.13b, se muestran los espectros obtenidos a 295 en Tris-HCl y en MOPS. Los espectros hechos en Tris en condiciones nativas, muestran que la mutante H242Q y la proteína silvestre tienen un máximo bastante similar de 316 nm. La mutante H53Q en Tris exhibe un máximo distinto, ya que tiene un corrimiento hacia la derecha, ubicándose en 328 nm (Fig. 4.13a) y una intensidad de fluorescencia menor. En cuanto a los espectros de las proteínas desnaturalizadas, los tres muestran corrimientos de sus máximos hacia la derecha, 340 nm para la wt, 341 nm para la H53Q y 348 nm para la H242Q, y la intensidad de la fluorescencia disminuyó en relación con los espectros nativos a excepción del espectro de la proteína silvestre, donde la fluorescencia no disminuyó e incluso se incrementó ligeramente. A pesar de lo anterior los espectros en condiciones desnaturalizantes indican que el microambiente del triptófano cambió indicando que las proteínas poseían estructura terciaria.

Algo similar ocurre con los espectros en MOPS, en condiciones nativas, la proteína wt y la mutante H242Q tienen espectros muy parecidos y comparten el máximo en 316 nm. La mutante H53Q tiene su



(a) Espectros de Fluorescencia a 280 nm en Tris-HCl 100 mM

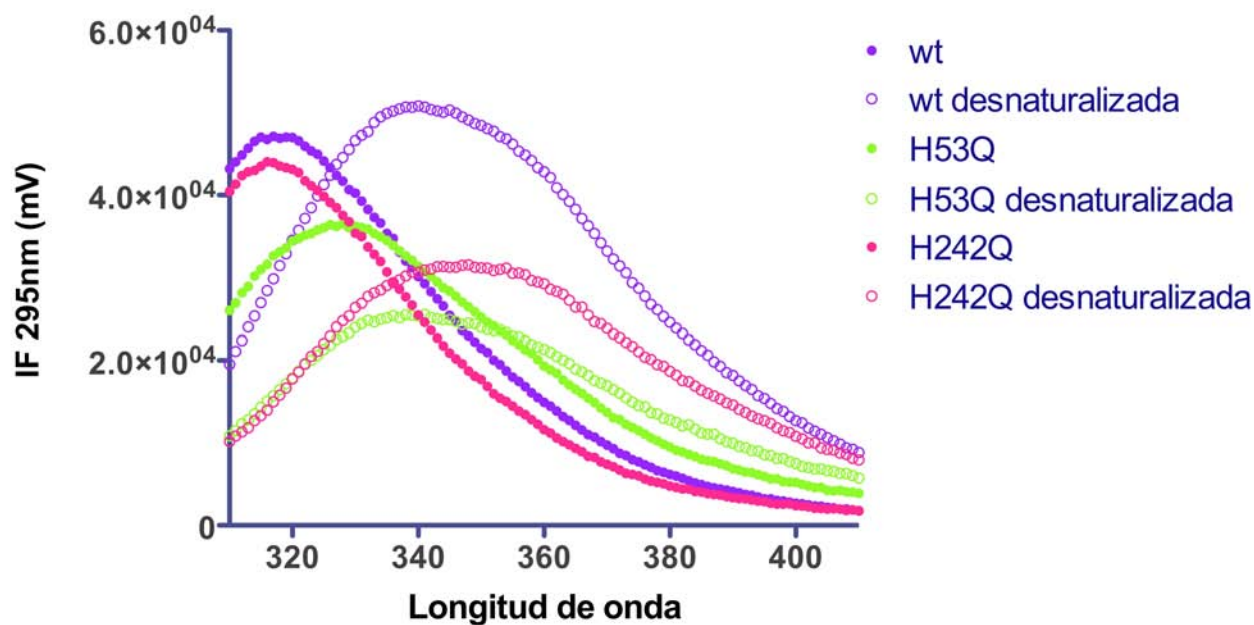


(b) Espectro de Fluorescencia a 280 nm en MOPS 200 mM

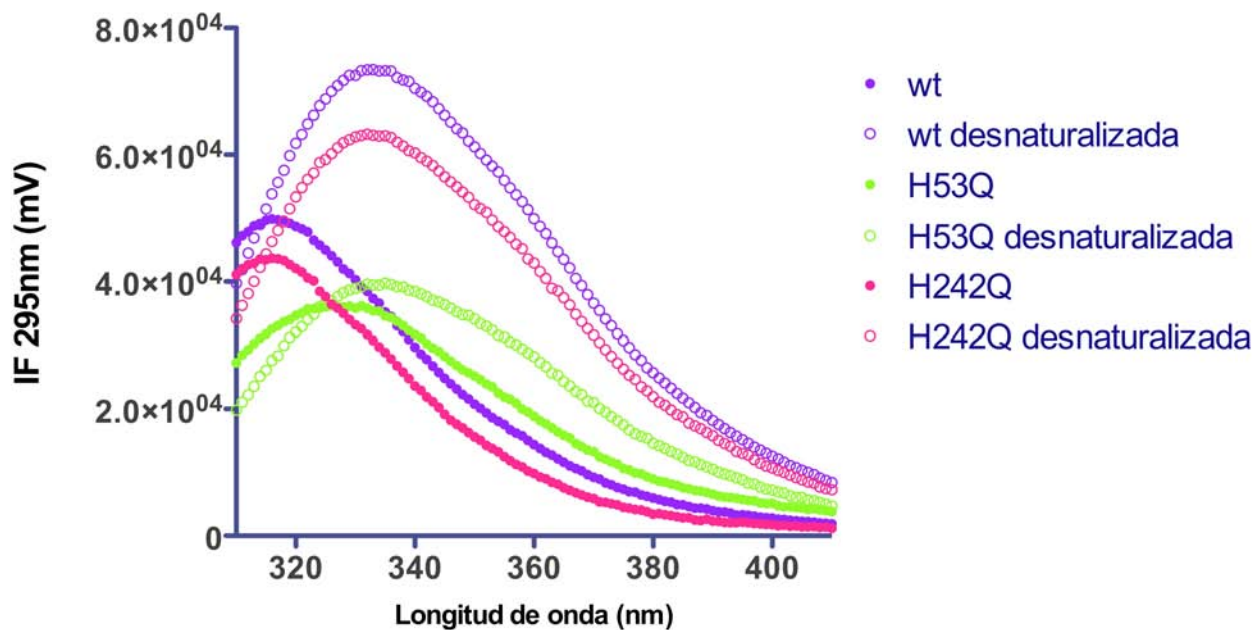
Figura 4.12: Espectros de Fluorescencia Intrínseca de NagBII silvestre (morado), H53Q (verde) e H242Q (rosa) a una λ_{ex} de 280 nm, pH 7.5, 30 °C. Los círculos llenos corresponden a los espectros nativos y los círculos vacíos corresponden a los espectros en condiciones desnaturalizantes (Urea 6 M).

máximo en 331 nm y muestra menor intensidad de fluorescencia que las otras dos proteínas (Fig. 4.13b). Todos los espectros hechos en condiciones desnaturalizantes tienen un corrimiento de su máximo de emisión hacia 334 nm, lo cual indica que los triptófanos sufrieron un cambio en su microambiente, sin embargo la intensidad de fluorescencia en los tres espectros aumentó con respecto al espectro nativo correspondiente.

La gran diferencia entre los espectros de 280 y 295 nm de cada proteína, revela que el triptófano no contribuye mucho al espectro de emisión a 280 nm. En general podría decirse que las tres proteínas poseen una conformación nativa y otra desnaturalizada. La proteína silvestre y la mutante H242Q comparten mayor similitud entre ellas que con la mutante H53Q que es notoriamente diferente, ya que emite menor fluorescencia y su máximo de emisión a 295 nm está recorrido al menos 10 nm hacia la derecha. Esto sugiere que la mutación H53Q afectó de alguna forma el ambiente local del triptófano, modificando su estructura terciaria, a pesar de la lejanía de la zona de la mutación con respecto a la zona donde se encuentra el W (Fig. 4.15b). Tal como se muestra en la Fig. 4.14, alrededor de la H53 se localizan al menos cuatro tirosinas que pudieron resultar afectadas por la mutación, el cambio de una histidina un aminoácido básico cargado, por una glutamina un residuo polar puede ocasionar una disminución en la intensidad de fluorescencia y explicar lo observado a 280 nm. Sin embargo, el espectro de diroísmo circular de esta mutante indica que se encuentra bien plegada y posee una proporción de estructura secundaria muy similar a la proteína silvestre (Fig. 4.10a). Otro aspecto interesante es el aumento en la emisión de fluorescencia de los espectros desnaturalizados en MOPS 200 mM, ya que generalmente cuando una proteína se desnaturaliza o se despliega, los residuos de Y y W que se sitúan en el núcleo hidrofóbico de la proteína, cambian de microambiente a uno más polar ya que quedan expuestos al solvente, lo que ocasiona que se recorra el máximo de emisión hacia el rojo (350 nm) y su intensidad de fluorescencia disminuya; sin embargo es posible observar un incremento de la fluorescencia cuando las proteínas están desplegadas, ya que esta depende totalmente del ambiente local que rodea a los residuos de Y y W, los cuales son sensibles al solvente polar. Este caso particular, el aumento en la intensidad de fluorescencia parece estar asociado al amortiguador MOPS, ya que en Tris-HCl no se presenta el aumento en la señal.



(a) Espectros de Fluorescencia a 295 nm en Tris-HCl 100 mM



(b) Espectros de Fluorescencia a 295 nm en MOPS 200 mM

Figura 4.13: Espectros de Fluorescencia Intrínseca de NagBII wt (morado), H53Q (verde) e H242Q (rosa) a una λ_{ex} de 295 nm, pH 7.5, 30 °C. Los círculos llenos corresponden a los espectros nativos y los círculos vacíos corresponden a los espectros en condiciones desnaturalizantes (Urea 6 M).

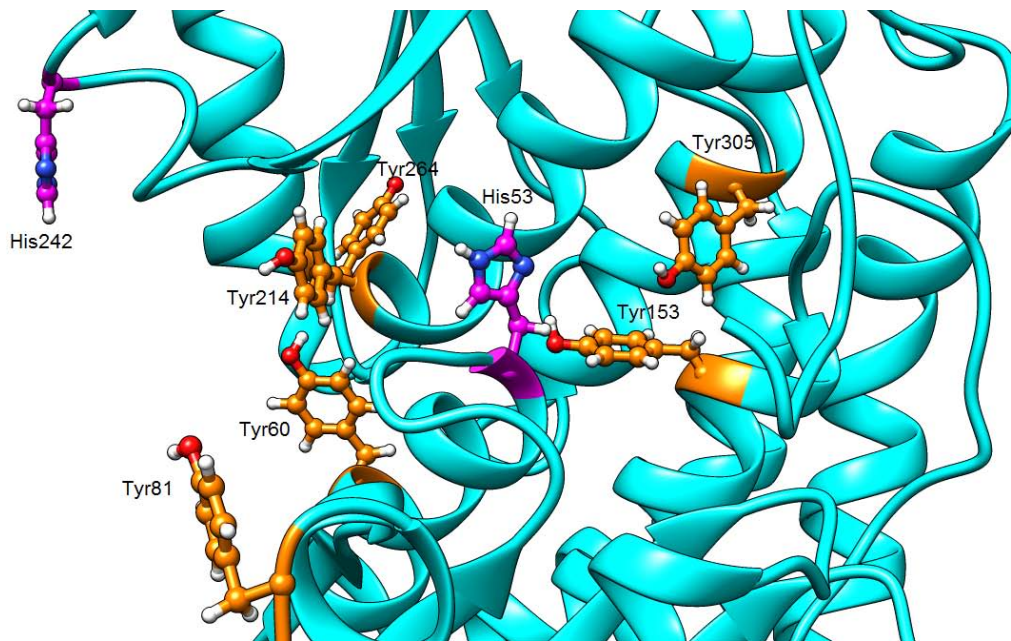


Figura 4.14: Modelo estructural de la proteína silvestre en el que se muestran las histidinas mutadas (magenta) y los residuos de tirosina por monómero (naranja). Imagen generada en el programa *UCSF Chimera* versión 1.11.1.

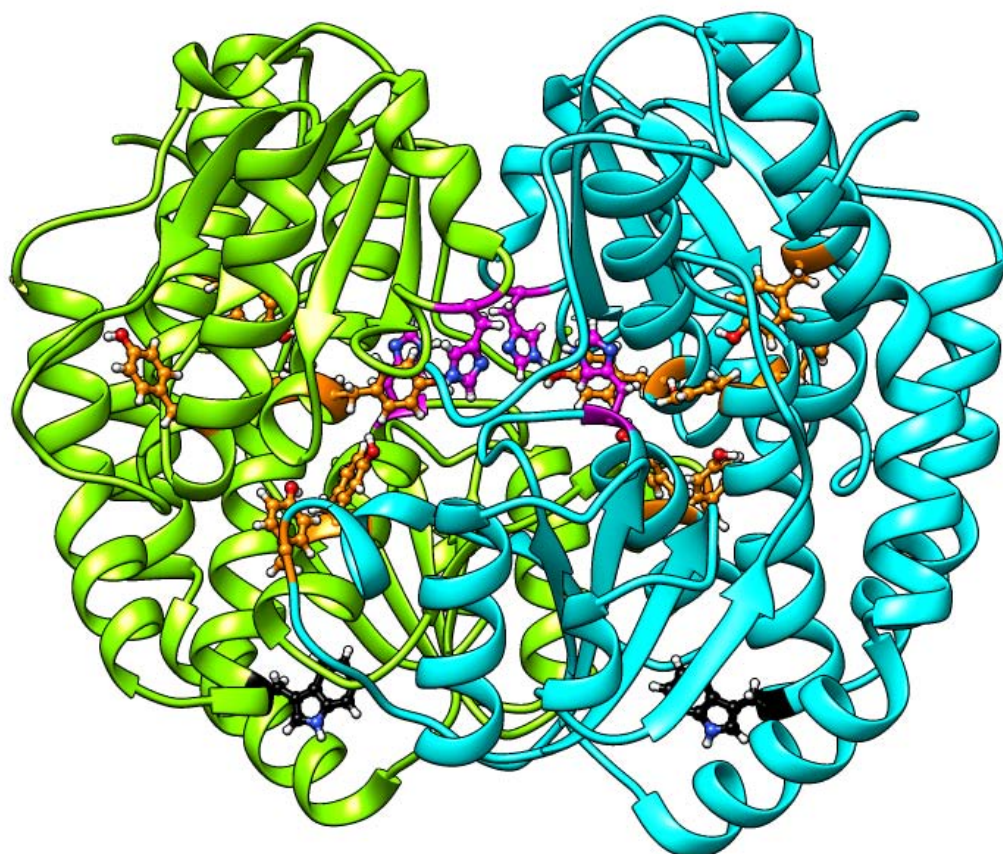
4.9. Dispersión dinámica de luz

Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz para evaluar el tamaño de las proteínas y poder relacionarlo con su estado oligomérico. Las medidas obtenidas fueron monodispersas (Fig. 4.16). El tamaño aproximado de la enzima silvestre fue de 8.4 ± 1.2 nm, para la mutante H53Q 8.3 ± 0.3 nm y para la mutante H242Q 8.1 ± 0.3 nm. De acuerdo a la *t de student* realizada para comparar medias, no existen diferencias significativas entre el tamaño de las enzimas mutantes y la silvestre.

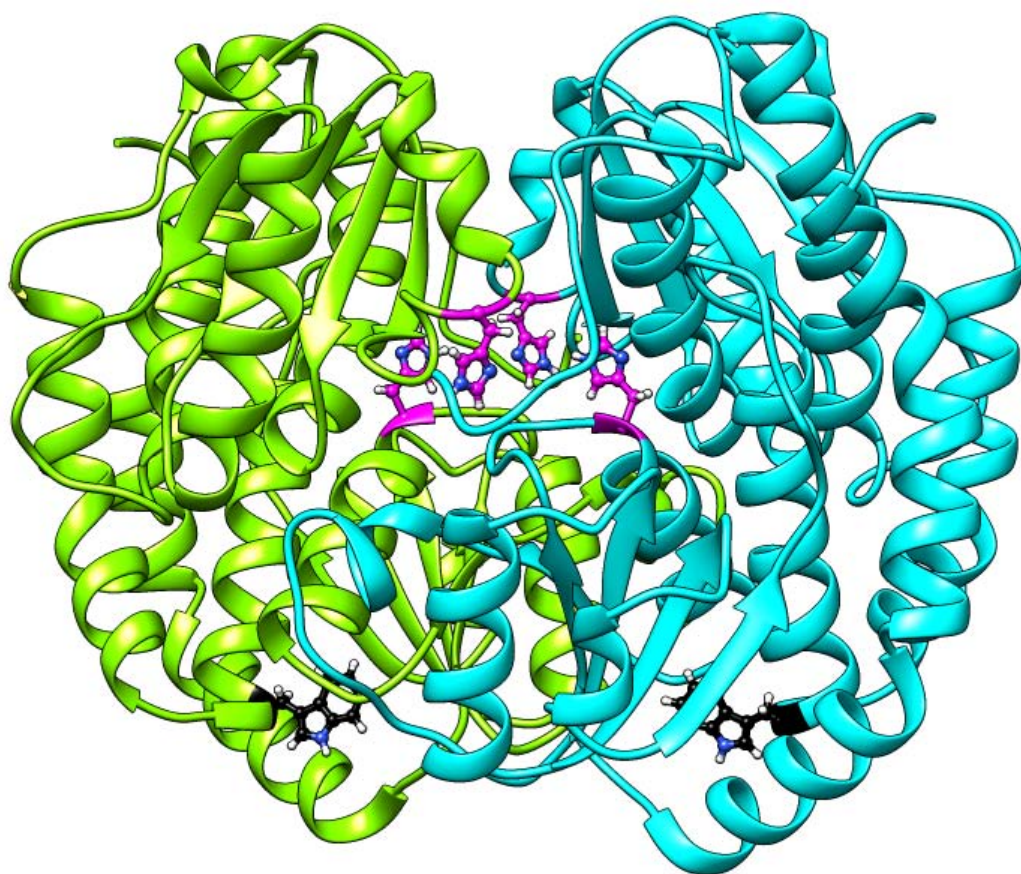
El tamaño de la proteína silvestre reportado por Marcos-Viquez [28], fue de 7.38 ± 0.09 nm, difiriendo ligeramente de obtenido en este trabajo, sin embargo coincide bien teniendo en cuenta el margen de error. Esta diferencia de tamaño también puede deberse a que la proteína puede presentar cambios conformacionales grandes [28,29].

4.10. Ensayos cinéticos enzimáticos

Para evaluar el efecto de la mutación en cada proteína, se realizaron ensayos cinéticos utilizando las condiciones que se usaron para seguir la reacción en la enzima silvestre, en amortiguador Tris-HCl 100 mM a 30°C y a una concentración de enzima de $0.2 \mu\text{M}$. Las curvas resultantes revelaron que ambas mutantes tenían efectos diferentes en la cinética con respecto a la proteína silvestre (Fig. 4.17a).

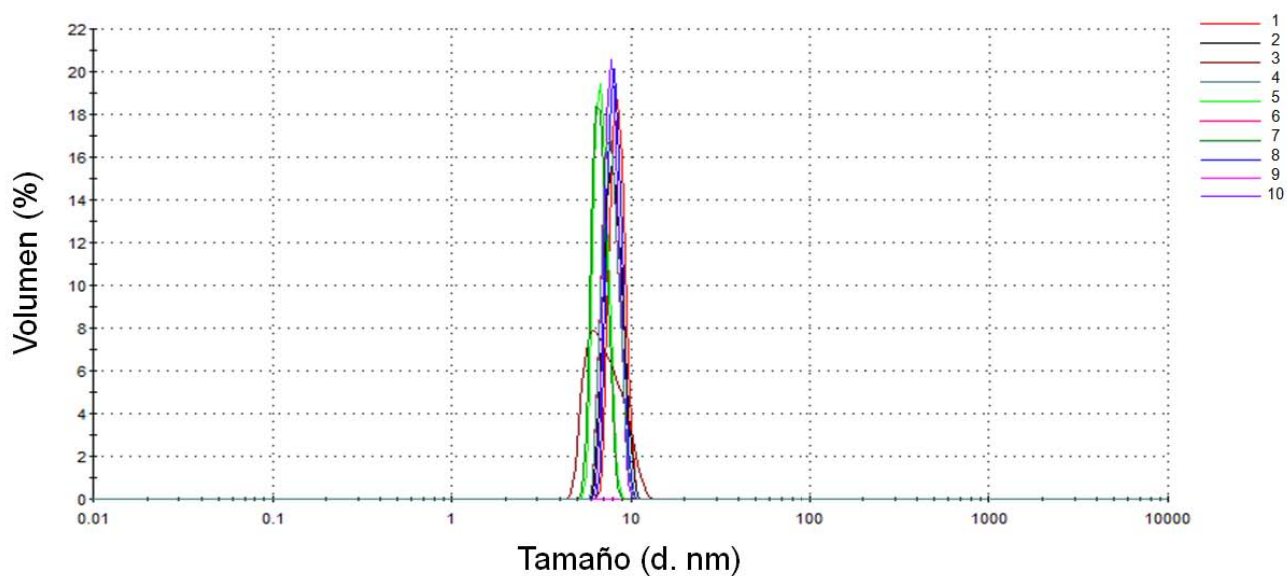


(a) Residuos de Y y W en la proteína silvestre

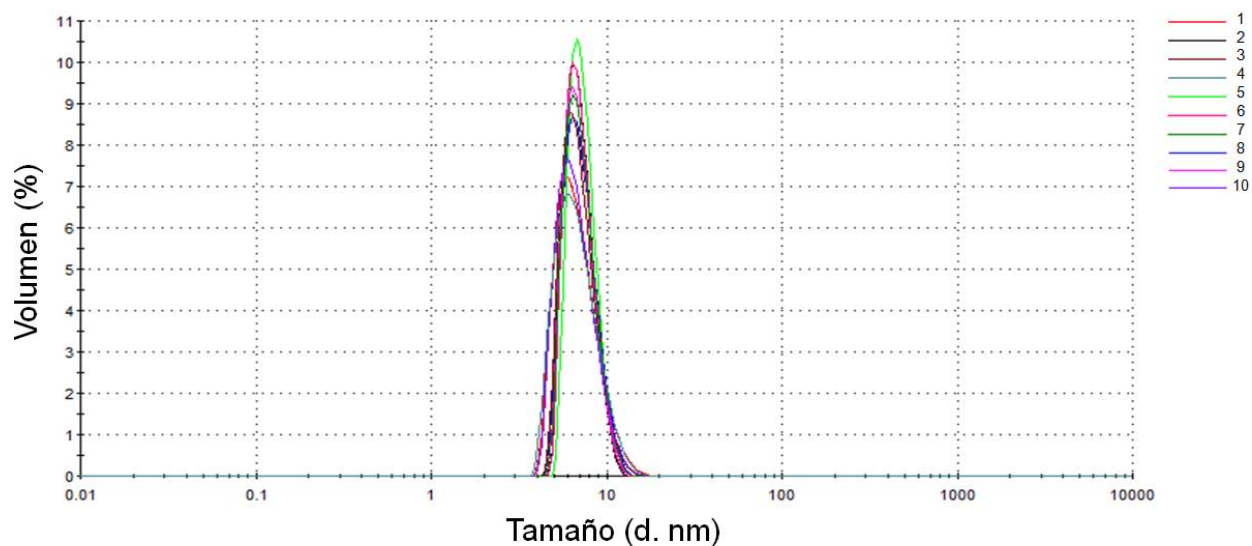


(b) Residuos de W en la proteína silvestre

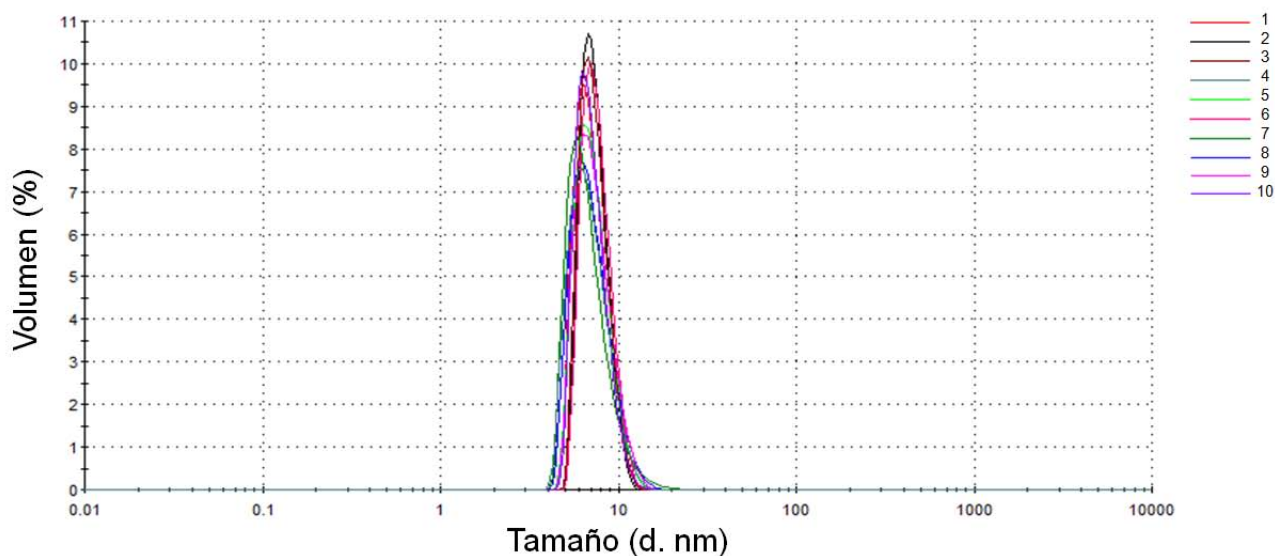
Figura 4.15: Modelo estructural de la proteína silvestre (PDB:3HBA) en la que se muestran los residuos de histidina mutados en magenta, las tirosinas en naranja y los triptófanos en negro. Imagen generada en el programa *UCSF Chimera* versión 1.11.1.



(a) DLS de la proteína wt



(b) DLS de la proteína mutante H53Q



(c) DLS de la proteína mutante H242Q

Figura 4.16: En (a) dispersión dinámica de luz (DLS) de la enzima silvestre, en (b) la mutante H53Q y en (c) la mutante H242Q. Todas fueron medidas en Tris-HCl 100 mM a 30 °C . Cada color corresponde a una medición diferente.

Al comparar las dos mutantes con la enzima silvestre, fue posible diferenciar dos efectos distintos, la mutante H53Q mostró un decremento en su afinidad por el sustrato GlcN6P ya que las curvas no llegan a la saturación con 10 mM de GlcN6P (Fig. 4.17b). A pesar de ello la GlcNAc6P activó alostéricamente a la enzima ya que la curva perdió sigmoidicidad. De la mutante H242Q se obtuvieron medidas extremadamente bajas para la curva con GlcNAc6P y sin activador (Fig. 4.17b), cuyos valores están dentro del error de medición del espectrómetro que fue utilizado, lo que hizo ineficiente el ajuste a la ecuación de Hill. A pesar de este inconveniente es claro que la mutante H242Q perdió abruptamente actividad.

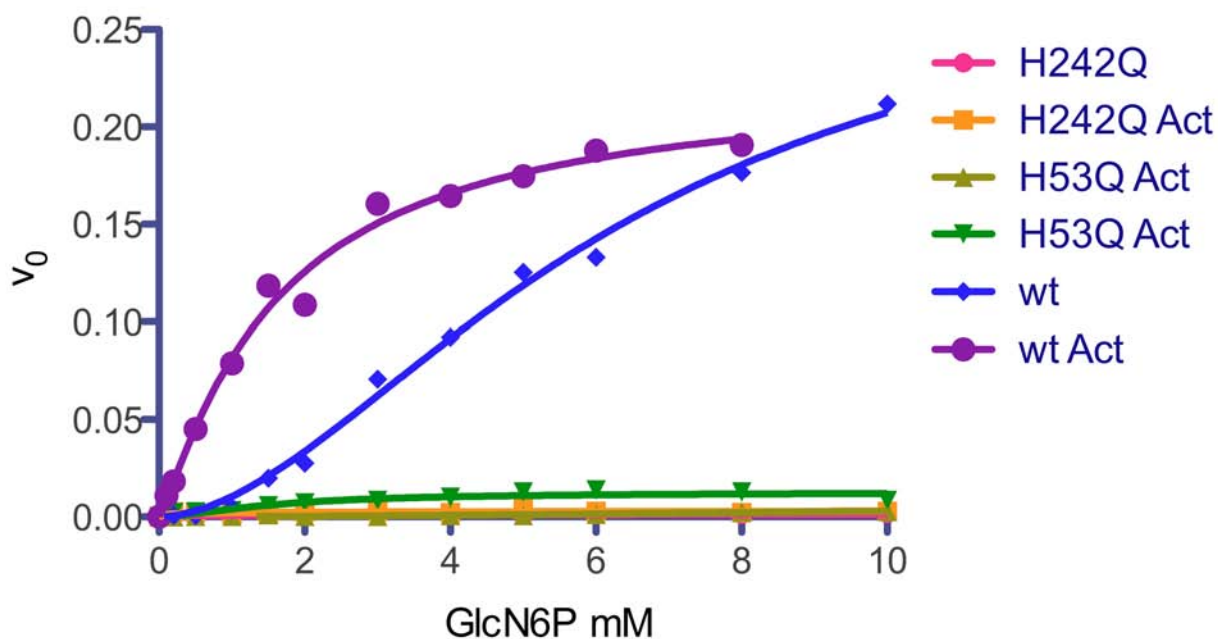
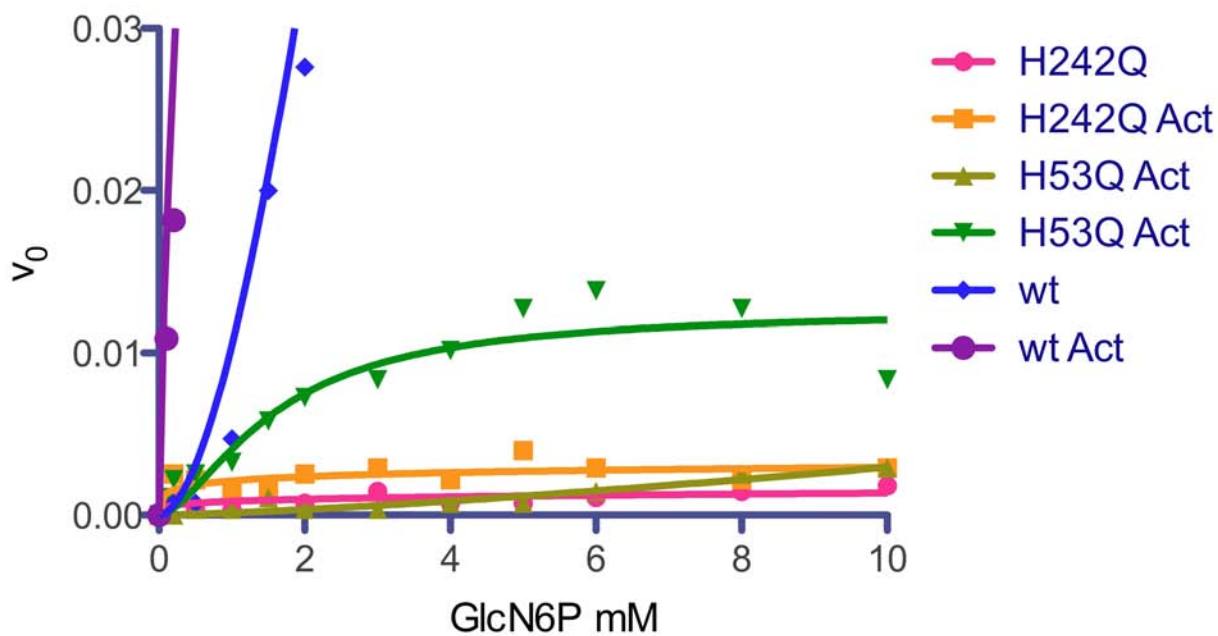
Debido a las bajos valores de absorbancia obtenidos, se optó por utilizar las enzimas a una mayor concentración para evaluar sus constantes cinéticas. La concentración de proteína mutante utilizada fue de 4 μM y la enzima silvestre se continuó utilizando a 0.2 μM como referencia. La cinética de la mutante H53Q tuvo medidas más altas que permitieron realizar ajustes más confiables. La curva sin activador obtuvo un $h = 2.11$, lo cual indica que la curva es sigmoide, sin embargo no se encuentra saturada de sustrato. A pesar de lo anterior, se pudo realizar un ajuste a la ecuación de Hill, con lo que se calculó una $K_{0.5}$ aparente de 16.4 ± 0.3 mM, la cual contrasta con la calculada para la enzima silvestre de $K_{0.5}$ de 3.7 ± 0.1 mM y confirma la pérdida de afinidad de la mutante H53Q por la GlcN6P; esta $k_{0.5}$ aparente fue útil para aproximar la concentración necesaria para saturar de sustrato a la mutante H53Q. Con base en esto, fue necesario modificar las condiciones de la cinética aumentando concentración de GlcN6P para obtener una curva de saturación y poder calcular las constantes correspondientes. La proteína H242Q a 4 μM aún tenía medidas de absorbancia muy bajas para poder medirlas con el espectrofotómetro y poder realizar el cálculo de sus constantes cinéticas.

Posteriormente se siguieron dos estrategias diferentes para poder tener un correcto seguimiento de la cinética de cada una de las mutantes:

4.10.1. Mutante H53Q

Debido a la poca afinidad de la mutante H53Q fue necesario buscar nuevas condiciones en las que se pudiera obtener un curva a altas concentraciones de GlcN6P manteniendo el pH constante a 7.5, modificando el amortiguador en el que se lleva a cabo la reacción puesto que la GlcN6P tiene naturaleza ácida.

Habitualmente la GlcN6P es utilizada hasta concentraciones de 10 mM, y el amortiguador Tris-HCl

(a) Cinética de la enzima silvestre, H53Q e H242Q $0.2\mu M$ 

(b) Acercamiento de la figura 4.17a

Figura 4.17: Cinéticas de la enzima silvestre, H53Q e H242Q a $0.2\mu M$ en Tris 100 mM

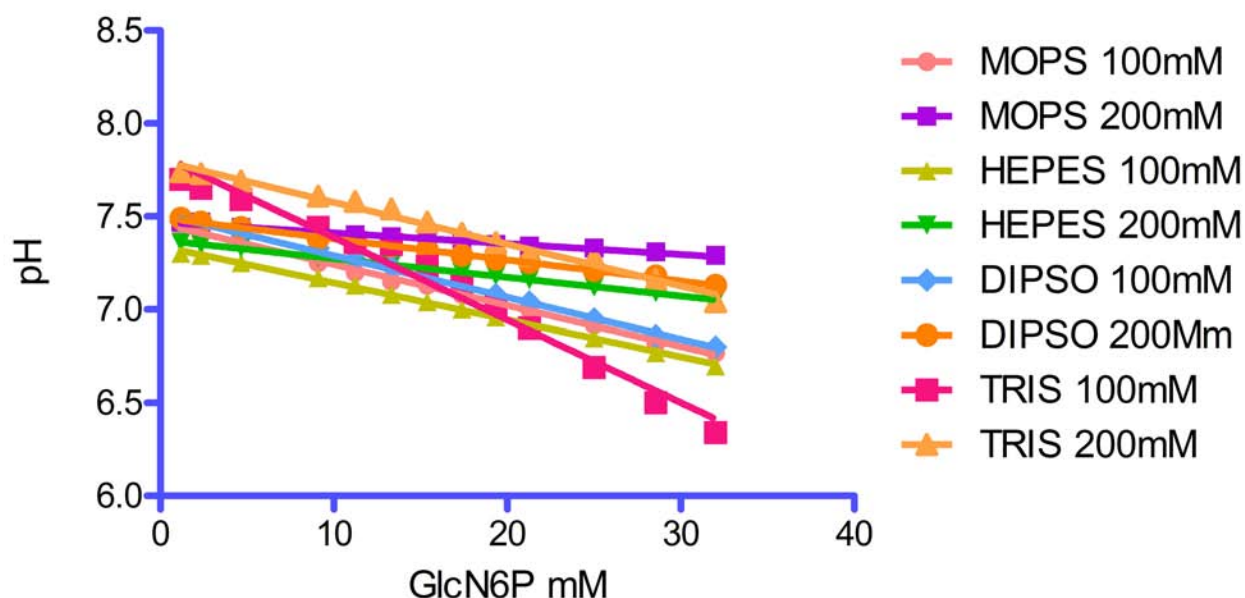


Figura 4.18: Titulación de amortiguadores con GlcN6P 100 mM

soporta bien los cambios de pH que genera el sustrato. Sin embargo a concentraciones mayores de 10 mM el pH es drásticamente modificado como se muestra en la Fig. 4.18. En consecuencia fue necesario explorar otros amortiguadores cuyo pH de amortiguamiento fuera óptimo a pH 7.5 y tuvieran una mejor capacidad de soportar los cambios de pH ocasionados por la GlcN6P. Los amortiguadores elegidos además del Tris, fueron MOPS con pKa 7.02, HEPES pKa 7.39 y DIPSO pKa 7.42. Para evaluar la capacidad de amortiguamiento de cada uno, se realizó una titulación añadiendo GlcN6P 100 mM por goteo a una disolución de amortiguador con pH inicial de 7.5 y se registraron los cambios de éste hasta llegar a una concentración de 30 mM de GlcN6P final. Tal como se muestra en la Fig. 4.18, el amortiguador que más modificó su pH fue Tris-HCl 100 mM, por lo que definitivamente no podía ser utilizado para hacer el ensayo cinético. El amortiguador que menos modificó su pH, manteniéndose en 7.3 con 30 mM de GlcN6P, fue MOPS 200 mM.

La condición más prometedora para evaluar la cinética de la mutante H53Q era con el amortiguador MOPS 200 mM, de modo que fue necesario evaluar si esta nueva condición tenía algún efecto en la cinética de la enzima silvestre. En la Fig. 4.19 se muestra una cinética de la enzima silvestre con amortiguador MOPS 200 mM. La curva sin activador alostérico fue muy parecida a la que se genera en las condiciones habituales de trabajo (Tris 100 mM), por lo que no hay diferencias significativas entre ellas; en contraste, la curva en presencia de activador tiene un marcado efecto de superactivación de la enzima dado que es rápidamente saturada.

El efecto sinérgico del MOPS con la GlcNAc6P es inusual y puede ser causado por la fuerza iónica

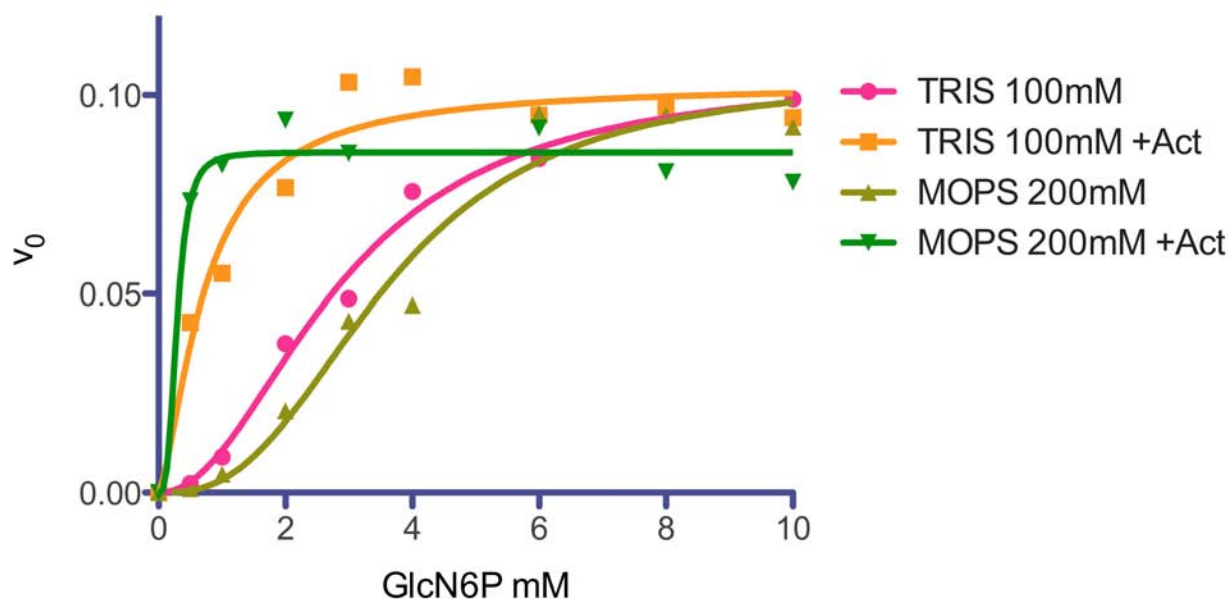


Figura 4.19: Cinética de la enzima silvestre con 200 mM de MOPS

generada al utilizar una alta concentración de amortiguador o bien porque el amortiguador MOPS es algún tipo de ligante para la enzima. Para discernir cual era la causa, se diseñó un experimento en el que se probaron los demás amortiguadores utilizados en la prueba de pH, todos a una concentración de 200 mM. El objetivo del experimento fue evaluar si la fuerza iónica era la causante del efecto de superactivación.

En la Fig. 4.20a se muestra el efecto en la cinética de la enzima silvestre en cinco diferentes condiciones, Tris 100 mM, Tris 200 mM, MOPS 200 mM, DIPSO 200 mM y HEPES 200 mM, donde las curvas en ausencia de activador guardan bastante similitud entre si. La única curva que sale de la tendencia es la condición con Tris 200 mM, en la que se observa un efecto K debido a que la $K_{0.5}$ se recorre a la derecha. Esta situación es típica de una inhibición competitiva, la cual puede explicarse en función a la composición química del Tris, el cual contiene un grupo amino que puede ocupar el sitio activo a altas concentraciones.

En cuanto a las curvas en presencia de GlcNAc6P, se observó una tendencia parecida, en la que todas las curvas son muy similares entre si a excepción de las condiciones en Tris 200 mM y MOPS 200 mM (Fig. 4.20b). La curva con Tris 200 mM más activador produjo una curva inhibida competitivamente; y en cuanto a la condición con MOPS 200 mM continuó mostrando un efecto V, en el se observa una superactivación como en la Fig. 4.19. Este resultado indica que el efecto sinérgico no es producto de la fuerza iónica, sino de la naturaleza química de la molécula de MOPS, la cual actúa como ligante

	H53Q	H53Q + 1mM de GlcNAc6P
$V_{max}(mM/min)$	0.45 ± 0.01	0.71 ± 0.02
h	2.42 ± 0.18	1.53 ± 0.25
$K_{0.5}(mM)$	8.53 ± 0.29	2.63 ± 0.29

Tabla 4.2: Parámetros cinéticos de la mutante H53Q a $4 \mu M$, MOPS 200 mM, $30^\circ C$.

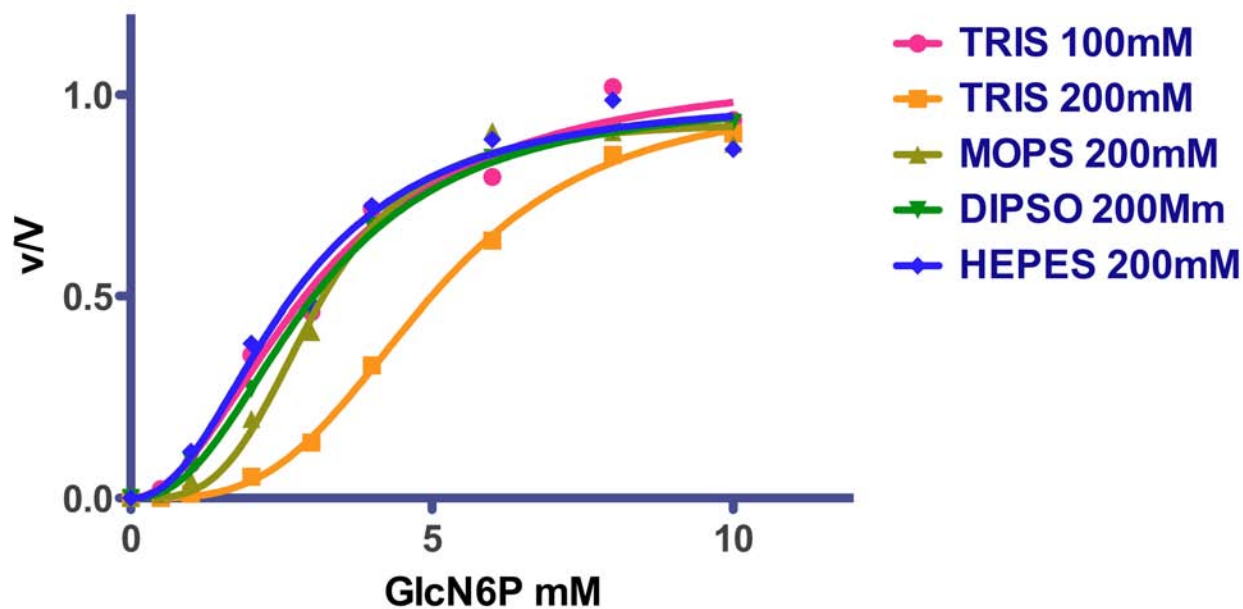
uniéndose a la enzima y produciendo un efecto que no es comprensible en su totalidad. Sin embargo, en el artículo de Mouilleron *et. al* se reporta la cristalización de la mutante C1A del dominio de isomerasa de GFAT (dominio homólogo de NagBII), que afecta la hélice CF asociada con la formación del canal de amonio necesario para la reacción de isomerización; en la estructura encuentran un sitio de unión no específico para el buffer MES en complejo con la GlcN6P, localizado en la intercara entre los dos monómeros que forman un dímero funcional [34]. El amortiguador MES es análogo estructural del MOPS, por lo que es posible que este compuesto tenga un sitio de unión a la proteína *wt*.

A pesar de que el MOPS parecía ser ligante de la enzima silvestre se decidió evaluar igualmente su efecto en la mutante H53Q, utilizando ésta a una concentración de $4 \mu M$ y saturando la reacción hasta 30 mM de GlcN6P. La curva obtenida para la mutante en estas condiciones no mostró el efecto de superactivación observado en la enzima silvestre. Es posible que no se observe en la mutante H53Q por la concentración a la que la proteína es utilizada o bien porque la mutación en esta proteína haya afectado el sitio de unión al compuesto MOPS.

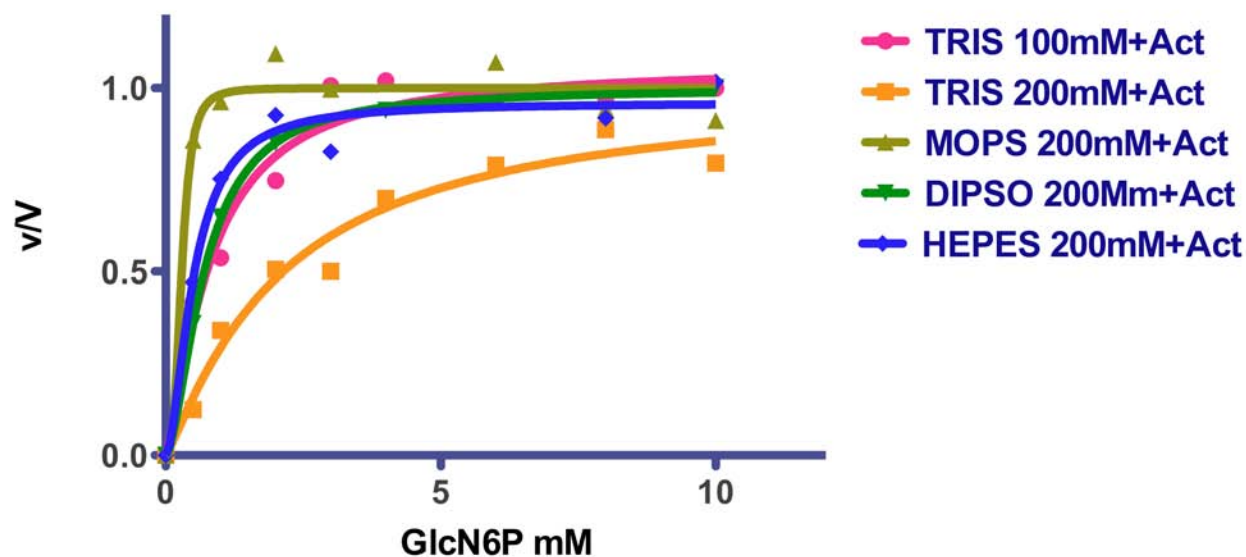
La curva resultante se muestra en la Fig. 4.21, la cual tiene parámetros cinéticos comparables a los de la enzima silvestre a excepción de la $K_{0.5}$ (Tabla 4.2), la cual para la mutante H53Q es más grande, 8.53 ± 0.29 mM para la mutante y 2.9 ± 0.35 mM para la silvestre) y por ende la enzima es menos afín por el sustrato. Este resultado concuerda con la hipótesis de que el residuo 53 está involucrado en el reconocimiento del sustrato, por lo que si es perturbado, la afinidad por la GlcN6P disminuye pero la actividad catalítica se mantiene intacta. La k_{cat} de la mutante H53Q es ligeramente menor comparada con la enzima silvestre pero se mantiene en el mismo orden de magnitud ($1.15 \pm 0.09s^{-1}$ para la mutante y $9.74 \pm 0.14s^{-1}$ para la silvestre).

4.10.2. Mutante H242Q

La mutante H242Q tiene una k_{cat} muy baja tal como se muestra en la Fig. 4.17. Por ello en la Fig. 4.22 se muestra la cinética de la mutante H242Q a una concentración de $40 \mu M$, que es aproximadamente 200 veces la cantidad utilizada en un ensayo cinético de la enzima silvestre. La curva producida en



(a) Cinética de la enzima silvestre en diferentes amortiguadores.



(b) Cinéticas de la enzima silvestre en diferentes amortiguadores en presencia de 1 mM de GlcNAc6P.

Figura 4.20: Cinéticas de la enzima silvestre en MOPS, HEPES, DIPSO y TRIS sin activador alostérico y con 1 mM de GlcNAc6P.

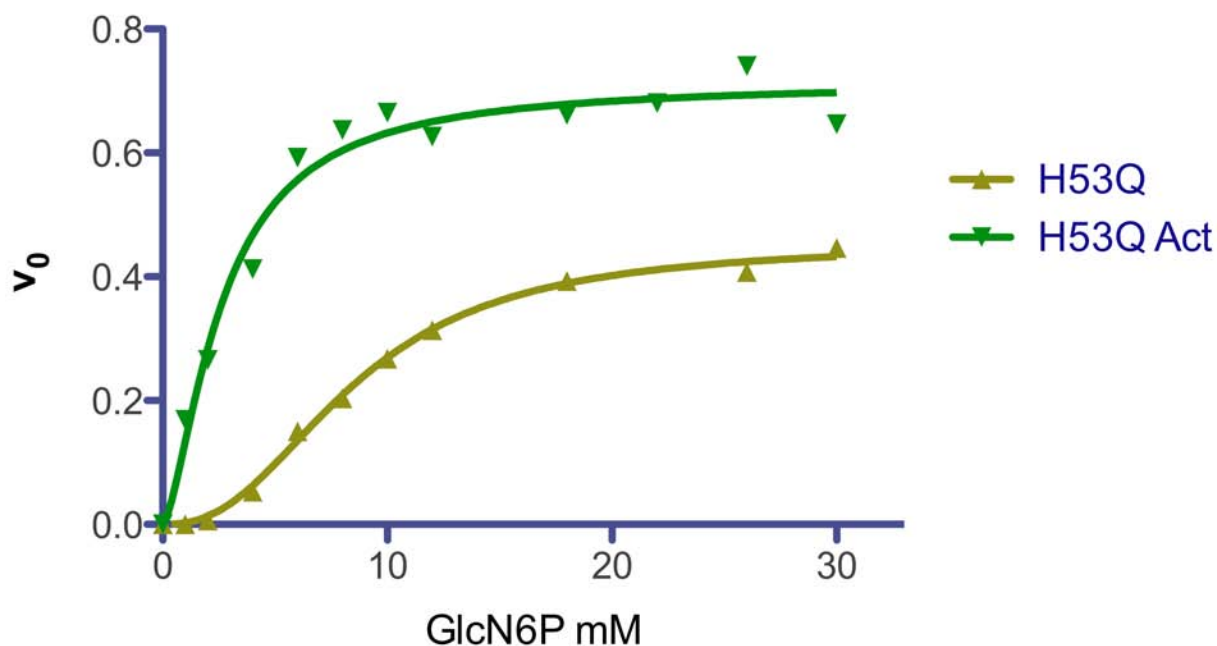


Figura 4.21: Cinética de la mutante H53Q en 200 mM de MOPS

	H242Q	H242Q + 1mM de GlcNAc6P
$V_{max}(mM/min)$	0.17 ± 0.05	2.17 ± 0.13
h	2.15 ± 0.73	0.54 ± 0.14
$K_{0.5}(mM)$	6.53 ± 2.28	16.9 ± 8.32

Tabla 4.3: Parámetros cinéticos de la mutante H242Q a $40 \mu M$, Tris-HCl 100 mM, $30^\circ C$.

ausencia de activador alostérico posee un comportamiento semejante al silvestre, tiene forma sigmoide y posee un número de Hill de $h = 2.15 \pm 0.73$ (Tabla 4.3). Sin embargo en presencia de 1 mM de GlcNAc6P la curva resultante exhibe un proceder diferente al comportamiento hiperbólico, ya que muestra cooperatividad negativa, es decir, un coeficiente de Hill menor a 1 ($h = 0.54 \pm 0.14$) (Tabla 4.3). Tal como lo mencionan varios autores [13, 24, 27, 31] la cooperatividad negativa es un fenómeno poco usual en la naturaleza, y en los casos donde se presenta, generalmente es causada por una heterogeneidad de sitios, o debido a conformaciones con diferente afinidad.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se realizó una cinética a diferentes concentraciones de GlcNAc6P: 0 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM; para verificar la existencia de conformaciones de diferente afinidad por el activador alostérico. Como se muestra en la Fig. 4.23, es evidente que existe una tendencia hacia la hiperbolicidad en función de la concentración ascendente de activador. Esta observación es sustentada al comparar los coeficientes de Hill, los cuales muestran una propensión a aumentar 0.43,

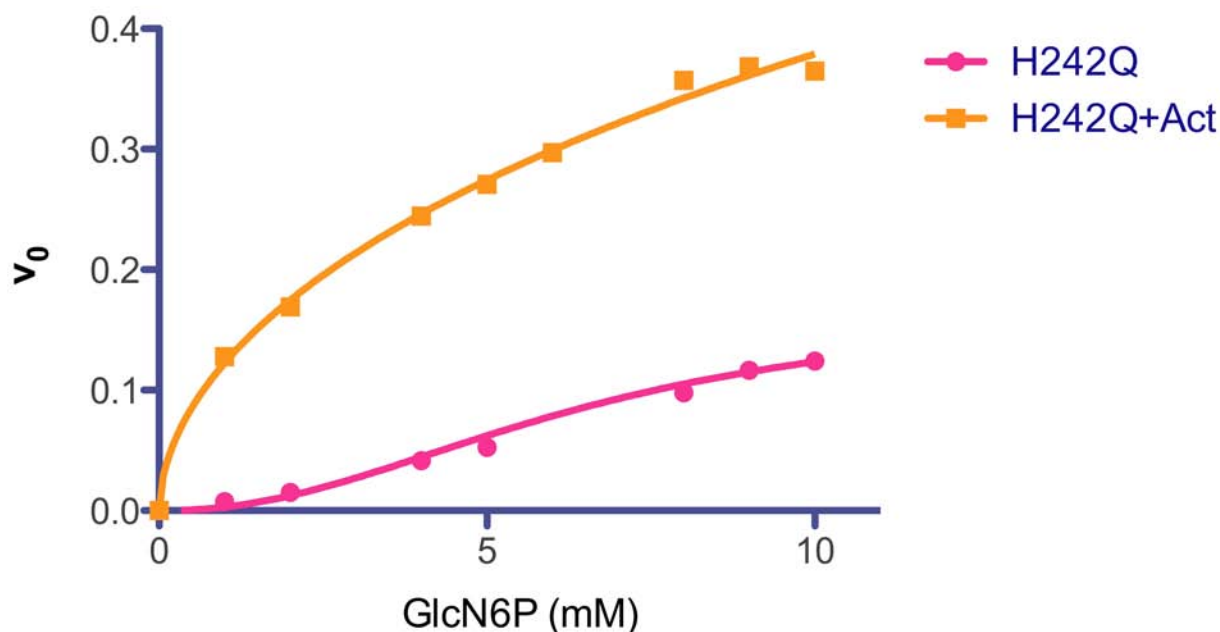


Figura 4.22: Cinética de la mutante H242Q a $40\mu M$ en Tris 100 mM

	0 mM	1 mM	2mM	4 mM
$V_{max}(mM\text{ m}\acute{a}n)$	0.57 ± 0.39	0.75 ± 0.07	0.95 ± 0.09	0.93 ± 0.07
h	2.44 ± 0.68	0.43 ± 0.07	0.84 ± 0.07	1.05 ± 0.11
$K_{0.5}(mM)$	10.66 ± 5.56	4.23 ± 1.08	4.60 ± 1.18	2.92 ± 0.49

Tabla 4.4: Parámetros cinéticos de la mutante H242Q a $40\mu M$, Tris-HCl 100 mM , $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a diferentes concentraciones de GlcNAc6P.

0.84 y 1.05 para las curvas con 1 mM, 2 mM y 4 mM respectivamente (Tabla 4.4). Con base en el experimento anterior, se puede inferir que la mutación modificó la afinidad de la enzima por el activador, propiciando una heterogeneidad de conformaciones catalítica, por lo que la cooperatividad negativa debería desaparecer en función de concentraciones mayores de GlcNAc6P que favorezcan la saturación de la enzima y a su vez una sola conformación catalítica. Es posible que un único cambio en la proteína, debido a la conectividad entre aminoácidos distantes, pueda alterar la afinidad por alguno de sus ligantes. En este caso, la mutación en la posición 242 afectó la afinidad de la proteína por la GlcNAc6P, lo que ocasionó que la concentración de 1 mM, a la que habitualmente se satura la enzima silvestre, no sea suficiente para saturar a la mutante H242Q y generar una heterogeneidad de conformaciones catalíticas, que se verían reflejadas en una aparente cooperatividad negativa.

En la Fig. 4.24 se muestra la cinética de la mutante H242Q en presencia de GlcNol6P, un análogo del estado de transición no hidrolizable. En la curva es observable el efecto de inhibición competitiva

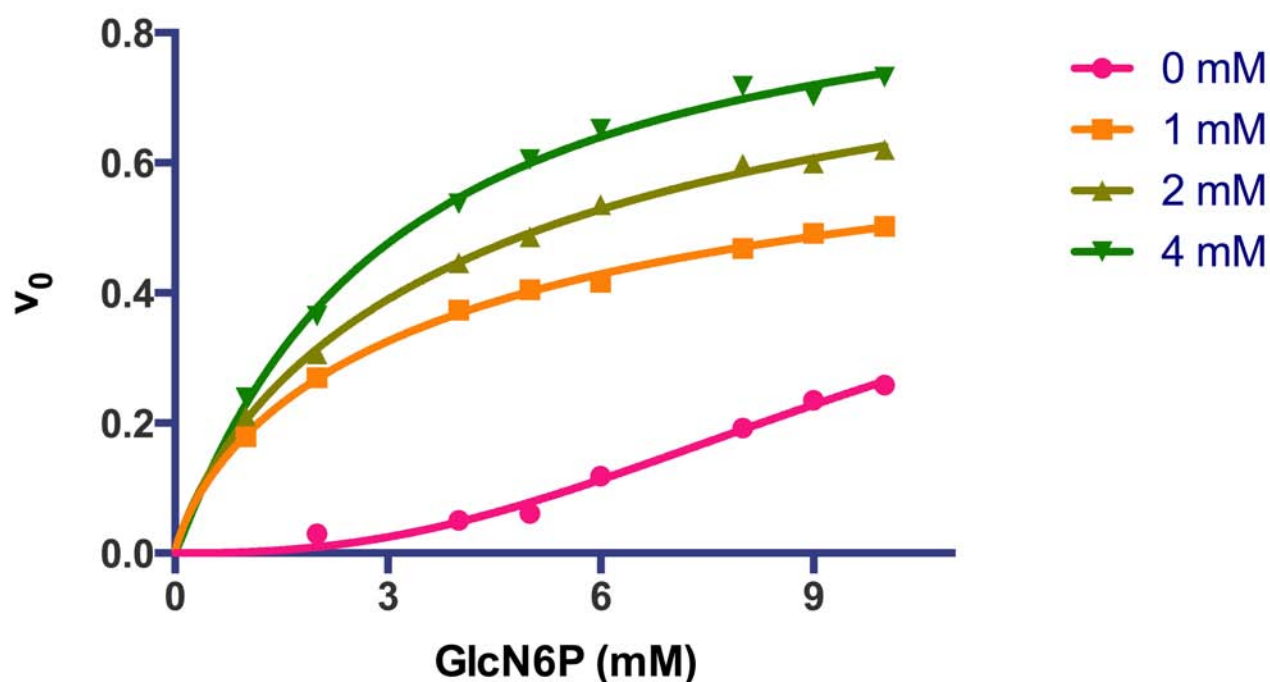


Figura 4.23: Cinética de la mutante H242Q a una concentración de $40 \mu\text{M}$ a 0 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM de GlcNAc6P en Tris 100 mM.

ya que la $K_{0.5}$ aumenta a concentraciones ascendentes de GlcNol6P además de un efecto de activación paradójica. El hecho de que el GlcNol6P inhiba competitivamente a la mutante H242Q significa que la enzima tiene alta afinidad por la forma abierta de la GlcN6P, por lo que sigue siendo activa siempre y cuando tenga disponible una conformación abierta del sustrato. Sin embargo la apertura espontánea de la GlcN6P ocurre a una velocidad sumamente baja [30], por lo que la constante catalítica de esta proteína mutante está limitada por este evento y es igualmente baja ($k_{cat} 0.005 \pm 0.001 s^{-1}$).

El GlcNol6P también causa una inhibición competitiva en la enzima silvestre (Fig. 4.25a). Al comparar el efecto causado en la enzima silvestre con el observado en la mutante H242Q es posible identificar ciertas tendencias. En la Fig. 4.25b se observa un acercamiento de la cinética de la Fig. 4.25a, la cual es muy similar a la curva de la mutante H242Q con inhibidor de la Fig. 4.24. Esto indica que ambas son inhibidas de una forma similar.

Los resultados cinéticos obtenidos para esta mutante indican que la histidina en la posición 242 tiene un rol fundamental en la donación o abstracción de protones durante la apertura de la estructura cíclica de la GlcN6P.

Finalmente las constantes cinéticas calculadas de las enzimas mutantes se muestran en la tabla 4.5.

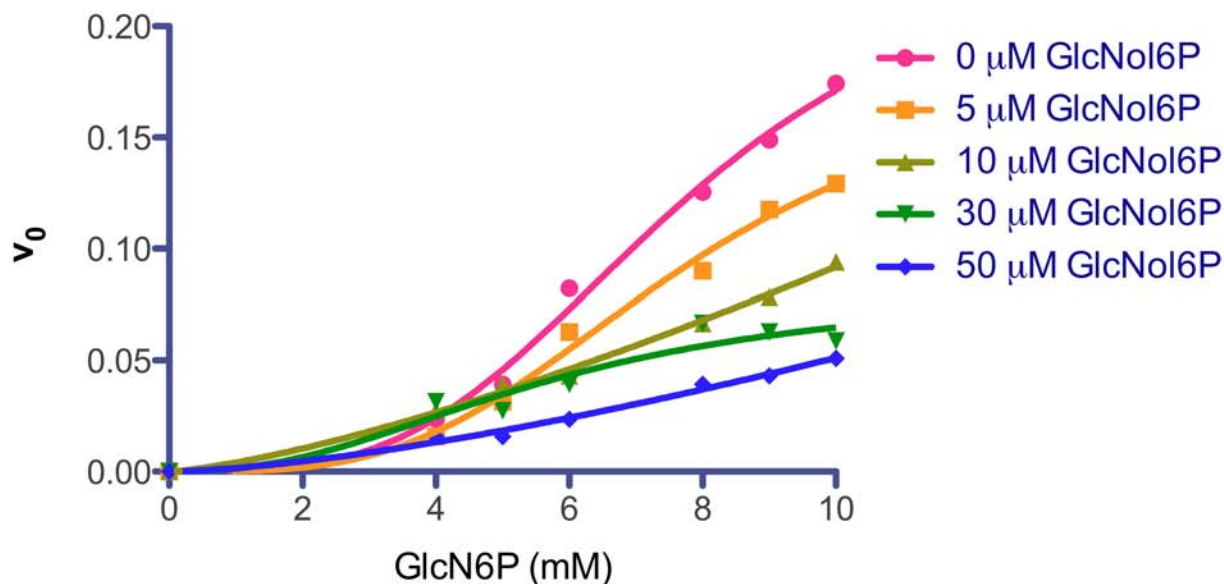
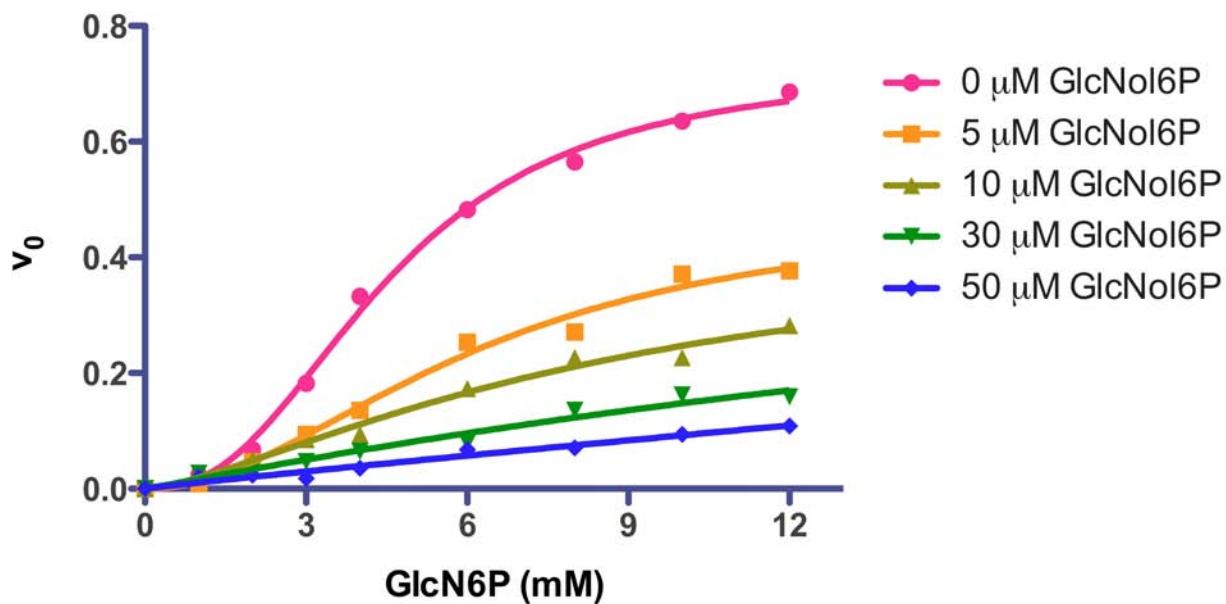


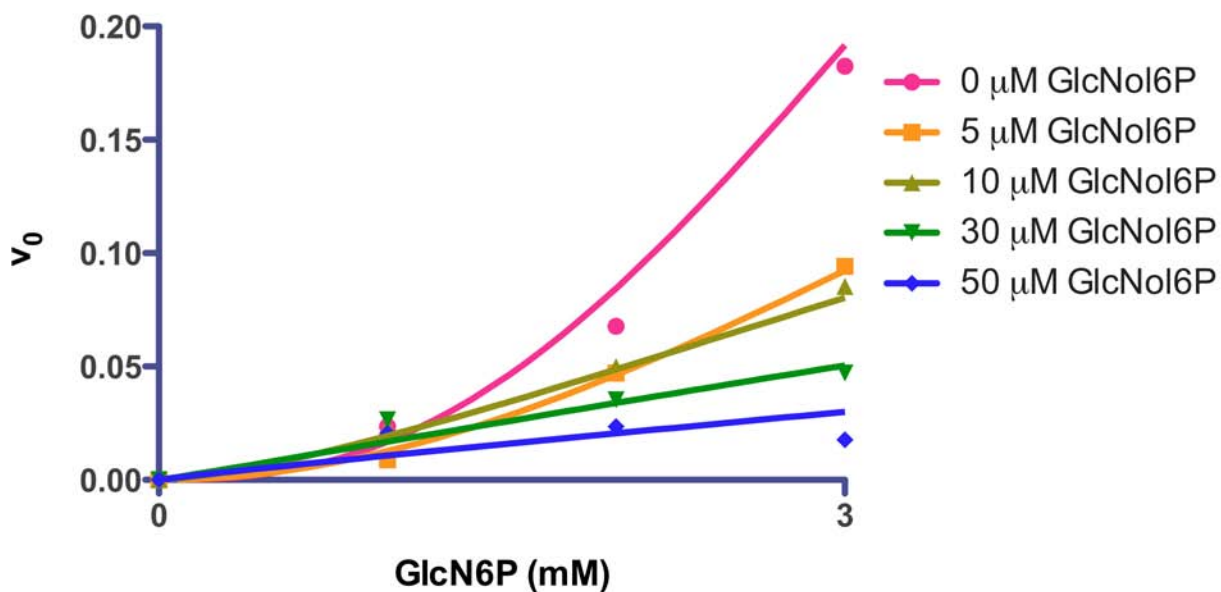
Figura 4.24: Cinética de la mutante H242Q a 40 μM con diferentes concentraciones de GlcNol6P

Proteína	Coefficiente de Hill(h)	$k_{cat}(s^{-1})$	$K_{0.5}(mM)$	$Ki^a(\mu M)$ GlcNol6P
Silvestre	2.69 ± 0.15	9.74 ± 0.14	2.9 ± 0.35	20.53 ± 0.77
H53Q	2.42 ± 0.18	1.15 ± 0.09	8.53 ± 0.29	—
H242Q	2.15 ± 0.73	0.005 ± 0.001	6.53 ± 0.28	16.19 ± 0.52

Tabla 4.5: Las mediciones fueron hechas a pH 7.5, 30 °C. Los datos fueron ajustados mediante un análisis de regresión no lineal a la ecuación de Hill. En a , los valores de Ki para GlcNol6P fueron calculados por un ajuste no lineal a la ecuación de Hill a la que se le agregaron parámetros de inhibición competitiva.



(a) Cinética de la enzima silvestre con GlcNol6P



(b) Acercamiento de la cinética de la enzima silvestre con GlcNol6P

Figura 4.25: Cinética de la enzima silvestre con concentraciones ascendentes de GlcNol6P que muestran una inhibición competitiva.

4.11. Calorimetría de titulación isotérmica, ITC

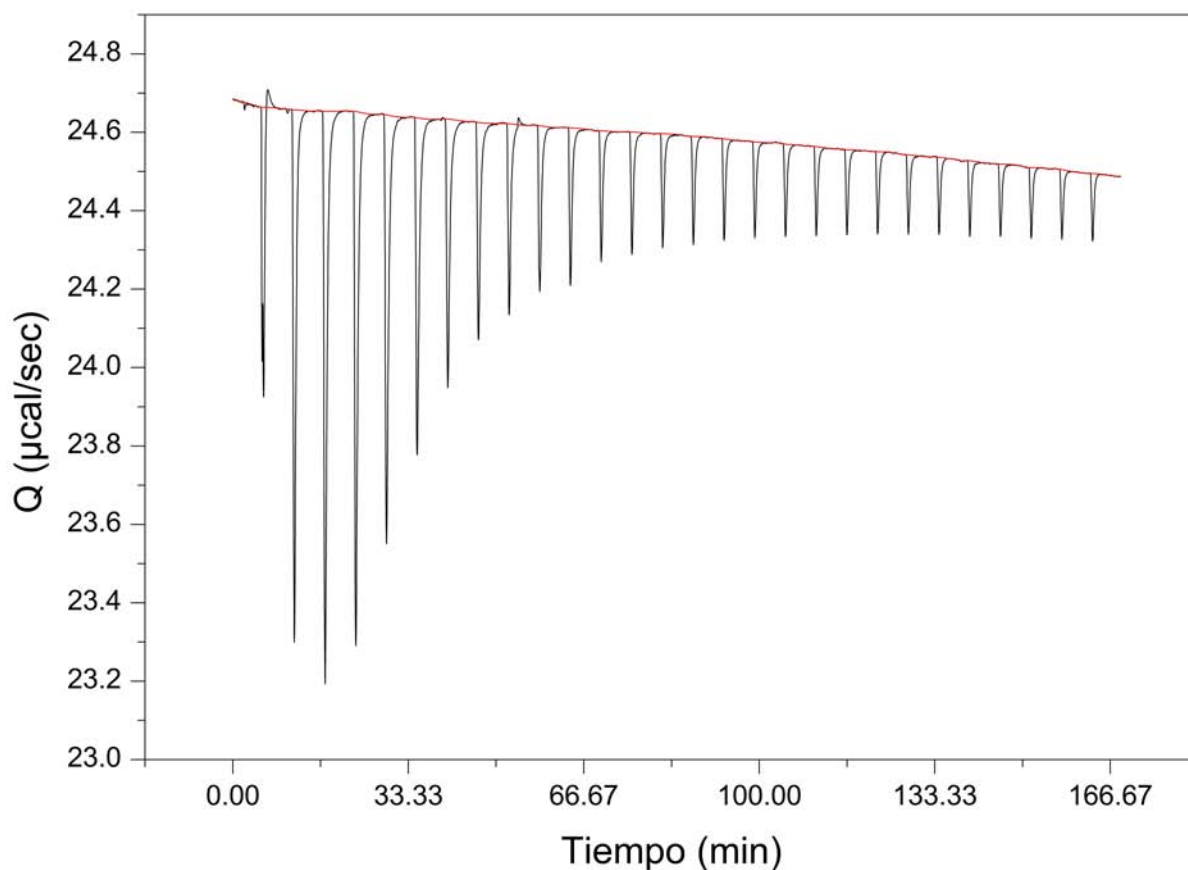
La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica utilizada para medir la estequiometría de unión de una reacción, ya que un calorímetro permite cuantificar la energía de unión. En este trabajo se realizó un experimento preliminar de calorimetría de titulación isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) con el objetivo de medir la energía de unión del GlcNol6P a la enzima silvestre y poder calcular la estequiometría de unión. Se utilizó el GlcNol6P, un análogo del estado de transición no hidrolizable, para evitar medir el calor provocado por la catálisis enzimática.

El termograma obtenido del experimento se muestra en la Fig. 4.26a, y la isoterma resultante en la Fig. 4.26b, la cual muestra una forma poco típica, dado que no es una sigmoide simple, esto refleja que el proceso de unión de GlcNol6P a la proteína tampoco lo es. Además en él, podría estar implicado un fenómeno cooperativo. Los datos se ajustaron a un modelo secuencial de sitios independientes, y para dilucidar la estequiometría de la reacción, se probaron modelos con dos, tres y cuatro sitios de unión. Este último modelo con cuatro sitios de unión fue el que mejor explicó los datos con un valor de $\chi^2 = 1$.

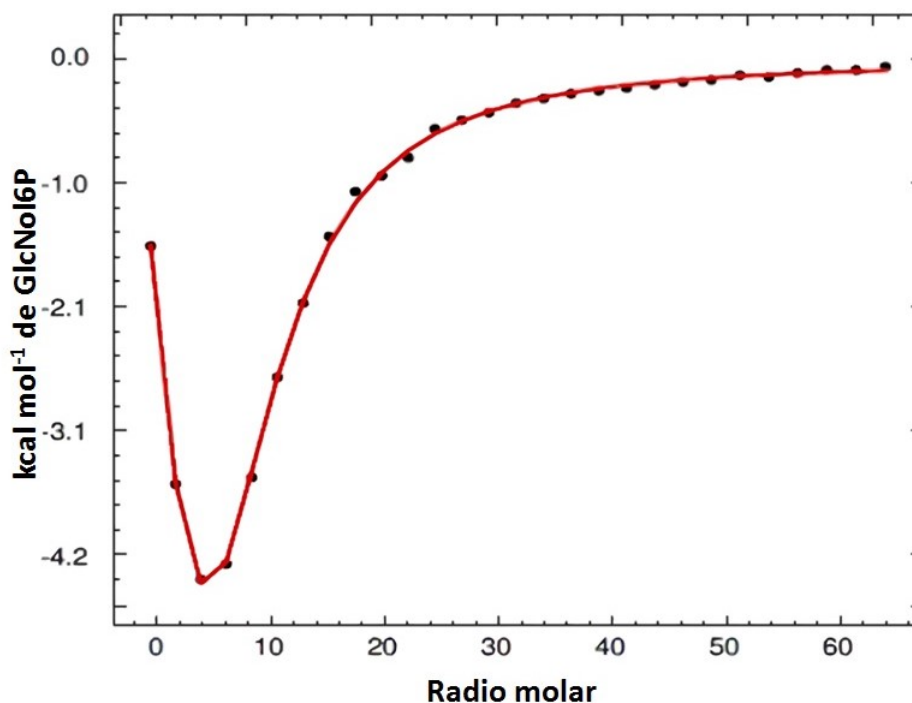
Con base en el ajuste, se puede decir que la proteína silvestre NagBII posee 4 sitios de unión, independientes y con diferentes constantes de afinidad (Fig. 4.6). Otro aspecto que es importante discutir, es la firma termodinámica obtenida para cada sitio, tal como se expone en la Fig 4.27, dos sitios están guiados entrópicamente (sitio 1 y sitio 3) y dos entálpicamente (sitio 2 y sitio 4), lo cual alenta la hipótesis de sitios secuenciales e independientes. Las diferencias entre los sitios y la estequiometría calculada de este experimento, proporcionan evidencias directas que apoyan el modelo alostérico propuesto por Marcos-Viquez [29].

Reacción	$Ka(M^{-1})$	$\Delta G(Kcal/mol)$	$\Delta H(Kcal/mol)$	$-T\Delta S(Kcal/mol)$
Especies libres $\rightleftharpoons M_2A_1$	4.18×10^8	-11.95	95.50	-107.50
$M_2A_1 + A_1 \rightleftharpoons M_2A_2$	6.60×10^5	-8.07	-88.54	80.47
$M_2A_2 + A_1 \rightleftharpoons M_2A_3$	3.05×10^2	-3.44	74.48	-77.93
$M_2A_3 + A_1 \rightleftharpoons M_2A_4$	5.42×10^4	-6.56	-84.14	77.57

Tabla 4.6: Parámetros termodinámicos obtenidos a partir del ajuste a un modelo secuencial de cuatro sitios.



(a) Termograma de unión a 30 °C.



(b) Isotherma a partir de la integración de los picos del termograma.

Figura 4.26: En *a*, termograma de unión de GlcNol6P a NagBII silvestre. En *b*, isoterma a partir de la integración de los picos del termograma en 4.26a (puntos negros), la línea roja representa el ajuste a un modelo secuencial con cuatro sitios de unión. Las gráficas fueron generadas por el servidor *Affinimeter* (<https://www.affinimeter.com/>).

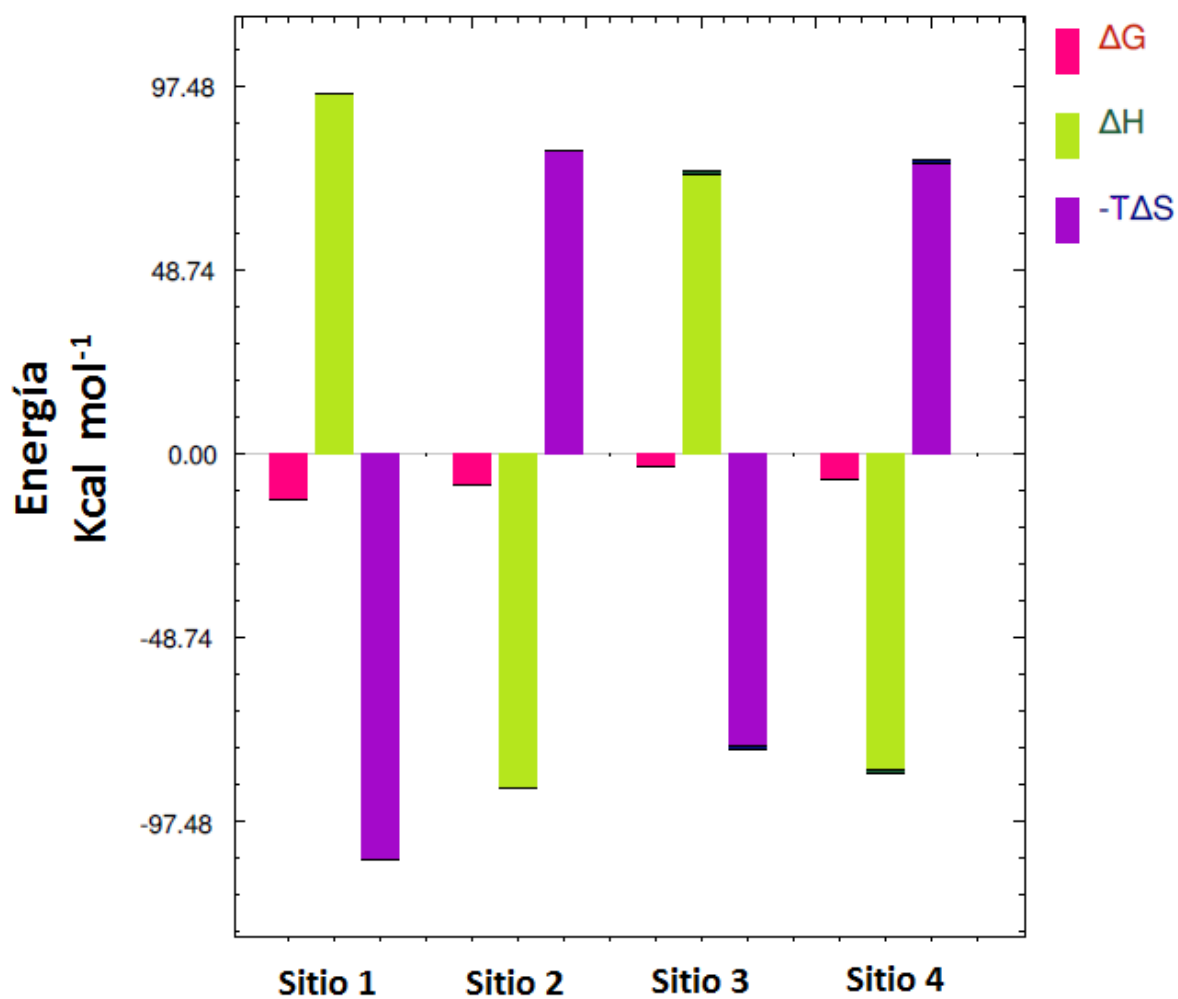


Figura 4.27: Comparación de la firma termodinámica de los cuatro sitios de unión, en rosa se representa el ΔG , en verde el ΔH y en morado el $-T\Delta S$. La gráfica fue generada por el servidor *Affinimeter* (<https://www.affinimeter.com/>).

4.12. Inferencia filogenética

El objetivo principal de reconstruir la genealogía de la proteína NagBII fue detectar la presencia de esta nueva versión de la GlcN6P desaminasa en otros organismos, además de generar una hipótesis de homología entre la enzima GFAT y NagBII con un robusto método estadístico ya que la sola comparación de secuencias y plegamientos no son pruebas suficientes para ello [19, 37].

Los árboles se construyeron a partir de la búsqueda y depuración de secuencias, de las que se obtuvieron 30 secuencias del dominio Bacteria, 30 del dominio Archaea y 14 del dominio Eukarya, teniendo en total 74 secuencias, los criterios de selección fueron: alto porcentaje de identidad, mayor *score* (un número que se utiliza para evaluar la importancia biológica de un hallazgo, donde los valores más altos corresponden a una mayor similitud), y menor *e value* (un valor que representa la probabilidad de que los resultados obtenidos una búsqueda en las bases de datos aparezcan por casualidad, cuanto menor sea el valor, menor es la probabilidad de que el resultado aparezca debido al azar).

La inferencia filogenética con el método de máxima verosimilitud generó un árbol en el que se pueden distinguir tres clados principales (Fig. 4.28), correspondiendo a cada dominio, bacterias en verde, eucariontes en morado y arqueas en naranja. El valor de bootstrap para cada nodo exhibe valores de 100 lo que indica que los clados está bien resueltos. Los grupos de bacterias y eucariontes parecen más relacionados entre sí en contraste con el grupo de las arqueas que luce independiente de estos dos. Es importante remarcar que todas las secuencias pertenecientes al género de *Shewanella* se agrupan en un clado bien soportado. De estas secuencias solo existen reportes experimentales de la especie *S. oneidensis* y de la especie *S. denitrificans*, de ésta solo se cuenta con su estructura cristalográfica y un reciente ensayo de actividad en el que se confirma su función de GlcN6P desaminasa alostérica (Comunicación personal de J. Marcos-Viquez); por lo que es altamente probable que las demás secuencias agrupadas en el clado también posean esta función. En cuanto a las demás secuencias de bacterias es posible que se traten de GFATs, ya que el porcentaje de identidad baja drásticamente, de 80 a 30 por ciento. En cuanto a las arqueas solo existen dos reportes experimentales, y estos se hayan agrupados juntos en un clado bien soportado junto con otras cuatro secuencias más, que posiblemente correspondan a secuencias no estudiadas con actividad de glucosamina 6-fosfato desaminasa no alostéricas.

La inferencia filogenética con métodos Bayesianos produjo un árbol resultado de 1,000,000 de generaciones. Tiene una probabilidad posterior de 0.37 y una desviación estándar de 0.031711. El valor de probabilidad posterior no es bueno, ya que las cadenas de la MCMC aún no convergen, además de que

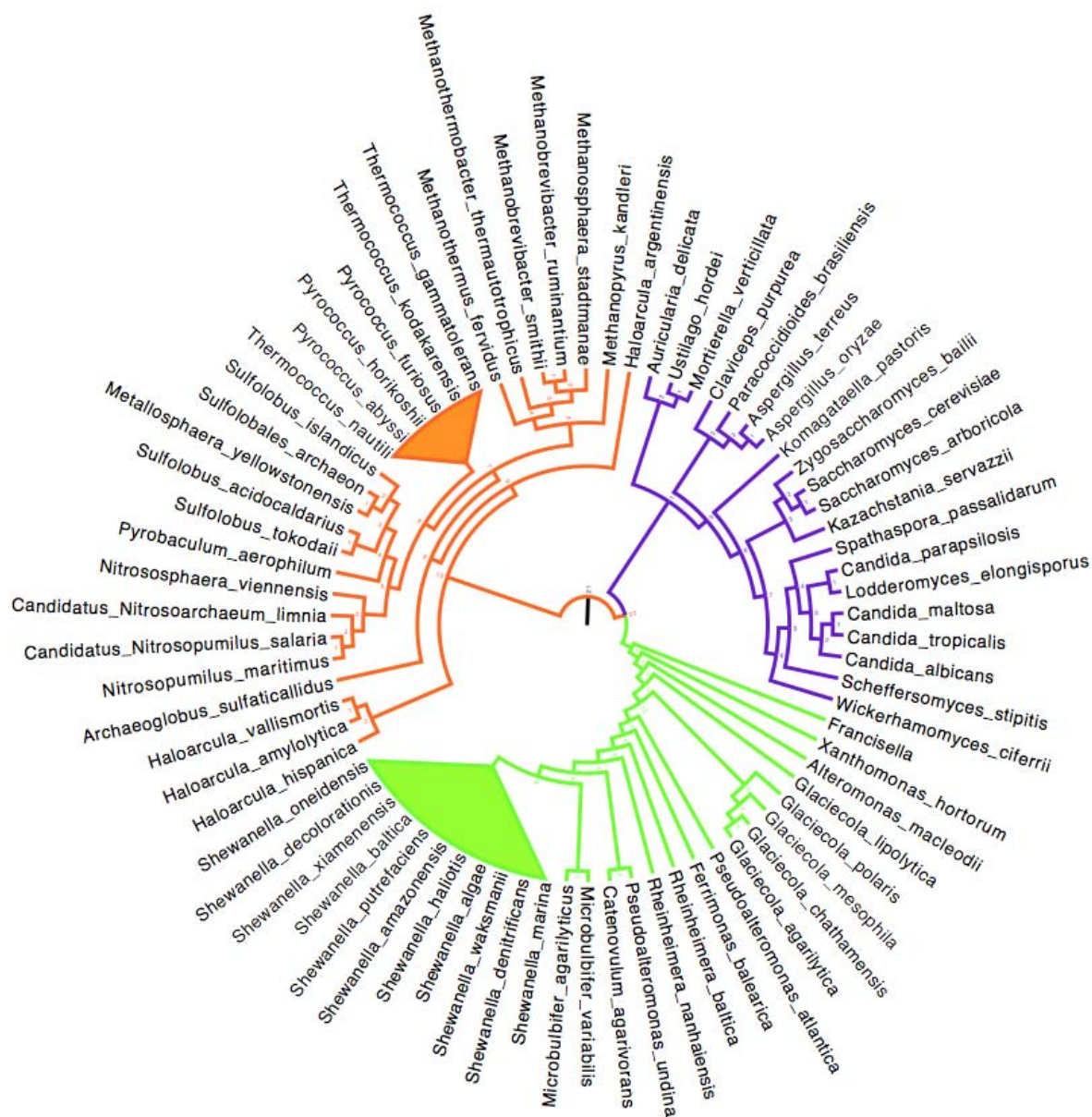


Figura 4.28: Árbol filogenético obtenido con el método de máxima verosimilitud. En verde se representa al dominio Bacteria, en morado el dominio Eukarya y en naranja el dominio Archaea.

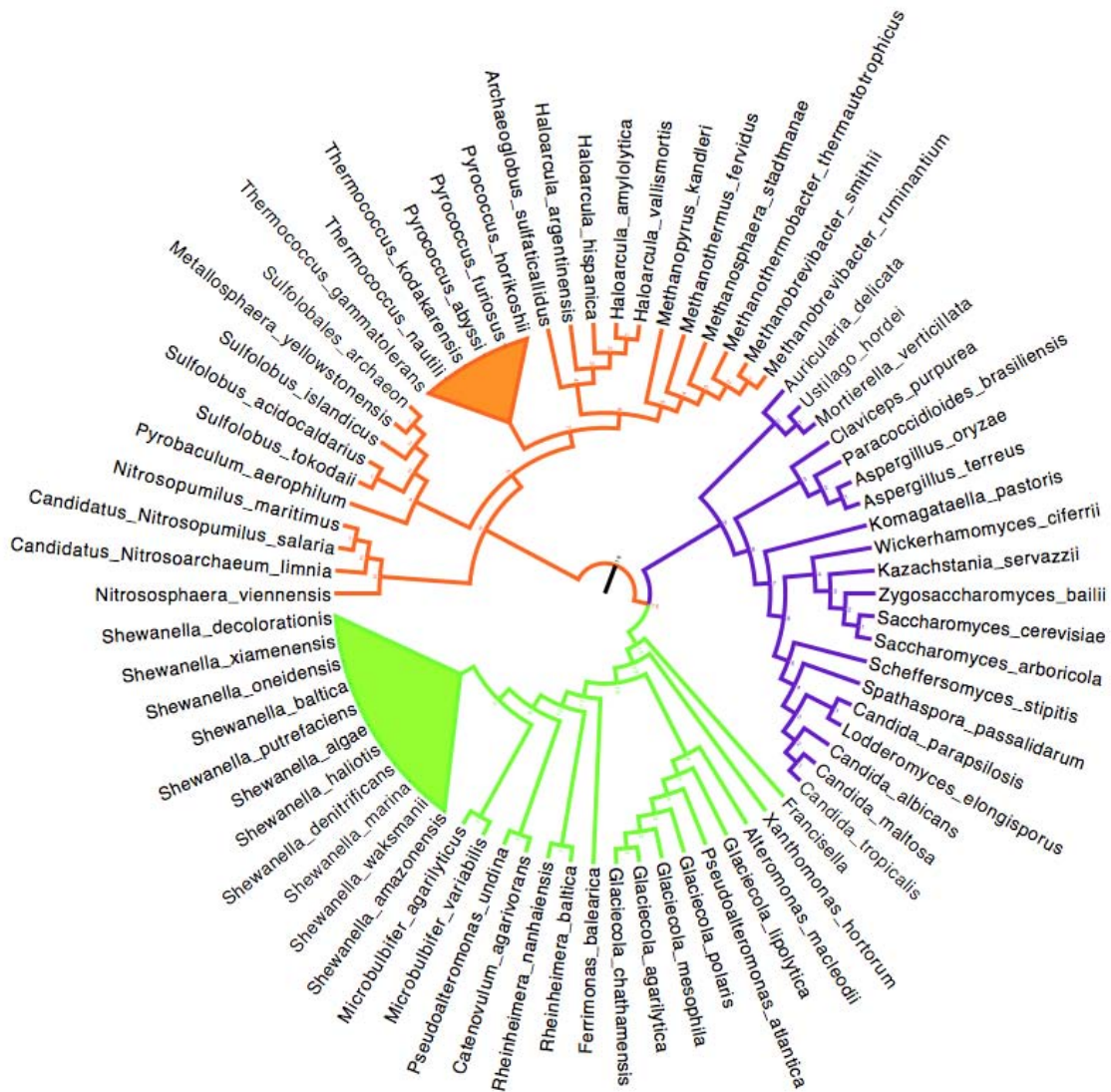


Figura 4.29: Árbol filogenético obtenido a partir de inferencia bayesiana. En verde se representa al dominio Bacteria, en morado el dominio Eukarya y en naranja el dominio Archaea.

solo se ha explorado la topología del árbol obtenido en aproximadamente el 37% de las generaciones; además la desviación estándar se recomienda mantenerla en valores por debajo de 0.01. Debido a esto es necesario correr más generaciones de MCMC para llegar a valores de probabilidad posterior más altos y de desviación estándar más bajos. Sin embargo al comparar ambos árboles (el obtenido con ML y el bayesiano), se identifican ciertas tendencias; al igual que en el árbol de máxima verosimilitud, en el árbol Bayesiano se observan tres grandes clados bien definidos (Fig. 4.29), que corresponden a cada dominio, además las secuencias que cuentan con reportes experimentales se agruparon de una manera muy similar a los descritos en el árbol de ML. A pesar de estas similitudes topológicas, el árbol bayesiano no se encuentra bien resuelto.

La mayoría de las secuencias utilizadas para generar los árboles en este trabajo, a excepción de las eucariontes, están reportadas como probables azúcares isomerasas o probables GFATs, lo cual indica que existe un mal etiquetado de estas en los bancos de datos, porque al menos las que se agrupan en el mismo clado con las secuencias experimentalmente comprobadas como NagBII, es altamente probable que se trate del mismo tipo de enzima. Con base en el los árboles obtenidos podemos afirmar que las siguientes especies del género *Shewanella* poseen una GlcN6P desaminasa tipo NagBII: *S. denitrificans*, *S. decolorationis*, *S.ximenensis*, *S.baltica*, *S. putrefaciens*, *S. amazonensis*, *S. haliotis*, *S. algae*, *S. waksmanii* y *S. marina*. También las arqueas: *Thermococcus gammatolerans*, *T. nautilli*, *Pyrococcus horikushii* y *P. abyssi*.

Discusión General y Perspectivas

El objetivo principal de este trabajo era comprobar el nuevo modelo propuesto por Marcos-Víquez [29] para explicar el alto coeficiente de Hill presentado en las curvas sigmoideas de la enzima mediante el aporte de evidencias experimentales, para ello se construyeron las mutantes puntuales H53Q e H242Q, dos residuos importantes de cada sitio de unión propuesto en el modelo, que se suponen necesarios para el reconocimiento del sustrato y para la catálisis del mismo.

La caracterización cinética de las enzimas mutantes fue fundamental, ya que en función de ello se develarían las respuestas (o al menos indicios de ellas) acerca de la pregunta que se aborda. Primeramente fue necesario un análisis estructural de las enzimas mutantes para verificar que se encontraran plegadas y tuvieran una conformación similar a la silvestre. Por dicroísmo circular se observaron grandes semejanzas en estructura secundaria entre la proteína silvestre y la mutante H53Q. Por su parte, la mutante H242Q mostraba una menor cantidad de estructura secundaria en comparación con las otras dos proteínas. Contrariamente, los espectros de fluorescencia mostraron grandes diferencias entre las proteínas silvestre y la mutante H242Q con respecto a la enzima H53Q, la cual poseía menor intensidad de fluorescencia y a 295nm su máximo de emisión mostró un corrimiento hacia el rojo, lo cual significa que la mutación en la posición 53, afectó la estructura terciaria de la proteína modificando el microambiente en el que se encuentra el triptófano de la enzima. Sin embargo las tres proteínas mostraron tener una conformación plegada, por lo que se pudo atribuir las diferencias en el comportamiento cinético de las proteínas mutantes a las alteraciones locales inducidas por la mutación.

Las diferencias cinéticas entre las mutantes H53Q, H242Q y la enzima silvestre fueron notorias desde el primer ensayo, era evidente que la mutante H53Q perdía afinidad por la GlcN6P, y que la mutante H242Q poseía una baja k_{cat} tal como se esperaba. Cada mutante requirió condiciones particulares para caracterizar y calcular sus constantes cinéticas. Por ejemplo la mutante H53Q requirió un cambio de amortiguador, ya que al perder afinidad fue necesario utilizar una mayor concentración de sustrato para llevarla a la saturación, y al probar diferentes amortiguadores se observó que el MOPS era algún tipo

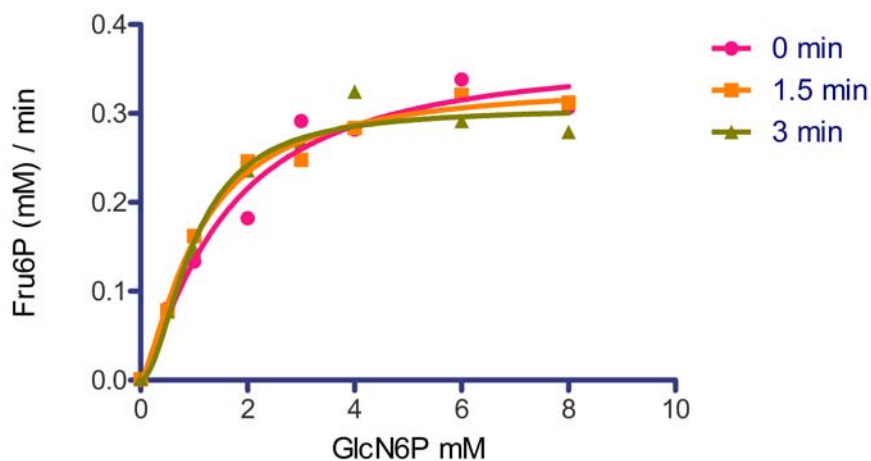
de ligante al estar en combinación con el activador alostérico y producía una superactivación en la enzima silvestre, sin embargo en la mutante H53Q no fue visible. Una posible explicación es que la concentración de enzima mutante utilizada en el ensayo fue 20 veces mayor a de la silvestre, lo cual probablemente aminoró el efecto del MOPS en la cinética. Otro aspecto interesante que se encontró al hacer los experimentos para encontrar el amortiguador más adecuado fue que el TRIS también podía ser ligante a altas concentraciones ($200\mu\text{M}$), además de que es el amortiguador que soporta menos los cambios de pH ocasionados por la adición de GlcN6P a la disolución, por lo que realmente se cuestionó la adecuación de este amortiguador para hacer los ensayos cinéticos no solo de NagBII, sino también de NagBI. Finalmente se logró estandarizar una condición en la que se pudo obtener una curva saturada de la enzima mutante H53Q, donde se destaca que la afinidad de la proteína modificada por la GlcN6P es más baja que la observada en la proteína silvestre, por lo que es probable que la histidina 53 forme parte de un sitio de reconocimiento y tenga un importante rol en la unión del sustrato pero sin actividad catalítica, ya que la k_{cat} calculada para la mutante H53Q es comparable con la enzima silvestre (Fig. 4.5).

Para caracterizar la enzima mutante H242Q se utilizó una concentración de $40\mu\text{M}$, que es 200 veces más a lo utilizado para la silvestre. Esta condición fue difícil de lograr ya que la enzima tiende a la agregación. Cuando finalmente se consiguió mantener a la enzima a altas concentraciones, lo esperado era obtener curvas similares a las producidas por la enzima silvestre, lo cual se obtuvo parcialmente, ya que la curva en ausencia de activador es sigmoidea y con un $h = 2.15 \pm 0.18$, sin embargo la curva con 1 mM de activador mostró un comportamiento inusual exhibiendo cooperatividad negativa con un $h = 0.54 \pm 0.14$. De acuerdo con varios autores [13, 24, 27, 31] la cooperatividad negativa es poco frecuente en la naturaleza. Levitzki y Kosland [27] señalan que existen algunos eventos moleculares que pueden producir cooperatividad negativa, entre los cuales está que el ligante induzca cambios conformacionales que afecten la interacción entre subunidades, o que exista repulsión electrostática entre ligantes, que la proteína tenga sitios de diferente afinidad por un mismo ligante, que haya más de una conformación catalítica de la enzima, que existan sitios no idénticos debido al arreglo geométrico o por los cambios conformacionales de las subunidades durante su asociación, o bien la combinación de dos o más de estas alternativas. Siguiendo estas consideraciones y adaptándolas en función del nuevo modelo a discutir, podemos inferir que la mutante H242Q muestra cooperatividad negativa con 1 mM de GlcNAc6P probablemente porque la mutación en la posición 242 afecta globalmente a la proteína debido a la conectividad existente entre aminoácidos distantes. Esto pudo haberse reflejado en una baja

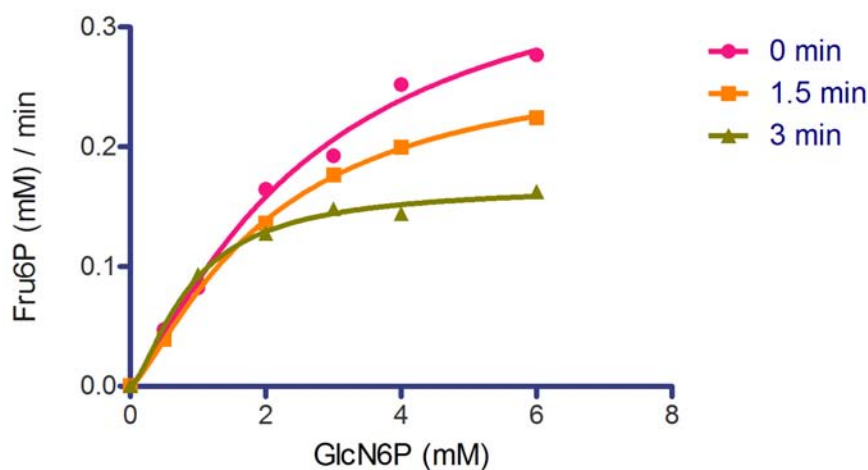
afinidad de la enzima por el GlcNAc6P, por tanto, es posible que lo que se observe en la curva con cooperatividad negativa sean dos conformaciones catalíticas diferentes en función de la concentración de GlcNAc6P, una en un estado activado y otra libre de activador.

Los resultados cinéticos y calorimétricos de este trabajo parecen indicar que existen dos sitios de unión de diferente afinidad por el sustrato. La mutante H53Q reveló que la His53 tiene un rol importante en el reconocimiento del sustrato, ya que al quitar este residuo la afinidad por la GlcN6P baja, sin embargo no afecta de manera abrupta a la k_{cat} , lo cual sugiere que el sitio de unión del que forma parte la His53 no es catalítico. Por otro lado, de acuerdo con los datos obtenidos, el sitio equivalente al catalítico en proteínas homólogas, del que forma parte la His242 es el que participa activamente en la catálisis y la His242 se encarga específicamente de la abstracción o donación de protones durante la apertura del anillo de la GlcN6P, ya que la k_{cat} la mutante H242Q baja al menos en tres ordenes de magnitud con respecto a la silvestre y además es inhibida competitivamente por el GlcNol6P, una forma análoga abierta no hidrolizable del sustrato y muestra una constante de afinidad muy similar, $16.19 \pm 0.52 \mu\text{M}$ y comparable con la de la enzima silvestre, $20.53 \pm 0.77 \mu\text{M}$.

Otra cuestión interesante que vale la pena mencionar son las constantes catalíticas de las desaminasas tipo NagBII reportadas en trabajos previos, ya que difieren con las obtenidas en este estudio. La k_{cat} para la enzima silvestre reportada en este trabajo fue de $9.74 \pm 0.14\text{s}^{-1}$ y la obtenida para la misma enzima por Yang y cols. [47] es de 0.9s^{-1} . Esta diferencia en los valores es significativa ya que es un orden de magnitud menor. Existen diferencias importantes en las condiciones de trabajo en las que fueron hechos los ensayos cinéticos, la más destacable es la temperatura. En el trabajo de Yang y colaboradores las cinéticas fueron realizadas a 37°C y en el presente trabajo a 30°C . Se sabe que la GlcN6P es inestable fuera de refrigeración (Comunicación personal del Dr. Mario Calcagno), por lo que se decidió evaluar la estabilidad del sustrato a 37°C y a 30°C , variando el tiempo de exposición del sustrato. La conclusión fue que la GlcN6P a 37°C se degrada y es más inestable (Fig. 5.1b), por lo que las condiciones a las que fueron calculadas las constantes cinéticas en el artículo de Yang no fueron las óptimas y explicaría la baja constante catalítica reportada. Por otro lado, Tanaka y colaboradores [44], reportan una k_{cat} de $97.5 \pm 2.1\text{s}^{-1}$ para la desaminasa tipo NagBII de *T. kodakaraensis*, la cual es muy alta comparada con las mencionadas anteriormente. Al igual que Yang *et. al.*, Tanaka y colaboradores realizaron los ensayos cinéticos a una temperatura diferente, específicamente a 60°C , a la cual el sustrato es inestable, sin embargo es importante mencionar que se trata de una enzima diferente y a pesar de ser homólogas pequeños cambios en secuencia pueden significar grandes diferencias en función,



(a) Cinética de la enzima silvestre a 30 °C



(b) Cinética de la enzima silvestre a 37 °C

Figura 5.1: Cinéticas de la enzima silvestre a diferentes tiempos de incubación del sustrato: 0 min, 1.5 min y 3 min.

además *T. kodakaraensis* es un organismo marino hipertermófilo que habita a elevadas temperaturas.

El caso de convergencia evolutiva de NagBI y NagBII es sumamente interesante, ya que además de catalizar la misma reacción, ambas se activan alostéricamente por el mismo compuesto, un grado tal de imitación no ha sido reportado en la literatura [28].

El reclutamiento enzimático parece ser el mecanismo más probable para la evolución de NagBII, ya que guarda un alto grado de similitud con la enzima GFAT, la cual cataliza una reacción diferente pero estrechamente relacionada, por lo que el cambio de función no involucraría un cambio drástico. Otro argumento a favor de esta hipótesis es, que tal como lo muestran los análisis de este trabajo, el gen NagBII tiene una limitada distribución filogenética y parece estar limitada a unas cuantas especies del género *Shewanella*, las cuales casualmente han divergido recientemente, tal es el caso de *Shewanella*

oneidensis que se ha adaptado a un ambiente de agua dulce mientras las demás especies del género habitan en agua salada, por lo que el reclutamiento enzimático pudo jugar un rol fundamental para adaptar el metabolismo a nuevos entornos.

El reclutamiento enzimático resulta ser una explicación satisfactoria para explicar la aparición de NagBII en el dominio Bacteria, ya que la GlcN6P desaminasa es una enzima que es utilizable en la ruta de la degradación de la quitina, ya que este polisacárido está compuesto por residuos del aminoazúcar GlcNAc y se encuentra codificada dentro del operón NagBACD. Este conjunto de genes regulados se encuentran altamente conservados en especies quitinolíticas como *Vibrio cholerae*, y no quitinolíticas como *E. coli*, donde se encarga de la transformación de GlcNAc en Fru6P, facilitando la utilización de GlcNAc como fuente de carbono [47]. Sin embargo en las especies del género *Shewanella*, la ocurrencia de este operón no es obvia, ya que se encontraron genes equivalentes no homólogos con los respectivos encontrados en *E. coli*, tal es el caso de NagBII. Debido a que la quitina es un polímero estructural esencial en los seres vivos, como componente esencial de las paredes celulares de hongos, cutículas y exoesqueletos de gusanos, moluscos y artrópodos, constituye una fuente natural de aminoazúcares para muchas bacterias en varios sistemas acuáticos. Además existe un registro de que la utilización de la quitina es extremadamente eficiente en el océano, ya que su presencia en los sedimentos es apenas detectable, por lo que no resulta difícil inferir que la evolución generó opciones convergentes para este tipo de tareas. Adicionalmente, la proteína NagB se encarga del último paso de la vía, isomerizando y desaminando de GlcN6P, convirtiéndola en Fru6P, un intermediario clave en el metabolismo del carbono en muchas especies. La eficiencia catalítica del gen NagBII tiene de 1 a 1.5 ordenes de magnitud más baja comparada con el producto de los genes NagA y NagK, por lo que hace altamente probable que NagBII sea el paso limitante de la velocidad de la vía en *Shewanella oneidensis* [47].

Sin embargo aún queda una pregunta evolutiva sin resolver y esta es la ocurrencia de NagBII en algunas especies de arqueas, el gen en este dominio también tiene una distribución limitada a unas cuantas especies quitinolíticas. Sin embargo, al analizar sus genomas es importante resaltar que no existen coincidencias para los genes homólogos del operón Nag clásicos ", por lo que se identificó una nueva ruta catabólica de la quitina, donde el gen de la desaminasa NagBII de arqueas está enbebido en un operón nuevo llamado quitinolítico, el cual solo muestra niveles de expresión en presencia de GlcNAc₂ [44].

Tanaka y cols. [44], también identificaron en *P. furiosus*, *P. abyssi* y *P. horikoshii* secuencias homólogas a NagBII, lo cual sugiere que estos organismos podrían tener esta nueva ruta de la degradación

de quitina, y en específico las secuencias identificadas podrían tratarse de desaminasas de tipo NagBII. Esta aseveración se respalda con los árboles filogenéticos obtenidos en este trabajo, en los que precisamente estos organismos aparecen agrupados en un clado bien soportado. Aunque el rol bioquímico de los aminoazúcares en arqueas no es claro, se puede inferir que estos organismos termófilos están explorando nuevos sustratos como fuente de carbono al incorporar la Fru6P, producto final del operón, a la glucólisis [44].

El reciclaje de quitina es un proceso sumamente eficiente en ambientes marinos, y no es trivial que todos los organismos que presentan una desaminasa tipo NagBII habiten en un ambiente acuático, por tanto es tentador inferir que este importante y necesario proceso haya sido desarrollado por la evolución de más de una forma. En este trabajo se recopila evidencia que parece indicar que la reacción de desaminación de la GlcN6P ha surgido en la evolución al menos dos veces: En forma de NagBI y en forma de NagBII.

Esto nos lleva a reflexionar acerca de la "plasticidad evolutiva" del dominio de isomerasa de la enzima GFAT, de la cual probablemente divergió NagBII. La variación genética ocurre de manera muy frecuente dentro de los organismos, y provee una amplia gama de oportunidades de reclutamiento enzimático para realizar nuevas funciones biológicas, sin embargo, es posible que el éxito de un evento de reclutamiento dependa en gran medida del ambiente en el que el evento toma lugar; adicionalmente, Schulenburg y Miller [41], detallan que existen ciertas características catalíticas, que parecen contribuir a un exitoso proceso de reclutamiento, las cuales le confieren a la enzima cierta "flexibilidad" a la evolución. Estas características le da más probabilidades a la proteína de ser reclutada de forma permanente para realizar otra nueva tarea. La "flexibilidad evolutiva" de una enzima está determinada por su estabilidad y por su potencial para la innovación funcional. Por lo que podemos inferir que el dominio de isomerasa, es una cadena polipeptídica estable tiene una alta flexibilidad conformacional ya que es capaz de soportar múltiples cambios para optimizar nuevas funciones.

Por último cabe destacar la importancia de el fenómeno alostérico en la regulación, no solo a nivel de expresión enzimática sino celular. Ejemplo de ello es la conservación de la activación alostérica en ausencia de cualquier notable homología entre NagBI y NagBII, lo cual es bastante inesperado y argumenta a favor de lo imprescindible de este mecanismo regulatorio a nivel funcional.

Conclusiones

- La histidina en la posición 53 forma parte de un sitio de regulador que participa en el reconocimiento del sustrato.
- La histidina en la posición 242 forma parte del sitio activo y probablemente participa en la abstracción o donación de protones durante la apertura del anillo de la GlcN6P.
- La GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* posee cuatro sitios de diferente afinidad por el GlcN6P.
- La GlcN6P desaminasa forma parte de un proceso altamente eficiente para el reciclaje de la quitina, por lo que es posible que la capacidad catalítica de conversión de GlcN6P a Fru6P y amonio haya surgido al menos dos veces en la evolución.
- El dominio de isomerasa de la enzima GlcN6P desaminasa es un excelente modelo para el diseño de proteínas, dado que la evolución ha demostrado que con pocos cambios, el dominio puede catalizar reacciones diferentes y además se pueden generar sitios reguladores de reconocimiento específicos.

Bibliografía

- [1] Myriam M Altamirano, Andrés Hernández-Arana, Salvador Tello-Solis, and Mario Calcagno. Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 220(2):409–413, 1994.
- [2] Myriam M Altamirano, Guillermo Mulliert, and Mario Calcagno. Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258(1):95–100, 1987.
- [3] Myriam M Altamirano, Jacqueline A Plumbridge, Andrés Hernández-Arana, and Mario Calcagno. Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1076(2):266–272, 1991.
- [4] Myriam M Altamirano, Jacqueline A Plumbridge, Eduardo Horjales, and Mario L Calcagno. Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of tyr 121. *Biochemistry*, 34(18):6074–6082, 1995.
- [5] Rodrigo Arreola, Brenda Valderrama, Maria L Morante, and Eduardo Horjales. Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS letters*, 551(1-3):63–70, 2003.
- [6] Ismael Bustos-Jaimes and Mario L Calcagno. Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(2):156–160, 2001.
- [7] Ismael Bustos-Jaimes, Montserrat Ramírez-Costa, Lorena De Anda-Aguilar, Pilar Hinojosa-Ocaña, and Mario L Calcagno. Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary

- structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*, 44(4):1127–1135, 2005.
- [8] Ismael Bustos-Jaimes, Alejandro Sosa-Peinado, Enrique Rudiño-Piñera, Eduardo Horjales, and Mario L Calcagno. On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase. *Journal of Molecular Biology*, 319(1):183–189, 2002.
- [9] Mario Calcagno, Pedro J Campos, Guillermo Mulliert, and Javier Suástegui. Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 787(2):165–173, 1984.
- [10] María Luz Cárdenas. Michaelis and menten and the long road to the discovery of cooperativity. *FEBS letters*, 587(17):2767–2771, 2013.
- [11] David A Cisneros, Gabriela M Montero-Morán, Samuel Lara-González, and Mario L Calcagno. 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(1):77–84, 2004.
- [12] Athel Cornish-Bowden. Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes. *FEBS Journal*, 281(2):621–632, 2014.
- [13] Athel Cornish-Bowden, Athel Cornish-Bowden, et al. *Fundamentals of enzyme kinetics*. Wiley-VCH Weinheim, 2012.
- [14] Thomas E. Creighton. *Proteins: structures and molecular properties*. Macmillan, 2nd edition dover printing, tenth gpo printing edition, 1993.
- [15] Philippe Durand, Beatrice Golinelli-Pimpaneau, Stephane Mouilleron, Bernard Badet, and Marie-Ange Badet-Denisot.
- [16] Erich Enghofer and Horst Kress. Glucosamine metabolism in drosophila virilis salivary glands: ontogenetic changes of enzyme activities and metabolite synthesis. *Developmental Biology*, 78(1):63–75, 1980.

- [17] Aron W Fenton. Allostery: an illustrated definition for the ‘second secret of life’. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(9):420–425, 2008.
- [18] Perry A Frey and Adrian D Hegeman. *Enzymatic reaction mechanisms*. Oxford University Press, 2007.
- [19] Michael Y Galperin, D Roland Walker, and Eugene V Koonin. Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome Research*, 8(8):779–790, 1998.
- [20] Eric R Henry, Stefano Bettati, James Hofrichter, and William A Eaton. A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin. *Biophysical chemistry*, 98(1):149–164, 2002.
- [21] Eduardo Horjales, Myriam M Altamirano, Mario L Calcagno, Richard C Garratt, and Glaucius Oliva. The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the t state at 2.3 Å resolution. *Structure*, 7(5):527–537, 1999.
- [22] Sharon M Kelly, Thomas J Jess, and Nicholas C Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2):119–139, 2005.
- [23] Kyung-Jin Kim, Myung Hee Kim, Ghyung-Hwa Kim, and Beom Sik Kang. The crystal structure of a novel glucosamine-6-phosphate deaminase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(1):413–417, 2007.
- [24] DE Koshland Jr, G Nemethy, and D_ Filmer. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5(1):365–385, 1966.
- [25] Samuel Lara-González, Henry BF Dixon, Guillermo Mendoza-Hernández, Myriam M Altamirano, and Mario L Calcagno. On the role of the n-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 301(1):219–227, 2000.
- [26] Luis F Leloir and Carlos E Cardini. Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 20:33–42, 1956.
- [27] Alexander Levitzki and DE Koshland. Negative cooperativity in regulatory enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62(4):1121–1128, 1969.

- [28] Jorge Marcos-Viquez. Convergencia evolutiva funcional de dos fosfoglucoamina desaminasas pertenecientes a diferentes familias estructurales. *UNAM*, Tesis de licenciatura, 2013.
- [29] Jorge Marcos-Viquez. Propiedades alostericas de una gln6p desaminasa con plegamiento sis. *UNAM*, Tesis de maestría, 2016.
- [30] Christian F Midelfort and Irwin A Rose. Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry*, 16(8):1590–1596, 1977.
- [31] Jacque Monod, Jeffries Wyman, and Jean-Pierre Changeux. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1):88–118, 1965.
- [32] Gabriela M Montero-Morán, Samuel Lara-González, Laura I Álvarez-Añorve, Jacqueline A Plumbridge, and Mario L Calcagno. On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry*, 40(34):10187–10196, 2001.
- [33] Hesam N Motlagh, James O Wrabl, Jing Li, and Vincent J Hilser. The ensemble nature of allostery. *Nature*, 508(7496):331–339, 2014.
- [34] Stéphane Mouilleron, Marie-Ange Badet-Denisot, Ludovic Pecqueur, Karine Madiona, Nadine Assrir, Bernard Badet, and Béatrice Golinelli-Pimpaneau. Structural basis for morpheein-type allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase equilibrium between inactive hexamer and active dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41):34533–34546, 2012.
- [35] David L Nelson, Albert L Lehninger, and Michael M Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [36] Glaucius Oliva, Marcos RM Fontes, Richard C Garratt, Myriam M Altamirano, Mario L Calcagno, and Eduardo Horjales. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure*, 3(12):1323–1332, 1995.
- [37] Marina V Omelchenko, Michael Y Galperin, Yuri I Wolf, and Eugene V Koonin. Non-homologous isofunctional enzymes: a systematic analysis of alternative solutions in enzyme evolution. *Biology direct*, 5(1):1, 2010.

- [38] TN Pattabiraman and BK Bachhawat. Purification of glucosamine 6-phosphate deaminase from human brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 54(2):273–283, 1961.
- [39] JA Plumbridge, O Cochet, JM Souza, MM Altamirano, ML Calcagno, and B Badet. Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and-degrading enzymes in *Escherichia coli* k-12. *Journal of Bacteriology*, 175(16):4951–4956, 1993.
- [40] E Rudino-Pinera, S Morales-Arrieta, SP Rojas-Trejo, and E Horjales. Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(1):10–20, 2002.
- [41] Cindy Schulenburg and Brian G Miller. Enzyme recruitment and its role in metabolic expansion. *Biochemistry*, 53(5):836–845, 2014.
- [42] V Shevchenko, M Hogben, R Ekong, J Parrington, and FA Lai. The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene*, 216(1):31–38, 1998.
- [43] Alejandro Sosa-Peinado and Martín González-Andrade. Site-directed fluorescence labeling reveals differences on the r-conformer of glucosamine 6-phosphate deaminase of *Escherichia coli* induced by active or allosteric site ligands at steady state. *Biochemistry*, 44(46):15083–15092, 2005.
- [44] Takeshi Tanaka, Fumikazu Takahashi, Toshiaki Fukui, Shinsuke Fujiwara, Haruyuki Atomi, and Tadayuki Imanaka. Characterization of a novel glucosamine-6-phosphate deaminase from a hyperthermophilic archaeon. *Journal of Bacteriology*, 187(20):7038–7044, 2005.
- [45] Florence Vincent, Gideon J Davies, and James A Brannigan. Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase missing link of the nagB superfamily? *Journal of Biological Chemistry*, 280(20):19649–19655, 2005.
- [46] Jeffries Wyman and Stanley J Gill. *Binding and linkage: functional chemistry of biological macromolecules*. University Science Books, 1990.
- [47] Chen Yang, Dmitry A Rodionov, Xiaoqing Li, Olga N Laikova, Mikhail S Gelfand, Olga P Zagnitko, Margaret F Romine, Anna Y Obraztsova, Kenneth H Neilson, and Andrei L Osterman. Comparative genomics and experimental characterization of n-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40):29872–29885, 2006.

- [48] Sergio Zonszein, Laura I Álvarez-Añorve, Roberto J Vázquez-Núñez, and Mario L Calcagno. The tertiary origin of the allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase studied by sol-gel nanoencapsulation of its t conformer. *PloS one*, 9(5):e96536, 2014.