

CLONACIÓN, EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL GEN *gam A* DE LA BACTERIA *Bacillus subtilis*.

Alvarez-Añorve L.I,¹ Plumbridge J.A,² Velázquez I¹ y Calcagno M. L.¹

¹Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F. Tel.: (525)623-2259, e-mail: laian20002000@yahoo.com.mx

²Inst. de Biologie Physico-Chimique, CNRS, Paris, 95005, Francia

Introducción

Hemos estudiado la utilización de los aminoazúcares por la bacteria *E. coli* y en particular el papel regulador de la activación alostérica de la enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa (*EcGNPD*) por la *N*-acetilglucosamina-6-P, así como el control de la expresión de su gen *nagB*.

En *E. coli*, el gen *nagB* y su producto de expresión (*EcGNPD*), juegan un rol fundamental en la regulación del metabolismo de los aminoazúcares. Este aspecto ha sido menos estudiado en *Bacillus subtilis* y en general en las bacterias Gram positivas de alto contenido G+C (firmicutes).

Nos ha interesado la glucosamina-6-P desaminasa de *B. subtilis* (*BsuGNPD*) ya que esta bacteria posee dos genes homólogos del gen *nagB* de *E. coli*, y parálogos entre sí, que han sido nombrados *nagB* y *gamA*. En este trabajo se describe la clonación del gen *gamA* y la expresión y purificación de la proteína codificada así como el inicio de su caracterización cinética. El gen *nagB* de *B. subtilis* ya había sido clonado por un estudiante del laboratorio, durante su trabajo apareció una publicación en la que Vincent y col. (1999) obtienen la proteína NagB recombinante y resuelven su estructura cristalográfica.

Materiales y métodos

Clonación.

Para la amplificación del gen *gamA* de 900 pares de bases de *B. subtilis* se empleó el DNA cromosomal de *B. subtilis* y los respectivos oligonucleótidos portadores de las secuencias para las enzimas de restricción Nde1 y BamH1, el producto de PCR se ligó al vector de clonación pJES307 con resistencia a ampicilina, el cual contiene los mismos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción; este producto se transformó en la cepa de expresión DH5alfa; posteriormente se pasó a la cepa de *E. coli* Rosetta Δ nag que tiene bloqueado el gen *nagB*. La expresión se realiza bajo el control del gen *lacI*, por lo que requiere el agregado de IPTG (isopropil-tio-b-galactopiranosido) al medio de cultivo.

Las bacterias con el plásmido se seleccionaron utilizando ampicilina. El plásmido de las colonias transformantes se secuenció en el segmento correspondiente para verificar la presencia del inserto con el gen *gamA* completo.

Los ensayos de sobreexpresión se llevaron a cabo probando diferentes concentraciones del inductor (IPTG) y para la purificación se empleó una columna de intercambio iónico (Source Q) y posteriormente una columna de exclusión molecular (Superdex 75). El ensayo cinético preliminar se realizó utilizando la enzima a una concentración 10 nM

Resultados

La expresión fue adecuada y suficiente como para permitir la purificación de la proteína, el pico de proteína eluyó a una concentración de sal de 120 mM, cabe mencionar que en ensayos cinéticos preliminares se obtuvo un valor de K_m de 2.4 mM.

Discusión

Las alineaciones muestran que los residuos que forman parte del sitio activo en la, (*EcGNPD*) y que son el punto de unión del fosfato del sustrato están conservados en la proteína GamA; la tríada catalítica formada por los residuos His 143, Glu 148 y Asp 141 se encuentra presente en ambas GNPDs, lo mismo sucede con la Arg 172 y la Lys208 que unen el grupo fosfo ($-OPO_3^-$) del sustrato en el sitio activo y el Asp72 cuyo grupo $-COO^-$ es la base que cataliza la enolización del sustrato.

Por el contrario, los residuos que unen el activador alostérico en la (*EcGNPD*), y los que crean contactos entre las subunidades no están conservados, lo que sugiere que esta enzima a diferencia de las GNPDs de gama-proteobacterias o de animales, no es hexamérica, por éste motivo la GlcNAc6P no actúa como un inhibidor alostérico; sin embargo, debido a la semejanza estructural con el sustrato de la misma, se esperaría que actuase como inhibidor competitivo.

La posible función de la duplicación del gen de la GNPD en *Bacillus subtilis* no es fácil de interpretar, Parker y col (2004) describen en *E. coli* dos vías metabólicas de la GlcNAc6P, una relacionada con su biosíntesis y el reciclado de los aminoazúcares de la pared celular y otra más con su conversión en GlcN6P y Fructosa 6P alimentando la glucólisis. Se puede especular que *Bsu-gamA* y *Bsu-nagB* se expresan coordinadamente, ya que *gamA* está en un mismo operón que *gamP* (gen que expresa un componente del sistema de transporte de la GlcNAc), por lo que sería funcional en la captura de la GlcNAc del medio. Por otra parte, el gen *nagB* (que es contiguo a *nagA*, que codifica para la GlcNAc6P desacetilasa), estaría más relacionado con la síntesis y el reciclado del proteoglicano de la pared celular. La única diferencia importante que encontramos en la caracterización cinética preliminar de estas enzimas parálogas es su K_m , NagB es más afin por el sustrato ($K_m = 0.13$ mM) que GamA (K_m 2.4 mM).

Esto es consistente con la idea sugerida sobre el papel fundamentalmente catabólico (preglucolítico) de GamA. Podría entonces esperarse una diferente regulación de la expresión de estos genes, para adecuarla a los estados metabólicos de la bacteria.

Referencias

- Alvarez-Añorve L.I; Calcagno M. L. y Plumbridge J. (2005) .Why Does *Escherichia coli* Grow More Slowly on Glucosamine than on *N*-Acetylglucosamine? Effects of Enzyme Levels and Allosteric Activation of GlcN6P Deaminase (Nag B) on Growth Rates. *Journal of Bacteriology* **187**: 2974-2982.
- Vincent F, Davies G J, Brannigan J. A. (2005) Structure and Kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the Nag B Superfamily *J Biol Chem.* **280**: 19649-55
- Uehara T, Parker J. T, (2004) The *N*-Acetyl D-Glucosamine Kinase of *Escherichia coli* and Its Role in Murein Recycling. **186**: 7273-7279