

00322



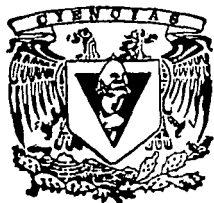
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

73

VIBRACIONES ATOMICAS, FLEXIBILIDAD CONFORMACIONAL Y LA
FUNCION BIOLOGICA DE PROTEINAS ALOSTERICAS: ESTUDIO A
PARTIR DE ESTRUCTURAS CRISTALOGRAFICAS DEPOSITADAS EN EL
PROTEIN DATA BANK.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
PAULA GONZALEZ RUBIO GARRIDO



DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EJEMPLAR UNICO

A



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Vibración atómica, flexibilidad conformacional y la función biológica de proteínas alostéricas: estudio de estructuras cristalográficas depositadas en el Protein Data Bank." realizado por Paula González-Rubio Garrido con número de cuenta 098529214, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Propietario

Dr. Eduardo Horjales Reboredo

Propietario

Dra. Adela Rodríguez Romero

Suplente

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Suplente

Dr. Enrique Merino Perez

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

**A mi Amachi,
dulce compañía**

**A Javier y Conchita,
Gracias a ustedes soy y
Con su ejemplo me construyo cada día**

*" un sauce de cristal, un chopo de agua,
aun alto surtidor que el vien to arquea,
un árbol bien plantado mas danzante,
un caminar de río que se curva,
avanza, retrocede, da un rodeo
y llega siempre: un caminar tranquilo..."*

O. Paz

*"...habla de las manos, hablo de las obras,
tan pronto nacen como mueren,
habla de las obras, hablo de las manos,
qué sería de ellas si les faltase la memoria
y el papel en que las escribo,
habla de las manos, hablo de las obras..."*

J. Saramago

GRACIAS, a todos los que son parte de mi vida y como tal han fomentado el desarrollo de mi personalidad y el crecimiento de mi pensamiento. Gracias a sus enseñanzas he aprendido a enfrentar e intentar comprender el mundo desde muchas perspectivas:

A la UNAM y sus jardines, el CCU y su gente. Pero sobre todo, por el orgullo de formar parte de su comunidad.

A la FACULTAD DE CIENCIAS, por sus clases, sus maestros, por las prácticas de campo. Por el cine club, las Asambleas, y la cafetería de la época pre-huelga. A sus físicos, matemáticos y biólogos, de quienes tanto aprendí.

Al laboratorio de Cristalografía de Proteínas del IBT, por mostrarme el mundo tan fascinante de ésta ciencia.

A Lorenzo Segovia, Enrique Merino y Adela Rodríguez por leerse este mamotreto, y alimentarlo con sus entusiastas comentarios.

A Eduardo Horjales por su aguerrida personalidad, sus chistes complicados y por sus enseñanzas cristalográficas; y a Rodrigo Arreola por siempre arreglarme la vida ante dificultades cibernéticas.

A Enrique Rudíño, por su inigualable guía. Por sus consejos y enseñanzas. Por cuidar y alentar el desarrollo de esta tesis. Por su confianza y entusiasmo, y siempre darme una buenas palmaditas en el hombro.

Al Colegio Madrid por acercarme a la ciencia, y cambiar mi vida y mi visión del mundo.

A mis maestros Carlos Chávez, Laura Fabela, El Tibur, Laura Fronjosá, Alicia, Josefina, Alejandro Stevele. De la facultad: Julio Prieto, Julio, Patricia Joseph, Eberto Nobelo, Pilar Segarra, Saúl Cano, Eduardo Corona, Jorge Meave, Palomino, Mary Ana.

A Nena, Aurelio, Víctor y Alejandro, porque son parte importante de mi ser.

A todos los amigos que por azares del destino han desaparecido pero que guardan un lugar en mi corazón y en mi vida.

A mis entrañables amigos Naomi, Constanze, Emilio Rivaud, Emilio Dominguez, Ana Goded, Mau, Betsa, Pepe, Evelia, Alejandro Filloy, Santiago Rincón-G, Simao, Nuria, Hugo, Nirvana, Adris, Joaquín, Aimy y Raúl M. Soy el resultado de sus influencias. Todos, han hecho de cada etapa de mi vida algo inolvidable.

A los amigos de la facu: Kasia, Eugene, Andrés, Guippi, Lakshmi, Alonso, Elda, Rodrigo Vargas, Matías, Mariana, Marcos, Cuervito, Mónica, Alejandro, Francisco, Raúl S y Cynthia. Por los descansos en el pastito bajo el árbol y en el pulpo. Por las prácticas de campo, por las clases con ustedes, por los reventones y las noches de chelas. Gracias amigos, hicieron del tiempo en la facultad una etapa realmente hermosa y divertida.

A Omar, mi amigo del alma, con quien todo son canciones y risas. DE VERDAD. Y a Emiliano Cerruti, que eres música, ideas y consejos. Por todo lo que es tu amistad.

Por siempre estar, entender y compartir todo: A Julieta, por tu inigualable amistad. Por tu espíritu revolucionario e inspirador, que tanto me ha dado. Y a Andrea, porque los poderes mágicos de las hadas nos unen y acompañan siempre.

Al amor de mis amores, Diego. Por llevarme a los lugares más ignótos de mi corazón. Por darme alegría y entusiasmo, ternura y sosiego. Eres amor y sueños.

A mis hermanos Claudia, Javier y Andrea. Son tres adoradas razones de mis esfuerzos, de mi búsqueda por ser mejor cada día. Los quiero.

Índice

1 Introducción	1
2 Marco Histórico	
2.1 Historia mínima de la cristalografía de proteínas	5
2.2 El Protein Data Bank (PDB)	8
3 Marco Teórico	
3.1 Consideraciones sobre el alosterismo	
3.1.1 Las proteínas alostéricas.....	11
3.1.2 El modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC).....	13
3.1.3 El modelo secuencial de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF).....	14
3.1.4 Teoría Alostérica de acuerdo a MWC.....	15
3.1.5 Modelo alostérico de la T oscilante: el carácter concertado y oscilatorio de la transición alostérica en la Glucosamina-6-fosfato Desaminasa de <i>E.coli</i>	16
3.2 Consideraciones sobre cristalografía	
3.2.1 Sobre cristales y simetrías.....	19
3.2.2 Información sobre la cristalografía de proteínas.....	20
3.2.3 Afinamiento cristalográfico.....	22
3.2.4 Parámetros estructurales resultado del afinamiento.....	23
3.2.5 Parámetros de desplazamiento (o factor B).....	25
3.2.6 Determinantes de afinamientos variados: consideración del desplazamiento.....	26
3.2.7 Relación entre el número de datos y la resolución: repercusiones sobre el afinamiento.....	28
3.3 Afinamientos cuasi-anisotrópicos: aplicación de tensores TLS a grupos pseudo-rígidos	29
3.3.1 Selección de grupos TLS y sus propiedades dinámicas.....	32
3.3.2 Implementación del afinamiento TLS en REFMAC5.....	34
3.4 Flexibilidad estructural	35
3.4.1 Cambios conformacionales: efectos de los dominios dinámicos determinados a partir de grupos pseudo-rígidos.....	37

3.4.2 Nuevos enfoques para abordar los fenómenos de flexibilidad	39
4 Objetivos.....	42
4.1 Objetivos generales	
4.2 Objetivos particulares	
5 Metodología	
5.1 La búsqueda de estructuras.....	44
5.1.1 Construcción de un criterio evaluador y selectivo.....	44
5.1.2 Construcción de la base de datos.....	45
5.1.3 Perfeccionamiento de la selección.....	46
5.2 Análisis vibratorios por factores de temperatura.....	47
5.3 Análisis vibratorios por grupos pseudo-rígidos.....	48
6 Resultados y discusión	
6.1 Pesquisa en el Protein Data Bank (PDB).....	50
6.2 Análisis de la base de datos: evaluación y selección.....	55
6.2.1 Justificación a la rigidez del criterio selectivo.....	57
6.2.2 Evaluación y selección de proteínas alostéricas.....	58
6.3 El caso de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)	
6.3.1 Caracterización de la enzima.....	60
6.3.2 Evaluación y selección de estructuras de FBPasa.....	62
6.3.3 Análisis por factores de temperatura isotrópicos.....	65
6.3.4 Análisis por grupos pseudo-rígidos.....	68
6.3.5 Afinamiento TLS de la FBPasa.....	73
6.3.6 Interpretación de las vibraciones atómicas en la transición alostérica.....	74
6.4 El caso de la Triptofano Sintetasa (TRPasa)	
6.4.1 Caracterización de la enzima.....	78
6.4.2 Evaluación y selección de estructuras de TRPasa.....	81
6.4.3 Análisis por factores de temperatura isotrópicos.....	83
6.4.4 Análisis por grupos pseudo-rígidos.....	87
6.4.5 Afinamiento TLS de la TRPasa.....	92

6.4.6 Interpretación de las vibraciones atómicas en la transición alostérica.....	94
7 Discusión General.....	98
A manera de conclusión.....	110
Perspectivas.....	113
Apéndice I. Dispositivo Integral para el análisis de PDBS (DIPA).....	114
Apéndice II. Tablas DIPA comparativas de caracteres.....	119
Referencias.....	125

~ FIGURAS ~

3 MARCO TEÓRICO

Fig.3.1 Modelos Alostéricos	3-I
Fig.3.2 Modelo alostérico de la T oscilante de la GlcN6P	3-II
Fig.3.3 Esquema de los eventos determinantes en la cristalografía de rayos X.....	3-III
Fig.3.4 Componentes direccionales de la vibración atómica.....	3-IV

6 RESULTADOS

PDB

Fig.6.1 Estadísticas del PDB	6-I
Fig.6.2 Lista de proteínas alostéricas	6-II
Fig.6.3 Selección de proteínas alostéricas.....	6-III
Gráf.6.1 Justificación para la rigidez del criterio de selección.....	6-IV

FBPasa

Fig 6.4. Esquema de la estructura tridimensional de FBPasa.....	6-V
Tabl.6.3. Tabla DIPA de estructuras PDB de Fructosa 1,6 Bisfosfatasa seleccionadas para el estudio.....	6-VI
Gráf.6.2. Comparación de distribución de factores B en cadena principal de todas las formas R y T.....	6-VII
Gráf.6.3. Comparación de la vibración atómica de cada conformero.....	6-VIII
Fig.6.5. Ubicación del eje de rotación Y en FBPasa.....	6-IX
Gráfs.6.4 a y b. Relación de vibración de C α -distancia a eje de rotación intramonomero.....	6-X
Gráfs.6.5a y b. Relación de vibración de C α -distancia a eje de rotación dimerica.....	6-XI
Fig.6.6 Grupos pseudo-rígidos en FBPasa forma T y los elipsoides de movilidad que generan.....	6-XII

TRPasa

Fig.6.7. Estructura tridimensional de la TRPasa.....	6-XIII
Tabl.6.4. Tabla DIPA de estructuras PDB de Triptofano Sintetasa Seleccionadas para el estudio.....	6-XIV
Gráf.6.6a y b. Distribución de factores B en las secuencia de residuos De las estructuras seleccionadas	6-XV
Fig.6.8. Ubicación del eje de rotación Z de TRPasa.....	6-XVI
Gráfs.6.7 a y b. Relación de vibración de Cα-distancia a eje de rotación en subunidad α.....	6-XVII
Gráfs.6.8a y b. Relación de vibración de Cα-distancia a eje de rotación en subunidad b.....	6-XVIII
Fig.6.9.a-d Grupos pseudo-rígidos en TRPasa y los elipsoides de movilidad que generan.....	6-XIX

DISCUSIÓN

Fig. 7.1 Incorporación de los modelos sugeridos aquí, al modelo de la T oscilante.....	7-I
Gráfs 7.1 Comportamiento vibratorio isotrópico de la Integrase 1 de HIV.....	7-II
Fig. 7.2 Despliegue anisotrópico de la integrasa-1 de HIV.....	7-III
Fig. 7.3. Propuesta de atributos conservados evolutivamente para derivar la función biológica de protetinas.....	7-IV

1 Introducción

Estamos en la era de la investigación biológica. El siglo XX se caracterizó por avances tales en las ciencias físicas que obligaron a la reinterpretación de los fenómenos naturales. La reestructuración del conocimiento físico, en consecuencia, promovió el desarrollo de nuevas concepciones en otras áreas como la química y la biología. Ahora, el siglo XXI perfila una era donde es la meta primordial la exploración de los sistemas biológicos, desde la perspectiva molecular hasta la ecológica.

La biología estructural constituye una de las vertientes más importantes de la actividad científica moderna. Como un enfoque reciente de exploración de los sistemas biológicos, intenta dar respuestas más contundentes, halladas en la forma espacial de las moléculas biológicas, a interrogantes como cuál es la naturaleza de las interacciones de moléculas durante procesos metabólicos o constitutivos, o cuáles son las vías de encuentro de unas con otras, cómo procede estructuralmente la catálisis enzimática y muchas otras.

En los últimos 20 años, la cristalografía ha abierto una puerta al universo de análisis de las moléculas esenciales para la vida: los ácidos nucleicos y las proteínas. Aunque en sus inicios el campo destinado a la cristalografía era principalmente la mineralogía, con el paso del tiempo, sus virtudes analíticas, así como los avances en sus técnicas de estudio, han fomentado su utilización en otros campos, como es la investigación de las biomoléculas. Desde mediados del siglo XX la determinación de estructuras protéicas -como la insulina (Blundell, 1969)- sentó las bases que permitieron combatir enfermedades -como la diabetes-; comprender fenómenos fisiológicos, como el transporte de oxígeno en la sangre, al resolver las estructuras de la hemoglobina (Perutz, 1959) y la mioglobina (Kendrew, 1960) y, desde que se conoció la estructura del DNA (Watson, Crick y Franklin, 1953), desarrollar la genética molecular; solo por mencionar algunos casos de los más famosos.

Al dilucidar la estructura de la hemoglobina e interpretar su mecanismo de transporte de oxígeno, fue posible no sólo explicar un fenómeno fisiológico muy

importante, sino también reconocer un tipo de regulación de la función proteica encontrada en muchas enzimas esenciales en el metabolismo de los organismos, así como en otras funciones celulares importantes como es la regulación alostérica (Monod, 1964).

Con la creciente disponibilidad de estructuras tridimensionales de proteínas, se ha desarrollado el interés por estudiarlas en mayor detalle, con dos finalidades principales: clasificar patrones estructurales y hacer relaciones estructuro-funcionales, aspectos insoslayables en la investigación bio-estructural.

El Protein Data Bank (PDB) es el resultado de esta impetuosa búsqueda. Desde 1971 ha sido el depositario de modelos biomacromoleculares, y de los datos experimentales de sus estructuras, generados tanto por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) como por Cristalografía de Rayos X.

Durante mucho tiempo la información estructural más valorada ha sido la posición de cada átomo, sin embargo, el comportamiento vibratorio del mismo, puede explicar, cuando es afinado cuidadosamente, las propiedades funcionales desde una perspectiva que aún no ha sido abordada lo suficiente. Esta circunstancia se ha debido a la falta de datos para validar los componentes vibratorios. Actualmente, el advenimiento de estructuras a muy alta resolución (más de 1,5 Å) ha permitirlo atender esta fuente de información para explicar las propiedades vibratorias de las macromoléculas. Sin embargo, los datos experimentales de muchas estructuras del PDB no son suficientes para dimensionar esta información de manera tradicional, haciendo expedito su análisis.

Numerosos trabajos han señalado la posible importancia de la flexibilidad conformacional en el despliegue funcional de toda proteína; sin embargo, aún no ha sido estudiado sistemáticamente. Recientemente, nuestro grupo ha abordado este tema buscando explicaciones sobre el papel de la flexibilidad estructural en el caso de la Glucosamina-6-fosfato-desaminasa (Rudiño, *et al.*, 2002), a partir de la información vibratoria de los datos de difracción. Para ello, se han utilizado modelos isotrópicos con conformaciones alternas y anisotrópicos

Desde esta perspectiva, en este trabajo desarrollamos un método de selección y evaluación de estructuras de proteínas alostéricas -o sistemas michaelianos con distintos estados conformacionales-, depositadas en el PDB. Con la finalidad de explicar el posible papel de la flexibilidad molecular en dichos complejos macromoleculares, se aplicaron análisis vibratorios tradicionales y nuevos (integrando vectores direccionales a grupos pseudo-rígidos (TLS)), generando información estructural que esclarece el comportamiento biológico en algunos ejemplos.

A partir de los hallazgos del trabajo mencionado de Rudiño, en la presente tesis, se busca evidenciar el papel de estos fenómenos de flexibilidad en la función biológica de proteínas a partir de su comportamiento vibratorio.

El estudio aquí realizado consta de tres partes primordiales: la primera orientada a la selección y evaluación de estructuras resueltas, depositadas en el Protein Data Bank (PDB); la segunda, encaminada al tratamiento directo de la información vibratoria como un elemento indispensable en los afinamientos estructurales para obtener mejores ajustes que expliquen las propiedades dinámicas direccionales de las proteínas. La tercera sección se concentra en el análisis de esta información vibracional, su repercusión en la flexibilidad molecular y las posibles implicaciones de la misma sobre la función biológica desplegada por cada proteína aquí tratada.

El trabajo está estructurado de tal manera que en un principio se pueda obtener una visión histórica de los avances que han permitido el desarrollo de la cristalografía de proteínas y los efectos de éste desarrollo en la construcción del Protein Data Bank; y también se menciona el papel que México juega en la construcción de esta ciencia, debido a la importancia que tiene el ubicar el desarrollo científico en el contexto humanista que lo plantea y construye.

A continuación la tesis se organiza primero refiriendo los antecedentes teóricos sobre los que descansa el desarrollo de esta tesis, donde se hace una referencia somera de los procesos en la determinación de estructuras protéicas, sobre alosterismo y fenómenos dinámicos en proteínas. La sección de resultados se organizó con base en

los objetivos que se persiguen y la secuencia metodológica empleada. En ella se habla en inicio de la búsqueda en el PDB y posteriormente se hace una división de las dos proteínas estudiadas: fructosa-1,6-bisfosfatasa y triptofano sintetasa. Se discute primero cada proteína en particular, y se retoman al final en una discusión general como conclusión.

2 Marco Histórico

*¿Dónde, pues, encontrar la fuente de verdad
y la inspiración moral de un humanismo
social realmente científico, sino en las
fuentes de la misma ciencia,
en la ética que funda el conocimiento?*

Jacques Monod
El azar y la necesidad

2.1 Historia mínima de la cristalografía de proteínas¹

¡"Una abuela gana el Premio Nobel"! anunciaban los periódicos en 1964. Fue Dorothy Hodgkin quien lo obtuvo, por "determinar, mediante difracción de rayos X, la estructura de moléculas de importancia biológica". Utilizando la técnica de W.L. Bragg, Dorothy se aventuró hábilmente desde los años cuarentas del siglo pasado, a determinar las estructuras de compuestos complejos nunca antes explorados como el colesterol, la vitamina D, la penicilina (1944) y la vitamina B₁₂ (1956). Al hacerlo extendió las fronteras de la química, encontrando en dichas estructuras, características químicas no conocidas hasta entonces.

En 1950 se supo sobre la estructura de las láminas beta y las alfa hélices en las proteínas, gracias a Linus Pauling; y tres años después, Watson y Crick revelaron la estructura del DNA.

Hodgkin difractó por primera vez la insulina en 1935, y creyó sería la primera en determinar la estructura de una proteína. Tardó treinta y cinco años en resolverla en colaboración con Blundell. Sin embargo hacia 1960 otros investigadores habían ganado terreno: 10 años antes, Kendrew al determinar la estructura de la mioglobina, Max Perutz, al resolver la estructura de la hemoglobina y, Blake y Phillips, la de la lisozima. Lo que no hubiera podido ser si ella, junto con Bernal, no hubieran hecho con antelación observaciones importantes sobre el proceso de cristalización de proteínas.

Gracias a sus estudios, Dorothy ayudó a establecer una de las características de la biología moderna: el uso de la estructura molecular para explicar la función

¹ Se puede leer una excelente y amena semblanza histórica de la cristalografía en Perutz, 2002 (79).

biológica. En esta revolución, Perutz, Kendrew y Bernal, con quienes trabajara Hodgkin en su estancia en Cambridge, tuvieron que ver decisivamente. Sin embargo sus manos hábiles y sus mentes brillantes no hubieran contribuido tanto a la biología estructural, si no se hubiera dado antes otra revolución.

En efecto durante 1895, Wilhelm Conrad Roentgen descubrió los rayos X o rayos Roentgen, haciendo entonces posible que, en 1912, Max von Laue revelara con ellos el orden existente en la estructura atómica de los cristales. Esto, a su vez, permitió que William Henry Bragg y su hijo William Lorentz Bragg iniciaran, en 1913, el establecimiento de la ciencia conocida como Roentgen cristalografía o Cristalografía de rayos X. Padre e Hijo facilitaron la comprensión de los patrones de difracción de estructuras tridimensionales al reducir la reflexión a una serie de planos. Ewald y Miller contribuyeron también a la interpretación de estos patrones.

Max Perutz conoció a Bragg en Cambridge en 1938 cuando este último empezaba a dirigir el laboratorio Cavendish. Un año antes Perutz había elegido a la hemoglobina como la proteína cuya estructura quería determinar. Tardó más de 20 años en hacerlo.

Rossmann había ideado un método de evaluación de simetrías no cristalográficas para aplicarlas en la determinación de las estructuras protéicas, basado en el conocimiento previo de estructuras homólogas a aquella a determinar. Hodgkin fue la primera en aplicar el método que hasta 1972 se llamó reemplazo molecular, durante la determinación de la insulina pero aún con muchos problemas. Fue Max Perutz quién logró aplicar exitosamente el reemplazo molecular durante la determinación de la hemoglobina, gracias a que con anterioridad había construido un modelo de plastilina de ella!

Gran cantidad de desarrollos teóricos sobre el estado cristalino, avances computacionales, adelantos en los procesos de análisis estructurales, progresos en la colecta de datos, la construcción de nuevos generadores y detectores de rayos X, así como numerosas fuentes de radiación sincrotrónica, fomentaron la expansión de la cristalografía de proteínas alrededor del mundo durante el siglo pasado.

La primera vez que se observó radiación de este tipo fue en 1946 en un sincrotrón de 70 Mev de los laboratorios Schenectady de la General Electric. Parrat en 1959 propuso que se utilizara en cristalografía. Sin embargo fue hasta los años setentas que se empezaron a ver resultados en su aplicación a sistemas biológicos. Primero en el sincrotrón DESY, en Alemania, con la difracción del músculo; y luego, en Stanford, Estados Unidos, con las primeras aplicaciones de experimentos cristalográficos en proteínas.

La cristalografía de proteínas llegó a México treinta y seis años después de las primeras investigaciones de los Bragg, con los trabajos pioneros de Carlos Graef, Octavio Cano y Francisco Fabregat. Ya en nuestro país, Manuel Soriano, le dió un gran impulso a esta ciencia. Cuentan sus alumnos que hubo una época en que constantemente invitaba a cristalógrafos importantes e innovadores en el área para darles cursos. Sin embargo fueron Adela Rodríguez y Eduardo Horjales quienes empezaron a crear escuela cristalográfica en México.

Hay mucha gente que, en colaboración con otros investigadores mexicanos y del mundo, en la actualidad hace que la cristalografía en México se desarrolle de manera importante. El doctor Alfonso Mondragón se ha dedicado a explicar la topoisomerasa de DNA I de *E.coli*, enzima importante para la topología del DNA. El doctor Adolfo E. Cordero determinó la estructura cristalina de la β -lactamasa II de *Bacillus cereus*, de gran importancia farmacéutica. El doctor Rogerio Sotelo ha contribuido a la investigación en cáncer al determinar la estructura tridimensional de la enzima timidilato sintetasa. La doctora Adela Rodríguez ha trabajado en resolver estructuras cuya importancia médica es inminente, como la del fragmento FAB del anticuerpo anti-Eselectina/A9, importante en procesos inflamatorios y la Triosafosfato isomerasa dimérica de *Trypanosoma cruzi*, agente de la enfermedad de "Chagas" en México y Sudamérica. El doctor Eduardo Horjales ha contribuido a describir la activación alostérica y la catálisis de la glucosamina-6-fosfato desaminasa, a nivel atómico. Además ha participado en el diseño de un conjunto de variantes de anticuerpos anti-toxina de alacrán, animal que tantas muertes causa en México. Estos

son sólo algunos de los tantos trabajos que estos investigadores han realizado y que siguen desarrollando en pos del crecimiento de la ciencia en nuestro país.

2.2 El Protein Data Bank (PDB)

Con la afluencia de estructuras determinadas fue necesario pensar en un archivo para toda la información obtenida. En la reunión de cristalógrafos macromoleculares en Cold Spring Harbor en 1971, se discutió el tema. Berman, Hamilton y Sussman se encargaron de los aspectos logísticos de su organización. Había únicamente 7 estructuras resueltas. Con ellas, el Brookhaven National Laboratory (BNL)² estableció un archivo de estructuras cristalinas de macromoléculas biológicas disponible en cinta magnética: El Protein Data Bank (PDB)³. Con este banco se inició una de las primeras colecciones de la comunidad de biología molecular.

A partir de 1980 se incrementó sustancialmente el número de estructuras depositadas, debido principalmente a los avances en la tecnología para el proceso de cristalización y, posteriormente, a la adición de estructuras determinadas por Resonancia Magnética Nuclear (NMR), crio-microscopía electrónica y modelaje teórico. Actualmente, el PDB está disponible vía la "World Wide Web".

En busca del desarrollo de una fuente informativa de alta tecnología que facilitara la utilización y el análisis de los datos estructurales para la investigación biológica, en 1998, el "Research Collaboratory for Structural Bioinformatics" (RCSB), se responsabilizó de la administración del PDB. Para que su objetivo se cumpliera, fue necesaria la implementación de un sistema de adquisición y procesamiento de la información, priorizando la atención a la información que les es enviada, por medio de revisiones continuas y exhaustivas para su validación, tanto de autores como del grupo revisor del PDB.

²Berman, *et al.*, 2000 (10)

³Berman, *et al.*, 2002 (9)

El PDB ha sido base para todos los desarrollos en la biología estructural, al ser depositario no únicamente de estructuras protéicas, sino de todas las estructuras biológicas macromoleculares, por ejemplo algunos DNA⁴, carbohidratos, RNA, y sobre todo proteínas y complejos de éstas. Es sin embargo una base de datos que, como veremos durante el desarrollo de este trabajo, aún presenta muchas deficiencias que deben ser superadas en este momento en que la biología estructural, por su inmersión cada vez más profunda en diversas áreas de investigación, se encuentra en un estado apoteótico.

Actualmente el PDB es dirigido por Helen Berman, una de sus fundadoras, y opera con la colaboración del Supercomputer Center de la Universidad de California en San Diego, la Universidad de Rutgers en New Jersey y el National Institute of Standard and Technology en Maryland.

Se conocen cada vez más genomas completos, pero la naturaleza estructural de los productos de la expresión de muchos de sus genes aún es desconocida. En este sentido, muchos de los esfuerzos actuales en cristalografía de proteínas están encaminados a sortear esta brecha, y es en la Genómica Estructural donde están tomando forma.

Los investigadores del mundo hacen esfuerzos importantes en la validación y clasificación de estructuras, así como en proveer secuencias no redundantes y conjuntos de estructuras reducidos, mejorar su visualización, etc. Esta información adquiere un gran valor y alcance para la biología estructural ya que representa una fuente accesible que permite un mejor entendimiento sobre cómo funcionan los sistemas vivientes y la forma de tratar muchas enfermedades, junto con la información que dan otros tipos de fuentes secundarias.

⁴ Existe un banco de estructuras específico para ácidos nucleicos, el NDB (Nucleotide Data Bank)

El Protein Data Bank, es donde se concretan estos esfuerzos, y tiene un papel preponderante como fuente de información estructural, en la divulgación de los hallazgos estructurales de proteínas que alimentan la ciencia bioestructural. Desafortunadamente este banco no es aún una base de datos lo bastante completa y depurada. Hace falta que se reúnan aún más esfuerzos de los responsables del Banco y de los estructurólogos que lo nutren para que la información que en él se maneja pueda ser utilizada óptimamente. Habrá lugar para la descripción del PDB y la discusión sobre sus virtudes y deficiencias a lo largo del trabajo.

3 Marco Teórico

*No sabemos nada, sólo
podemos suponer: conjeturamos.
Nuestro mejor saber
es el grandioso saber de la ciencia natural...
que se basa precisamente sólo en suposiciones...*

Karl R. Popper
La responsabilidad de vivir

3.1 Consideraciones sobre alosterismo

3.1.1 Las proteínas alostéricas

Dentro del grupo de las proteínas, macromoléculas esenciales para la vida, existen algunas con atributos catalíticos y regulatorios, indispensables para las reacciones metabólicas: las enzimas. Este tipo de proteínas es variado, dependiendo de la regulación que presentan y la o las reacciones en las que participan.

Con base en la regulación y coordinación de los procesos enzimáticos en las células, se ha visto la existencia de enzimas cuyo comportamiento cinético no es el clásico ya que se ve afectado por la unión de moduladores a lugares específicos de la enzima, distintos del sitio activo.

La primera evidencia de que un estímulo externo -regulatorio de la actividad protéica- puede desencadenar cambios conformacionales en una proteína, se obtuvo en 1938 cuando Haurowitz, estudiando los procesos de control por retroalimentación, observó que la desoxihemoglobina y la oxihemoglobina cristalizaban de manera diferente. Esto lo llevó a suponer que se daba un cambio en su estructura⁵. Tiempo después, en 1962, Perutz y su grupo obtuvieron las primeras evidencias estructurales -por las cuales Perutz ganó el Premio Nobel- de los cambios conformacionales que se sucedían en la hemoglobina por la acción del oxígeno.

Este tipo de proteínas fueron nombradas alostéricas -*allos (Otra) stereo (estructura*

⁵Perutz, 1985. (80)

o sólido)-⁶ que, como su nombre lo dice, cambian de forma para desplegar su función con un patrón regulatorio específico. Sus moduladores -llamados efectores alostéricos- actúan como inhibidores o activadores, de manera reversible, al unirse a los llamados sitios alostéricos⁷.

Las enzimas alostéricas son elementos claves en la regulación celular ya que permiten una adaptación fina de los organismos a cambios de concentración en metabolitos y a distintas condiciones fisicoquímicas. En las regulaciones de retroalimentación en que participan este tipo de enzimas, el sustrato y el inhibidor o activador son de distinta forma (alo-estérico) ocasionando dos tipos de efectos: uno homotrópico, si las moléculas son iguales, y otro heterotrópico, si éstas son distintas⁸. Tal descubrimiento llevó a Monod, Changeux y Wyman en 1964 a desarrollar un modelo de regulación enzimática resaltando la cooperatividad en las moléculas y retroalimentación en que participan, y a formular los conceptos de efectores y sitios alostéricos⁹.

La formulación de este modelo se basó también en los hallazgos de otras personas que trabajaban con la hemoglobina en ese tiempo. Bohr descubrió la forma sigmoidal de la curva de equilibrio en la regulación de la enzima (característica de los sistemas alostéricos). Archibald Hill, matemáticamente, explicó este comportamiento como el resultado de la unión del oxígeno a cada subunidad y de las interacciones entre ellas¹⁰. El coeficiente de Hill es resultado de los trabajos pioneros sobre cooperatividad de este científico. Estos antecedentes fueron también indispensables para el desarrollo posterior de otro modelo alostérico implementado por Koshland, Nemety y Filmer. A continuación se considerarán brevemente algunos planteamientos importantes de estos modelos.

⁶Monod, *et al.*, 1964 (63)

⁷Morris, 1982. (64)

⁸*Ídem*

⁹Monod, *et al.*, 1964 (63)

¹⁰Rudiño, 2002. (88)

3.1.2 Modelo alostérico de Monod, Wyman y Changeaux (MWC).

El modelo de regulación alostérica MWC (Monod, Wyman, Changeaux, 1964), también llamado modelo simétrico o concertado¹¹, plantea que una proteína alostérica debe ser en primera instancia oligomérica¹², para desplegar tal comportamiento, con una organización equivalente de los protómeros¹³ dentro de los oligómeros. Por lo tanto debe presentar por lo menos un eje de simetría.

En este arreglo, cada una de las subunidades¹⁴ puede exhibir dos conformaciones distintas llamadas T (poco afín al sustrato y tensa) y R (más afín al sustrato y relajada)¹⁵ que están en equilibrio en ausencia de ligantes. Cuando hay una ruptura de este equilibrio, ocasionada por la unión del ligante a R, el equilibrio se desplaza de T a R, ocasionando un cambio conformacional de todas las subunidades en conjunto, para así conservar la simetría de la molécula oligomérica. La existencia de estados intermedios no se plantea debido a que las interacciones de este modo son poco favorables.

El modelo MWC hace sus predicciones con base en dos parámetros físicos: la constante de equilibrio alostérico entre ambos estados T y R sin ligantes ($L = T_0/R_0$) y el coeficiente de unión, proporción de las constantes de disociación de ambos estados ($c = K_T/K_R$). Así se propuso, según la naturaleza de las interacciones con ligantes que se pueden dar en este tipo de proteínas y los efectos que éstos pueden acarrear al desarrollo de la reacción enzimática, tres tipos de comportamientos descritos como sistemas (V, K y K-V)¹⁶.

Las interacciones alostéricas son la consecuencia de una alteración reversible,

¹¹Monod, *et al.*, 1964 (63)

¹²Monod-Wyman-Changeaux propusieron la terminología empleada para el alosterismo. Definen entonces oligomérica a cualquier proteína polimérica con un número relativamente pequeño y finito de subunidades idénticas.

¹³Protómero, según MWC es el nombre de cada subunidad dentro del oligómero. Al protómero disociado o a una subunidad de una proteína con subunidades no idénticas, se llama monómero.

¹⁴Subunidad es cualquier entidad sub-molecular identificable de la proteína, sean idénticas o diferentes de otros de sus componentes.

¹⁵Esta nomenclatura es una consecuencia de los fenómenos explicados por el modelo donde se consideraba a la forma T como tensa, sin movimiento y sin actividad; y a la R activa, móvil y por lo tanto responsable de la transformación.

¹⁶Los sistemas se explican claramente en *Fisicoquímica para biólogos* de Morris.

inducida por el efector, en la estructura cuaternaria del oligómero que implica cambios en los enlaces intermonómeros. En este sentido el mecanismo de cambio conformacional se debe al diferencial de energía de unión entre los dos estados. En un sistema alostérico, si hay un efector con afinidades distintas para ambos estados, las interacciones que sostiene serán homotrópicas y cooperativas, es decir se produce un efecto producido por sustratos de la misma forma (homotrópicos) y de distinta afinidad. Si se dan efectos heterotrópicos (por la unión de sustratos de forma distinta) - en caso de que el efector tenga la misma afinidad por ambos estados- pueden ser antagónicos o cooperativos, pero siempre acompañados de un efecto homotrópico cooperativo para alguno de los ligantes del sistema.

Un arreglo oligomérico impone ciertas restricciones en simetría y cooperatividad; los dos estados T y R, a pesar de diferir en conformaciones y afinidad al sustrato, dentro de cada estado, las subunidades guardan una relación simétrica entre sí. Crick resaltó que la oligomerización *per se* es un fenómeno crucial en conferir a la proteína un elemento de simetría. El modelo MWC considera imprescindible, en un sistema alostérico una geometría molecular que facilite la influencia de una subunidad sobre el resto. Se permite así que se den fenómenos cooperativos entre las subunidades: los oligómeros se transforman de manera similar entre dos estados simétricos con respecto a los ejes que mantienen la simetría general de la proteína. (Figura 3.1-A) Fenómenos de este tipo pueden ser descritos por un modelo matemático simple como lo es éste.

Sin embargo, por las restricciones simétricas impuestas, el modelo no puede explicar la cooperatividad negativa. Esta deficiencia condujo a Koshland, Nemyt y Filmer a construir otro modelo alostérico en 1966.

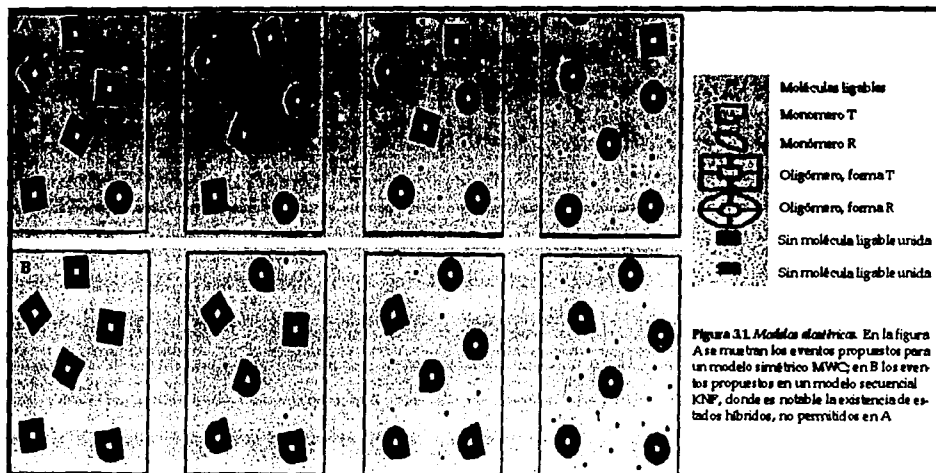
3.1.3 Modelo alostérico de Koshland-Nemyt-Filmer (KNF)

El modelo secuencial simple o de "induced fit" (Koshland *et al.*, 1966) es una variante general del MWC, que permite la existencia de oligómeros mixtos (T-R), ya que las subunidades pueden unir diferentes moléculas y desplegar conformaciones distintas de las vecinas. Se forman entonces una serie de intermediarios asimétricos, entre los

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

extremos simétricos cooperativos monodianos, donde las interacciones distintas entre subunidades, con diferentes conformaciones, modifican la forma de unión de ligantes adicionales (Figura 3.1-B). Se crean así un gran número de parámetros a considerar dentro del modelo, que ocasionan que las predicciones del comportamiento enzimático sean más complicadas que en el modelo MWC.



La posibilidad de la existencia, en este modelo, de estados intermedios no presentes en el MWC, se debe a que se incluye un elemento que modifica la energía de interacción que, eventualmente, al aumentar al infinito, permitirá una transición concertada MWC, mientras que si es cero, no habrá cooperatividad. Pero dentro de este intervalo se podrán observar casos de cooperatividad negativa.

3.1.4 Teoría Allostérica de acuerdo a MWC

El modelo Allostérico MWC se divide en dos procesos claramente diferenciables que pueden ser combinados de varias maneras para generar nuevos modelos teóricos¹⁷. El primer proceso se lleva a cabo con el enlace del efector a un sitio de unión estereoespecífico en la proteína, en un proceso bi-molecular descrito como un equilibrio entre

¹⁷ Rudíño, 2002 (88)

el estado afín al sustrato R sin ligante en el sitio de unión, y el R con el sitio de unión ocupado. Durante la unión se da un cambio de energía libre que desencadena el segundo proceso: la transformación estructural de la proteína.

Este fenómeno es llamado transición alostérica y se lleva a cabo entre los dos conformeros de afinidad al sustrato T y R, durante el cual también existe una constante de equilibrio entre los dos estados y un cambio en la energía libre. Aunque no se conocen bien todos los procesos físicos asociados a esta transición, se ha considerado que el cambio en la energía libre y la transformación en sí pueden deberse a cambios rotacionales en algunos de los enlaces de la cadena principal o de las laterales de la secuencia polipeptídica. Por otro lado, también se piensa está involucrado el rompimiento de algunos enlaces no-covalentes durante la transformación¹⁷.

Como los ligantes se mantienen en su posición por las mismas interacciones físicas responsables de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, se puede decir que ambos procesos -unión y transformación- tienen cambios en la energía libre del mismo orden, que permiten que un evento influya al otro. Las propiedades termodinámicas de estos cambios de conformación molecular determinan su actividad biológica.

3.1.5 Modelo alostérico de la T oscilante: el carácter concertado y oscilatorio de la transición alostérica en la Glucosamina-6-fosfato Desaminasa de E.coli

El modelo simétrico explica perfectamente la cinética de la glucosamina-6-fosfato Desaminasa de *E.coli*. En él se presentan dos estados conformacionales T y R, en cuya transición se dan modificaciones estructurales que han sido estudiadas ampliamente¹⁸. Es un ejemplo de proteína alostérica que cuenta además con estudios cinéticos que esclarecen su carácter concertado.

Con base en el modelo MWC, Rudiño propuso un modelo teórico¹⁹ que, a partir

¹⁷Hammes, 2002 (27)

¹⁸Horjales, *et al.*, 1999 (35)

¹⁹Rudiño, 2002 (88)

de análisis vibratorios -por modelos isotrópicos con conformaciones alternas y anisotrópicos²¹- que evidencian la flexibilidad de la proteína²², explica los procesos homotrópicos y heterotrópicos durante la transformación alostérica de esta enzima. Rudiño destacó, con este modelo, los componentes estructurales que determinan la oligomerización, el alosterismo y el carácter concertado del mismo, así como sus consecuencias en la función biológica.

Este modelo predice la existencia de un estado T oscilante, en el sentido de la transformación alostérica, donde una parte de las conformaciones de la oscilación alcanzan un estado R sin ligantes, capaz de unir al activador o al sustrato, produciendo así un estado R con ligantes.

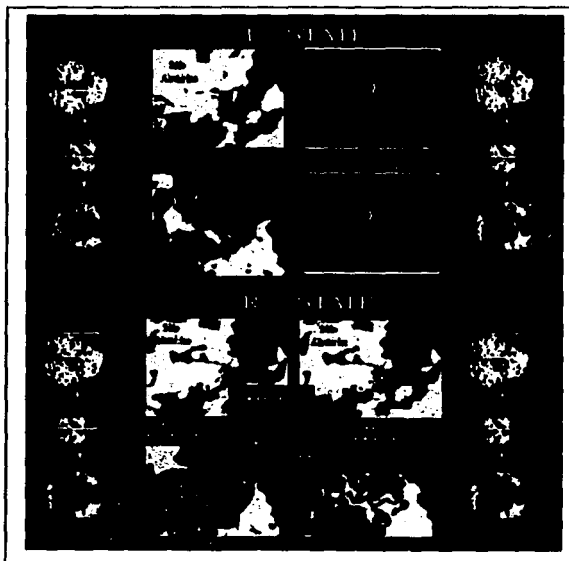


Figura 3.2. Modelo alostérico de la T oscilante de la GlcN6P. Muestra la secuencia de transformación de la enzima incluyendo el conformero R teórico como (?). Se muestra la representación oligomérica de la enzima en la orientación del eje de transformación (de orden 3) y a un lado de cada recuadro que hace un acercamiento a sitios activo (interfase intermonomérica del trímero) (A-D superior) y alostérico de la enzima (interfase intermonomérica del hexá-mero) (A-D inferior).

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P) de *E.coli* es una proteína homohexamérica cuyo arreglo es esencial para la cooperatividad del sistema. Está formada por un hexámero con un eje de simetría de orden 3 y tres ejes de orden 2

²¹ Estos conceptos se definen brevemente en el Glosario. Este y otros conceptos relacionados con la vibración atómica se explican en la sección 3.2.3-3.2.7

²² Sobre flexibilidad molecular se hace un acercamiento en la sección 2.5. En la metodología se habla particularmente de la realización de un análisis de este tipo.

perpendiculares a éste. Horjales y sus colaboradores dividieron a cada subunidad en 2 zonas generales²⁰: la zona interna, responsable de la mayoría de los contactos intermonoméricos, y la zona externa -a la cual pertenece la tapa del sitio activo- y que rota perpendicularmente al eje de simetría de orden 3 del hexámero durante la transformación alostérica²¹.

Observaron que cuando la proteína está en R, el desplazamiento del equilibrio de T a R puede ser causado homotrópicamente por la unión de algún sustrato, o heterotrópicamente por la adición del activador. Durante la transición homotrópica el sustrato se une al sitio activo del estado R. Este se cierra, se reduce la vibración de la tapa del sitio activo y se favorece la cooperatividad. Mientras que si R no tiene ligante, la tapa del sitio activo se abre, aumentando su vibración (Figura 3.2). También observaron que este comportamiento de la tapa con mayor desplazamiento en la forma T hacia R, estaba directamente relacionado con un aumento en la movilidad atómica.

Cuando hay una transición heterotrópica, el conformero R puede presentar tres conformaciones de la tapa que abren o cierran el sitio activo. El estado T libre de ligantes es el más vibrante de todos los estados, y podría semejar un estado R teórico sin ligantes con la tapa muy móvil. Cuando la forma R está ocupada en el sitio alostérico, la vibración disminuye ligeramente, y la tapa es parcialmente estabilizada. Al ocuparse ambos sitios en este estado, disminuye dramáticamente la vibración atómica de toda la proteína y la tapa se ve completamente estabilizada (Figura 3.2).

Al realizar los análisis vibratorios direccionales (anisotrópicos) en el estado T, se observaron valores compatibles con un movimiento colectivo de rotación de la tapa del sitio activo, de la zona externa y del carboxilo terminal con respecto al eje de transformación a R. Debido a que el sitio alostérico se ubica en la interfase intermonomérica, las interacciones de residuos específicos en la zona permiten una coordinación y concertación del movimiento en toda la molécula que es descrita anisotrópicamente en la dirección de la transformación alostérica (Figura 3.2).

²⁰ Horjales, *et al.*, 1999 (35)

Rudiño y sus colaboradores entonces propusieron que la tapa, además de ser determinante en la flexibilidad molecular, afecta la K_m de unión del sustrato al cambiar la entropía del sistema. En este sentido resaltaron el papel de la vibración atómica en la función biológica de la proteína.

Los trabajos de Rudiño, *et al.* son el antecedente directo de los estudios de flexibilidad conformacional que se realizan en esta tesis. En aras de brindar mayores elementos para la comprensión del estudio aquí realizado, es necesario revisar algunos conceptos cristalográficos de importancia.

3.2 Consideraciones sobre cristalografía

La cristalografía es la ciencia de los cristales y se consagra a las leyes de las estructuras atómicas que son la base del estado sólido. Estudia en particular los fenómenos originarios de los arreglos espaciales de átomos, de moléculas y de iones. Como las propiedades físicas y químicas de los cristales están estrechamente ligadas a sus estructuras atómicas, los métodos de cristalización tocan diversos dominios de las ciencias naturales donde son formalmente aplicados. La cristalografía revela así un aspecto particularmente interdisciplinario, en la esquina entre la investigación básica y la aplicada, en la investigación biológica y farmacéutica, en química y en física.

3.2.1. Sobre cristales y simetrías

Un cristal -del griego *krystallos* (agua sólida)- es un ordenamiento de moléculas con simetría tridimensional interna, caracterizado por un conjunto de parámetros que definen exactamente la posición y la periodicidad de las unidades fundamentales que lo componen²². Bravais, en 1845 observó que los componentes básicos constitutivos de un cristal podían ser sólo de 14 tipos diferentes, agrupados en 7 sistemas cristalinos de simetría (celdas unitarias)²³. Con ello, estableció los aspectos geométricos de la

²¹Una celda cristalina está definida por seis parámetros: tres longitudes (a,b,c) y tres ángulos (α,β,γ).

²²Sands, 1975. (91)

²³Una celda unitaria es el volumen más pequeño de un cristal a partir del cual se puede generar éste al

cristalografía ²⁴.

La simetría es un concepto esencial sobre el cual la cristalografía se funda, desarrolla y expande. La simetría fundamental que ostenta un cristal se refiere a los operadores simétricos para trasladar su celda unitaria en pos de generar el cristal. Dichos operadores simétricos determinan el grupo espacial²⁵ al que pertenece la celda. Cada celda unitaria se forma por la aplicación de operadores simétricos a la unidad asimétrica²⁶ (la molécula en sí, o parte de ella)²⁷. Cabe aclarar que la unidad asimétrica, si tiene simetría propia, puede consistir en muchas unidades biológicas o sólo la mitad de la unidad funcional de la proteína²⁸. Es importante tener en mente esto ya que la simetría de las macromoléculas funcionales en solución es una propiedad indispensable de considerar para entender su función.

Los procesos propios de la cristalografía de rayos X, en cuanto a su utilización para la determinación de estructuras macromoleculares, son demasiado intrincados. Abordarlos en detalle rebasaría los límites de esta tesis. Sin embargo es importante considerar algunos de los aspectos relacionados con esta determinación estructural ya que serán referidos constantemente a lo largo del trabajo.

3.2.2 Información primaria sobre cristalografía de proteínas

Cuando se intenta determinar una estructura cristalográfica por difracción de rayos X, el detalle de las observaciones depende de la resolución²⁹. Esta última responde al tipo

aplicar traslaciones

²⁴Abad, 2002 (1)

²⁵ El grupo espacial es un conjunto de arreglos de operaciones de simetría coherentes con un patrón regular que se extiende al infinito.

²⁶ La unidad asimétrica es el conjunto de moléculas más pequeño que al aplicarle operadores simétricos genera la celda unitaria. La consideración de la celda unitaria nos permite facilitar los cálculos cristalográficos para obtener la estructura de la o las moléculas incluidas en la unidad asimétrica, la cual puede ser la molécula funcional completa o sólo un fragmento de ella, o varias moléculas funcionales. Por lo tanto en el PDB se reporta tanto la unidad asimétrica como los operadores para generar a partir de ella la molécula completa en su caso, y la celda unitaria en cualquier caso.

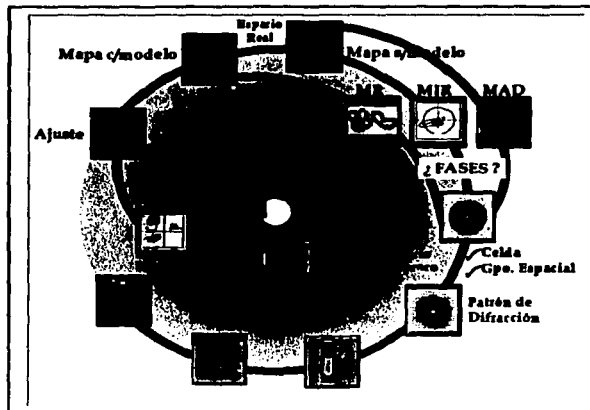
²⁷ Existen 230 grupos espaciales tridimensionales de los cuales las moléculas biológicas únicamente cristalizan en aquellos que no poseen simetría de inversión (sólo 65); los operadores simétricos a aplicar a la unidad asimétrica con objeto de generar la celda unitaria dependen de la naturaleza del grupo espacial al que pertenezca dicha unidad asimétrica.

²⁸Rhodes, 2000 (84)

²⁹ En un modelo generado a partir de los datos de difracción de rayos X, la resolución es la distancia más

de la fuente de radiación y a la calidad del cristal de la proteína cuya estructura se ha de determinar.

Figura 3.3. Esquema de los eventos determinantes en la cristalografía de rayos X. Como fondo está un patrón de difracción clásico. El afinamiento corresponde a la marca de Ajuste. De la evaluación estadística de éste depende la realidad del modelo depositado en el PDB. (Se agradece a Rudiño por el facilitar esta imagen)



La resolución en cristalografía se refiere a la cantidad de datos observables de los cuales se pueden conocer sus fases³³ y por lo tanto ser utilizados para la determinación estructural. Los datos que se obtienen durante la difracción de rayos X son reflexiones que emergen de los planos de átomos en el cristal al reflejar este tipo de radiación.

Por muchos años se consideró alta resolución a aquella cercana a 2 Å. Actualmente, con los avances logrados para la construcción y manipulación de cristales y el uso de sincrotrones, es posible obtener datos a resoluciones más altas -hasta una resolución atómica o casi atómica (1.2 Å). Mientras mayor es la resolución se pueden obtener datos más completos y por lo tanto mayor detalle sobre las propiedades atómicas de la estructura, facilitando interpretaciones sobre la relación que esta última

³³ Ya que durante la difracción cada punto en el patrón de difracción, es la contribución de todos los átomos, el reconocimiento de la fase que distingue una onda difractada de otra, es indispensable para ubicar espacialmente cada átomo. Debido a que éstas fases no se pueden conocer de manera directa se emplean métodos distintos para inferir dichas fases.

mantiene con la función de la proteína³¹.

Los límites de la resolución son revelados por el patrón de difracción³². Con base en él se conoce la simetría de la celda unitaria y se calculan los factores de estructura³³. A partir de estos últimos -indispensables para la determinación estructural- se genera un mapa de densidad³⁴ (Figura 3.3) que permite conocer la posición de los átomos, según la distribución electrónica de la fuente de difracción, es decir, la nube de electrones de cada átomo.

3.2.3. Afinamiento cristalográfico.

El propósito de la cristalografía de proteínas es crear un modelo estructural lo más cercano posible a la realidad. Por medio de varias vías, como son el Reemplazo Molecular (MR)³⁵, el Reemplazo Isomórfico Múltiple (MIR)³⁶ o la Difracción Anómala Múltiple (MAD)³⁷, y a partir del mapa de densidad que generan los datos experimentales, se pueden construir modelos tridimensionales que se ajusten a dicho mapa de densidad electrónica (Figura 3.3). Sin embargo el resultado es un "bosquejo" que necesita ser mejorado. Esto se logra al realizar un afinamiento cristalográfico.

El objetivo primordial del afinamiento es generar nuevos y mejores mapas de densidad que permitan examinar y corregir el modelo, de forma manual o automática. Para lograrlo se provocan iteraciones computacionales sucesivas de minimización, que

³¹Rudiño, 2002 (88)

³²El patrón de difracción es la imagen en el espacio recíproco de todos los átomos que conforman el cristal difractado. Cada punto del patrón representa la reflexión de todos los átomos que por su arreglo espacial en el cristal, producen ondas de difracción que se interfieren positivamente.

³³Los factores de estructura son los datos experimentales de la determinación estructural que se obtienen del patrón de difracción, son las intensidades medidas. A partir de ellos se generan los mapas de densidad electrónica ya que contienen las amplitudes y las fases de los átomos difractados en las diferentes direcciones.

³⁴Un mapa de densidad electrónica representa topográficamente las zonas espaciales con mayor densidad de electrones. Es el producto espacial de la difracción de las nubes de electrones de los átomos que conforman la proteína y por lo tanto es la guía para encontrar la estructura a la que pertenece.

³⁵El reemplazo molecular es un método que permite conocer las fases al comparar una estructura homóloga conocida con los datos de difracción de la estructura desconocida

³⁶El reemplazo isomórfico múltiple es el método que permite determinar las fases *ab initio* a partir de comparaciones entre los datos colectados de cristales en los que se han difundido metales pesados de referencia, con un cristal nativo.

³⁷La difracción anómala múltiple consiste en determinar las fases difractando con rayos de distintas longitudes de onda que permitan obtener una difracción anómala de un átomo de referencia cuya

calculan un nuevo mapa de densidad y construyen un modelo más afín a éste (formas del espacio real), con base en la posición (coordenadas x,y,z) y los parámetros dinámicos (factores de temperatura)³⁸ de los átomos constitutivos de una proteína³⁹. De esta forma se mejora el ajuste entre el modelo y los datos de intensidad basados en las amplitudes observadas de los factores de estructura, es decir, los datos experimentales (espacio recíproco).

El nuevo mapa de densidad generado puede presentar zonas que estén pobremente definidas y que impidan mejorar el modelo. Ya sea porque las densidades están presentes pero no son interpretables, probablemente por presentar zonas de conformaciones múltiples o porque el modelo tiene errores. Es frecuente encontrar áreas que ajustan perfectamente con el modelo y otras que no lo hacen tanto, esta conducta está claramente influenciada por los parámetros de desplazamiento o factores de temperatura.

3.2.4. *Parámetros estructurales resultado del afinamiento.*

Como resultado del afinamiento se obtienen varios parámetros estructurales de importancia. El primero de ellos a considerar es el valor R^{40} , el cual denota la confiabilidad de la determinación de una estructura dada, al verificar el nivel de coincidencia entre las intensidades de los datos de difracción y las calculadas por el modelo. Mientras más bajo es este valor, mejor es dicho ajuste.

Una estructura bien afinada presenta un valor R de aproximadamente 20%. El modelo resultado explica los datos experimentales con un margen de error que es generalmente de cerca del 5%. Esta circunstancia es un punto de acalorado debate en el área, donde se argumenta que muchos aspectos de los modelos actuales no describen apropiadamente la conducta de la proteína en el cristal, como son las características

difracción sea conocida.

³⁸Sobre estos parámetros estructurales se habla más a profundidad en la sección 3.2.5.

³⁹Rhodes, 2000 (84)

⁴⁰ El valor R es una medida de la coincidencia del modelo experimental cristalográfico y los datos de difracción a partir de la comparación de las amplitudes de las ondas, esperadas y observadas para cada reflexión en el patrón de difracción. Evalúa que tanto el modelo atómico sugerido como la estructura a determinar, predice los datos completos.

dinámicas de la estructura y el comportamiento de la fase acuosa del cristal⁴¹.

Otro parámetro importante por considerar -y que no muchos le prestan atención- es el factor residual R_{free} ⁴². EL valor R_{free} fue introducido por Brünger (1992)⁴³ como un estadístico de prueba que se calcula a partir de un grupo de datos que se omiten del afinamiento. Se estableció como un índice objetivo de la calidad de estructuras macromoleculares a resoluciones medias. Representa, por lo tanto, otra medida independiente de la concordancia entre el modelo y los datos cristalográficos⁴⁴. Un R_{free} no debe estar separado del R por más de 5 unidades ya que si el R_{free} se eleva demasiado quiere decir que hay un sobreafinamiento. Es decir, el modelo se aleja de la realidad. Por esta razón el poner atención a este valor es definitorio en la sucesión de un afinamiento correcto.

Existen muchos casos, sobre todo determinaciones a altas resoluciones, donde se omite el cálculo de este estadístico de prueba, ya que el no considerar datos en el afinamiento produce efectos indeseables. Según algunos cristalógrafos estos efectos pueden pesar más que la información que podría brindar la diferencia entre R y R_{free} , a la hora de decidir si calcular o no este valor. Sin embargo la validación que promueve el R_{free} es determinante en un afinamiento cuidadoso. En este sentido existen muchos intentos para mitigar el efecto negativo de omitir grupos en el afinamiento⁴⁵, para así poder calcular el R_{free} mejorando su valor.

Otro dato importante es la integridad (completeness)⁴⁶. Ésta nos habla del número de intensidades utilizadas para la determinación de la estructura de la proteína y su afinamiento, según el conjunto de las reflexiones medidas, las cuales dependen del volumen de la celda unitaria, su grupo espacial y la resolución.

⁴¹Se hablará de esto más ampliamente en la discusión general.

⁴² El R_{free} es otra medida de coincidencia entre el modelo y los datos experimentales, calculado a partir de un grupo aleatorio de prueba, el cual, no es incluido en el afinamiento y permite hacer una validación cruzada. Evalúa que tanto el modelo atómico sugerido como la estructura a determinar, predice un sub-grupo de las intensidades medidas no incluidas en el afinamiento.

⁴³ Brünger, AT, *et al.*, 2000 (13)

⁴⁴ Matthews, 1997. (60)

⁴⁵ Chen *et al.*, 1999. (17)

⁴⁶ La integridad se refiere a la cantidad de datos medidos de las reflexiones obtenidas.

3.2.5. *Parámetros de desplazamiento (o factores B).*

Otro parámetro importante, resultado del afinamiento, son los factores B o factores de temperatura. La fuente de difracción de un átomo es la nube de electrones alrededor de su núcleo y por tanto de ella depende su poder de difracción. Entre más voluminosa sea ésta, y por lo tanto la distribución electrónica en ella sea más espaciosa, más rápido disminuye el poder difractante del átomo.

Para estudiar el comportamiento de los átomos dentro del cristal es importante considerar esta tendencia. Por lo que al tomar en cuenta la difracción, se incluye un promedio cuadrado de la amplitud de la vibración del átomo, en función del tiempo. Si un átomo está estabilizado en una pequeña región espacial -ya sea por su posición o por sus interacciones- la nube electrónica promedio ocupará un volumen mayor que tendrá menor intensidad, si está vibrando que si está en reposo. La magnitud de esta vibración depende de la temperatura, por lo tanto el parámetro que la define es llamado factor de temperatura.

La deslocalización de la nube electrónica, sin embargo, no es resultado únicamente de la temperatura o de la vibración térmica, sino también del desorden. Es decir, de la localización estocástica de un centro atómico en todas las celdas unitarias del cristal, en todas las unidades asimétricas o en todas las moléculas que conforman esta última, que es resultado de la diferencia en la orientación de cada molécula al ser empaquetada. Por tanto, debido a que el factor B es resultado de varias circunstancias sería más correcto llamarla parámetro de desplazamiento⁴⁷.

En los modelos cristalográficos, los parámetros de desplazamiento describen dos componentes del desorden; el estático (de coordenadas atómicas equivalentes que difieren de una unidad asimétrica a otra) y el dinámico, donde los datos de difracción representan el promedio en el tiempo del movimiento atómico en cada una de las unidades asimétricas. Pueden, por otro lado, simplemente evidenciar errores en el modelo. La corrección de estos parámetros es indispensable para hacer un buen ajuste y predicciones realistas sobre el promedio posicional de cada átomo.

⁴⁷Rhodes, 2000 (84)

Para describir esta deslocalización, generalmente se reporta el factor B, resultado del afinamiento, el cual revela tanto la vibración térmica como el desorden atómico. Ambos determinantes muestran sus efectos en los valores de los factores B finales del afinamiento.

El factor de desplazamiento o factor B^{48} es una medida de la oscilación de un átomo alrededor de la posición especificada en el modelo. A partir de estos datos podemos saber cuáles átomos tienen mayor libertad de movimiento y tener indicios de la dinámica del modelo, generalmente más estático. Al agregar los efectos del movimiento al modelo, éste se hace más real y ajusta mejor con los datos. Cuando se incluye la ocupación del átomo -si presenta posiciones idénticas (ocupación=1) o si las cadenas laterales presenta conformaciones alternas (ocupación=0.5)- se amplía la información de las propiedades dinámicas⁴⁹.

Otro aspecto que afecta el factor B son las moléculas de agua. Cuando estas moléculas están ordenadas contribuyen al poder dispersante de los rayos X. Representan, por lo tanto, una parte importante de la estructura. Muchas veces para bajar los valores de R y R_{free} se construyen moléculas de agua donde podrían estar otras moléculas, sin embargo esto no representa un buen afinamiento. Aunque estos valores se bajen, puede ocasionarse que los factores B de la proteína se eleven. Es decir, que figure una deslocalización de la nube electrónica irreal, que si fuera tal no se vería para evaluarla. El R_{free} es una buena herramienta para saber cuándo la adición de agua mejora o no el modelo y también para saber cuándo colocarla o aumentarla durante el procesamiento.

3.2.6. Determinantes de afinamientos variados: consideración del desplazamiento.

El factor B o factor Debye-Waller -a quienes se debe su formulación- sugiere ampliamente aspectos sobre la dinámica de la proteína. Las características atómicas detalladas del factor B permiten obtener información valiosísima sobre la función de la

⁴⁸En esta tesis se utilizarán indistintamente estos dos conceptos o factor de temperatura.

⁴⁹Rhodes, 2000 (84)

misma. Como ya se mencionó, los cálculos que realiza el afinamiento parten de la posición y de los parámetros de desplazamiento (factor B) de cada átomo.

Muchas veces, después de que el afinamiento converge, existen factores B fuera del margen (2-100Å) permitido, indicando desorden -en el extremo superior del intervalo-, y una selección errónea del átomo -en el extremo inferior. Al analizar los mapas de densidad y de diferencias se puede evidenciar la existencia de conformaciones múltiples en las regiones que sugieren desorden. Si se incluye estas conformaciones en el afinamiento, se pueden mejorar el R, R_{free} y el mapa, revelando más claramente la naturaleza del desorden.

Si el factor B fuera resultado únicamente de la vibración térmica del átomo, entonces el caso más simple de movimiento armónico térmico sería un parámetro de desplazamiento isotrópico, indicando que la nube electrónica es uniforme en todas direcciones. Sin embargo, en la realidad, los modos vibratorios no son isotrópicos y resultan sólo una aproximación del comportamiento de los átomos en el cristal.

Las bajas resoluciones que se obtenían en años anteriores sólo permitían afinamientos isotrópicos de los factores de temperatura. Era ésta la única manera de explicar la vibración atómica en las estructuras de macromoléculas. Actualmente, las altas resoluciones permiten obtener diferencias cualitativas y cuantitativas en el análisis cristalográfico, que proporcionan una descripción anisotrópica de la vibración de cada átomo en la estructura. Es decir se le atribuye al movimiento un elemento de direccionalidad.

Para relacionar las intensidades difractadas con la dirección, se corrige el parámetro isotrópico hacia uno anisotrópico. Entonces se describe la distribución probable de la densidad electrónica como una curva de Gauss tridimensional⁵⁰ que, cuando se presenta en una superficie, donde la densidad electrónica tiene un valor fijo, se obtiene una elipsoide.

⁵⁰Merrit, 1999. (62)

3.2.7. Relación entre el número de datos y la resolución: repercusiones sobre el afinamiento.

La complejidad de un modelo afinado depende de la cantidad de datos disponibles, es decir, del cociente entre el número de observaciones y el número de parámetros a afinar por el modelo. Si esta relación aumenta, mejora la calidad del modelo afinado, obteniendo una mejor estimación de parámetros individuales.

El número máximo de observaciones depende de la calidad del cristal y el límite de resolución. En cristales de proteína, el número de observaciones regularmente es insuficiente para hacer un afinamiento libre del modelo. Por lo cual, para reducir los parámetros a medir, se recurre a afinamientos de cuerpos rígidos, simetrías no cristalográficas o afinamientos torsionales. De esta manera se aumenta el cociente datos/parámetros. Las observaciones entonces son suficientes para explicar la nueva cantidad de parámetros calculados. Esto mejora la calidad del modelo estructural ya que incluye información que describe con mayor detalle la estructura.

Cuando la relación datos/parámetros es muy alta, se puede realizar un afinamiento anisotrópico, donde la descripción de cada átomo está dada por seis parámetros (PAD)⁵¹. Esto incrementa el número de parámetros isotrópicos -tres de posición y uno térmico- a nueve -tres de posición y seis térmicos-. Al incluir los PAD se mejora globalmente el modelo, disminuyen los valores de R y R_{free} y se reducen errores de las posiciones. Además se pueden analizar cuantitativamente las características locales o globales de la estructura (como movimientos globales de algunas zonas). El valor de B , reportado en los PDBs, aunque sea el mismo en varios casos, puede tener valores anisotrópicos diferentes, los cuales pueden estar relacionados con direcciones preferenciales de movimiento y con la función biológica.

Merrit introdujo la utilización de los PADs en los estudios de estructuras macromoleculares⁵². Propuso que es en la faja de resolución de 1.2 a 1.6Å, donde se encuentran las mejores relaciones datos-parámetros, que presentan curvas gaussianas de entre 0.4 y 0.6. Sugirió que de no cumplirse esto es necesario implementar

⁵¹ Parámetros anisotrópicos de desplazamiento (PAD).

⁵² Merrit, 1999. (62)

restricciones al afinamiento anisotrópico para mejorar la distribución. En nuestro laboratorio se ha propuesto la inclusión de la relación datos-parámetros como determinante en la selección de estructuras a ajustar por esta vía⁵³.

Existe una franja de resolución llamada zona gris -entre 1.9 a 1.2 Å - donde surge la duda acerca de si incrementar el número de observaciones es suficiente para justificar el aumento de parámetros en el modelo. En el extremo inferior de la zona (1.6-1.9 Å) el cociente para nueve parámetros por átomo es casi el mismo que en afinamientos isotrópicos entre 2 y 2.3 Å. De hecho sólo las restricciones geométricas permiten que el modelo isotrópico sea ajustado correctamente en esa faja de resolución. Para lograr un ambiente equivalente en el extremo de la zona es necesario jugar con ciertos límites que se imponen a los afinamientos, retirándolos total o parcialmente según el comportamiento del proceso.

3.3. Afinamientos cuasi-anisotrópicos: aplicación de tensores TLS a grupos pseudo-rígidos.

Dentro de este juego de variables que conducen a afinamientos mejores, es prudente recurrir, cuando se trabaja en la zona gris, a otros tipos de análisis que brinden información de las propiedades vibratorias.

Un paso esencial en todo afinamiento macromolecular es la selección de parámetros del modelo, que darán una descripción lo más realista posible de los datos experimentales, manteniendo una buena relación datos-parámetros. Esto es fundamental sobre todo para el caso de los parámetros de desplazamiento atómicos donde el afinamiento de movimientos isotrópicos individuales o afinamientos anisotrópicos involucra un aumento en la cantidad de parámetros a calcular por átomo.

Cuando el cociente datos-parámetros no es suficiente para realizar un afinamiento anisotrópico de los factores B, se puede recurrir a la reducción de

⁵³ Rudiño, 2002. (88)

parámetros, usando variables colectivas más que variables atómicas independientes durante el afinamiento⁵⁷. Esto puede lograrse a través de los modos normales⁵⁸ de Kidera & Go (1999) o por un afinamiento con la parametrización de Schomaker & Trueblood (1967) por tensores TLS⁵⁹ a grupos pseudo-rígidos.

Estos tipos de análisis grupales no sólo permiten una disminución en el número de parámetros a calcular para el modelo, sino también dan una explicación de las propiedades dinámicas de la molécula, al evidenciar la dirección de los movimientos, así como la correlación de los desplazamientos entre átomos vecinos.

Los modos normales representan un método de análisis de la dinámica proteínica. Expresan a ésta última como una superposición de movimientos colectivos que son calculados a partir de una matriz de energía conformacional en una estructura de energía mínima, considerando a los movimientos atómicos como anisotrópicos y concertados. Se calcula así un factor de desplazamiento de modos normales a partir del afinamiento de este tipo, el cual también reduce el R y R_{fre} . A pesar de ser un método muy útil para explicar dinámicas moleculares, requiere de cálculos intrincados para llevarla a término.



Figura 34. Componentes direccionales de la vibración atómica. Según el tipo de afinamiento que los ajusta los valores B, de izquierda a derecha, se observa un afinamiento isotrópico sin dirección preferencial, el anisotrópico con una dirección marcada por el eje mayor de los elipsoides y por último un cuasi-anisotrópico que describe la dirección pero no la misma magnitud del movimiento que los anisotrópicos.

⁵⁷ Kidera & Go, 1990. (42)

⁵⁸ *ídem*

⁵⁹ Schomaker & Trueblood, 1967. (93)

La parametrización por TLS, por su parte, es más sencilla. El afinamiento con tensores TLS, es un método de ajuste de los datos experimentales y el modelo que consiste en aplicar tensores a cuerpos rígidos dentro de la unidad asimétrica para obtener parámetros vibratorios direccionales. La ecuación de TLS da un promedio cuadrado del desplazamiento de un punto dentro del cuerpo rígido en términos de tres tensores: T (traslación, L (rotación), S (rotación helicoidal) -donde T y L son simétricos, mientras que S es asimétrico-. Estos tensores consideran tanto la dirección como la amplitud del movimiento, permitiendo identificar un factor de desplazamiento anisotrópico.

El análisis de Cruickshank de los movimientos de cuerpos rígidos de moléculas en cristales en términos de dos tensores simétricos (rotación y traslación)⁵⁷ fue ampliamente adoptado durante mucho tiempo para interpretar resultados de afinamientos anisotrópicos. Sin embargo en los años sesenta del siglo XX, se vio que este tratamiento era inadecuado cuando no existía en la molécula un centro preordenado de rotación, por ejemplo un centro de simetría. Schomaker y Trueblood adicionaron entonces un tercer tensor (S) para considerar los aportes al movimiento por la correlación de los otros dos tensores (T y L).

Cuando una molécula, o cuerpo rígido tiene un centro asimétrico, S tiene 8 componentes independientes, uno de ellos arbitrario. Las contribuciones de los cuerpos rígidos a los tensores de desplazamiento anisotrópicos que representan una enorme cantidad de movimientos, pueden ser descritas en términos de seis movimientos simples no correlacionados; seis traslaciones y seis rotaciones helicoidales, movimientos desplegados con respecto y a lo largo de tres ejes perpendiculares que no se intersectan (x , y , z). Se generan así 20 parámetros a ajustar por cuerpo rígido, disminuyendo considerablemente el número de parámetros para calcular el modelo⁵⁸ en relación a los que son necesarios para un afinamiento anisotrópico.

Si el cuerpo rígido tiene un centro simétrico, algunos o todos los componentes de S se restringen y puede ser que éste no tenga efecto. Por lo tanto el movimientos

⁵⁷ Cruickshank, 1968 (20)

⁵⁸ Se calculan seis parámetros por átomo en afinamientos isotrópicos y nueve en los anisotrópicos

sólo es interpretable en términos de L y T.

3.3.1 Selección de grupos TLS y sus propiedades dinámicas.

Un aspecto indispensable en la modelación por TLS de desplazamientos anisotrópicos es -como se mencionó en los párrafos anteriores- la selección de los cuerpos rígidos sobre los cuales se va a basar el cálculo⁵⁹. El método más simple para seleccionar estos grupos se basa en la naturaleza química de la rigidez de ciertos grupos de átomos. Como los elementos estructurales con mayores grados de libertad de una proteína son las cadenas laterales, la manera más común de selección de grupos TLS es a partir de éstas o de residuos completos⁶⁰. Sin embargo esto se realiza en estructuras a altas resoluciones.

Holbrook (1986), al afinar las estructuras de DNA⁶¹ demostró que el método de TLS podía ser aplicado a estructuras macromoleculares para describir desplazamientos anisotrópicos de cuerpos rígidos. Se han afinado con TLS varias proteínas: la pepsina (Sali, *et al.*,1990), la papaina (Harris *et al.*,1992) y la ribonucleasa (Howlin *et al.*,1989)⁶² para describir cambios conformacionales y movimientos de cadenas laterales.

Para las estructuras de resoluciones medias, en contraparte, se ha recomendado usar grupos de átomos más grandes que una cadena lateral⁶³. Grupos con esta particularidad no son completamente rígidos, ya que se pueden identificar en ellos, una gran cantidad de movimientos internos -que pueden ser explicados por modos normales o por torsiones individuales-, que representan un componente significativo del desplazamiento atómico. Es por esta propiedad de dinámica interna que a estos grupos se les atribuye la cualidad de cuerpos pseudo-rígidos. Por esta razón, estructuras secundarias o dominios pueden ser tratados como grupos TLS.

Han habido algunos casos -pocos en realidad- donde se han seleccionado

⁵⁹ Aspectos variados sobre la determinación de cuerpos rígidos en los estudios de flexibilidad se abordan en la sección 3.4.1

⁶⁰ Harris, *et al.*, 1992. (29)

⁶¹ Holbrook, *et al.*,1986. (33)

⁶² *Idem*, Sali, *et al.*, 1990 (90), Howlin, *et al.*, 1993 (36)

grupos más grandes como cuerpos rígidos. Wilson y Brunger (2000) compararon un afinamiento anisotrópico de la calmodulina con un afinamiento TLS para identificar los desplazamientos de dominios⁶⁴. Al afinar la crambina a resolución atómica, Stec (1995) la dividió primero en dos, y luego en tres grupos y comparó los valores anisotrópicos derivados de TLS con valores calculados a partir de un afinamiento anisotrópico directo⁶⁵. De este modo corroboró su utilidad en la descripción de la movilidad atómica. Recientemente Sixma (2002) afinó con TLS un receptor nicotínico de acetilcolina, obteniendo bajas significativas en R y R_{free} ⁶⁶.

Pero, ¿cómo seleccionar estos grupos más robustos? El camino puede ser variado pero identificando regiones estructurales o funcionales que puedan ser considerados dominios dinámicos. En nuestro laboratorio se planteó que en proteínas con diferentes estados conformacionales -donde existe más de una forma cristalina de una proteína en particular- los cambios conformacionales entre las diferentes formas se pueden usar para identificar los dominios dinámicos, es decir, dominios que se mueven como cuerpos pseudo-rígidos. Considerando estos dominios dinámicos como grupos TLS, se asume que los desplazamientos relativos entre las diferentes formas de cristales reflejan los desplazamientos como si fueran los de un cristal único⁶⁷.

Los dominios dinámicos⁶⁸ pueden ser también identificados por simulaciones de dinámicas moleculares al superponer series de configuraciones instantáneas, rotando cada una de ellas con respecto al resto. Las regiones superimpuestas pueden, bajo cierto grupo de rotaciones, considerarse potenciales grupos pseudo-rígidos⁶⁹. Otra manera de identificar este tipo de agrupamientos se refiere a que a partir de valores anisotrópicos previamente afinados, se ajusten los parámetros de TLS a los factores de desplazamiento anisotrópicos. Así se facilita la interpretación de estos valores. Si esta determinación se logra, entonces se pueden inferir los grupos posibles, para utilizar en los cálculos de los valores de desplazamiento de las estructuras donde no han sido

⁶³ Winn, *et al.*, 2000. (115)

⁶⁴ Wilson & Brunger, 2000. (114)

⁶⁵ Stec, *et al.*, 1995. (102)

⁶⁶ Sixma, *et al.*, 2002 (100)

⁶⁷ Winn, *et al.*, 2000. (115)

⁶⁸ Aclaraciones sobre este tipo de dominios se hacen en la sección 3.4.

⁶⁹ Papiz, 1996 (77), Horjales, *et al.*, 1987 (34)

determinados⁷⁰.

Otra aproximación es usar el criterio de cuerpo rígido de Rosenfield (1978), donde se construye una matriz de diferencias entre todos los pares de átomos. Ahí, se comparan los parámetros de desplazamiento similares. Los átomos que pertenezcan al mismo grupo pseudo-rígido tendrán valores de la diferencia cercanas a cero⁷¹.

Otra vía -la utilizada en esta tesis- es la consideración de las propiedades vibratorias de un modelo sencillo, como es sólo los $C\alpha$ de la cadena principal -suficiente para reconocer movimientos en grupos-, en función de la distancia que exista a los centros de rotación; y asociando a los átomos que tengan patrones vibratorios similares⁷².

3.3.2. Implementación de afinamiento TLS en REFMAC5

Los pioneros en la realización de afinamientos por parametrización de TLS fueron Holbrook al afinar estructuras de DNA⁷³ y extender el programa RESTRAIN de CCP4 (Collaborative Computational Project, number 4, 1994)⁷⁴ para aplicar TLS a la ribonucleasa A. Este programa también fue aplicado por Sali y Papiz en sus estudios ya mencionados. Sin embargo este tipo de afinamientos no habían sido usados en extenso, debido al tiempo requerido para hacer los cálculos. Además, anteriormente eran necesarios afinamientos anisotrópicos previos para calcular los TLS.

Para hacer eficiente este proceso, Winn, Isupov y Murshudov (2000) implementaron la parametrización por TLS en el programa REFMAC⁷⁵ de CCP4. Este avance, a la par del crecimiento actual de estructuras a resoluciones atómicas, ha facilitado hacer ajustes TLS para afinar anisotrópicos grupales sin necesidad de cálculos anisotrópicos individuales previos.

⁷⁰ Holbrook, *et al.*, 1986. (33)

⁷¹ Rosenfield, 1978. (86)

⁷² Sobre este método de selección de grupos pseudo-rígidos se ahonda en la sección 5.3

⁷³ Holbrook, *et al.*, 1986. (33)

⁷⁴ CCP4, 1994. (15)

Durante la parametrización TLS, el programa calcula el centro de masas de cada grupo pseudo-rígido. A partir de él se calculan los tensores que permitirán describir los desplazamientos en la traslación, rotación y rotación helicoidal de los grupos pseudo-rígidos. Cuando se aplican TLS, los factores B -calculados isotrópicamente- de cada átomo individual, dentro del dominio dinámico, bajan considerablemente. Es a partir de éstos, que se determinan las amplitudes cuadráticas promedio del desplazamiento anisotrópico (MSDAs)⁷⁶ que servirán para calcular las elipsoides anisotrópicas de desplazamiento.

Durante la parametrización TLS puede utilizarse un grupo de datos afinados anisotrópicamente para ajustar los TLS o pueden derivarse los PADs y calcular factores de estructura a partir de los parámetros de un afinamiento directo por TLS. Se ha visto que de cualquier manera, la inclusión de parámetros TLS mejora las estadísticas del afinamiento en particular el R y el R_{free} .

3.4 Flexibilidad estructural

Las primeras referencias sobre cambios en las estructuras de las proteínas oligoméricas se tienen de los estudios sobre alosterismo de Monod (1964) y Koshland (1966). Con base en estos modelos se intentó explicar los fenómenos de transformación alostérica en enzimas oligoméricas. Los estudios se enfocaron en describir los cambios conformacionales de la estructura cuaternaria, desde la perspectiva de conservación de la simetría molecular -modelo MWC- o como producto de procesos localizados de cambio en interacciones interfásicas -modelo secuencial-. Durante la última década, la visión tradicional de que una proteína puede estar en equilibrio entre dos estados conformacionales discretos ha tenido una transformación radical, respondiendo a las crecientes evidencias sobre regiones muy móviles en este tipo de macromoléculas.

La observación de los fenómenos de movilidad dentro de las proteínas ha despertado un gran interés en los mecanismos que las gobiernan y que podrían

⁷⁵ Murshudov, *et al.*, 1997. (68)

⁷⁶ Harris, *et al.*, 1992. (29)

influenciar su función biológica. De este tipo de mecanismos se tuvo noticia por primera vez gracias a estudios bioquímicos y cinéticos, que supusieron la existencia de conformaciones múltiples a partir de medidas indirectas y con base en la naturaleza flexible de los enlaces bioquímicos. Posteriormente, los análisis estructurales han evidenciado y descrito la naturaleza de esas conformaciones variadas. Sin embargo, aunque han sido caracterizadas estructuralmente muchas proteínas, ya sea por cristalografía o por resonancia magnética nuclear, se conocen sólo algunos aspectos sobre sus propiedades dinámicas.

La flexibilidad estructural ha sido abordada desde una perspectiva de enlaces atómicos, restringiendo el dinamismo a una propiedad intrínseca del enlace, la cual se despliega al construirse o destruirse éste. Por otro lado, desde el punto de vista residual, se considera a las cadenas laterales como los principales componentes flexibles de la proteína. A pesar de ser éstas las zonas más móviles de la molécula, las conformaciones alternas variadas que presentan y que repercuten sustancialmente en la función biológica, han sido consideradas simples accidentes cristalográficos.

Aunque la flexibilidad molecular se manifiesta en estas diferentes formas, existe también una flexibilidad más global, referida como la sucesión de cambios de conformación totales que se dan en algunos tipos de proteínas y que pueden ser abordados desde la perspectiva de los componentes vibratorios que les dan su carácter dinámico.

La cristalografía es una de las técnicas más eficientes en la elucidación de los aspectos estáticos y dinámicos de este tipo de moléculas y ha provisto "instantáneas" que dan información sobre los diferentes estados conformacionales en varios casos. En el mundo de las macromoléculas biológicas, son las proteínas alostéricas los ejemplos más claros de variabilidad y adaptabilidad conformacional, sin embargo su estudio ha sido parcialmente desplazado por aquellos dirigidos a comprender el dinamismo en proteínas consideradas motores moleculares.

3.4.1 Cambios conformacionales: efectos de los dominios dinámicos determinados a partir de cuerpos pseudo-rígidos.

Al intentar abordar las propiedades dinámicas de las proteínas, partiendo del despliegue de sus diferentes estados conformacionales, se presentó la necesidad de replantear conceptos sobre los constituyentes estructurales y dinámicos de una proteína. El reflejo más claro de esta reconceptualización descansa en la naturaleza de los dominios proteínicos.

Existen al menos dos definiciones de dominios; la que, al referirse a los aspectos estructurales, lo define como un plegamiento compacto que al unirse a otros dominios por medio de elementos estructurales como asas o hélices, conforma a una proteína. La otra definición correspondiente a los aspectos dinámicos, se refiere a una región en la proteína relativamente rígida, que está separada de otros dominios "rígidos" por regiones más flexibles que éstos⁷⁷. En algunos casos los dominios estructurales y dinámicos coinciden. Sin embargo no siempre es así y las dos aproximaciones pueden dar resultados diferentes especialmente en proteínas oligoméricas. En este tipo de moléculas los dominios dinámicos pueden estar conformados por elementos de varias cadenas, mientras que los dominios estructurales sólo se dan sobre una sola cadena. Por otro lado, un mismo dominio estructural puede contener varias regiones rígidas que conformen dominios dinámicos separados⁷⁸. El interés en estos fragmentos dinámicos radica en que sus movimientos están relacionados ampliamente con la función desplegada por la proteína.

Los dominios dinámicos se definen por la existencia de las regiones rígidas - regiones con movimiento rotacional constante⁷⁹- interconectadas por regiones flexibles -como asas- en el exterior de la proteína. Sin embargo al definir los dominios dinámicos de este modo no se precisan los límites de los dominios y tampoco se permite la división de la proteína completa en cuerpos rígidos⁸⁰. Esto tiene congruencia con la realidad física, ya que una proteína no consta de regiones perfectamente rígidas conectadas por simples juntas mecánicas, sino más bien de regiones cuasi-rígidas

⁷⁷ Hinsen, *et al.*, 1999. (32)

⁷⁸ Schulz, *et al.*, 1991. (94)

⁷⁹ Hayward, *et al.*, 1997 (30)

cuyo movimiento relativo requiere de la deformación de las regiones más flexibles, situadas entre ellas. Mientras que dos regiones rígidas separadas por estas bisagras, pueden constituir dos dominios distintos, la ausencia de una juntura flexible entre ellos no forzosamente supone que el cuerpo rígido constituya un dominio dinámico, ya que puede haber transiciones definidas de un dominio al siguiente. Así que se vuelve necesario calcular la movilidad de cuerpo rígido de cada zona rígida para hallar los dominios dinámicos. Este cálculo de movilidad del cuerpo rígido da más información sobre la dinámica dentro del dominio⁸¹.

Los cambios conformacionales debidos a desplazamientos de dominios, son movimientos de baja frecuencia y de amplitudes grandes, y representan los movimientos más evidentes dentro de la proteína, por lo tanto, han sido los más estudiados. Se ha obtenido detalle de los movimientos de cambio de conformación sucedidos en varios ejemplos clásicos de enzimas alostéricas, considerando a los movimientos de dímeros completos o de monómeros (dominios estructurales) como las zonas dinámicas descritas anteriormente. Son precisamente este tipo de movimientos los que alteran la conformación de la molécula globalmente y, por lo tanto, son esenciales en la función protéica⁸². Los movimientos de baja frecuencia de grupos han demostrado ser los que aportan mayores contribuciones a las fluctuaciones entre diferentes estados de conformación⁸³, mientras que los de alta frecuencia, más localizados -involucrando sólo algunos residuos-, juegan papeles importantes en transmisión de señales, catálisis u otros procesos internos⁸⁴.

Existen muchos ejemplos de movimientos diferenciales de baja frecuencia en muchas proteínas alostéricas. Por la facilidad de disectarlos han sido más descritos que aquellos de alta frecuencia. La piruvato cinasa, por ejemplo, una proteína tetramérica de simetría 222, lleva a cabo desplazamientos coordinados de gran amplitud y baja frecuencia durante su transformación alostérica, combinando dos tipos de movimiento: una rotación de dos de los tres dominios de cada subunidad (17° para el dominio B y

⁸⁰ Winn, *et al.*, 2000. (115)

⁸¹ *Idem*

⁸² Hinsen, *et al.*, 1999. (32), Amadei, *et al.*, 1993. (2), Bahar, *et al.*, 1998. (6), Groot, *et al.*, 1998 (26)

⁸³ Brooks, *et al.*, 1995. (11)

⁸⁴ Keskin, *et al.*, 2002. (45)

15° para el dominio C)²¹ y una rotación de 16° de toda la subunidad. Este mecanismo presenta algo sin precedentes: reside en una rotación de los doce dominios que conforman a la proteína, que altera las interfases entre los dominios y subunidades⁸⁵. La flexibilidad de esta proteína se enfatiza por la observación de que el dominio B despliega diferentes orientaciones en las subunidades cristalográficas independientes presentes en el cristal de ambas conformaciones, activa e inactiva⁸⁶.

La hemocianina hexamérica de simetría 32 exhibe un comportamiento similar, al de la piruvato cinasa, donde una rotación de 7.5° de un dominio está acompañada de una rotación de 3.1° de un trímero sobre el otro⁸⁷. La lactato deshidrogenasa bacteriana es una proteína tetramérica donde cada subunidad presenta una rotación de 8° pero donde las interfases interdominios se mantienen ya que los dos dominios que forman cada subunidad no rotan entre sí⁸⁸. Lipscomb junto con sus colaboradores describió las transformaciones de la fructosa 1,6 bisfosfatasa tetramérica de simetría 222, cuyo comportamiento alostérico sigue el modelo concertado: un dímero rota 17° con respecto al otro para generar la conformación activa⁸⁹. En la proteína hexamérica con simetría 32, glucosamina 6-fosfato desaminasa, por otro lado, se da una rotación de 12° de cada monómero con respecto al resto en el mismo plano trigonal.

3.4.3 Nuevos enfoques para abordar los fenómenos de flexibilidad.

El acercamiento a los fenómenos de flexibilidad ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas para el alcance de su explicación y comprensión. Avances recientes en técnicas de espectroscopía han permitido examinar detalladamente los movimientos atómicos individuales⁹⁰ y los movimientos globales asociados al plegamiento o desdoblamiento de las proteínas⁹¹. Los movimientos moleculares a gran escala han sido asociados a los motores macromoleculares (tubulina por ejemplo). Se han reportado

²¹Notese que se está hablando de dominios estructurales que han sido considerados dominios dinámicos.

⁸⁵ Mattevi, *et al.*, 1996 (58)

⁸⁶ Larsen, *et al.*, 1994. (48)

⁸⁷ Hazes, *et al.*, 1993. (31)

⁸⁸ Iwata, *et al.*, 1994. (39)

⁸⁹ Liang, *et al.*, 1993. (49)

⁹⁰ Weiss, *et al.*, 1999. (111)

⁹¹ Arrington & Robertson, 2000 (5)

simulaciones de mecánica clásica⁹² y de dinámicas macromoleculares⁹³ que intentan explicar las relaciones entre movimientos moleculares y la función biológica. Sin embargo estas aproximaciones sólo han tenido éxito limitado, especializándose en explicar movimientos lentos a gran escala de proteínas grandes o multiméricas.

Para explicar los cambios conformacionales se ha recurrido a muchos métodos de análisis e interpretaciones variadas. Englander y sus colaboradores han intentado explicar la flexibilidad como resultado del plegamiento y su dinámica, resaltando las implicaciones biológicas de éstos. Es decir, consideran que las proteínas dirigen reacciones de desdoblamiento a lo largo de toda su estructura, que ocurren independientemente unas de otras, involucran pocos aminoácidos y dan lugar a muchos estados de conformación con la presencia de regiones desdobladas. Desde esta perspectiva, se ha planteado que la colección de estos estados representa la forma nativa de la proteína, en la cual se ubican regiones de alta energía de estabilización y otras de baja, que provocan una cooperatividad local, más que global⁹⁴.

Una perspectiva contrapuesta intenta explicar la flexibilidad en términos de movimientos oscilatorios o de vibración atómica dentro de los cuerpos pseudo o cuasi-rígidos, la cual contribuye a los aportes en movilidad de estos grupos, cooperativa y concertadamente, dando lugar a cambios globales en la estructura. Como parte de este enfoque, se han construido varios algoritmos para detectar la dinámica de dominios en las proteínas⁹⁵ y se han catalogado tipos de movimientos de dominios, distinguiendo movimientos finitos e infinitos (por sus amplias magnitudes). Donde los primeros se refieren al movimiento de un átomo de un punto específico a otro, y los segundos describen las cantidades y direcciones de los movimientos atómicos de cambios pequeños en la conformación.

Los estudios de flexibilidad fueron motivados por varias preguntas esenciales: ¿Cómo se comunican los sitios distales? ¿Cómo se dan las interacciones en la regulación alostérica? ¿Es la localización de zonas estabilizadas y no estabilizadas, un

⁹² Keskin, *et al.*, 2002. (45)

⁹³ Brooks, *et al.*, 1995. (11)

⁹⁴ Freire, 2000. (24)

evento aleatorio o se debe a un dictamen de consideraciones funcionales? ¿Cómo se relaciona la estabilidad o flexibilidad de la proteína con la función?

Aunque muchos trabajos han señalado la posible importancia de la flexibilidad conformacional en el despliegue funcional de toda proteína, aún no se ha estudiado sistemáticamente y éstas preguntas continúan sin una respuesta satisfactoria.

⁹⁵ Nichols, 1995. (73), Groot, *et al.*, 1998 (26), Hinsen, *et al.*, 1999. (32)

4 Objetivos

4.1 Objetivos generales

- a) Generar un criterio evaluador y selectivo de las estructuras cristalográficas de proteínas depositadas en el PDB, en busca de proteínas alostéricas.
- b) Evidenciar la importancia de incluir información vibratoria en los afinamientos estructurales para obtener mejores ajustes que expliquen las propiedades dinámicas de las proteínas al aplicar tensores de direccionalidad.
- c) Analizar a partir de la información vibracional de las proteínas alostéricas seleccionadas, el papel de la flexibilidad molecular en su función biológica, y con base en ello, ampliar el modelo estructural del estado T "oscilante" propuesto para la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E.coli* por Rudino, *et al* (2001).

4.2 Objetivos particulares

A partir del objetivo general *a* se generan los siguientes objetivos particulares:

- a.I) Desarrollar un método evaluador y de selección de estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB).
- a.II) Construir un programa computacional para llevar a cabo la selección de estructuras.
- a.III) Seleccionar las proteínas alostéricas, objeto de estudio.

A partir del objetivo general **b** se generan los siguientes objetivos particulares:

b.I) Identificar las propiedades vibratorias de los diferentes estados conformacionales de las proteínas problema.

b.II) Realizar análisis vibratorios por factores B isotrópicos- de ambos conformeros R y T de las proteínas seleccionadas.

b.III) Realizar análisis vibratorios por grupos pseudo -rígidos, en ambos conformeros R y T de las proteínas seleccionadas.

b.IV) Evaluar por factores de temperatura y por grupos pseudo -rígidos las propiedades dinámicas de una proteína con cinética michaeliana que presente diferentes estados conformacionales como validación del método utilizado.

b.V) Destacar los beneficios de la incorporación de parámetros vibratorios direccionales en los ajustes estructurales.

Del objetivo general **c** se derivan los siguientes objetivos particulares:

c.I) Identificar un estado T oscilante conforme al modelo propuesto por Rudiño, *et al* (2001) en las proteínas alostéricas seleccionadas.

c.II) Evidenciar la importancia del comportamiento vibratorio en la transición conformacional y el comportamiento biológico en las proteínas problema.

c.III) Integrar los resultados al modelo estructural de la transformación alostérica y flexibilidad conformacional (del estado T "oscilante") propuesto para la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E.coli* por Rudiño, *et al* (2001).

5 Metodología

"Las cosas deben ponerse tan simples como sea posible. Pero no más simples."

Albert Einstein

5.1 La búsqueda de estructuras

En el *Protein Data Bank* (PDB) existen 19,052 estructuras depositadas (16,094 de ellas resueltas por difracción de rayos X), de éstas 15,495 son de proteínas, -considerando péptidos, virus, proteínas, así como complejos proteína/ácido nucleico⁹⁵.

Para realizar una discriminación en este bagaje babélico, es indispensable la implementación de criterios selectivos que respondan a las necesidades de la búsqueda, los cuales pueden ser muy variados. Sin embargo, existen datos sobre las condiciones de cristalización, sobre el proceso de afinamiento, sobre la captura de datos y sobre la calidad de la estructura, que todo biólogo estructural -o investigador que busque realizar un análisis estructural- necesita saber para realizar un análisis estructuro-funcional.

5.1.1 Construcción de un criterio evaluador y selectivo

Con base en esta premisa se desarrolló un sistema de selección y de evaluación estructural considerando las siguientes características: la resolución a la que fue resuelta la estructura, los índices de error del afinamiento: valor R y R_{free} , la integridad de los datos de difracción que presenta la estructura determinada, los componentes de la unidad asimétrica, el número de átomos en ella, el número de reflexiones o de datos obtenidos en la difracción y el grupo espacial de la celda unitaria. Considerando el número de parámetros necesarios para afinar isotrópicamente cada átomo⁹⁶, se evaluó la relación reflexiones/parámetros⁹⁷, otro dato importante del afinamiento. Por otro

⁹⁵ Estadísticas hasta el 1 de noviembre del 2002.

⁹⁶Una explicación sobre esta relación para afinamientos isotrópicos y anisotrópicos se encuentra en la sección 3.2.6.

⁹⁷ Como las reflexiones son los datos experimentales de una determinación estructural por difracción de rayos X, este cociente se referirá como datos/parámetros o reflexiones/parámetros indistintamente.

lado se tomó en cuenta si estaban depositados los factores de estructura, elemento esencial para el análisis pretendido, ya que permite realizar un afinamiento "en casa".

Junto con estos datos primordiales se buscaron otros secundarios, no decisivos para la selección, pero también importantes: las dimensiones de la celda unitaria, el programa utilizado para el afinamiento. Otras características biológicas que permitieron el reconocimiento adecuado de las proteínas problema, fueron la unidad biológica de funcionamiento, los ligantes a la estructura, y el organismo al que pertenecieran.

5.1.2 Construcción de la base de datos

La elección de las proteínas problema se basó, en primer lugar, en la cantidad de depósitos de estructuras resueltas por cristalografía de rayos X. Se consideró que aquellas proteínas con más de 10 depósitos nos brindarían una abundante fuente de información comparable. Así se contaría con un número considerable de estructuras para cada caso. Por otro lado se dió importancia para la selección a las características cinéticas, es decir, si desplegaban un comportamiento alostérico durante su función, si desarrollaban efectos cooperativos y si estaba descrita su transformación.

Con base en los criterios anteriores, se procedió a una primera selección de las proteínas candidatas y se obtuvieron todas las claves PDB (PDB-ID) correspondientes a todos los depósitos de cada una de ellas.

Para buscar, a partir de las claves PDB, todos los datos necesarios para la evaluación y la selección, en los documentos particulares de cada estructura, se construyó el programa DIPA en el lenguaje de programación Perl.

Este programa utiliza como base de datos PDB Cd-ROM Released (#100) abril 2002, el cual contiene 17, 679 estructuras. DIPA rastrea en esta base de datos los PDB-ID's señalados en una lista previa y genera una tabla con todos los datos de las diferentes estructuras. Todos aquellos depósitos posteriores a abril de 2002 que no se hallaban en este documento fueron obtenidas de la Red directamente y después

inspeccionadas por el programa. Tanto las listas de entrada como las tablas de salida se generaron por separado para cada una de las proteínas. Estas tablas comparativas de caracteres constituyeron nuestra base de datos para realizar una selección más afinada aplicando el criterio evaluador y selectivo construido.

5.1.3 Perfeccionamiento de la selección

De las tablas comparativas de caracteres DIPA, resultado de esta pesquisa, se hizo otra selección. Con la finalidad de obtener las estructuras mejor afinadas, se prefirieron aquellas estructuras a altas resoluciones, con valores de R y R_{free} bajos, mayor porcentaje de integridad, alta relación datos/parámetros y cuyos factores de estructura estuvieran presentes.

Después de obtener por esta vía las mejores proteínas con las cuales trabajar y sus mejores estructuras, se analizaron las bases de datos, en atención a cuáles y cuántos depósitos correspondían a estados conformacionales distintos, y se aplicó el mismo criterio para seleccionar de cada confórmero las mejores estructuras.

En los casos en que no estaba especificado a que confórmero correspondía la estructura, se realizó un análisis por ligantes basado en la literatura -especificaciones sobre el activador o inhibidor alostérico, sustrato, cofactores, análogos competitivos, etc.- y en la información de la estructura problema, es decir los ligantes presentes. Esta valoración, junto con la búsqueda de contactos cristalinos⁹⁸ sirvió para evaluar las vibraciones de cada zona y discernir entre diferentes estados conformacionales.

Al obtener las mejores estructuras para los confórmeros T y R de las proteínas problema según los criterios de selección, éstas se contrastaron para determinar si se podía considerar que la estructura de mejores características explicaría el comportamiento de las demás. Para ello, se supuso a los factores B como indicadores

⁹⁸ Los contactos cristalinos son resultado del empaquetamiento del cristal. Se pueden dar con las paredes del mismo o entre las moléculas agrupadas, produciendo artificios estructurales que no se sabe cómo alteran las propiedades dinámicas de las conformaciones nativas.

de un buen afinamiento⁹⁹. Se realizaron empalmes entre mismos estados por medio del programa "O"¹⁰⁰, y se consideró la presencia de ligantes o de contactos cristalinos que pudieran afectar la vibración atómica. Esto nos permitió evaluar si efectivamente se trataba de un estado T o uno R, como se describe a continuación.

Con la lectura de los documentos PDB por una subrutina del programa CNS 0.1¹⁰¹ se generó una lista de los factores B promedio para cada residuo de cada estructura. Con ellos, se hizo un contraste interestructural de los resultados, por medio de gráficas de distribución de los factores B a lo largo de la cadena principal, considerando los factores B más fiables los de aquellas estructuras a mejor resolución y con valores R y R_{free} menores. En aquellas estructuras sobrefinadas (con R_{free} desfazados por más de 5 unidades del R) se evaluó la presencia espuria de moléculas de agua.

Para corroborar lo anterior, los empalmes por "O" de todas las estructuras R y todas las T, permitieron evaluar mediante el consenso en las coordenadas, la veracidad de cada reporte de estado, o inferirlo en los que no estaba presente. Al obtener de esta manera las mejores estructuras en ambos confórmers de las proteínas problema, se obtuvo el primer acercamiento al comportamiento vibratorio de la proteína. El patrón de distribución de factores B de cada estructura permitió visualizar una posible selección de dominios dinámicos en cada proteína.

5.2 Análisis vibratorios por factores de temperatura

Utilizando un método sencillo para explicar las propiedades vibratorias de grupos móviles, se consideraron sólo los parámetros de desplazamiento de los C α . Con el programa ONLYCA en Fortan, se seccionaron los factores B de la cadena principal. Con base en el paradigma del aumento en la movilidad de un punto conforme éste se

⁹⁹Se evaluó el intervalo de factores B que presentaba cada estructura según los valores de R y R_{free} y la presencia de exceso de moléculas de agua según lo descrito en la sección 3.2

¹⁰⁰Jones, *et al.*, 1991 (40)

¹⁰¹Brunger, *et al.*, 1998 (12)

aleja de un centro rotatorio, se hizo una evaluación de la vibración de cada C α en función de la distancia a un eje probable de la transformación.

Para establecer este eje, se realizaron superposiciones alternantes de configuraciones instantáneas tomando como referencia los ejes de la celda unitaria reconstruida por "O"¹⁰². Para dicho empalme se tomaron como secuencias base a aquellas con factores B más bajos y aquellas reportadas en la literatura como zonas de movimiento como cuerpos-rígidos.

A partir de esta semblanza obtenida por la revisión de la distribución de los factores B, se procedió al análisis de la movilidad de la proteína en función de la distancia al eje de rotación, con el fin de encontrar las zonas de movimientos más conspicuos, tanto aquellas que fomentaban una correlación como las que ocasionaban ruidos. Para ello, se consideró al C α con factor B más bajo como un elemento del eje de rotación. Se evaluaron tendencias de movimiento similares donde los átomos pudieran ser agrupados de acuerdo al comportamiento vibratorio que presentaban uno con respecto al otro y en relación a la distancia que los separaba del eje propuesto.

5.3 Análisis vibratorios por grupos pseudo-rígidos

Las secciones o grupos de residuos dispersos con parámetros de desplazamiento más altos, que se identificaron en las graficas de distancias de C α , se omitieron de la gráfica, en busca de una correlación parabólica que evidenciara su carácter oscilatorio. Se hizo a partir de ellos una división de la proteína en zonas de movimiento, sobre el supuesto de que aquellos con patrones vibratorios similares, correlacionados por su distancia al eje de rotación, representan grupos de movimientos coordinados, con menores diferencias de desplazamiento entre ellos. Se atribuyó a estas zonas una movilidad como grupos pseudo-rígidos, para evaluar si eran definitorios de la transición alostérica.

¹⁰²ver como ejemplo Figura 6.

Esta consideración permitió realizar, con los factores de estructura depositados, un nuevo afinamiento de la proteína por REFMAC TLS¹⁰³, subrutina del programa REFMAC5 de CCP4¹⁰⁴. Se ajustaron los parámetros vibratorios a un modelo cuasi-anisotrópico para ver si se mejoraban los valores estadísticos de la estructura (R y R_{free}) y si se obtenía una descripción estadística que definiera el movimiento en la dirección de la transición alostérica.

El proceso del afinamiento consistió en calcular los parámetros TLS para cada grupo pseudo-rígido, con sus respectivos ciclos de ajuste. Posteriormente se realizaron varios ciclos de minimización por mínimos cuadrados de máxima similitud. La decisión del número de ciclos a efectuar se basó en el análisis de la convergencia o divergencia del R y el R_{free} en varios ciclos de prueba.

Se fijaron los factores B en un valor constante (el valor más bajo del afinamiento reportado para cada caso). Se calcularon entonces los factores B globales y, posteriormente los parámetros TLS. Cuando los parámetros TLS convergen adecuadamente, se liberan los factores B , para ampliar la descripción del desplazamiento.

Los 20 parámetros de TLS resultantes: tres matrices que refieren los ejes ortogonales y el origen escogido, sirvieron para construir el despliegue gráfico de estos valores rotando y ajustando las coordenadas por el programa TLSANL de CCP4¹⁰⁵. La representación se hizo por elipsoides de desplazamiento anisotrópico.

Esta secuencia de análisis se utilizó para todas las estructuras analizadas incluyendo procesos específicos para cada una de ellas de acuerdo a las características del cristal, del afinamiento y de la proteína en sí.

¹⁰³ Schomacker & Trueblood, 1967 (93)

¹⁰⁴ CCP4, 1994 (15)

¹⁰⁵ Howlin *et al.* 1993 (36)

6 Resultados y Discusión

*Datos, Watson, necesito datos!
No se puede construir una casa sin ladrillos.*

Sir Arthur Conan Doyle,
Estudio en escarlata

6.1 Pesquisa en el Protein Data Bank (PDB)

La indagación sobre la disponibilidad de estructuras de proteínas alostéricas en la principal fuente de información estructural de macromoléculas, el Protein Data Bank (PDB), brindó más resultados que aquellos que motivaron la búsqueda.

Organización del Protein Data Bank
19062 Total de depósitos hasta 1 noviembre 2002

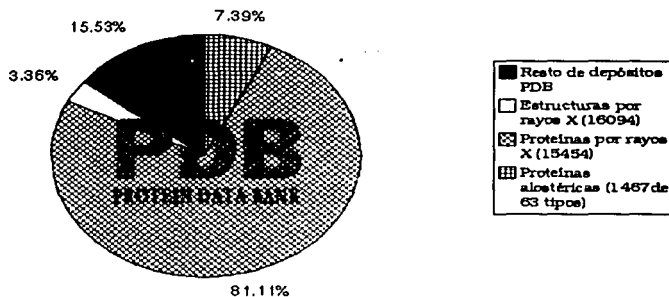


Figura 6.1. Estadísticas del PDB hasta el 1 de noviembre del 2002 y primeros resultados de la búsqueda.

Los resultados fueron de dos tipos, aquellos que respondían directamente a las necesidades de la investigación -se encontraron estructuras de proteínas alostéricas candidatas a selección y análisis- y aquellos que surgieron al abordar la búsqueda, y que reflejaron algunas inconveniencias de este banco.

No se puede hablar de los resultados de la búsqueda de proteínas sin hablar de los problemas que hubo para hacerla. Sin embargo por cuestiones prácticas y para exponer con mayor claridad lo obtenido durante la investigación, se abordarán en primer lugar, las características confusas y las inconveniencias más intrínsecas al PDB,

haciendo referencia algunas veces a las relacionadas con nuestra búsqueda particular. En la sección siguiente se hablará de la selección de proteínas alostéricas propiamente.

Nombre proteína alostérica	No. depósitos	Nombre proteína alostérica	No. depósitos
1 Fructosa 1,6 Bisfosfatasa	51	Fosfofructocinasa	6
2 Piruvato cinasa	17	Integrina	59
3 Apartato Transcarbamioilasa	14	Fenilalanina hidroxilasa	18
4 Glucogeno fosforilasa	62	ATP sulfurilasa	8
5 Glutamina transferasa	6	Glucosa 1-fosfato timidiltransferasa	13
6 Hemoglobina	212	O-Acetilserina sulfhidrolasa	4
7 Fosfoenolpiruvato carboxikinase	10	D-glucosa 6 fosfotransferasa	2
8 Triptofano sintetasa	29	Antramitrato sintetasa	4
9 Glicerol cinasa	12	Aamilasa	89
10 Corimato mutasa	12	Peptido antrial antiurético	2
11 Hexocinasa	7	Represor de la síntesis de purina	10
12 Glucosamina 6-fosfato desaminasa	10	Heparina	2
13 Carbamoil fosfato sintasa	2	P38 Map cinasa	5
14 Mioglobina	195	Proteasa Hsl dependiente de ATP	7
15 Ornithine transcarbamioilasa	6	Fosfoenol deshidrogenasa	1
16 Glutamina fosforibosilamidotransferasa	6	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	3
17 Ribonucleasa pancreática	8	Treonina desaminasa	1
18 Lactato deshidrogenasa	32	GCN4	39
19 Rad 50 ATP sintetasa	3	Proteína activador de Hemo	2
20 GTP ciclohidrolasa	10	Piridoxal fosforilasa B	4
21 Theonine Sintetasa	2	Citrate sintetasa	21
22 Oxido Nítrico Sintetasa	68	Glutamato deshidrogenasa	14
23 Proteína de activación catabólica	11	Ribonucleótido reductasa	37
24 Ribonucleótido-trifosfato reductasa	5	Proteína de unión a calcio dependiente	
25 CCAAT/enhancer	2	de vitamina D	10
26 Factor de transcripción Runt	6	Trombina	289
27 Proteína funcional Bira	3	Hemocianina	12
28 Adenosimetiloin decarboxilasa	7		

Cuadro 6.a. *Lista de proteínas alostéricas.* Enumera algunas de las proteínas de las 64 encontradas, resultado de la primera búsqueda en el PDB, señalando el total de depósitos con que cuenta cada una de ellas en dicho banco. La búsqueda se basó en principio en el criterio de alostéricas, el cual brindó la primera lista de moléculas presentes; posteriormente a partir de esa lista se hicieron búsquedas particulares que vertieron los depósitos señalados.

Hasta el 1 de noviembre del 2002, 19,052 estructuras macromoleculares conformaban el PDB. De éstas, 16,094 son resultado de difracción de rayos X (Figura 6.1). Esto se debe en principio a que los avances en la cristalografía de macromoléculas fueron los detonantes de la construcción de esta base de datos que se ha ido alimentando desde sus inicios con los resultados de la investigación de esta ciencia. Ha sido en los últimos años, que se integraron estructuras resueltas por las nuevas técnicas de Criomicroscopía Electrónica o por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esto nos refiere que en principio podría haber una amplia gama de estructuras cristalográficas que podrían dar información relevante para el tema que aquí se aborda.

De las 19,052 estructuras que conforman el PDB, 15,454 son de proteínas - considerando péptidos, virus, proteínas, así como complejos proteína/ácido nucleico; de éstas hay 1,467 determinaciones cristalográficas de proteínas alostéricas¹⁰⁷ correspondientes solamente a 64 diferentes¹⁰⁸ (Cuadro 6.a).

El PDB consiste de varios depósitos para cada proteína, generalmente algunas determinadas por RMN, muy pocas por Criomicroscopía y la mayoría por Cristalografía, aunque en algunos casos sólo existe una sola determinación. También es frecuente encontrar que la estructura de cierta proteína sólo esté restringida a la determinación de fragmentos de éstas, ya sea el dominio carboxilo terminal, el amino terminal o el núcleo catalítico. Por estas razones, es difícil encontrar varias estructuras completas correspondientes a una misma proteína, o por lo menos disponer de su núcleo catalítico completo. Es indispensable, para el análisis realizado en esta tesis, contar con la molécula completa que permita abordar su transformación y la flexibilidad en ésta involucrada en su componente real.

Otro de los problemas a que nos enfrentamos al analizar el PDB, consistió en la variedad de formatos de los depósitos. Esto se debe a todos los cambios que desde su inicio ha tenido el PDB que van determinando las exigencias de los depósitos, a la par de los avances tecnológicos y científicos. Durante sus primeros años los archivos PDB sólo contaban con la información de coordenadas, el programa utilizado y la resolución obtenida. Posteriormente se fueron solicitando más datos a los depositantes. Los depósitos hechos en los años ochenta y principios de los noventa presentan además de la información ya mencionada, el valor estadístico de R y datos sobre la cristalización y sobre la difracción. Actualmente presentan muchos datos valiosos como son también el valor de R_{free} , descripción detallada de las condiciones de cristalización y de difracción, el porcentaje de integridad que manifiestan los datos de difracción de la estructura determinada y la adición de los factores de estructura.

¹⁰⁷Estadísticas hasta el 1 de noviembre del 2002.

¹⁰⁸Sobre esta base se hizo la selección que se explica en la sección 6.2

PDBID	RES (Å)	R	R _{Free}	INT	No. REFLE	No. ATOM	No. PARAM	F.S
3csu	1.88	0.19	0.29	94.6	*	7604	38020	0
1d09	2.1	0.2	0.23	*	59066	7887	39435	1
1flb	2.3	0.2	0.23	*	57236	8278	41390	1
8atc	2.5	*	*	*	*	8192	40960	0
1rad	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1rae	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1raf	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1rai	2.5	*	*	*	*	7314	36570	0
1rah	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1rag	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1raa	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1rac	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0
1rab	2.5	*	*	*	*	7379	36895	0

Tabla 6.I. Fragmento de tabla DIPA de Aspartato Transcarboamiloasa. Ejemplifica la falta de información en depósitos PDB antiguos. F.S corresponde a la disponibilidad de factores de estructura.

PDB-ID	RES (Å)	R	R _{Free}	INT	No. REFLE	No. ATOM	No. PARAM	F.S
1qop	1.4	0.15	0.18	95	133915	5880	29400	1
1k8y	1.5	0.17	0.21	95.1	111900	5619	28095	0
1k3u	1.7	0.15	0.19	97.7	77570	5785	28925	1
1k7x	1.7	0.19	0.24	96.8	78258	*	*	1
1k8z	1.7	0.21	0.27	96.4	79408	5354	26770	1
1qoq	1.8	0.17	0.21	94	63650	5461	27305	1
1ubs	1.9	*	*	*	*	5188	25940	1
2tys	1.9	0.17	*	82.4	*	5321	26605	1
1k7f	1.9	0.2	0.25	93.8	53470	4964	24820	1
1beu	1.9	0.22	0.28	80.3	45259	5236	26180	1
1a5a	1.9	0.24	0.3	77.7	43791	5292	26460	1
1ttq	2	*	*	*	*	4981	24905	1
1geq	2	0.2	0.25	90.8	30701	4238	21190	0

Tabla 6.II. Fragmento de tabla DIPA de Triptofano Sintetasa. Ejemplifica depósitos bien realizados con información completa y casos de falta de información por no reporte. F.S corresponde a la disponibilidad de factores de estructura.

Desgraciadamente toda esta información se obtiene sólo idealmente. Aún en los nuevos depósitos, aunque se solicitan ciertos datos, no son siempre adjuntados. Esta falta de homogeneidad -sea porque la información no es solicitada al momento del depósito (casos más viejos), o porque no es depositada o es adscrita deshonestamente- ocasiona que se dificulte su utilización, y pone en tela de juicio su credibilidad en muchos casos (a manera de ejemplo se pueden observar las tablas 6.I. y 6.II).

Los factores de estructura –datos experimentales- son información indispensable para reutilizar o reinterpretar las estructuras determinadas, y suele ser uno de los elementos más ausentes en los depósitos.

Estas omisiones afectan la eficiencia del PDB como base de datos estructurales precisos y confiables. Ya que aunque se encuentren estructuras a muy altas resoluciones y supuestamente con datos completos (información que muchas veces también falta (integridad)), si no presentan los valores de validación estadística, u otro tipo de información relacionada con la toma de datos, o con la difracción, aspectos necesarios para evaluar la calidad de la estructura, la veracidad del modelo reportado es dudosa.

Sobre esta premisa, resulta poco conveniente usar estructuras "de dudosa reputación" en un trabajo posterior que intente explicar aspectos finos de la regulación, de las interacciones de la proteína, sobre la incorporación a sistemas membranosos, sobre ensamblados moleculares, sobre catálisis, etc.¹⁰⁹ Esta circunstancia toma mayor trascendencia en estudios estructurales más detallados. Cuando se quiere evaluar información atómica muy fina como son los valores de los factores B reportados en los archivos de depósito, los efectos de un mal afinamiento se resienten sustancialmente.

La construcción del criterio de selección y evaluación que aquí se propone es resultado de las omisiones en los depósitos del PDB de la información que se obtienen durante la determinación, y que caracterizan a la estructura. Por lo tanto, la información faltante, así como las diferencias entre los datos de validación de las estructuras determinadas con la misma resolución, pueden ser argumentos de selección decisivos.

¹⁰⁹Una discusión más amplia sobre la evaluación de estructuras y su consiguiente credibilidad se da en la sección 5.2

6.2 Análisis de la base de datos: evaluación y selección

Al escudriñar del PDB se encontraron 64 proteínas alostéricas depositadas (Cuadro 6.a), de las cuales solo 17 contaban con más de 10 depósitos hechos por difracción de rayos X. El programa DIPA¹¹⁰, nos permitió evaluar las características de 614 depósitos correspondientes a los 17 resultados de la primera selección (Cuadro 6.b), evidenciando las faltantes y particularidades de cada uno de ellos. Con DIPA se construyeron las tablas de caracteres comparativas para cada una de estas proteínas¹¹¹. De acuerdo a la aplicación del criterio evaluador y selectivo se realizó el análisis.

En dichas tablas se hizo un arreglo de los depósitos de acuerdo a tres criterios de orden: de mayor a menor resolución, de menor a mayor R y de mayor a menor relación datos parámetros. Estos datos fueron un primer indicio de la calidad de las estructuras que estábamos considerando. La resolución indica qué tanto se ve o no de la estructura; el valor de R nos permite decidir que tan confiable es la determinación de esa estructura y la relación datos-parámetros nos indica de cuánta información se dispuso para calcular todos los parámetros necesarios para dicha determinación.

Al tener un orden de depósitos se evaluaron las estructuras dependiendo del R_{free} así como de su integridad, ya que estas características permiten evaluar más detalladamente las estructuras: el R_{free} , nos indica de otra manera la confiabilidad de la estructura, al ser otra medida de concordancia entre el modelo y los datos de difracción, y gracias a él podemos descubrir si la estructura fue sobre afinada para bajar el R. Por otro lado la integridad, nos dice qué tan completos fueron los datos de difracción de la estructura de que se trata. Finalmente, se exploró cuales depósitos contaban con sus factores de estructura, es decir los datos de la difracción. Esta condición es importante para nuestro análisis ya que a partir de ellos es posible re-afinar las estructuras según lo descrito en la sección 4.3.

¹¹⁰Una descripción del programa se encuentra en la sección 4.1.2 de la metodología. En el Apéndice I se encuentra el programa.

¹¹¹ Para una revisión exhaustiva de las tablas que conforman la base de datos remitirse al Apéndice II.

Es importante señalar que de las 16,094 estructuras resueltas por cristalografía de rayos X, solo 7,742 presentan factores de estructura¹¹². Y del total de estructuras analizados por nosotros (614) solo 130 los tienen depositados. Esto nos habla de que a pesar de que el PDB es una fuente de información inmensa, aún no es posible trabajar con los datos de difracción de todas las estructuras que lo conforman, lo cual sería de enorme beneficio para los estudios estructuro-funcionales a partir de estructuras cristalográficas.

Proteína	# depo	% alost
INTEGRIN ALPHA 2 BETA	40	2.73
ALPHA-AMYLASE	71	4.84
GLYCEROL KINASE	13	0.89
CATABOLITE GENE ACTIVATOR PROTEIN	10	0.68
HEMOCYANIN	13	0.89
ASPARTATE CARBAMOYLTRANSFERASE	28	1.91
PYRUVATE KINASE	18	1.23
GENERAL CONTROL PROTEIN GCN4	35	2.39
CHORISMATE MUTASE	13	0.89
GLUTAMATE DEHYDROGENASE	15	1.02
L-LACTATE DEHYDROGENASE	30	2.04
NITRIC OXIDE SYNTHASE	50	3.41
CITRATE SYNTHASE	19	1.3
PHENYLALANINE HYDROXYLASE	13	0.89
GLYCOGEN PHOSPHORYLASE	50	3.41
GLUCOSAMINA-6P-DESAMINASA	10	0.68
TRYPTOPHAN SYNTHASE	29	1.98
FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE	38	2.59
TOTAL	495	33.74
TOTAL de depósitos proteínas alostéricas	1467	100.00%

Cuadro 6.b. Selección de proteínas alostéricas por cantidad de depósitos
Se considera únicamente aquellos con más de 10 estructuras hechas por difracción de rayos X.

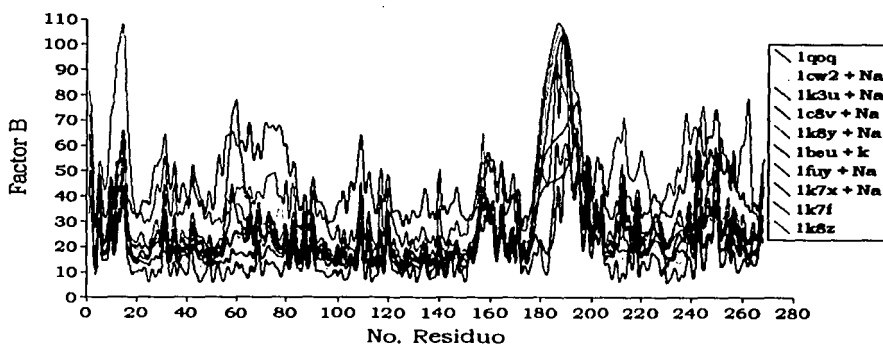
Todas las estructuras se organizaron también según el organismo al que pertenecieran, de acuerdo a la consideración de las pequeñas variaciones que pueden existir entre la misma proteína de un organismo a otro, evitando así la posibilidad de ruido en el análisis.

¹¹² Estadísticas hasta el 1 de noviembre del 2002.

6.2.1. Justificación de la rigidez del criterio selectivo.

Como se discutió en los párrafos anteriores, las omisiones en el PDB o el reporte irregular de los datos de validación de las estructuras determinadas, son buenos argumentos de selección de los modelos estructurales con los que cualquier persona piense trabajar. Es cierto sin embargo, que las diferencias no son tan evidentes entre las estructuras a la misma resolución o aún en las que difieren un poco. Donde se manifiestan más claramente estas diferencias es en los factores de temperatura o parámetros de desplazamiento. Es por ello que resulta necesario utilizar un criterio de selección estricto que asegure la utilización de estructuras lo más realistas posibles.

Vibración atómica en la selección de estructuras de TRP sintetasa



Gráfica 6.1. Justificación para la rigidez del criterio de selección. Muestra como los patrones vibratorios de estructuras determinadas a resoluciones similares son poco distinguibles.

En la sección 3.2.3 y 3.2.5 se pone de manifiesto que estos factores dependen del afinamiento y por lo tanto, los valores de pruebas estadísticas sobre el ajuste durante este proceso (R , R_{free}), así como la integridad de la proteína y otras características, son información indispensable para valorar si un parámetro de desplazamiento está bien calculado. Sobre todo, es de relevancia esta validación para estudios de los comportamientos dinámicos de la proteína como el presente.

En la Gráfica 6.1 no es fácil determinar qué distribución de factores B describe mejor la realidad de las vibraciones atómicas de cada proteína. Por ejemplo, las

estructuras con clave de depósito 1k7f e 1fuy, revelan una distribución de factores B más o menos cercana, aunque algunas regiones (residuos 15-20 o 60-80) parecen zonas de movimientos muy marcados, discrepan en la magnitud de la vibración y en la amplitud de la secuencia en que se manifiestan. Estas disimilitudes pueden ser cruciales para realizar un correcto análisis de flexibilidad y de movimientos. Estas dos estructuras están determinadas a resoluciones distintas (1.9 y 2.25 Å respectivamente) y ostentan diferencias significativas en sus parámetros estructurales.

El resto de las estructuras, todas ellas más cercanas en cuanto a la resolución a la que fueron determinadas, muestran distribuciones de factores B muy parecidas, con la misma línea base y más o menos el mismo patrón. Sin embargo pueden observarse zonas donde las magnitudes de los factores de temperatura varían mucho entre sí sobre todo en la zona de residuos 20-80 y de 180-200. ¿Cómo decidir entre todas ellas cuál es la que describe mejor la vibración de toda la proteína y sobre todo de zonas de movimientos importantes para la transición? La única manera es validando la estructura. Como al hacerlo es necesario ponderar unos datos sobre otros, de acuerdo a la información que pueden generar, se consideran todos los ya mencionados parámetros cristalográficos y características estructurales¹¹³ para seleccionar a la estructura que represente el modelo más cercano posible a la realidad.

6.2.2. Evaluación y selección de proteínas alostéricas.

Al concluir la revisión de las 17 proteínas alostéricas en un inicio seleccionadas, se descartaron muchas de ellas con base en las características observadas en las Tablas A-Q (Apéndice II).

En un principio se contaba con varios candidatos fuertes por sus propiedades cinéticas y de transformación descritas¹¹⁴, que podrían semejar el caso de la glucosamina 6-fosfato desaminasa: la fructosa 1,6 bisfosfatasa, la corismato mutasa, la lactato deshidrogenasa, la hemocianina y la piruvato cinasa. El limitado espectro que estas proteínas permitió poner mayor atención a otras proteínas alostéricas que la búsqueda había arrojado pero cuya transición alostérica no estaba completamente

¹¹³Las características consideradas están en la sección 4.1.1

¹¹⁴Aspectos sobre sus cambios conformacionales son descritos en la sección 3.4

definida y cuyos comportamientos cinéticos eran más complicados: la triptofano sintetasa o la glucógeno sintetasa, entre otras.

La fosfofructocinasa había sido un buen candidato antes de realizar la búsqueda por abundancia –en la cual su incidencia no fue significativa por haber únicamente 4 estructuras depositadas y a bajas resoluciones. Aún así, como representaba uno de los ejemplos más claros de cambios conformacionales que pudieran seguir el modelo en que nos basamos, se realizó un análisis de sus factores B para ver si alguno de los depósitos podría haber sido utilizado, sin embargo las distribuciones de factores B fueron muy dispares ya que ninguna de ellas contaba con una integridad que las pudiera hacer comparables (Datos no mostrados).

Como evidencian las tablas del Apéndice II, las características de los depósitos de cada una de las proteínas son muy dispares, en varios casos. Se consideraron, por lo tanto, resoluciones altas aquellas mayores a 2Å y, como valores aceptables de R aquellos menores al 25% y de R_{free} los que no distaran más de 5 unidades de sus respectivos R. Fueron admisibles, integridades de 80% en adelante y cocientes reflexiones/parámetros cercanos a 3 o mayores. De acuerdo a esto, al realizar un análisis profundo de todas ellas decidimos seleccionar a la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Sus scrofa* (Tabla A) y la Triptofano Sintetasa de *Salmonella thiphymurium* (Tabla B), como las proteínas alostéricas con estructuras depositadas con suficientes datos para validarlas y para proceder a un análisis estructuro-funcional de flexibilidad molecular. Las particularidades de la selección para cada proteína, se describen en las secciones correspondientes (sección 6.3 y 6.4).

De manera paralela, se decidió trabajar también con una proteína michaeliana que presentara cambios conformacionales globales significativos que constataran la validez del método de análisis vibratorios como descriptor de la transformación, como se señala en los objetivos. De este modo se optó por la Integrasa de VIH, una proteína de la cual se cuenta con muchas estructuras comparables, por los fragmentos que han sido determinados y por los parámetros estructurales que presentan (Tabla Q).

6.3 El caso de la Fructosa 1,6 Bisfosfatasa

6.3.1. Caracterización de la enzima

La Fructosa-1,6-bisfosfatasa (D -fructosa-1,6-bisfosfato 1-fosfohidrolasa; EC 3.1.3.11; FBPasa) es la enzima alostérica responsable de hidrolizar fructosa 1,6-bisfosfato ($\text{Fru}_{1,6}\text{P}_2$) a fructosa 6-fosfato (Fru_6P) y fosfato inorgánico (Pi), reacción esencial en la gluconeogénesis renal y hepática¹¹⁵.

La FBPasa es una enzima de 146 KD con un plegamiento $\alpha\beta\alpha\beta$ en cada monómero. Estos están dispuestos en un arreglo homotetramérico del 1 al 4 (C1-C4 según la nomenclatura de Liang *et al.*,1991) en el sentido de las manecillas del reloj. Como todas las enzimas alostéricas presenta dos estados conformacionales uno R (afín al sustrato y activo) y otro T (menos afín al sustrato)¹¹⁶, en este caso en particular, el estado R puede presentarse en dos formas: un R con un asa, pivote de la transformación¹¹⁷, ordenada y un R con la misma desordenada¹¹⁸. El conformero T presenta un giro de 17° del dímero C1C2 con respecto al C3C4, en relación a la posición que tienen en R.

Cada subunidad consta de dos dominios, el N terminal -con plegamiento $\alpha/\beta/\alpha$ - y el C terminal -con plegamiento $\alpha\beta$ -¹¹⁹. Funcionalmente, éstos corresponden a los dominios de unión a F6P y a AMP respectivamente. Cuando se da la rotación, intramonómericamente, el dominio de F6P permanece sin cambio, mientras que el de AMP sí lo sufre. Éste último presenta un giro de 1.9° con respecto al dominio de F6P. En la interfase entre estos dominios están los sitios de unión a iones metálicos que se alteran en el estado T distorsionando el sitio activo¹²⁰ ubicado en la interfase C1:C2 y así impiden la hidrólisis¹²¹.

¹¹⁵ Benkovic, *et al.*,1982 (8), Marcus, *et al.*,1982 (52), Tejwani, *et al.*,1983 (99)

¹¹⁶ Existen algunos ejemplos en donde existe más de un estado activo y en los que esta nomenclatura no es aplicada.

¹¹⁷ Choe, *et al.*, 1998 (17)

¹¹⁸ Ke, *et al.*,1990 (39)

¹¹⁹ Topología según SCOP

¹²⁰ Zhang, *et al.*, 1994 (113)

¹²¹ Villeret, *et al.*, 1995 (101), Choe, *et al.*, 2000 (18)

El sitio alostérico, en el dominio AMP está a 28 Å del sitio activo en el dominio F6P. El AMP inhibe alostéricamente a la FBPasa. Para ello, se une al sitio alostérico sin competir con el sustrato¹²².

La FBPasa requiere de la unión de cationes divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+} o Zn^{2+}) para desplegar su actividad catalítica y de la unión de cationes monovalentes (K^+ , NH_4^+ , Tl^+) para incrementar la catálisis¹²³. Y es con el Mg^{2+} con quién el AMP compete. La saturación de este ión y la inhibición por AMP son procesos cooperativos con coeficiente de Hill entre 2 y 2.5 respectivamente¹²⁴.

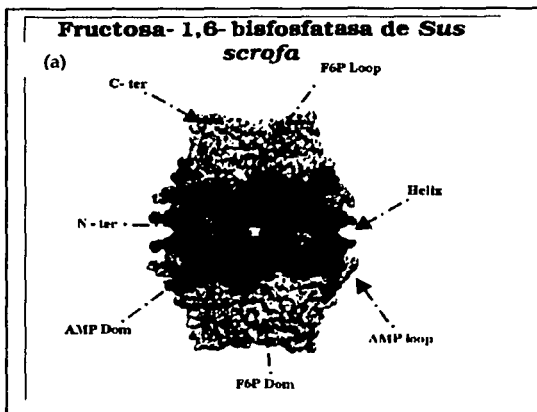
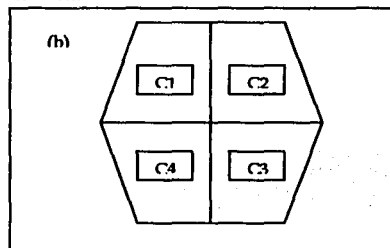


Figura 6.4. Esquema de la estructura tridimensional de FBPasa. (a) Se señalan en colores dominios de importancia en la función biológica. (b) Muestra la disposición de monómeros en la estructura.



El que la unión del AMP y el Mg^{2+} sea mutuamente excluyente es consecuencia directa del cambio conformacional entre dominios producido por la unión del AMP. En ausencia de AMP, los cationes divalentes se unen a todos los sitios de unión a iones metálicos, mientras que cuando el AMP está presente se unen a un único sitio. El Mg^{2+} es el único que se coordina con la F6P cuando está en el sitio 1 de unión a iones metálicos sugiriendo un papel importante en la catálisis. Es precisamente esta localización la que se ve afectada por la unión del inhibidor¹²⁵. Estos provocan, por otro

¹²² Nimmo, *et al.*, 1975 (70)

¹²³ Benkovic, *et al.*, 1982 (8), Zhang, *et al.*, 1995 (111), Tejwani, *et al.*, 1983 (99)

¹²⁴ Liu, *et al.*, 1986 (46), Marcus, *et al.*, 1982 (52)

¹²⁵ Pilkis, *et al.*, 1988. (77), Liu, *et al.*, 1995. (48), Scheftler & Fromm 1986 (92)

lado, el ordenamiento de un asa dinámica, importante en la transformación alostérica, en el estado R. Si los metales no están, el asa se desordena parcialmente en T¹²⁶.

6.3.2 Evaluación y selección de las estructuras de FBPassa

El comportamiento que ésta enzima despliega es muy similar al analizado por Rudiño en la Glucosamina-6-fosfato Desaminasa. Sin embargo, la dinámica de FBPassa no ha sido estudiada a profundidad; por lo tanto, representó, gracias a las características que describen su actividad y su transformación alostérica, una buena elección para abordar el análisis de flexibilidad molecular en relación a su transformación alostérica y las subsiguientes implicaciones en la función biológica.

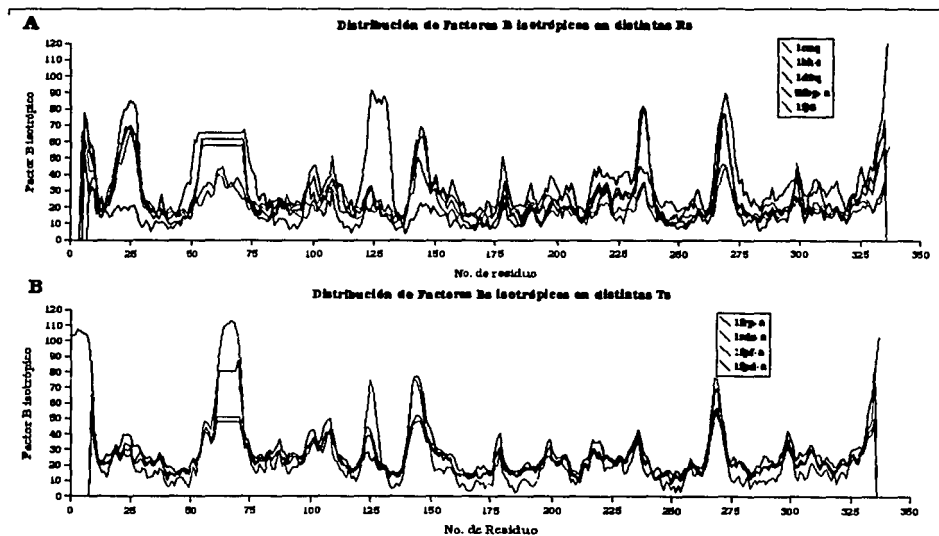
PDB-ID	RES (Å)	R	R Free	INT	DAT/PAR	ES	G. ESPA	U ASIM
Estado T								
1rdz	2.05	0.2	0.22	*	1.2	0	P 21 21 2	A, B;
1fjf	2.1	*	*	*	*	0	P 21 21 2	A,B
Estado R								
1cnq	2.27	0.17	0.23	77.6	0.99	1	I 2 2 2	A;
1bk4	2.3	0.18	*	93	1.36	0	I 2 2 2	A;
1d9q	2.4	0.19	0.24	*	1.03	0	P 1 21 1	A, B,C, D;

Tabla 6.3. Tabla DIPA de estructuras PDB de Fructosa 1,6 Bisfosfatasa seleccionadas para el estudio.

Al realizar la búsqueda de estructuras de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa en el PDB, se encontraron 38 depósitos, considerando enzimas mutantes, nativas y si especificaban el tipo de conformación. A partir de estos antecedentes se abordó la revisión más amplia de su correspondiente tabla DIPA (Tabla A de apéndice I) en aras de encontrar por lo menos una estructura que cubriera nuestros parámetros de selección para cada uno de los confórmeros. Se seleccionaron entonces, 5 estructuras en estado R y 4 en estado T. (Tabla 6.3.) La decisión de catalogar a los depósitos sin la información sobre su estado conformacional, en las secciones que se presentan en la tabla, se basó en una comparación por empalme, por la presencia o ausencia de los ligantes para cada caso y por la comparación entre las distribuciones de los factores B isotrópicos.

¹²⁶ Ke, et al.,1991. (40)

De conformidad con esta selección se realizó una comparación de las distribuciones de los factores B (sección 5.1.3 y 5.2) en toda la secuencia de la proteína para cada caso de las T y de las R catalogadas. La Gráfica 6.2 muestra que el único que presenta valores de B desfasados de las demás es la T 1rdz. Tiene factores B más bajos que el resto, pero los más altos son arriba de 120 \AA^2 , es decir, sus factores B están fuera del intervalo permitido en zonas donde la densidad electrónica no era clara. Al ver el archivo PDB se encontró un exceso de moléculas de agua, que permitieron bajar artificialmente el R_{free} en la determinación reportada. Estas propiedades "anómalas" podrían haber sido evaluadas por controles de un nuevo afinamiento eliminando las aguas espúreas o por otras vías; sin embargo, esto no se hizo y por lo tanto se excluyó de la selección, al haber otras estructuras afinadas conforme a los criterios de evaluación y selección utilizados, y con las cuales sería posible trabajar.



Gráfica 6.2. Comparación de distribución de factores B en cadena principal de todas las formas R (a) y T (b) con un monómero en la unidad asimétrica. (a) La forma R 5fbp, que es un dímero en la unidad asimétrica, se contrasta tanto el monómero a como el b con el resto. Las diferencias entre estos se deben a contactos cristalinos en el b. (b) La forma T 1fpf, que es un dímero en la unidad asimétrica, se contrasta tanto el monómero a como el b con el resto. Como se ve no existen diferencias significativas, sólo 1rdz presenta factores B fuera del intervalo (arriba de 100).

La estructura con clave 1frp es, además, la estructura determinada a mayor resolución y con la relación datos parámetros más alta. Aunque este cociente definitivamente no es suficiente para realizar un afinamiento anisotrópico¹²⁷, es la única con factores de estructura. La única deficiencia de esta estructura es que no presenta el R_{free} , pero esta omisión se compensa con los otros datos. Esto nos hizo seleccionar a 1frp¹²⁸ como la mejor estructura determinada para el estado T.

En el caso de las estructuras en estado R se seleccionó a 1cnq¹²⁹ por ser la única con factores de estructura. Aunque la resolución es buena, no es la más alta, tampoco su integridad es la mejor y la discrepancia entre R y R_{free} es muy amplia. Para evaluar si realmente este depósito, con esas características estructurales, era un buen descriptor de la conformación R de la enzima se empalmó con las otras en la misma conformación con el programa "O", obteniendo un rmsd de 0.310 Å entre 1cnq y 1bk4 y un rmsd de 0.250 Å con 1d9q a partir de 320 C α en ambos casos. La superposición con 5fbp dio un rmsd de 0.788 Å (237 C α) (Gráfica 6.3), lo que se puede deber a que esta estructura cuenta con un asa semi-ordenada, como se discutirá más adelante, que no coincide con el asa ordenada del estado R ni con el asa completamente desordenada del estado T, por lo que se ha interpretado como un estado intermedio entre T y R¹³⁰. Por lo tanto, se consideró también en la selección final a la 5fbp, pero por falta de sus factores de estructura no se pudo corroborar, sobre su mapa de densidad electrónica, si el semi-desorden reportado era tal, y tampoco se pudo re-afinar.

Como podemos ver existe un balance al hacer la selección, que depende de aquella información que nos será más útil y fiel al momento de hacer el análisis vibratorio y el afinamiento posterior por grupos pseudo-rígidios.

¹²⁷Por arriba de una resolución de 1.5 Å se puede realizar un afinamiento anisotrópico aunque puede existir la duda de hacerlo a esa resolución porque forma parte de la zona gris.

¹²⁸ Xue, *et al.*, 1994 (c)

¹²⁹ Choe, *et al.*, 2000 (a)

¹³⁰ Ke, *et al.*, 1991 (b)

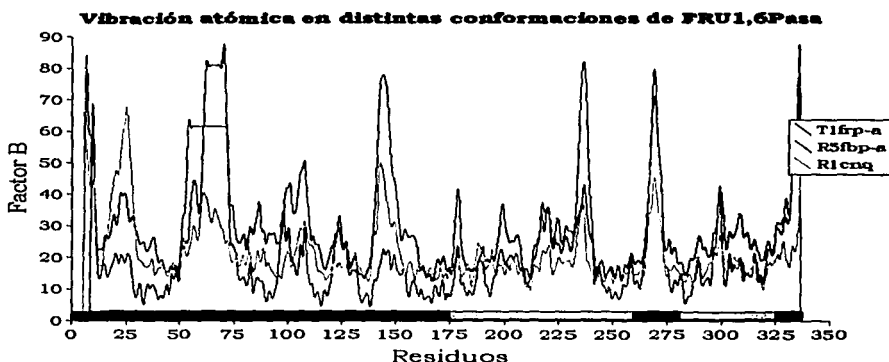
6.3.3. Análisis por factores de temperatura isotrópicos

De acuerdo a la distribución de factores B, el confórmero T (1frp) presenta mayor vibración global que el confórmero R (1cnq) (Gráfica 6.3.). Sobresalen en esta relación las vibraciones altas en 1frp de los residuos 63-72, 148-152 y 265-275, regiones que se muestran en tres grandes picos y que corresponden al asa más móvil de la proteína (52-72), del dominio de AMP, -concretamente a las bisagras de ésta ya que en 1frp (T) el asa está desordenada-; al asa superior de unión a AMP y de conexión con la capa beta, y algunos sitios de unión de F1,6P₂ y metales en el sitio activo, respectivamente. En estas zonas las vibraciones oscilan entre 70 y 80 Å², contrastando con aquellos de 1cnq (forma R) entre 35 y 45 Å². En ésta, los residuos 265-275, al tener ligantes, presentan vibraciones de menor magnitud. Una vibración similar se observa en el asa 140-149, que al no tener una molécula de AMP unida que la desestabilice, presenta factores B más bajos. La situación es muy distinta en los residuos 22-27, asa de conexión de las hélices H1 y H2 de la interfase C1:C4 que unen AMP. En esta región se despliegan vibraciones amplias en concordancia con la ausencia del ligante, mientras que en T la unión estabiliza esta zona. Por otro lado, el asa 52-72 está ordenada completamente. El C-terminal y N-terminal también presentan vibraciones significativas aunque del mismo orden en ambos estados. Para distinguir si las vibraciones bajas eran intrínsecas o se debía a un efecto del empaquetamiento en el cristal, se analizó la presencia de contactos cristalinos en esas zonas con ayuda del programa O, y se vio que las vibraciones de estas regiones no eran afectadas por estos artefactos cristalinos.

Al analizar el mapa de densidad electrónica de T se observó que el asa (52-72), efectivamente no presentaba densidad. y que esta omisión era producto de la movilidad atómica y no de un error en el afinamiento, el cual se hubiera hecho evidente al tener densidad en esa zona.

La conformación ordenada en R (1cnq) fomenta una disminución de la movilidad total de la proteína, contrario a lo que pasa en T, donde la movilidad global es más alta. En lo que se refiere a 5fbp, se ha considerado un estado intermedio -como se introdujo en la sección anterior- R-neutro que está semi-inhibido o en semi-actividad. En el asa 52-72 se observa un desorden completo contrastando con el

desorden parcial del estado T (residuos 63 -72). La movilidad global , en este caso, influenciada por el desorden total del asa 52-72 es también intermedia, ya que hay zonas con comportamiento "tipo" R y otras con comportamiento "tipo" T. Los residuos 22-27, que unen AMP, presentan una vibración muy baja, aún más baja de lo que presenta T, lo cual no debería ser ya que no tiene ligante ni se observó la presencia de contactos cristalinos en la zona. Sin embargo esta conducta puede deberse precisamente al completo desorden del asa (52-72), el cual también ocasiona una baja vibratoria en los residuos de interfase C1:C2. La alta movilidad en la zona del sitio activo puede deberse a la ausencia de un metal en 5fbp -como en 1frp (T)- ya que estos estabilizan esa zona en 1cnq.



Gráfica 6.3. Comparación de la vibración atómica de cada conformero a lo largo de la cadena principal considerando el factor B promedio de cada residuo. Se evidencian zonas de mayor vibración atómica a partir de las cuales se hizo la selección de los grupos pseudo-rígidos señalados por las bandas de color en el eje X. N-terminal (turquesa), Dominio AMP (rojo), asa de unión a AMP asociada a hélices de la interfase C1:C4 (azul), asa residuos de la interfase C1:C2 (verde), dominio de pegue de fructosa-6-fosfato (F6P) (amarillo), residuos de coordinación en sitio activo (morado) y C-terminal (anaranjado)

Este tipo de movimiento intermedio ha sido interpretado por Choe (1998) como resultado de dos posibilidades: que se trate de una conformación alterna global que podría sugerir un estado de colección de estados R entre T y R, que pueden funcionar en diferentes formas bajo distintas condiciones, de los cuales sólo uno es seleccionado para el proceso de cristalización; o bien, que la existencia de este estado intermedio se debe a un mal afinamiento, el cual no podemos evaluar por la falta de información en su tabla DIPA.

El análisis vibratorio se dirigió a ubicar zonas de la proteína con mayor desplazamiento atómico, para de este modo encontrar agrupamientos de residuos con vibraciones similares que pudiéramos relacionar en distintos grupos pseudo-rígidos. La consideración de los grupos rígidos reportados en la literatura y aquellos que fueron sugeridos por la distribución de factores B se contrastaron a partir de superposiciones por "O". Por esta vía se corroboró que estas regiones móviles son las que presentan mayores diferencias en las distancias de empalme.

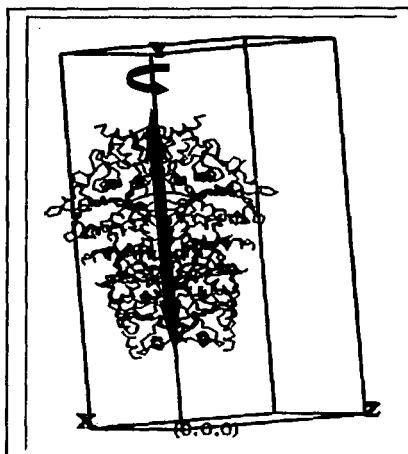


Figura 6.5. Ubicación del eje de rotación Y en FB_{Pasa} a partir de la celda unitaria. Representación del tetramero de FRU_{1,6Pasa} en "O" con la celda unitaria de simetría P₂₁₂. Aunque el tetramero no cristaliza en este grupo espacial la sobre posición de éste con el dímero correspondiente a esta simetría ajusta perfectamente. Por ello se puede mostrar con esto, la ubicación del eje Y que corresponde al eje (flecha azul) de rotación de esta enzima (flecha morada).

Lipscomb y sus colaboradores sugirieron una distinción de regiones rígidas según los dominios AMP y F6P -los cuales presentan una rotación de 2° entre ellos-. También sugirieron la existencia del dímero completo como otro cuerpo rígido más grande, que rota 17° con respecto al otro durante la transición alostérica. La superposición primero se realizó con base en el criterio de los dominios AMP y F6P, y luego atendimos a regiones que Choe (1998) había reportado como movimientos no de cuerpo rígido pero sí en grupo. La H1 (residuos 12-22), la H2 (residuos 28-51, el asa 52-72, H4 y el asa 267-272, estructuras que presentan diferentes conformaciones en R y T. Para ello consideramos a las hélices H1, H2 y H4 como un cuerpo rígido, al asa de conexión (residuos 23-27) -desordenada en R y ordenada en T- como otro y al asa 267-272, como otro más. Como en T el asa 52-72 no está presente no se podía utilizar para el empalme.

Se obtuvo un mejor empalme al seleccionar las zonas más pequeñas, obteniendo un rmsd más bajo que al hacerlo con sólo los dominios. Las diferencias más notorias se dieron en las zonas de mayor movimiento -las distancias del empalme eran las más grandes-. Considerando que los residuos de factores B más bajos se encontrarían en los puntos más cercanos al eje de rotación probable, se hizo una superposición de configuraciones instantáneas, que se alternaban para determinar éste eje (Figura 6.3). Se observó que los cambios producidos en un estado con respecto al otro, se daban alrededor de un eje Y (Figura 6.3). Al analizar las coordenadas correspondientes al centro de rotación, coincidieron éstas con aquellas de los C α con factores B más bajos.

En primera instancia, el acercamiento a la división de la proteína en zonas móviles a partir de la distribución de sus factores de temperatura, podría decirnos ya qué grupos seleccionar, sin embargo fue necesario buscar un modelo que precisara estas divisiones de residuo a residuo y en el que se pudiera hacer un avalúo estadístico, como se describe a continuación.

5.3.4 Análisis por grupos pseudo-rígidos para TLS

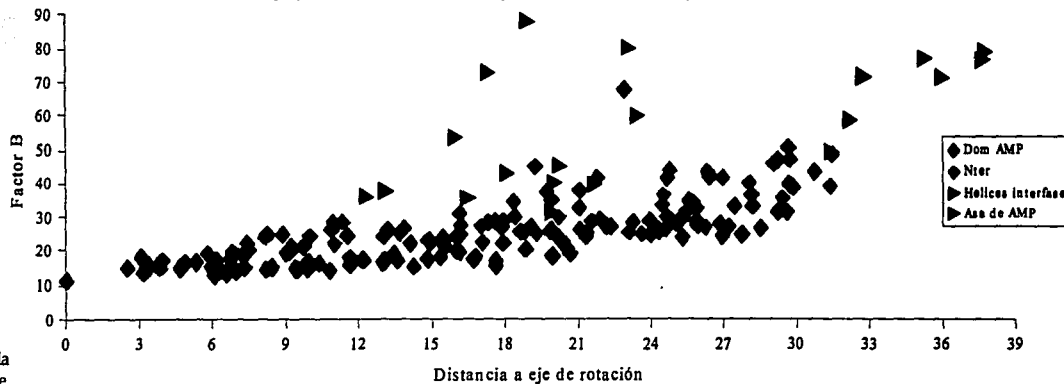
Todas las zonas de movimientos claramente diferenciables por el patrón de distribución de factores B fueron el punto de partida de decisión de los probables grupos pseudo-rígidos, necesarios para la parametrización por TLS.

Para hacer una mejor separación de los residuos que se mueven como grupos se utilizó un modelo sencillo de análisis de las propiedades vibratorias. Este modelo consistió en considerar la distancia entre el eje de rotación¹³¹ y sólo los C α de la cadena principal -suficiente para reconocer movimientos en grupos-, para describir la vibración de cada residuo y su aporte a movimientos grupales. De este modo se asoció a los átomos que tuvieran parámetros de desplazamiento similares²⁰.

¹³¹Sobre como se ubicó este eje de rotación se habla en la sección 5.3

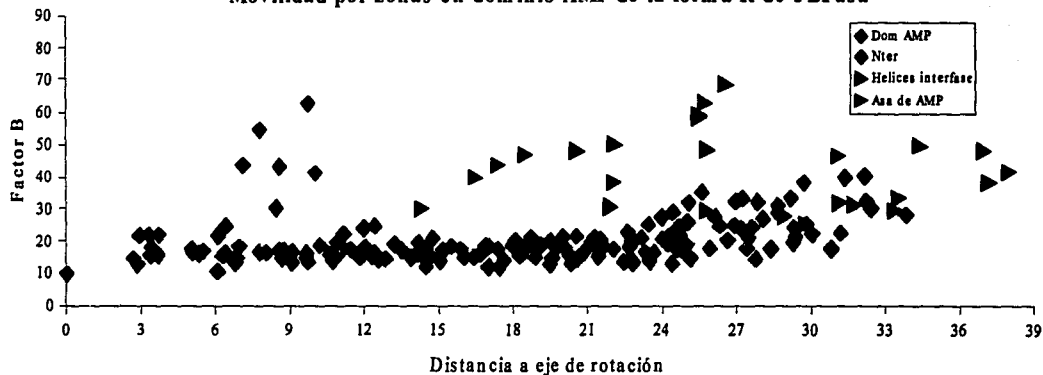
²⁰Sobre las particularidades de este método de selección de grupos pseudo-rígidos se ahonda en la sección 5.3

Movilidad del dominio AMP de la forma T en FBPass



Gráficas 6.4 a y b.
Relación de vibración de
Co-distancia a eje de
rotación. (a) Rotación de
2° entre dominio
AMP: dominio AMP en la
forma T. (b) Rota-ción de
2° entre dominio de
AMP: dominio AMP en
la forma R. En ambas el
comportamiento vibra-
torio se observa al
aumento conforme la
distancia del punto en
vibración al eje, se
incrementa.

Movilidad por zonas en dominio AMP de la forma R de FBPass



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mientras mayor es el radio desde un punto cualquiera a un eje de rotación, mayor es el movimiento que ese punto despliega, en relación a aquellos cercanos al eje rotatorio. Este paradigma permitió reconocer grupos definidos de C α con patrones de movimientos globales similares (Gráficas 6.4 y 6.5). La referencia de la distancia a la que se encuentra cada C α del eje de rotación, brindó información sobre la agrupación de los residuos en las zonas que se seleccionaron previamente como grupos potenciales, de acuerdo a la consideración de dos ejes rotatorios paralelos al eje Y cristalográfico, que corresponden a la rotación de 17° de dímero sobre dímero (Gráfica 6.5.a y b) durante la transformación, y a la rotación de 2° entre dominios (Gráfica 6.4.a y b), respectivamente.

En el dominio de AMP de ambas conformaciones (Gráfica 6.4.a y b) algunos de estos agrupamientos presentaron parámetros de desplazamiento isotrópicos más altos, que los separaba considerablemente del cuerpo de la proteína (puntos azules) aunque la distancia al eje de rotación no fuera tan grande. Otros reflejaron la tendencia de aumentar su vibración conforme crecía la distancia existente ente ellos y el mismo eje. Esta distinción de zonas de movimiento evidenció agrupamientos de algunas de las regiones de mayor vibración de acuerdo al análisis por factores de temperatura. Por otro lado mostró zonas mucho más ruidosas donde no es clara la distinción de grupos.

Para subrayar el hecho de que las vibraciones atómicas de la proteína eran más grande en la zona externa de la proteína, y para recalcar la unidad que pueden conformar ciertos residuos al moverse en conjunto, se hizo una correlación del dominio en cuestión. Se suprimieron de la gráfica tanto las zonas claramente agrupadas como el ruido y se hizo la correlación de los C α dispuestos como un gran grupo "core" de la proteína, es decir el resto del dominio AMP (que no se distingue en grupos separados) o F6P que no correspondía a los movimientos más conspicuos (los de los grupos pequeños).

Para definir movimientos oscilatorios es preciso que la correlación sea parabólica. En este caso una parábola que pasa por (0,10) ajusta los valores vibratorios de los Ca en la forma R y por (0,12) en T, cuando hay una rotación de 17° del dímero 6.5. (Gráfica. Por otro lado las parábolas que ajustan los datos cuando la rotación es de

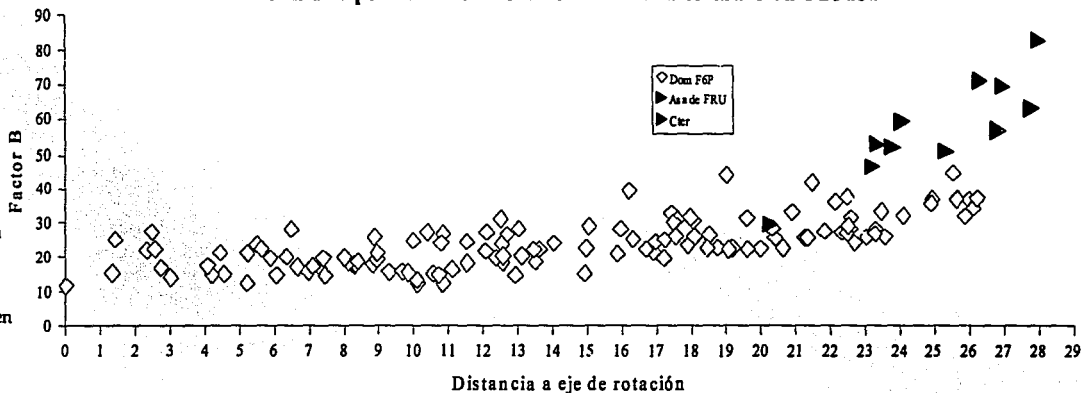
2° en el monómero, pasan por (0,8) en R y por (0,12) en T (Gráfica 6.4.). Esto es un reflejo de la tendencia al aumento del movimiento conforme aumenta la distancia al eje de rotación. Esto nos da información que sugiere al estado T como un estado T oscilante, y nos habla del carácter concertado de los movimientos de esos grupos en la molécula. Las Gráficas 6.4. y 6.5 muestran que ambos conformeros se describen con un componente vibratorio que aumenta hacia la superficie de la proteína (residuos más lejanos al eje). Sin embargo este componente es mucho mayor en ambos dominios de T.

A partir de la distinción de ejes rotacionales que permitió evaluar de manera separada los grupos móviles dependientes de cada uno de ellos, se reconocieron como dominios dinámicos, fragmentos de los dominios funcionales y fragmentos de los dominios estructurales. El seccionar a la proteína de esta manera condujo a la selección de 7 grupos -como señala la banda de colores de la Gráfica 6.4- que se mueven ampliamente y al parecer de manera concertada durante la transformación: el N-terminal (residuos 12-15), el dominio AMP (residuos 72-141 y 148-200), el asa de unión a AMP asociada a hélices de la interfase C1:C4 (residuos 16-71), el asa de unión a AMP que coordina la capa beta (residuos 142-147), el dominio F6P (residuos 201-266 y 274-331), residuos de coordinación en sitio activo (residuos 267-273), y el C-terminal (residuos 332-335).

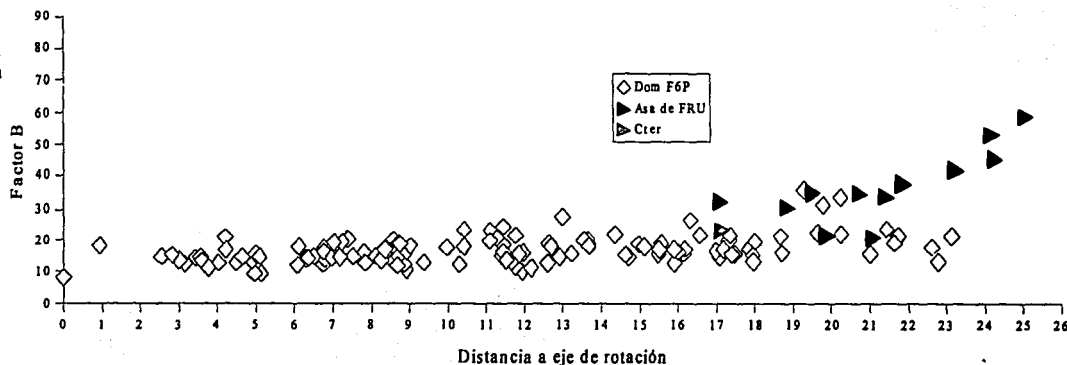
Como podemos observar existen diferencias entre los movimientos mostrados en T y en R que radican en la magnitud de las vibraciones y por lo tanto la ubicación gráfica de cada grupo, sin embargo son distinguibles los mismos grupos.

Por la naturaleza de estos grupos, debida a las vibraciones que son evidentes dentro de ellos y a las conformaciones alternas que presentan algunos residuos esenciales en las comunicaciones interfásicas o de unión a ligantes, no pueden ser considerados como cuerpos rígidos, por lo que se llaman grupos pseudo-rígidos. En este caso podemos ver que estos agrupamientos tienen una lógica biológica o funcional, no sólo son artefactos de convención prudentes para un análisis de movilidad, y tampoco responden únicamente a patrones de plegamiento.

Movilidad por zonas en dominio F6P de la forma T en FBPaSa



Movilidad por zonas de dominio F6P de la forma R de FBPaSa



Gráficas 6.5a y b.
 Relación vibración de
 Co-distancia a eje de
 rotación. (a) Rotación
 de dominios F6P que
 corresponden a la
 rotación de 17° del
 dímero C1C2:C3:C4 en
 T. (b) Rotación de
 dominios F6P que
 corresponde a la
 rotación de 17° del
 dímero C1C2:C3:C4 en
 R. En ambas el
 comportamiento vi-
 bratorio se observa al
 aumento conforme la
 distancia del punto en
 vibración al eje, se
 incrementa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El N terminal, considerado en este trabajo como un grupo pseudo-rígido, ha sido propuesto como un regulador de la estabilidad del asa 52-72¹³². El asa 52-72, como parte del dominio de AMP, es considerada el asa más dinámica de la proteína, presentando dos conformaciones por lo menos, una desenganchada en T y enganchada en R -con claras implicaciones funcionales-. No fue considerada como grupo pseudo-rígido por estar desordenada en el conformero T, y por no ser posible el re-afinamiento en R, sin embargo claramente podría serlo. En el conformero R, el asa se coordina con el sitio activo de la misma subunidad y con las hélices de la interfase, H1 y H2 del dominio AMP de la subunidad vecina, desplegando un papel esencial en la transformación. Ya que las hélices de la interfase C1:C4 -cerca al sitio alostérico- están ampliamente asociadas a la cooperatividad.

Al unirse el AMP, las H1, H2 y H3 rotan 14° como cuerpo rígido, y con ello se consigue una cooperatividad vía la H1 con la interfase C1:C2 -donde se encuentra el sitio activo-, en particular con el asa 267-272. El asa del sitio alostérico 22-27 es la conexión entre H1 y H2 y vibra mucho en R y poco en T influenciando la afinidad por AMP y participando en el despliegue de la cooperatividad producto de la interfase C1:C4. Se considera entonces que las hélices de la interfase H1-H4, el asa 52-72 y el asa del sitio activo 267-272, que presentan diferentes conformaciones en R y T son producto de movimientos concertados.

5.3.5. Afinamiento TLS para la FBPassa

Con estos grupos pseudo-rígidos, con claras implicaciones en los movimientos concertados y cooperativos de la proteína, se pudo hacer entonces, un análisis de la direccionalidad de dichos movimientos a partir de la parametrización por TLS. Era pertinente realizar esta parametrización tanto en T como en R para poder comparar el dinamismo en cada caso. Observar las direcciones de los movimientos en ambos casos permitiría definir si efectivamente se está describiendo el movimiento de la proteína con una clara asociación con la función. Ya que si los movimientos en R se describen en

¹³² Nelson, *et al.*, 2000 (66)

dirección a T o al contrario tendríamos una clara muestra de un posible estado oscilante del cual depende de la transformación.

Sin embargo, aunque se contaba con los factores de estructura de 1cnq (R), éstos pertenecían a un grupo espacial distinto del reportado por lo que no se pudieron utilizar¹³³ y por lo tanto no fue posible evaluar los movimientos en R como un punto de referencia para interpretar T, al cual si se le pudo hacer el afinamiento por TLS.

Con los factores de estructura depositados de 1frp (T) se realizó la parametrización TLS obteniendo los tensores para cada grupo pseudo-rígido. A partir de estos parámetros se realizó el afinamiento con estos grupos tensionados, y se obtuvo un valor de $R=0.14590$ y un $R_{free}=0.1857$, -mucho mejores en relación con aquellos reportados en el depósito de 1frp ($R=0.19$, R_{free} no reportado)- y un $FOM=0.9084$ ¹³⁴. Es decir se logró un mejor ajuste del modelo con los datos experimentales, un acercamiento más realista.

Cuando se hizo el despliegue gráfico por elipsoides anisotrópicos (Figura 6.4) se observaron tendencias de movimiento alrededor de tres puntos de rotación, uno coincidente con el eje de rotación sugerido y los otros dos paralelos a éste, los más evidentes. Estos últimos muestran la rotación de 2° que despliega el dominio AMP con respecto al F6P (Figura 6.4. C). Con respecto al centro de rotación del tetrámero, los movimientos que la sustentan se observan en los residuos de la periferia donde las elipsoides tienen un eje mayor y donde los factores B son más altos (Figura 6.4. A y C).

5.3.6. Interpretación de las vibraciones atómicas en la transición alostérica.

Al desglosar el desplazamiento atómico se observa que las hélices de la interfase muestran los valores de B más bajos y no hay direccionalidad en sus componentes (se representan como esferas isotrópicas). Pero es posible suponer que son la "palanca" para el movimiento rotacional generado alrededor de ellas y que se evidencia por las

¹³³En la sección tal se discute sobre este caso con detalle.

¹³⁴El FOM es el figure of merit y mientras mayor es su valor mejor es la descripción que afinamiento provee.

Análisis vibratorio por Pseudo-grupos rígidos y
afinamiento en **REFMAC TLS**

$R = 0.14590$ y $R_{free} = 0.1857$ y un $FOM = 0.9084$.

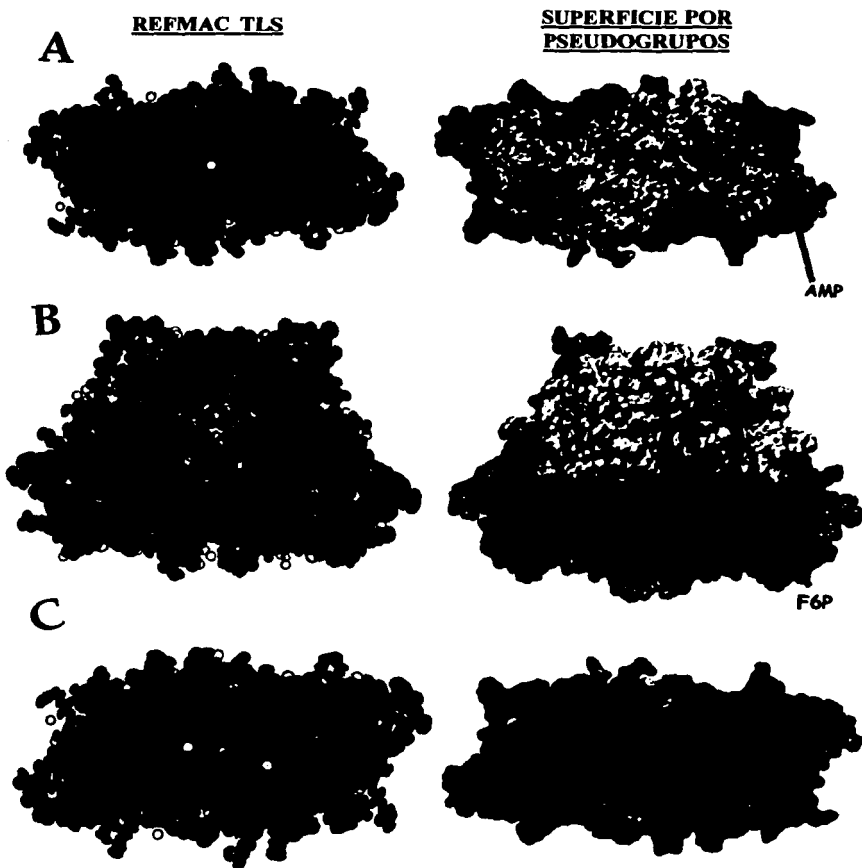


Figura 6.4 Grupos pseudo-rígidos en Fru1,6Pasa forma T y las elipsoides de movilidad que generan. El despliegue gráfico por elipsoides anisotrópicas del afinamiento TLS muestra los puntos alrededor de los cuales la molécula rota. (círculos amarillos). La superficie que muestra los grupos pseudorigidos utiliza el mismo patrón de colores de la gráfica 6.3.3. (A) muestra la parte superior del dímero. (B) Muestra la cara frontal del dímero orientado conforme a su eje Y. (C) Es la interfase C1(C2):C4(C3).

elipses en esa región con factores B intermedios. (Fig.4.C). Estas vibraciones intermedias corresponden a la capa beta antiparalela que separa al dominio AMP del dominio F6P. A esta capa precisamente está conectado el asa superior de unión a AMP (residuos 125-130) que vibra mucho más cuando se une este inhibidor al sitio alostérico, ordenando el asa 22-25. Es decir, el asa de unión se engancha mientras que se ve desplazada otro asa involucrada en el movimiento global. Esta última está considerada dentro del grupo de hélices interfásicas, por presentar un desplazamiento vibratorio pequeño en T. El asa (125-130) es claramente más móvil en este caso (Gráfica 6.4, 6.5.a y Figura 6.4. B), mientras que en R su movilidad está disminuida (Gráficas b de 6.4 y 6.5).

La estabilización del asa 22-27 perturba la posición de H2 desplazándola y con ello las hélices asociadas¹³⁵. Se ha descrito que esta posición favorece el desenganche del asa 52-72 y entonces el sitio de unión a iones metálicos es perturbado. Si estos movimientos se dan de manera concertada como es propuesto, entonces el desenganche del asa, el movimiento de hélices y la distorsión de los sitios de unión a metal se pueden estar dando de manera oscilante, permitiendo mayor flexibilidad en este sitio de metal, lo que podría explicar la unión diferencial de metales a estos sitios y, como resultado, la competitividad del AMP y el Mg^{2+} , los cuales se unen a regiones espacialmente separadas. De hecho Zhang (1994) propuso que había dos vías de alosterismo para esta enzima¹³⁶: una que involucra a la capa beta del dominio AMP como un cuerpo rígido que se ha propuesto, es responsable de la comunicación de sitio alostérico al sitio activo; y otra ruta que involucra a las hélices interfásicas, propagando la información desde el asa 52-72, influenciando la transformación o sólo alterando los sitios de unión a metal. Sin embargo, la estrecha conexión entre el asa 142-149 afectada por la unión de AMP, a la capa beta y la estrecha relación del asa 22-27 que se estabiliza con el AMP, a las hélices, puede sugerir la posibilidad de que estas dos vías se influyeran de manera concertada.

Adicionalmente, parte de la capa beta, los residuos 166-170 de conexión entre dominios AMP1:AMP2 son claramente alterados durante la rotación de 2°

¹³⁵ Choe, *et al.*, 1998 (17)

¹³⁶ Zhang, *et al.*, 1994 (113)

intramonomérica¹³⁷ y como podemos ver en la gráfica 6 tienen una mayor vibración en T que en R, aunque ésta no sea considerablemente de la misma magnitud que la vibración de aquellos que seleccionamos como grupos rígidos. Esta zona se desordena junto con el asa en la zona interdominio 50-53. Esta particularidad refleja que estas dos vías propuestas como distintas alternativas de propagación del movimiento pueden estar asociadas más que ser excluyentes.

¹³⁷ *Idem*

6.4 El caso de la Triptofano Sintetasa

6.4.1 Caracterización de la enzima

La triptofano sintetasa (TRPasa, EC 4.2.1.20) es una enzima alostérica bifuncional que cataliza los últimos dos pasos de la biosíntesis del triptofano. Es un tetrámero lineal $\alpha\beta\alpha^{140}$ dependiente de piridoxal -5-fosfato (PLP). La subunidad α produce indol y gliceraldehido-3-fosfato (G3P) utilizando indol-3-glicerol-fosfato (IGP) como sustrato, en la llamada reacción alfa. La subunidad β por su lado realiza la reacción beta, donde el indol se condensa con la serina, gracias a la unión de PLP y se forma el triptofano. El indol pasa por un túnel hidrofóbico -de 25 Å de longitud- desde el sitio activo α al β en un proceso de canalización sin difusión libre por solvente. Se han realizado muchos estudios en la dirección de interpretar el papel que esta canalización juega en la regulación metabólica y modulación celular de actividades enzimáticas¹⁴¹; así como otros que refieren su importancia en la transmisión de información durante la transformación alostérica¹⁴². En el caso de la TRPasa la canalización previene la pérdida de intermediarios por membranas celulares y regula alostéricamente y en sincronía las dos reacciones que se dan en esta enzima¹⁴³.

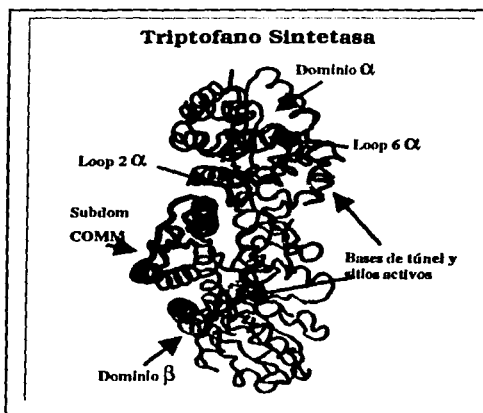


Figura 6.5. Estructura tridimensional de la TRPasa. Se muestra en un patrón de colores regiones de importancia en la función biológica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

¹⁴⁰ Esta nomenclatura nada tiene que ver con el plegamiento de estructura secundaria que presenta la estructura

¹⁴¹ Pan, *et al.*, 1997. (72), Weyand, *et al.*, 1999 (d)

¹⁴² Pan, *et al.*, 1997. (72), Marabotti, *et al.*, 2001 (51)

¹⁴³ Weyand, *et al.*, 2000 (104)

Recientemente han habido avances notables en la explicación de los fenómenos que suceden en la TRPasa. Aún no están esclarecidos muchos aspectos de su función, incluyendo las particularidades de su transformación alostérica. Sin embargo hasta el momento se sabe que el alosterismo de la TRPasa -y en enzimas que presentan reacciones diferentes moduladas por un túnel- se explica en primer lugar, por la sincronización de sus reacciones. Esta última se debe a la influencia de ligantes en el sitio activo α en la afinidad por serina y en la distribución de los intermediarios formados en el sitio activo β durante la unión y reacción de serina-piridoxal. Por otro lado, se sabe que por la unión y división del IGP, se permite la transferencia del indol por el túnel hasta que se forme un intermediario aminoacrilato en el sitio β . Este intermediario representa un pivote de la transformación alostérica entre subunidades. El aminoacrilato, al ser producido irreversiblemente, previene la acumulación de indol en el túnel o en el sitio β permitiendo un flujo rápido por el canal.

Topológicamente, la subunidad α es una barril típico α/β de 8 hebras, con el amino terminal unido al lado opuesto de la localización del sitio activo. Presenta un asa ($\alpha L2$) que une $\alpha S2$ y $\alpha H2$ y un asa ($\alpha L6$) entre $\alpha S6$ y $\alpha H6$ ¹⁴⁴, ambas de importancia alostérica¹⁴⁵. Por otro lado, la subunidad β presenta un plegamiento típico de las enzimas dependientes de PLP: consiste en dos dominios similares relacionados por una pseudodiada. Consta de tres capas $\alpha/\beta/\alpha$ y una capa beta paralela de 4 hebras¹⁴⁶. Hyde (1999) separó esta subunidad en dominios N-terminal (β 1-204) y C-terminal (β 205-397)¹⁴⁷. Rhee incluyó un tercer dominio de la subunidad β que se vio, permanecía independiente al resto del monómero: el dominio COMM (β 102-189)¹⁴⁸ (Figura 6.5). Éste último, participa en la apertura del túnel y por lo tanto también es de importancia en la transformación alostérica¹⁴⁹.

La clave de la interacción alostérica entre α y β es la cerradura del dominio COMM. Este se abre para unir sustratos con alta afinidad y se cierra durante la

¹⁴⁴ La nomenclatura empleada para describir cada estructura secundaria precedida por un a o un b corresponde a si pertenecen a la subunidad a o b y no tiene que ver con el plegamiento en sí.

¹⁴⁵ Schneider, *et al.*, 1998 (88)

¹⁴⁶ Topología según SCOP

¹⁴⁷ Hyde, *et al.*, 1999 (34)

¹⁴⁸ Rhee, *et al.*, 1997 (78)

¹⁴⁹ Schneider, *et al.*, 1998 (88)

catálisis. Para que se dé esta interacción entre la subunidad α y β , se ha señalado que es importante el orden concomitante de α L2 y α L6 al unirse el IGP¹⁵⁰, y que los dominios estructurales y dinámicos involucrados en la cerradura de los sitios y el túnel despliegan movimientos en fase¹⁵¹. En esta sincronización de las interacciones alostéricas, el túnel y la unión de cationes monovalentes al sitio β , juegan un papel preponderante, ya que el primero acopla las reacciones en los extremos de la enzima, y la segunda contribuye a desencadenar los movimientos del dominio COMM y de otras regiones flexibles¹⁵².

Existen tres estados conformacionales identificados. Un estado sin ligantes inactivo con los dos sitios abiertos, un estado activo cerrado, y un tercero parcialmente cerrado de baja afinidad en ambos sitios¹⁵³. Se ha propuesto que los fenómenos alostéricos involucrados en estos cambios conformacionales se suceden del estado abierto al cerrado. En la forma abierta, capaz de unir al sustrato IGP en el sitio α , el asa α L6 se coordina con el dominio COMM separándolo de la subunidad β . Durante la transformación uno de los primeros componentes es el cierre del asa flexible α L6 sobre el sitio α . Esto origina que el α L2 se desplace y cierre el túnel. Entonces el asa α L2 hace contactos con la β H6 moviendo al dominio COMM y así afecta la afinidad en el sitio β ¹⁵⁴. Cuando se une el PLP en el sitio β se modula la formación de indol en el sitio α y su paso por el túnel. El indol no va al sitio β hasta que el intermediario se haya formado ahí y así se previene la acumulación del mismo. Así también se modula la formación del aminoacrilato en el sitio β . Cuando el intermediario se forma es comunicado al sitio α y se acelera la ruptura de IGP. Rhee propuso que ambos sitios α y β debían estar ocupados para que el asa α L6 se cierre.

Debido a la coordinación necesaria entre las reacciones que se suceden a 25 Å una de otra en la TRPasa y el control necesario para la canalización, esta enzima es ideal para estudiar las interacciones alostéricas de efectos distantes.

¹⁵⁰ Weyand, *et al.*, 1999 (d)

¹⁵¹ Pan, *et al.*, 1997. (72),

¹⁵² *Idem*, Ro, *et al.*, 1999 (81)

¹⁵³ Weyand, *et al.*, 1999 (d)

¹⁵⁴ Rhee, *et al.*, 1997 (78), Weyand, *et al.*, 1999 (d), Schneider, *et al.*, 1998 (88)

6.4.2. Evaluación y selección de estructuras de TRPasa

¿Por qué seleccionar esta enzima con un mecanismo alostérico tan complejo, para un análisis como el que se ha de realizar aquí? La primera razón es que representa un sistema muy útil para la investigación de relaciones entre estructura y función¹⁵⁵, sobre todo como ejemplo de los efectos alostéricos de efectos a distancia, como el que se da por la coordinación de las dos reacciones en sitios tan alejados dentro de la enzima.

En segundo lugar porque la TRPasa, por estas características que despiertan nuestro interés, ha despertado también el de otros, y en los últimos años se han realizado varios estudios sobre su estructura y los aspectos funcionales de ésta. De esta manera se cuenta con una gran cantidad de estructuras determinadas de muy buena calidad. Esta es una situación inusual en el caso de proteínas alostéricas, las cuales han sido parcialmente olvidadas como objetos de estudio estructural. La mayoría de las proteínas alostéricas, sobre todo los ejemplos clásicos -como reflejan las tablas DIPA-, presentan estructuras determinadas a resoluciones no mayores a 2.0 Å y sin el reporte de todas los demás parámetros estructurales.

Existen muchos estudios que han descrito la regulación alostérica de esta enzima destacando aspectos que sugieren una cooperatividad negativa y un intercambio continuo de estados¹⁵⁶. Según el modelo de Koshland¹⁵⁷, en algún momento de la regulación, cuando la energía de interacción aumenta infinitamente, la transición adquiere un aspecto concertado que sigue el modelo MWC. A partir de este supuesto, se asumió que los estados cerrado y abierto corresponderían a un estado R y T respectivamente, no híbridos. Esta suposición, es válida debido a que el análisis de flexibilidad a realizar aquí, se concentra en la evidencia de los movimientos de un estado observado al otro, ambos con propiedades funcionales importantes. El asumir una transformación monodiana ayuda a explicar las propiedades dinámicas en este caso. Por lo tanto la búsqueda de estructuras se concentró en hallar estas conformaciones.

¹⁵⁵ Ro, *et al.*, 1999 (81)

¹⁵⁶ Millar, *et al.*, 1998 (57)

¹⁵⁷ Revisar sección marco teórico sobre este modelo alostérico.

PDB-ID	RES (Å)	R	R _{free}	INT	DAT/PAR	No. REFLE	F.S	G. ESPA	U ASIM
<i>F. abierta</i>									
<i>1qoz</i>	1.9	0.17	0.18	95	4.55	133915	1	C 1 2 1	A,B;
<i>F cerrada</i>									
<i>1qop</i>	1.4	0.15	0.18	95	4.55	133915	1	C 1 2 1	A,B;

Tabla 6.4 Tabla DIPA de estructuras PDB de Triptofano sintetasa seleccionadas para el estudio

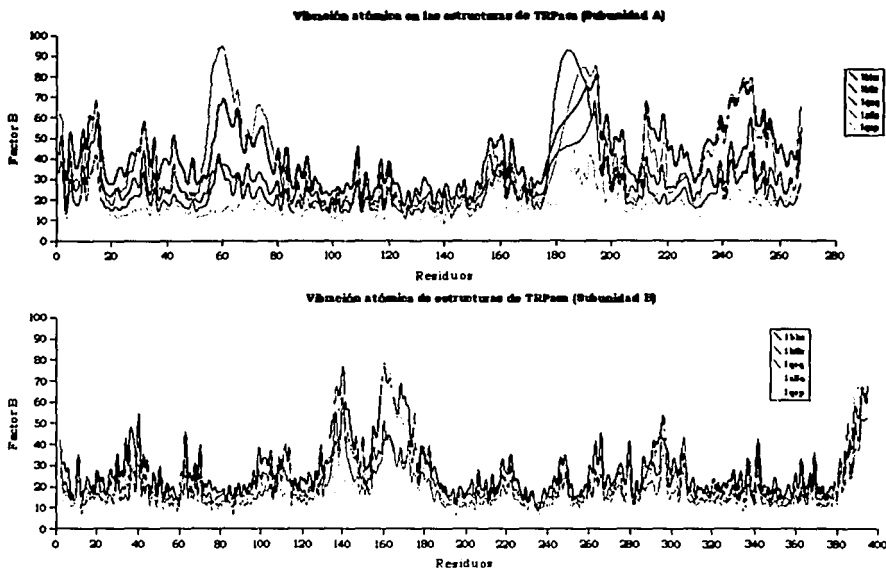
De acuerdo a las características cristalográficas de cada estructura revisada, la selección entre los depósitos en este caso fue más complicada. Muchos de ellos podrían haber sido considerados buenos objetos de estudio (ver Gráfica 6.1 y Tabla DIPA-B). La elección se basó en la comparación de estructuras con los mismos ligantes tanto en sitio α como en β , o por la ausencia de estos, así como por la consideración de las mutantes, y cuales podrían explicarnos según los reportes de la literatura un comportamiento cinético acorde con un estado R y uno T monodianos.

En primera instancia se contaba con dos estructuras con excelentes parámetros cristalográficos que representaban dos conformaciones distintas: la forma semi-abierta con clave 1qoz y la forma cerrada, con código 1qop, afinada anisotrópicamente¹⁵⁸. Se consideró a 1qoz como forma semi-abierta por ser una forma activa según la literatura y por su comportamiento vibratorio en la distribución de factores B (Gráfica 6.6.a y b), mucho menor con respecto a 1a5a (forma abierta). Aunque como se puede ver en la tabla 6.IV hay un espectro de estructuras con buenas características entre estas dos señaladas. Se seleccionó a 1qop por estar afinado anisotrópicamente, lo que permitió a sacar los factores B isotrópicos indirectamente y evaluarlos en la distribución de factores B. De esta forma se determinó que se trataba de la forma más cerrada de todas¹⁵⁹ (línea amarilla Gráficas 6.6a y b).

¹⁵⁸ Recordemos que los factores de temperatura anisotrópicos están separados en sus componentes direccionales y por lo tanto son muy distintos de aquellos isotrópicos que fueron utilizados en este primer análisis vibratorio

¹⁵⁹ Se hablará más a profundidad sobre este método de obtención de factores B isotrópicos en sección 6.4.5

$\alpha 50$ – $\alpha 80$ y $\alpha 170$ – $\alpha 200$. Estas zonas corresponden a las estructuras más móviles que conforman a ésta subunidad, y que están muy involucradas en el control de la canalización, en la comunicación entre subunidades y por lo tanto en la transformación alostérica¹⁶⁰: el asa $\alpha 2$ y el asa $\alpha 6$.



Gráfica 6.6a y b. Distribución de factores B isotrópicos en la secuencia de residuos en las estructuras seleccionadas. (a) corresponde a la subunidad α y (b) a la subunidad β . El patrón vibratorio en todas las estructuras es muy similar, las diferencias se hacen notar en los residuos 55-80 y en 135-185. Lo que sugiere distintos estados conformacionales.

La estructuras con código 1a5a y 1bks (formas abiertas) presentan vibraciones muy similares en estas zonas. Sobre todo en el asa $\alpha L2$ se distingue una clara diferencia en la amplitud entre estas tres (60 – 90 \AA^2) y 1k8z y 1qoq (30 – 40 \AA^2), donde el asa está estabilizada. El asa $\alpha 6$ está desordenada en todas las estructuras lo mismo que una tercera región (residuos $\alpha 230$ – $\alpha 255$), la $\alpha H13$. Esta primera evaluación condujo a suponer que 1a5a y 1bks representan formas más abiertas que 1qoq y 1k8z.

Por la evaluación *a posteriori* de los factores B isotrópicos de 1qoq, se determinó que éste depósito era la estructura menos vibrante de todas, lo que coincide con su

¹⁶⁰ Rhee, et al., (1998) (e)

forma cerrada, estabilizada, donde sólo el α L6 presenta valores vibratorios más pronunciados.

En la subunidad β , la situación es distinta y sólo se observa una región grande muy móvil, donde 1bks y 1a5a presentan factores B de entre 65-85 Å² mientras que 1k8z y 1qoq están disminuidos a 40-50 Å² pero aún así son altos (Gráfica 6.6.b). Esta zona, que más que moverse en amplitudes muy grandes, refleja un movimiento de una zona muy grande de la proteína, correspondiente a los residuos β 102- β 189, el denominado dominio COMM. Las primeras dos estructuras corresponden a un estado totalmente abierto, es decir tanto los sitios activos α y β , como el túnel, están expuestos. 1a5a y 1bks con PLP y K⁺ o Na⁺ respectivamente como ligantes. En contraparte, en 1qoq y 1k8z, este dominio sólo está cerrando el sitio β pero no el túnel, el cual sólo está siendo obstruido por el asa α L2. Se supuso entonces que representaban estados parcialmente abiertos. Comparativamente, en 1qop, la vibración del dominio COMM es de la magnitud del resto de la proteína, mostrando la estabilización completa de éste dominio.

Hay estudios¹⁶¹ que demuestran la importancia de la unión de cationes monovalentes en los efectos alostéricos de esta proteína, asociados de manera importante a la comunicación. Los sitios de unión a iones metálicos se encuentran en la base del dominio COMM, por lo que este se ve afectado por esas uniones. Es notable que la unión de estos cationes en la subunidad β pueda comunicarse a la subunidad α , alterando las conformaciones del asa α L2 principalmente y de la zona α 230- α 255. Esto se da principalmente por medio del dominio COMM¹⁶².

A partir del análisis de factores de temperatura puede observarse que las mayores diferencias son debidas a la unión de los cationes. En el asa α L2 la TRPasa con Na⁺ y PLP presenta una vibración significativamente menor que en la que tiene K⁺ y PLP. Lo que resalta la importancia de la unión de estos iones metálicos es que en la TRPasa con K⁺, PLP y el sustrato IGP el comportamiento vibratorio del asa α L2 es el mismo. Contrastando con esto se ve que el IGP sí provoca que la zona α 230- α 255 se

¹⁶¹ Woehl, *et al.*, 1999 (111)

¹⁶² *Idem*, Weyand, *et al.*, 1999. (103), Weyand, *et al.*, 2000. (104)

estabilice, mostrando en esta zona una vibración similar a la que presentan 1k8z y 1qoq. En 1qoq, por su lado, el sustrato provoca la estabilización de $\alpha 230-\alpha 255$, así como del $\alpha L2$, mientras que el Na^+ provoca sólo una disminución en la vibración de $\alpha L6$, pero no se estabiliza completamente. Mientras esto sucede en la subunidad α , en la β , se hace notar más claramente el efecto del sustrato o de su análogo, ya que las dos estructuras, que sólo presentan el PLP y un catión metálico, muestran una vibración baja en el dominio COMM (entre 60 y 70 Å²), en comparación con la de aquellas que tienen el PLP y el K^+ unidos y que describen una vibración de entre 80-90 Å². En 1qoq se presenta la menor vibración en esa zona (15-30 Å²).

Bajo estas circunstancias el asa $\alpha L6$ no presenta diferencias significativas en ningún caso, por lo que se cree que el IGP no tiene efecto en esas zonas como el que tiene en el asa $\alpha L2$ donde 1k8z y 1qoq muestran la cerradura parcial del túnel, y 1qoq la cerradura total de dicho canal.

En FBPasa las regiones móviles están asociadas con las regiones de unión tanto del sustrato como del inhibidor alostérico y, dependiendo de lo que se una en un sitio específico, la vibración de una estructura móvil asociada a ese sitio en particular, se verá afectada. Es importante señalar que en este caso sucede lo contrario: el pegue o despegue del sustrato, de cofactores iónicos o PLP, a los sitios activos tanto α como β , o cercanos a éste tienen efectos de amplio espectro. Los cuales se evidencian en este estudio de vibraciones atómicas.

El que todas las estructuras incluidas en este análisis presenten vibraciones sin diferencias significativas en el asa $\alpha L6$ puede deberse a que la función principal de ésta es la comunicación entre las subunidades, y que por lo tanto algunos de los movimientos implicados en la transformación, no sean concertados. Cuando se hace el empalme de las diferentes estructuras, se observa que el principal contacto del dominio COMM es con el asa $\alpha L2$, mostrando en la distribución de factores B relaciones en concierto de cierre y apertura. Del mismo modo se correlacionan las vibraciones amplias de $\alpha L2$ con las elevadas de $\alpha L6$ en las formas abiertas. Es decir, si el asa $\alpha L2$ se abre $\alpha L6$ lo hace también, y si $\alpha L2$ se cierra lo mismo ocurre con $\alpha L6$. Sin embargo,

cuando la unión es del Na^+ (1bks) esta concomitancia se perturba y cuando el asa αL2 se estabiliza cerrándose, el asa αL6 se desestabiliza abriéndose, ocasionando el anclaje del dominio COMM a la subunidad β .

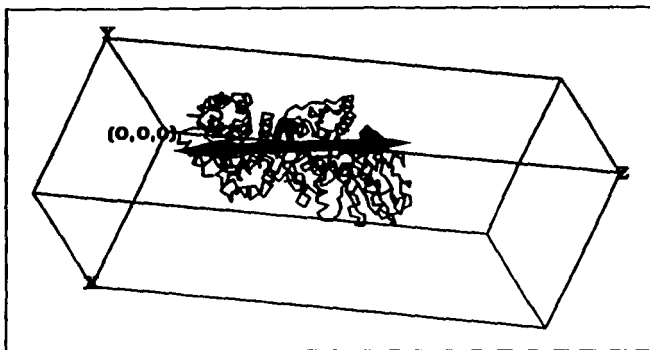


Figura 6.8 Ubicación del eje de rotación Z en TRPasa a partir de la celda unitaria. Representa el dímero de TRPasa en "O" que corresponde a la unidad asimétrica, en una celda unitaria de simetría $C_{2,2,2}$. La unidad funcional corresponde a un dímero de la molécula representada. La flecha naranja señala la orientación del eje de rotación que se da durante la transformación (flecha verde).

Las estructuras con Na^+ y PLP también se representan por 1k8z¹⁶³, 1qoq y 1qop, todas con sustratos distintos. Las dos primeras presentan un comportamiento muy parecido, y al no ser mutante 1qoq se optó por considerar a esta estructura como la referencia del estado semi-abierto. En este último, todas las regiones móviles se estabilizan y se ve un desorden del asa αL6 asociada probablemente al pegue del Na^+ .

Como las estructuras con código de registro 1a5a y 1bks, presentan desplazamientos muy similares puede escogerse la mejor afinada para explicar la conducta sin ligantes. Aunque las estadísticas del afinamiento dependen mucho del programa con que fue realizado, el comportamiento vibratorio casi no cambia. Entonces, de acuerdo a la información en la tabla-DIPA B se consideró a la 1a5a como explicatoria de este fenómeno más abierto.

6.4.4 Análisis por grupos pseudo-rígidos

Como se ha señalado a lo largo de la sección, las regiones de vibraciones amplias observadas en la distribución de factores B corresponden a regiones de la proteína esenciales en la transformación alostérica, en la catálisis y en la coordinación de las

¹⁶³ Esta estructura presenta una mutación en

reacciones α y β . Es con base en estas zonas relevantes que se hizo la predicción de dominios dinámicos que pudieran fungir como grupos pseudo-rígidos.

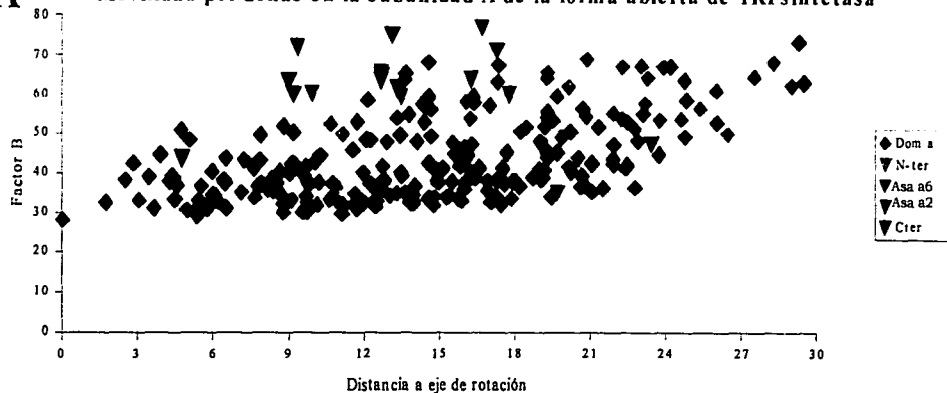
Para precisar los límites de cada una de las zonas descritas y alrededor del cual se da la transformación alostérica, se procedió de la misma forma que en la FBPasa. Se ubicó el eje de la transición en un eje Z como muestra la Figura 6.6.

Al distinguir las vibraciones diferenciales de los C α en relación a la distancia que los separaba del eje sugerido de transformación, las únicas estructuras que dibujaban agrupamientos más definidos de ciertos grupos concordantes con nuestra preselección, fueron el estado más cerrado 1qoq y el estado más abierto 1a5a. Entonces fueron en estos en los que se basó el análisis por grupos pseudo-rígidos. Estos nos dieron evidencia sobre el comportamiento de dominios dinámicos importantes en los cambios conformacionales de estados discretos de la proteína.

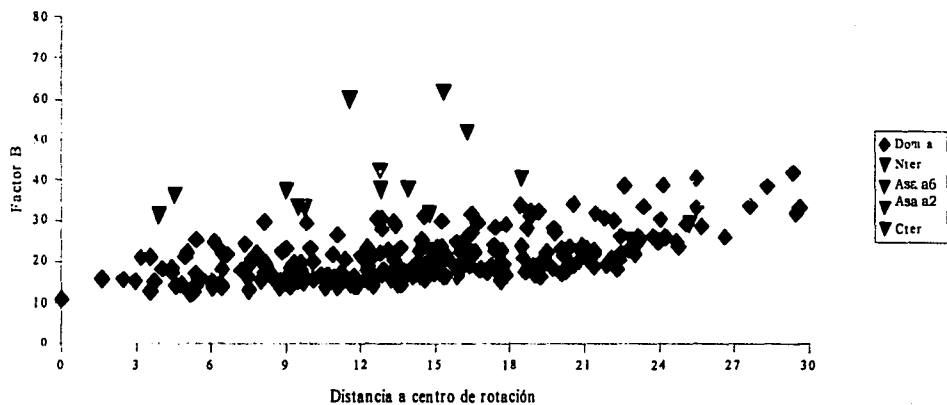
Cuando se hicieron las relaciones de C α -distancia al eje, en la subunidad α de 1qoq (Gráfica 6.7.b), se observó un comportamiento global predominantemente único, es decir, la vibración sí refleja un aumento conforme los C α están más alejados del eje, pero es toda la proteína en general como un sólo grupo. Sólo algunos puntos se separan de este comportamiento global, y corresponden a las bisagras del asa $\alpha 2$ y $\alpha 6$. Pero la mayor parte de estos grupos que conforman a la proteína, en este estado se ven anclados al cuerpo del monómero. Como resultado, la vibración descriptora del movimiento de la subunidad α se restringe a los valores del cuerpo general de dicho monómero. Cabe aclarar que aunque se de esta tendencia al aumento en la magnitud de la vibración, ésta no es muy grande debido a que la proteína se encuentra en su estado más estabilizado.

Nuevamente era preciso encontrar correlaciones parabólicas en las gráficas, que definieran movimientos oscilatorios; sin embargo, en algunos casos (Gráfica 6.7b y 6.8b) una recta ajusta mejor los datos en el estado semiabierto de esta proteína. Ésto aunque sí refleja una tendencia al aumento del movimiento conforme aumenta la distancia al eje de rotación, el que no sea una parábola clara puede deberse a una

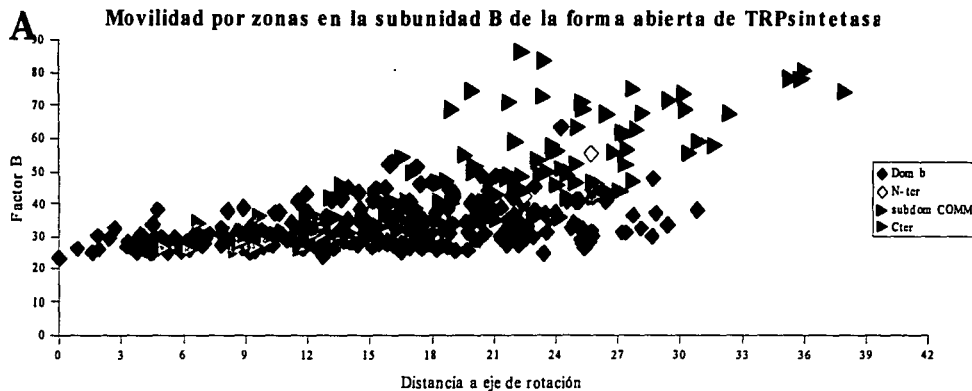
A Movilidad por zonas en la subunidad A de la forma abierta de TRPsintetasa



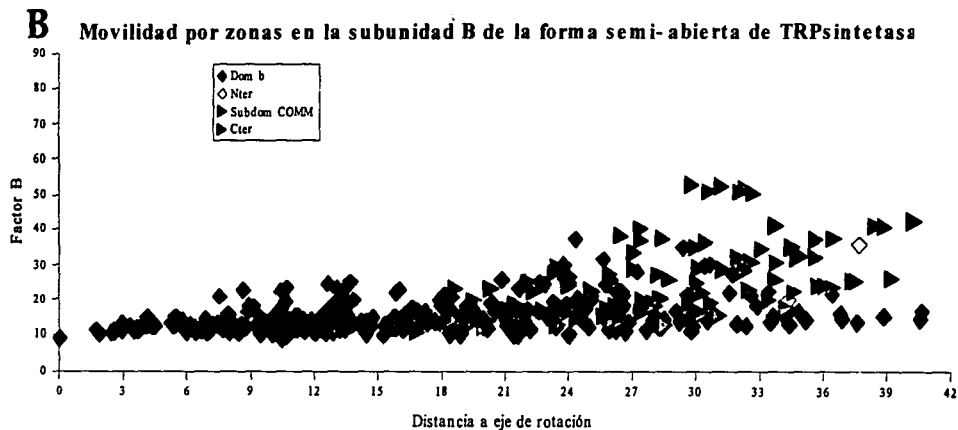
B Movilidad por zonas en Subunidad A en la forma semi-abierta de TRPsintetasa:



Gráficas 6.7a y b. Relación vibración de α -distancia al eje de rotación en la subunidad α de la conformación abierta y semi-abierta. (a) y (b) La conformación abierta muestra mayor vibración que la semi-abierta. La subunidad α presenta una tendencia parabólica que refleja su comportamiento oscilante.



Gráficas 6.8a y b. Relación vibración de Co-distancia al eje de rotación en la subunidad β de la conformación abierta y semi-abierta. (a) y (b) La conformación abierta muestra mayor vibración que la semi-abierta. La subunidad β presenta una tendencia parabólica que refleja su comportamiento oscilante en la forma abierta, mientras que en la semi-abierta no se percibe un aumento significativo en la vibración.



6-XVIII

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

subvaloración de los factores B que provoca que la oscilación sea menor y por lo tanto se linearice. También puede deberse a una mala selección de grupos o a que efectivamente hay una disminución significativa de la oscilación en el estado semiabierto que contrasta con la oscilación más pronunciada de la forma abierta. Por otro lado ambas tendencias pueden sugerir que los movimientos de esos grupos en la molécula son de carácter concertado.

En el estado abierto 1a5a, el comportamiento es muy similar al que se observa en la forma menos abierta 1qoq pero de mayor magnitud, sugiriendo que las vibraciones de los asas no difieren significativamente de un estado a otro, pero que la movilidad del monómero completo es más representativo de los desplazamientos de transformación de la proteína, que conciernen a la subunidad α (Gráfica 6.7.a y b)

En lo que respecta a la subunidad β , en el estado semi-cerrado, el dominio COMM se distingue como un agrupamiento aparte del cuerpo global de la subunidad, aunque este dominio sugiere un movimiento conjunto con toda la subunidad β , evidenciando la cerradura en la que está implicado (Gráfica 6.8.b), donde el COMM permanece todavía anclado, cerrando solamente el sitio β y no el túnel. En comparación, la forma abierta presenta un aumento de los parámetros de desplazamiento marcado del dominio COMM con respecto al cuerpo de la subunidad β , representado por un levantamiento de este dominio en aquellos residuos más alejados del eje de rotación, con respecto al cuerpo de la subunidad, la cual muestra vibraciones globales de mayor magnitud que las que se observan en la forma semi-cerrada. Esto debido a la abertura que se da en este caso y la cual está influenciada por la unión del potasio (Gráfica 6.8.b).

De estos análisis se distinguieron a partir de su información vibratoria, tres grupos pseudo-rígidos a considerar para el afinamiento con TLS. La subunidad α completa constituyó un sólo grupo, sobre el argumento de que, en los dos estados analizados aquí, las bisagras de los asas $\alpha L2$ y $\alpha L6$, no mostraban comportamientos

vibratorios tan disímiles, y en los que además sus estructuras no estaban modeladas¹⁶⁴. La subunidad β por su lado se dividió en los dos grupos ya sugeridos por la literatura: el dominio COMM y el resto de la subunidad β .

6.4.5 Afinamiento TLS para la TRPasa.

La distinción de dominios dinámicos como grupos pseudo-rígidos permitió hacer la parametrización TLS para esta enzima. El proceso de los re-afinamientos fue distinto que lo realizado con la FBPasa. En este caso se partió del análisis de 1qop -afinada anisotrópicamente- y de su contraparte 1qoq -afinada isotrópicamente-, en la cual se basó la diferenciación de dominios dinámicos.

Al trabajar con la 1qoq, procedió el afinamiento primero calculando los parámetros TLS para cada grupo con REFMAC TLS. Subsecuentemente se hicieron 15 ciclos de minimización de máxima similitud con REFMAC 5 para ajustar el modelo a partir de los nuevos parámetros obtenidos. Esto brindó un ajuste mucho mejor que el reportado inicialmente por Weyand, et al., (1999). El R y el R_{free} con que fue reportada esta estructura correspondían a valores de 0.17 y 0.21 respectivamente. Mientras que el afinamiento TLS permitió obtener un ajuste mejorado del modelo de la enzima con un valor de $R=0.16$ y un $R_{free}=0.20$.

En el caso de la estructura con código 1qop, como ya se contaba con el afinamiento direccional (Figura 6.7) se utilizó esta referencia como comprobatoria de las ventajas de utilizar un afinamiento TLS, cuasi-anisotrópico. Es decir, el procedimiento se hizo en sentido inverso. Se obtuvieron de este afinamiento los valores isotrópicos de 1qop y se hizo un afinamiento de estos, aplicando distintos ciclos de minimización con CNS1.0. Se obtuvieron valores de R y R_{free} más altos ($R=0.21$ y $R_{free} = 0.22$) de los reportados por el afinamiento anisotrópico inicial ($R=0.15$ y $R_{free} = 0.18$) (Figura 6.7.a) como se esperaba. Posteriormente, a partir de los valores isotrópicos obtenidos, se calcularon los parámetros TLS considerando los mismos grupos que para

¹⁶⁴ Debido a que en el mapa de densidad electrónica estas zonas no presentaban densidad para crear un modelo de ellas.

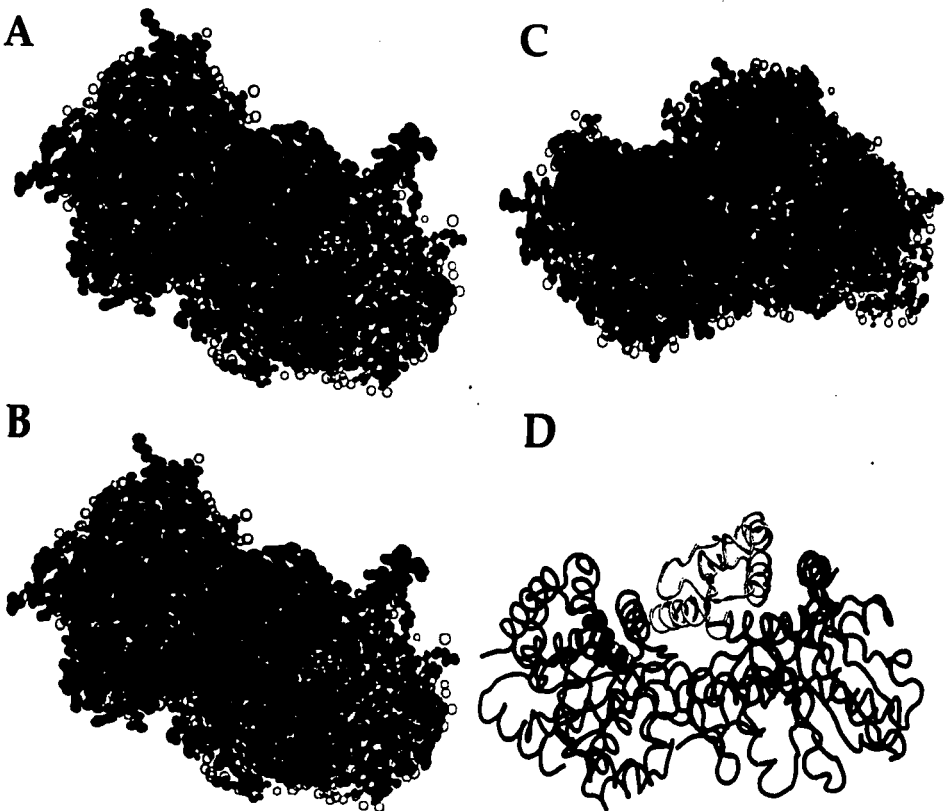


Figura 6.9.a-d Grupos pseudo-rígidos en TRPasa y los elipsoides de movilidad que generan. El despliegue gráfico por elipsoides anisotrópicos del afinamiento TLS muestra los movimientos más conspicuos con relación al eje de la transformación. (a) y (b) Muestran la movilidad en la forma cerrada y semi-abierta (respectivamente) desde la perspectiva trasera o inferior al túnel. (c) Muestra la movilidad de la forma semi-abierta, cuyos desplazamientos son más marcados en el dominio COMM (elipsoides rojas con el eje mayor orientado en el sentido de la transformación) (perspectiva paralela al túnel). (d) Representación de los grupos pseudo-rígidos seleccionados en este caso. En rojo, la subunidad b; en azul la subunidad a y en amarillo el dominio COMM.

1qoq, en busca de un mejor afinamiento que el isotrópico, por incluir elementos de direccionalidad en la determinación del modelo, pero que el ajuste anisotrópico inicial fuera mejor. Los valores de R y R_{free} obtenidos por REFMAC TLS fueron $R=0.18$ $R_{free}=0.20$ (Figura 6.7.b y c) mejores valores que el afinamiento isotrópico, pero no tan cercanos a los anisotrópicos. Ésto hizo suponer que se había realizado una mala selección de grupos que impedía que los tensores TLS ajustaran como los anisotrópicos. Al analizar el gráfico de elipsoides en la que se hicieron TLS se vió que presentaba zonas con mayor oscilación que no habían sido seleccionadas en la primera separación de grupos (Figura 6.7c (zona en círculo)). Sobre estas premisas, según las Gráficas 6.7 y 6.8, puede suponerse que efectivamente las asas $\alpha 2$ y $\alpha 6$ podrían conformar un grupo pseudo-rígido, así como el C-terminal de la subunidad β (Figura 6.7c (zona en círculo)).

Este análisis reflejó que el incluir la información vibratoria direccional en los ajustes para la determinación de estructuras protéicas es muy importante, ya que se construye un modelo más real de las mismas. Una manera de hacer evidente la contribución de la dirección de las vibraciones en la transformación alostérica es el despliegue visual de las elipsoides anisotrópicas (Figura 6.7.c)

Con los parámetros de desplazamiento isotrópicos calculados en 1qoq fue posible evaluar la distribución de estos factores B y contrastarla con las otras estructuras estudiadas (Gráfica 6.6.a y b). Como se observa en la gráfica, representa el estado más cerrado, contrario a las suposiciones hechas en un inicio. Así se tuvo información vibratoria de los tres estados conformacionales: de la forma cerrada 1qoq y la forma semi-abierta 1qoq con componentes direccionales, y la caracterización de la oscilación (gráficas de $C\alpha$ -distancia al eje) de 1qoq y de la forma abierta 1a5a. De ésta última no se contaba con los datos experimentales para un re-afinamiento por TLS y por lo tanto no se obtuvo la información direccional del movimiento en este caso.

6.4.6. Interpretación de las vibraciones atómicas en la transición alostérica.

La descripción direccional de las formas semi-abierta y cerrada que se obtuvo de los TLS no fue tan esclarecedora de la transformación alostérica como lo fue la obtenida

del análisis de la FBPasa, debido a la complejidad de los fenómenos alostéricos de TRPasa. Sin embargo nos brindó información importante sobre los mismos.

Los movimientos que sugiere la visualización de las estructuras 1qoq y 1qop responden a una regulación alostérica complicada. Sin embargo es posible observar patrones generales diferenciables y que muestran claros desplazamientos de ciertas zonas de interés. Para poder interpretar estos resultados adecuadamente, se optó por visualizar estos dos cónfómeros de la proteína, en dos orientaciones: una paralela al canal de conexión entre la subunidad α y β , mostrando el prominente dominio COMM y los sitios activos de ambas subunidades (Figura 6.7c), y otra orientación que muestra la parte posterior del dímero (Figura 6.7a y b).

Al ver la parte posterior de la proteína en la forma semi-abierta se distingue una rotación muy clara de la subunidad β con respecto a la subunidad α que se acentúa en la interfase (Figura 6.7.a y b). Puede observarse también una rotación de la subunidad α en sí misma. La cual también se evidencia desde la perspectiva paralela al túnel (Figura 6.7.c), donde las elipsoides más amplias se muestran en la periferia de la subunidad. Esto puede indicar una rotación de la misma, independiente del resto de la proteína, que puede ser la causante de la distorsión del túnel en esa zona. Desde esta perspectiva gráfica, la direccionalidad observada en la subunidad β sugiere que el dominio COMM podría estar rotando también de manera independiente lo mismo que el resto de la subunidad.

Ya Weyand (1999) hizo referencia a la rotación entre subunidad α y β , y sugirió que el dominio COMM rota dos grados alrededor del eje conector entre ambas. Funcionando los residuos que están a sus extremos como bisagras de este movimiento a manera de cuerpo rígido. En la visualización de elipses de 1qoq (Figura 6.7b), el componente vibratorio del movimiento observado en esta interfase, correspondiente a la subunidad β , nos puede estar hablando del movimiento de estas bisagras para desplazar al dominio COMM. Este componente de β puede estar influenciado por la rotación global de la subunidad α la cual contribuye a los movimientos de la

subunidad β en particular del dominio COMM, y puede sugerir la participación de esta subunidad en la modulación de la canalización, vía sus desplazamientos globales.

El planteamiento global de esto es que, los efectos de la rotación global de la subunidad α , son absorbidos por el dominio COMM, ocasionando que este se mueva considerablemente y obstruya la transmisión de este efecto resonante al resto de la subunidad β , la cual se mueve mucho menos. Esto tiene coherencia con el análisis vibratorio en función de la distancia al eje rotatorio, donde se ve que la vibración global de la subunidad α , aunque es interpretable como de un sólo grupo pseudo-rígido, muestra un aumento de magnitud 40 \AA^2 desde el punto de menor vibración en el eje de rotación, hasta el punto de mayor vibración, más alejado del eje rotatorio (Gráfica 6.7.a). Además la vibración más baja se encuentra en 27.6 \AA^2 .

En contraparte, la vibración más baja del cuerpo de la subunidad β se encuentra en 22.43 \AA^2 y su vibración sólo aumenta en 20 \AA^2 hasta el residuo más alejado del eje de rotación. En esta subunidad en cambio, es el dominio COMM el que muestra una vibración 40 \AA^2 en su residuo más alejado del eje (Gráfica 6.8.b).

En el movimiento atribuido a esta interfase, propuesta como esencial en la comunicación durante la transformación alostérica, también puede estar involucrada la unión de los cationes monovalentes en la base del dominio COMM, ubicada en esa zona. Como se ha señalado, estos cationes son indispensables en la inducción de los cambios conformacionales. Según lo sugerido en el análisis por factores B, vía esta interfase es que los cationes metálicos pueden estar comunicando sus efectos a la subunidad α afectando las conformaciones de las asas $\alpha L2$ y $\alpha L6$.

Cuando se ve la forma cerrada en la misma orientación estos movimientos rotatorios no se hacen evidentes, y la mayor parte de los residuos muestran vibraciones cuasi-isotrópicas sin mostrar ninguna dirección preferencial del movimiento de la proteína. Esto puede deberse a que no existe discrepancia entre los valores de vibración más baja en el eje de rotación de la subunidad α y β ambos están en 9 \AA^2 , y en ambos el efecto de la distancia del C α al eje de rotación sólo se observa en un aumento de 20 \AA^2

en la vibración más alta y más alejada para ambos casos (Gráfica 6.7.b y 6.8.b). Estos resultados son coherentes con la vibración observada en la distribución de factores B (Gráficas 6.6.a y b) donde la vibración es más estándar en toda la secuencia de la forma cerrada 1qop.

Cuando se visualizan las elipsoides de forma semi-abierta desde la perspectiva paralela al túnel, se hace más evidente el movimiento del dominio COMM, donde las elipsoides están dirigidas en el sentido del cierre-apertura de este dominio sobre el canal. Este movimiento direccional se ve acompañado de otro significativo y en la misma dirección desplegado por el C-terminal. Se observa también un comportamiento vibratorio similar de este grupo en función de la distancia, mostrando la mayor vibración (Gráfica 6.8.a). Sin embargo este último no fue seleccionado como dominio dinámico para hacer el afinamiento TLS. En lo que respecta a la subunidad α , desde esta perspectiva de visualización gráfica, se observan las mayores vibraciones en las asas $\alpha L2$ y $\alpha L6$, pero sin mostrar una direccionalidad clara.

Estos resultados no explican sin embargo la naturaleza de las interacciones finas y de comunicación entre los asas de la subunidad α y el dominio COMM que van alternando el cierre y apertura de los sitios activos en ambas subunidades por los efectos de los distintos ligantes.

7 Discusión General

Un aspecto que se resaltó durante el desarrollo de esta tesis es la crucialidad de la información estructural como un elemento de interpretación de la función biológica de las macromoléculas. Entonces surge la pregunta: ¿cómo a partir de la estructura en el cristal de una proteína se pueden explicar su función y dinámicas, que en la realidad se dan en solución?

Los cristales protéicos tienen un contenido de solvente de un 40-80%, es decir están altamente hidratados. La concentración de la proteína en el cristal es aproximadamente la contenida celularmente¹⁶³. Bajo estas condiciones el cristal exhibe paralelismos con el medio biológico. Finalmente, ni las proteínas están en un medio absolutamente en solución -es más gelatinoso-, ni los cristales de proteínas son sólidos.

Una misma proteína puede cristalizar con diferente celda unitaria o bajo diferentes condiciones y a pesar de ello obtener estructuras similares. Esto ha llevado a los investigadores a pensar que la determinación cristalográfica de una biomolécula es una buena aproximación a la estructura en solución. Si bien es cierto, también es importante señalar la desventaja que representa el empaquetamiento cristalino. Los contactos cristalinos puede perturbar el comportamiento dinámico de la proteína, no solo en los movimientos individuales de cadenas laterales, sino en la movilidad de la cadena principal o de dominios. Pero al lado de esta desventaja existen circunstancias que pueden resultar ventajosas para interpretaciones biológicas. Tal es el caso de los cristales de caderinas donde los contactos cristalinos simulan las adhesiones célula-célula requeridas en la formación de tejido durante el desarrollo embrionario¹⁶⁴. Por consiguiente, la interpretación de las estructuras proteicas cristalinas son excelentes simulaciones de la realidad biológica de la proteína. Adicionalmente las estructuras en solución, resueltas por RMN, son prácticamente iguales a aquellas determinadas por rayos X.

¹⁶³ Srivastava, 1987 (96)

¹⁶⁴ Shapiro, *et al.*, 1995 (91)

Pero ¿cómo abordar esta realidad dinámica de una proteína desde esta perspectiva?. Los complejos macromoleculares, son el clásico ejemplo que hace honor al principio de que el total, es mayor que la suma de sus partes. Ilustran, cómo un agrupamiento de proteínas puede establecer un amplio espectro de capacidad funcional y control de propiedades basadas en interacciones definidas y orquestadas.

Las enzimas alostéricas, complejos moleculares intrincados en sus aspectos regulatorios e interacciones estructurales, son los ejemplos más claros de variabilidad y adaptabilidad conformacional. La comprensión cabal de los fenómenos de flexibilidad que se dan para este intercambio de formas tridimensionales, nos guía a un entendimiento más profundo de las propiedades funcionales de este tipo de proteínas.

Es la conformación de una proteína la propiedad que nos permite hacer una interpretación de los fenómenos biológicos a nivel atómico. A este nivel, los parámetros de desplazamiento direccionales permiten hacer interpretaciones más realistas de la flexibilidad funcional de la proteína, desde el nuevo enfoque de las contribuciones de la vibración y las oscilaciones en los cambios conformacionales.

Como se ha señalado ya, si la relación datos-parámetros de una estructura determinada no es lo suficientemente alta (de aproximadamente 3) para calcular valores anisotrópicos, esta información se obtiene evaluando conjuntos de átomos moviéndose en grupos, como grupos pseudo-rígidos. Esta aproximación permitió evaluar cuasi-anisotrópicamente (por TLS) los movimientos de dominios dinámicos de la proteína utilizando variables colectivas y obtener así la información anisotrópica de utilidad para analizar la transformación alostérica desde una perspectiva vibratoria. De este modo se facilitó la interpretación de movimientos de baja frecuencia a partir de las contribuciones que en ellos tienen, los movimientos internos de alta frecuencia, componentes indispensables para la comprensión de algunos fenómenos que le confieren flexibilidad conformacional a las proteínas alostéricas.

La selección de los grupos pseudo-rígidos en los dos casos estudiados en este trabajo, se basó en atribuir esta cualidad tanto a dominios estructurales completos como a dominios, al parecer más flexibles, dentro de éstos. Esta consideración condujo

a seccionar a las proteínas en regiones que se coordinan por sus propiedades dinámicas más que por su orden espacial únicamente.

Se ha mencionado ya, que la manera más común de abordar la flexibilidad molecular es haciendo referencia a fenómenos alternados de plegamiento y desplegado, o asociando estas propiedades dinámicas a estructuras secundarias de conexión, principalmente. Cuando se ha intentado explicar el dinamismo en dominios estructurales más amplios, se atribuye el mayor componente móvil a las bisagras de estos dominios. Aunque es cierto que éstas tienen más grados de libertad que dominios estructurales más complejos, se pueden asociar fenómenos de movilidad importantes a éstos, y es gracias a las vibraciones atómicas que se pueden encontrar las mayores contribuciones a éstos dentro de un supuesto cuerpo rígido.

La premisa sobre la que se fundó esta tesis, sostenida en estos argumentos, sugiere la existencia de un estado T (de menor afinidad por el sustrato) oscilando hacia un estado R (de mayor afinidad), al estar el primero libre de ligantes. El disponer de la información vibratoria de cada átomo de la molécula permitió a Rudiño proponer este modelo oscilatorio en la glucosamina-6-fosfato desaminasa.

Al hacer la búsqueda de proteínas alostéricas con las cuales trabajar, se intentaba encontrar un estado T sin ligantes según los planteamientos del modelo de Rudiño. Aunque en ninguno de los casos estudiados se encontró tal estado libre. Las formas de poca afinidad por sustrato analizadas resultaron ser las que presentaban vibraciones más altas globalmente, en comparación con las formas activas y donde se encontraban mayores vibraciones en las regiones más distantes a los ejes de rotación. Sin embargo en ambas conformaciones de las dos proteínas se observa un aumento de la tendencia de vibración.

En FBPasa esta situación puede sugerir, en primer lugar, que el conformero T muestra vibraciones oscilantes que pueden indicar la tensión sostenida en él por la influencia ejercida por la unión del inhibidor, que se hacen evidentes por la direccionalidad de ciertas elipsoides (Figura 6.4). Pero por las gráficas de distancia se ve que la forma R tiene un componente vibratorio muy similar pero de menor

magnitud. Esto puede significar que los efectos sobre la vibración de los ligantes respectivos para cada estado son muy distintos, sobre todo la unión de los cationes monovalentes en R que afecta sustancialmente su movilidad. Mientras que en T, sin ellos, se ve favorecida. El sitio de unión a F6P y a los iones metálicos se encuentra en la interfase intermonomérica (C1:C2), probablemente estas uniones en R impiden la rotación del dominio de AMP con respecto al dominio de F6P. Cuando el AMP se une y ocasiona la rotación entre dímeros que impide la unión de los cationes, esa interfase se hace menos estable y por lo tanto es posible la rotación del dominio de AMP. Es decir, en el estado T la interfase estabilizada es la C1:C4 y en el estado R se estabiliza la interfase C1:C2. Si no existiera ningún componente estabilizador de estas zonas, habría una forma mucho más vibrante que un estado T y poco afín al sustrato que uniría los cationes para aumentar la afinidad por el sustrato y entonces formar una conformación R. En esta conformación sin ligantes hipotética, se evidenciaría aún más la dirección de la T oscilante a R que se ve en este caso.

El arreglo oligomérico de la FBPasa favorece la distorsión de los sitios de unión a iones metálicos asociados al sitio activo, que se da al unirse el inhibidor alostérico (AMP). El doble giro provocado por esta unión, la rotación del dominio AMP con respecto al dominio F6P y la rotación de un dímero sobre el otro, se da en todo el tetrámero concertadamente. El comportamiento vibratorio direccional observado en la figura 6.4a y c, muestra valores compatibles con un movimiento colectivo entre los 2° que rota el dominio AMP en relación al de F6P y de la rotación dimerica que se evidencia en la interfase. Aunque no se pudo evaluar la vibración anisotrópica del asa 52-72, considerada pivote de la transformación, al hacer las superposiciones alternadas de configuraciones instantáneas, entre la forma T, R y R neutra, se ve que dicha asa se desplaza en el sentido de la transformación, al separarse de los contactos que mantiene en las cercanías del sitio activo (Zhang,1995), posiblemente como producto de la distorsión provocada en éste por la unión del inhibidor.

En resumen, si al unirse el AMP provoca un giro entre dímeros, provoca un estado de ambos correlacionado de tal forma que induce la rotación entre dominios en todo el tetrámero, manteniendo la simetría de la molécula. Es por esta distorsión del sitio activo que se explican los efectos homotrópicos cooperativos de distinta afinidad

por F6P, así como la transición heterotrópica provocada por la unión del AMP.

Estos atributos funcionales se esclarecen a la luz de las propiedades vibratorias del sistema alostérico en cuestión, donde se muestra que las subunidades se influyen entre sí de manera coordinada.

Este comportamiento concertado entre subunidades no se puede explicar a cabalidad en la TRPasa. En este caso, sin embargo, la conducta vibratoria refleja la sucesión de fenómenos compatibles con una explicación de este tipo, como es la distorsión del túnel provocada por la rotación de la subunidad α en conjunto con el desplazamiento a la apertura del dominio COMM. Por otro lado, la concomitancia sugerida en la literatura entre los asas $\alpha L2$ y $\alpha L6$, y sus efectos en las interacciones que estas sostienen con el dominio COMM, aunque pudieran ser concertados no es posible asegurarlo debido a la ausencia de estos asas en las estructuras analizadas.

En la visualización de las elipsoides anisotrópicas de la forma semi-abierta de la TRPasa, como se ve en la Figura 6.7, es marcada la tendencia de la vibración atómica hacia una conformación cerrada, ya que el eje mayor de las elipsoides se proyecta en esa dirección en la representación gráfica. De hecho el comportamiento vibratorio expuesto con la relación de Ca-distancia al eje, se observa que es mucho mayor la vibración de la forma completamente abierta en contraste con la forma semi-abierta (Gráfica 6.7.a-d), sugiriendo que la forma abierta, libre de sustratos, oscila mucho más que la cerrada. El dominio COMM, en la forma semi-abierta, se distingue por vibraciones grandes en la dirección del cierre, así como evidencia la rotación de la subunidad α importante en la distorsión del túnel para su cierre, en el que las asas $\alpha L2$ y $\alpha L6$ participan. En la forma semi-abierta las bisagras de las vibraciones muestran un comportamiento en esa dirección mientras que en la forma cerrada se encuentran sumamente estabilizadas.

Este desglose de la movilidad en esta enzima no puede explicar completamente los efectos de aquella en la función de la proteína, donde la acción catalítica del sitio β está regulada alostéricamente por muchos factores, como son: la transición de subunidades α y β entre abierto y cerrado, el cambio de flexibilidad conformacional de

la subunidad β , en particular su dominio COMM, la distribución de equilibrio entre intermediarios con actividad catalítica dependiente de pH, la influencia distinta de cationes monovalentes que influye en la actividad y distribución de intermediarios, y por último, por los efectos dirigidos por la unión del sustrato al sitio α . En este proceso el α L6 es esencial en la transmisión de señales originadas en el sitio α y el α L2 indispensable en la comunicación intersubunidades. Se ha cuestionado si existen una o múltiples vías de comunicación para controlar las propiedades funcionales descritas. En este trabajo, aunque no se puede decir contundentemente, si es posible proponer que la transformación alostérica se da más bien por combinaciones de eventos móviles que suceden en sincronía y que permiten abordar de manera más plausible los fenómenos de flexibilidad conformacional en este caso.

El modelo de la T oscilante de Rudiño de la glucosamina-6-fosfato desaminasa, predice la existencia de un estado T oscilante, en el sentido de la transformación alostérica, donde una parte de las conformaciones de la oscilación alcanzan un estado R sin ligantes, capaz de unir al activador o al sustrato, produciendo un estado R con ligantes. Explica la existencia de un estado T libre de ligantes, el más vibrante de todos los estados, que podría semejar un estado R teórico sin ligantes con la tapa muy móvil.

En este contexto la suposición de una conformación libre de ligantes en FBPasa, a la luz de la información del comportamiento vibratorio que se observó en este enzima, se perfila como otro ejemplo donde se puede hablar de la existencia de un estado T oscilando hacia la forma activa R. A partir de la teoría alostérica podría decirse para este caso que el equilibrio está entre una forma sin ligantes R, la cual sería producto de un T sin ligantes, y una forma T con inhibidor, donde al unirse éste se da la transformación.

Se puede concluir entonces que si una proteína alostérica es activada o inhibida, existe un estado T oscilando a R. Este es el punto donde confluyen ambos modelos: un estado T que siempre tiende a la actividad. Aunque la vía por la cual, cada una llega a este punto es distinto: en la glucosamina-6-fosfato Desaminasa hay un T oscilante, sin ligantes que deriva en un R sin ligantes dispuesto a unir al sustrato formando un R con ligantes. En el caso de la Fructosa 1,6 bisfosfatasa, hay un estado T con ligantes

oscilando de tal manera que podría suponerse un fenómeno de tensión que "jala" a la proteína hacia un estado sin inhibidor —es decir liberando al AMP— que la permita volver a su forma R sin ligantes capaz de unir al sustrato y así formar un estado R ocupado y activo. Esta propuesta se hace sobre la base de que por la naturaleza de las interacciones físicas responsables de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, la unión y transformación son fenómenos mutuamente influenciados, por lo que si un sustrato se une la conformación cambia, si éste se despega la estructura regresa a su estado inicial. Sobre este argumento toma forma el suponer que la vibración acentuada de la forma T hacia la forma R, "empuja" al AMP a desprenderse de la enzima y así conformar un estado R sin ligantes susceptible de ser activado. Por otro lado la T oscila de tal forma que es pertinente suponer que durante la oscilación podrá unir diferencialmente al AMP, o al Mg^{2+} que facilitará la coordinación con la F6P para que se despliegue la actividad.

En este sentido la oscilación de la forma T en la FBPasa no es en la dirección de la transformación alostérica, sino se dirige, en sentido inverso a la conformación inicial. Esto implica una contraparte al modelo de Rudiño.

En la TRPasa la información de la vibración atómica analizada, propone la existencia de un estado abierto ("T") oscilando en la dirección de la transformación hacia la forma activa, de menor oscilación. Existe entonces en ambos casos un componente vibratorio de la forma inactiva que la dirige a la forma activa, funcional, a pesar de no haber hallado en ninguno de los casos la forma T sin ligantes.

Se ha planteado que, en general, los movimientos más localizados son los que afectan la función, y que los más globales son más trascendentes en la conformación. Sin embargo los resultados de esta tesis sugieren que los movimientos de dominios dinámicos complejos pueden influenciar ampliamente aquellos regionales, sin eliminar las evidentes repercusiones de estos últimos en las propiedades catalíticas o funcionales. Es decir, los movimientos de dominios dinámicos más grandes, vierten sus efectos en los movimientos de asas generalmente asociados a los sitios activos o alostéricos, o en aquellas involucradas en interacciones para la oligomerización. Los desplazamientos atómicos de los cuerpos pseudo-rígidos repercuten de tal manera en

la flexibilidad de la proteína que, a partir de ellos, se pueden explicar los procesos de transformación conformacional en enzimas alostéricas subrayando sus efectos en su función biológica.

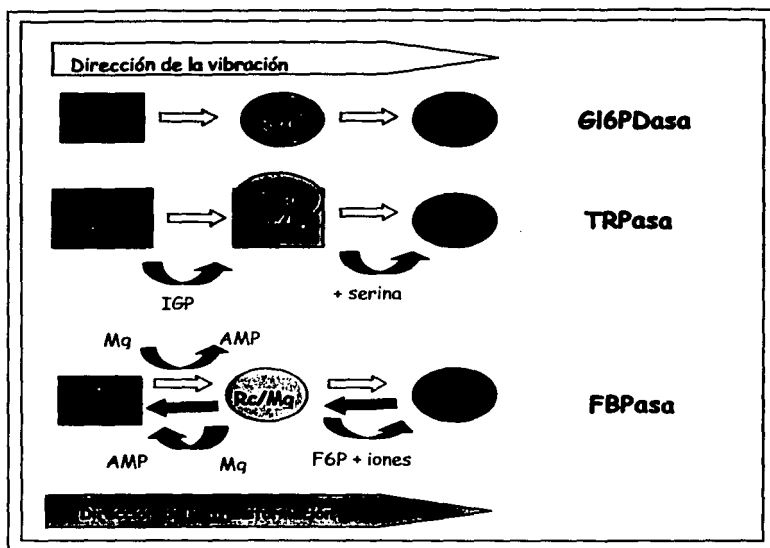
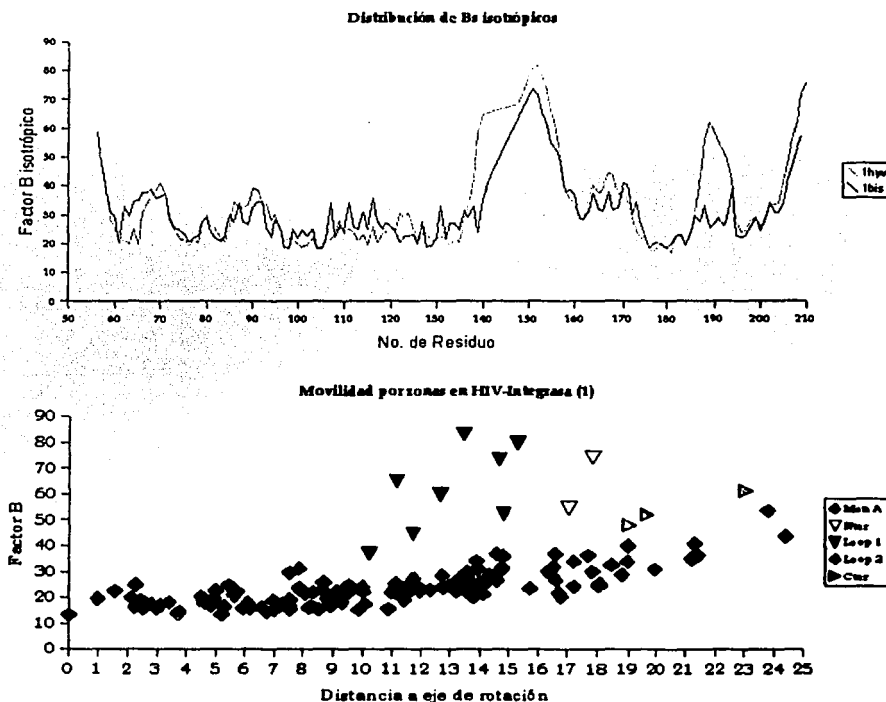


Figura 7.1 Incorporación de los modelos sugeridos aquí, al modelo de la T oscilante. La TRPasa vibra en el sentido de la transformación alostérica a pesar de que el mecanismo de transformación no puede ser explicado a cabalidad. Se evidencia, sin embargo, que mientras más abierta esté la conformación, vibra con mayor amplitud hacia una forma cerrada, coincidiendo con la tendencia sugerida en el modelo T oscilante. La FBPasa sugiere una vibración pronunciada en el sentido inverso de la transformación alostérica, sugiriendo una contraparte al modelo de la T oscilante.

Las hélices de la interfase interdimérica de FBPasa, por ejemplo, se mueven de tal manera que las asas conectadas a éstas hélices se desplazan por su causa. Las traslaciones del dominio COMM y la rotación de la subunidad α en la TRPasa afectan la posición de los asas, compuerta del túnel y la conformación de éste. Los movimientos de estas zonas de la proteína en conjunto se pueden explicar por fenómenos oscilatorios que se dan en la estructura tridimensional provocados por la vibración atómica.

Los acercamientos a los dominios dinámicos, con influencias claras en las propiedades funcionales de las proteínas aquí analizadas, conjugados con la virtud que

posee la información vibratoria direccional de mejorar los modelos estructurales, evidencian que la aplicación de afinamientos con tensores de direccionalidad es muy útil en la aproximación de un ajuste anisotrópico e igualmente hace al ajuste más real. El modelo mejora debido a que el componente vibratorio direccional ajusta mejor los datos experimentales y el modelo, cuando se trabaja a resoluciones alrededor de 2 Å. Esto conduce a pensar que al incorporar elementos direccionales al afinamiento de estructuras se esclarecen o justifican patrones de movilidad sugeridos por otras vías experimentales. Permiten por otro lado modelar los aspectos móviles importantes funcionalmente, de una manera más realista.

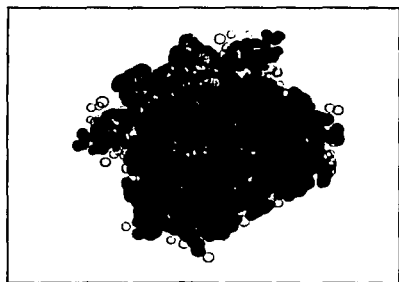


Gráficas 7.1 Comportamiento vibratorio isotrópico de la Integrasa 1 de HIV. Se muestra la distribución de factores B de dos conformaciones distintas (arriba) donde 1hyv es la estructura que muestra mayor vibración y de la cual se hizo el análisis de grupos pseudo-rígidos en función de su vibración a un eje de rotación establecido en Y (abajo) (por los métodos utilizados en las otras proteínas analizadas (no se muestra figura).

La incorporación de ésta información vibratoria en las explicaciones estructurales, según los resultados vertidos por los afinamientos TLS permitieron construir modelos más realistas de las enzimas trabajadas, que mostraron propiedades estructurales que, como ya vimos, pueden conducir a una mayor comprensión de la conducta funcional de las enzimas alostéricas. Sin embargo, esto puede verse también en proteínas no-alostéricas con múltiples conformaciones. Tal es el caso del núcleo catalítico de la HIV-1 integrasa, el cual fue analizado también en este trabajo.



Figura 7.1 Despliegue anisotrópico de la integrasa 1de HIV. A partir del afinamiento por TLS de la estructura más móvil (gráfica 7.1) se puede ver la movilidad de esta proteína, donde el eje mayor de los elipsoides se orienta en el sentido de la transformación y las de eje menor agudizan la valoración de la movilidad en la rotación. (superior) Muestra rotación alrededor del eje supuesto -círculo amarillo- (monómero). (inferior) Muestra grupos pseudo-rígidos más móviles (elipsoides rojas con ejes mayores en el sentido de la transformación (otra orientación).



Por falta de información suficiente para explicar los fenómenos que en esta enzima ocurren, sólo podemos mencionar que de acuerdo al análisis de las vibraciones de los C α , en función de la distancia al eje de rotación, se observa que la mayor vibración corresponde a la forma abierta (Gráfica 7.1),

donde se hace una distinción de grupos muy claros que son importantes para la función¹: el N y C terminal y dos asas asociados al cierre y apertura del núcleo catalítico. Cuando se hizo el afinamiento TLS para esta enzima, con esos grupos, el valor de R fue de 0.22 y el R_{free} de 0.24 comparativamente mejores que en los reportados en el archivo PDB ($R=0.22$ y $R_{free}=0.26$). En el despliegue gráfico de éste afinamiento por elipsoides anisotrópicos, se observó que las mayores vibraciones se daban en la dirección del cierre del núcleo catalítico cuando se une al DNA. Este conforma otro ejemplo en que el afinamiento por TLS mejora los modelos.

¹ Goldgur, et al.,1998 (i), Molteni, et al.,1999 (h)

estructurales al incluir la dirección de los desplazamientos atómicos.

Todos estos estudios no podrían haber sido posibles sin una selección cuidadosa de las estructuras con las cuales trabajar. El PDB a pesar de ser muy útil en muchos aspectos aún presenta deficiencias importantes en cuando a la divulgación de la información requerida sobre las estructuras. Todos los datos que se omiten en los depósitos de diferentes estructuras impiden la reutilización de esa información optimizando su uso.

El PDB al tener mucha información que no es utilizable y que fomenta en ella misma redundancias innecesarias, obstaculiza el dimensionar su tarea principal de difundir las estructuras tridimensionales de proteínas para el crecimiento de la ciencia estructural.

Una de las deficiencias más grandes del PDB, completamente injustificada, es que existe una cantidad inmensa de depósitos que no cuentan con sus factores de estructura. Éstos son el resultado de sus observaciones, es decir de las difracciones. Sólo a partir de ellos es posible reproducir un ajuste por un re-afinamiento o recrear los mapas de densidad para reconstruir el modelo reportado y analizarlo. Si tienen reportada una estructura cristalográfica quiere decir que cuentan con esos factores de estructura. ¿Por qué entonces no los reportan? Es un problema complejo que va desde la desidia hasta razones históricas y presiones de competencia.

A manera de anécdota, me gustaría mencionar algo sucedido durante la realización de esta tesis: se seleccionó una estructura que contaba con los factores de estructura, pero al intentar reconstruir el mapa de densidad, el archivo marcaba errores continuamente. Esa estructura era el reemplazo de otra determinada con anterioridad, que había sido depositada como perteneciente a un grupo espacial errado. Los factores de estructura depositados eran los correspondientes a aquél depósito ya olvidado. Como se trataba de una estructura necesaria para el análisis, contacté a los autores para solicitarles los factores de estructura correctos. Se trataba de una estructura depositada en 1997. Los autores no estaban enterados de que existiera tal problema con el depósito y dijeron que lo solucionarían.

Cuando se intentó trabajar con una estructura del núcleo catalítico de la HIV-1 integrasa cuyos parámetros cristalográficos eran muy buenos (ver tabla DIPA Q, código 1bis). Al tratar de re-afinar esta estructura por TLS, vimos, gracias a los factores de estructura, que había sido depositada con muchísimas violaciones a las geometrías, por lo que tuvimos que rehacer el afinamiento corrigiendo esos errores. Al hacer este re-afinamiento se obtuvieron un $R = 0.21$ y un $R_{free} = 0.25$, que, cuando se ajustaron por TLS con los mismos grupos que lo mencionado con anterioridad, bajaron a 0.20 y 0.23 respectivamente, en relación a los originales 0.20 y 0.26.

Como último ejemplo de esto, el año pasado se publicó un artículo que estudiaba la conservación evolutiva de regiones de estructura secundaria no regular (NORS), a partir de estructuras del PDB. El trabajo en cuestión no se juzga, pero si en ese estudio se encontraron con estructuras determinadas con violaciones geométricas, que semejan estructuras secundarias no regulares, y no se dieron cuenta, su análisis está sesgado no por su causa, sino por la de otros investigadores negligentes.

Esto pone en evidencia la importancia de reportar los datos experimentales para que las estructuras puedan ser reutilizadas. Lo que sucedió con el depósito 1cnq y 1bis son cosas que no tendrían porqué pasar en un banco de datos como el PDB, donde se han implementado distintos sistemas de validación y corrección para poder depositar la estructura determinada.

En el área de la cristalografía existen muchos científicos que contribuyen a la creación de información computando datos de alta calidad y promoviéndolos. Sin embargo hay quienes no lo hacen y, o son egoístas con la información (e.j. No brindan la información necesaria para reproducir experimentos de cristalización) o deshonestos al otorgarla (e.j. Reportan ciertos datos de la determinación de la estructura, pero no los elementos para corroborarla o reproducirla (los factores de estructura)). Por lo tanto, el PDB es un claro ejemplo de datos que serían de excelente calidad si no existiera duda en muchos casos.

Bernal en los años sesentas previó el advenimiento de la explosión de la era de la información¹⁶⁶ y la necesidad de dirigirla dándole los medios y las posibilidades. Actualmente gracias a la WWW el hecho es inminente. Existe gran cantidad de bancos de datos científicos, y de vínculos informáticos que permiten acceder a una gran cantidad de información en todas las áreas. Una responsabilidad muy grande recae sobre aquellos que distribuyen y organizan la información -como es el caso del personal del PDB-; sin embargo, otra parte de la responsabilidad es de aquellos que construyen esta información.

Entre los cristalógrafos la conformación de un banco de datos de buena calidad ha sido una meta primordial y como parte de esos esfuerzos, se instauró en los últimos años, que el depósito de datos cristalográficos debía ser parte integral del proceso de publicación. También se han desarrollado nuevos formatos para estandarizar los datos como los CIF de la IUCr. Sin embargo los formatos estandarizados sirven poco si les falta la información necesaria para la reutilización de los datos, y si la organización de ésta en los archivos no es de fácil interpretación -como es el caso de los CIF.

Sobre las características tan heterogéneas del PDB se fundó la idea de crear el criterio selectivo que se utilizó en esta tesis. Aunque el PDB tuviera todos los depósitos estandarizados y completos sería necesario un criterio de selección aunque en estas circunstancias podría ser menos estricto.

A manera de conclusión.

Es importante mantener una actitud crítica siempre que se maneje información de una base de datos tan heterogénea y en constante transformación como lo es el PDB. Pero también es importante asumir la responsabilidad ética de reportar íntegramente los resultados experimentales.

La era de la información llegó y se impuso. Este privilegio conduce a la

¹⁶⁶ Murria-Rust, 1998 (62)

necesidad de una educación y formación informática tanto para construir como acceder a la información. En este adiestramiento, debe preponderar la ética, con que se trabaja y divulgan los hallazgos de dicha tarea, que implique responsabilidades y honestidad, y donde prevalezca el contribuir realmente a la construcción del conocimiento sobre el de obtener beneficios personales. Esta discusión sería motivo de otra tesis, sin embargo es preciso señalar, que si bien la ciencia requiere de una formación académica rigurosa, ésta no implica que se posean los elementos éticos implicados en la comunicación de la ciencia. En muchas áreas de la biología, se recurre a la información estructural para explicar fenómenos que se han explicado por otras vías o simplemente para ubicar espacial y geoméricamente al objeto de estudio. Es importante por esto, que una base de datos como el PDB posea datos absolutamente confiables.

Los avances estructurales, recientemente, se han manifestado en muchas áreas dentro de la biología, conduciendo a la posibilidad de relacionar las estructuras con la función biológica y el ensamblaje que le da identidad a la molécula que describen. Como resultado, el interés en el campo se está enfocando, más que a determinar estructuras *per se*, a asir los elementos estructurales que pudieran explicar los fenómenos conformacionales asociados con procesos biológicos clave en los que participan los ensamblados.

Desde esta perspectiva, es esencial la utilización de nuevos enfoques de análisis de las propiedades dinámicas de las proteínas. La incorporación de la información vibratoria direccional a la determinación de estructuras proteicas, a partir de tensores a los grupos pseudo-rígidos, es un ejemplo que permite además obtener modelos estructurales más realistas.

De los modelos aquí ajustados se infiere que es factible la existencia en las enzimas alostéricas, de conformaciones oscilantes en la dirección de la transformación hacia las formas activas funcionales, que permite dar interpretaciones más finas de su flexibilidad molecular.

A la luz de estas propuestas se propone que la vibración atómica es una

propiedad de la proteína que está relacionada crucialmente con su función, misma que está gobernada por la estructura tridimensional que la proteína ostenta, así como por la geometría que la distingue. Esta conformación, que generalmente es muy conservada, está determinada por la secuencia polipeptídica, la cual puede no estar tan conservada y aún así determinar una estructura conservada de acuerdo a una función que ha de realizar. Generalmente cuando se insertan mutaciones en ciertas proteínas no es la estructura la que se ve afectada. Es en la vibración atómica donde se dan los efectos más evidentes. En un sentido evolutivo uno podría entender que la evolución de una enzima alostérica está guiada a conservar una estructura y una vibración global particular, como un factor epiprotéico, que lleve a una conservación de la función (Figura 7.3). Estudios sobre esta cuestión en particular podrían abordarse en trabajos posteriores.

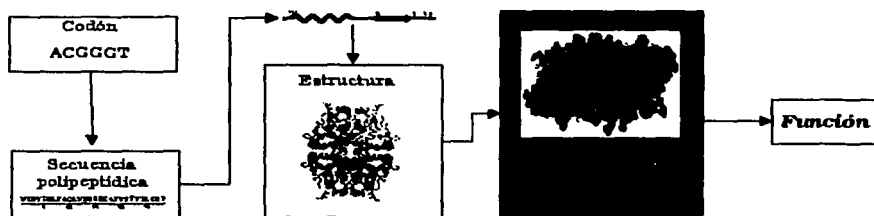


Figura 7.3. Propuesta de atributos conservados evolutivamente para derivar la función biológica de proteínas

La biología estructural es una realidad, así como la biología celular progresa desde identificar y caracterizar los componentes para entender cómo se integran distintas proteínas para producir las máquinas moleculares que generan las funciones celulares básicas. Es de crucial importancia entender la estructura y dinámica de estos complejos macromoleculares involucrados y cómo su estructura cambia. Actualmente existen atisbos de los cambios en conformaciones e interacciones moleculares, así como de la geometría asociada con cierta función, lo que forma las bases para entender la biología celular en un contexto estructural.

Perspectivas.

La información sobre la estructura de una proteína es una fuente inagotable donde crear experimentos de utilidad para descartar ideas preconcebidas. Sobre esta premisa se proponen las siguientes perspectivas:

- ❖ En trabajos subsecuentes sería prudente evaluar los dominios dinámicos de la FBPassa y la TRPassa, con herramientas más sofisticadas de dinámicas moleculares, comprobar la naturaleza de los cuerpos pseudo-rígidos de importancia funcional, lo mismo que verificar las interpretaciones hechas en esta tesis.
- ❖ Será necesario hacer estudios cinéticos que expliquen funcionalmente las propuestas del proceso de transformación alostérica sugeridas en esta tesis.
- ❖ Este trabajo sienta las bases para trabajos posteriores sobre flexibilidad molecular de proteínas alostéricas o michaelianas con conformaciones alternas, desde una perspectiva atómica; e impulsa la búsqueda de este tipo de fenómenos en muchos otros ejemplos.
- ❖ Las virtudes de interpretación de la función que sean conferidas por la información vibratoria permitirán entender a cabalidad los procesos regulatorios y de interacción de enzimas o complejos enzimáticos y otro tipo de ensamblados macromoleculares.
- ❖ La aventura de los ingenieros moleculares será emular la naturaleza, conjuntando con precisión, las conformaciones flexibles con la regulación de la función proteica.
- ❖ Será posible dirigir estudios donde se evalúe a la vibración como un elemento epiprotéico que se conserva junto a la estructura y la función.


```

        Sque=0;
    }
}

if (/BIOLOGICAL_UNIT/) {
s/$espa/$nada/g;
    @A2=split(" ",$ _);
}

if ($r==1) {
if (/CHAIN/) {
s/$espa/$nada/g;
    @A3=split(" ",$ _);
    $r=0;
    $spes=0;
}
}

if ($spes==1) {
if (/ASYMMETRIC UNIT/) {
chomp($reel);
s/$reel.*/$nada/g;
s/$espa/$nada/g;
$Aw1=$Aw1.$ _;
$spes=0;
$renglon=1;
}
}

if ($re==1) {
if (/AUTHOR/) {
chomp($reel);
s/$reel.*/$nada/g;
s/$espa/$nada/g;
    $Ar1=$ _;
    $re=0;
}
}

if (/REMARK 2 RESOLUTION/) {
chomp($reel);
s/$reel.*/$nada/g;
s/$espa/$nada/g;
s/ANGSTROMS.*/$nada/g;
    @A5=split("RESOLUTION",$ _);
    #print"$A5[1]\n";
    @As5=split(" ",$A5[1]);
    #$_=$As5[1];
    #s/ANGSTROMS.*/$nada/g;
    # $As5[1]=$ _;
    #print "#####$As5[1]\n";
}

if ($rrq==1) {
if (/COMPLETENESS/) {
s/$espa/$nada/g;
    @A6=split(" ",$ _); $rrq=0;
}
}

if (/NUMBER OF REFLECTIONS/ || /UNIQUE REFLECTIONS/) {
chomp($reel);
s/$reel.*/$nada/g;
s/$espa/$nada/g;
s/$espa/$nada/g;
    $RECUER = $ _;
    @A7=split(" ",$ _);
    $ _ = $A7[1];
    s/\s/$nada/g;
    $A7[1] = $ _;
    #print "$ _\n";
    if ($A7[1] eq $nada) {
        $ _ = $RECUER;
        s/.*/REFLECTIONS/$nada/g;
        @A7=split(" ",$ _);
        #print "$A7[0], $A7[1], $A7[2], $A7[3]\n";
        $A7[1] = $A7[0];
    }
}

```

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

```

}

if ($rr==1) {
if (V VALUE) {
#print "//////////////////////////////////$_\n";
s/$espa/$nada/g;
@A8=split(" ",$_);
$rr=0;
$pepe=0;
if ($A8[1] eq $nada) {
s/.VALUE/$nada/g;
@A8=split(" ",$_);
#print "$A8[0], $A8[1], $A8[2], $A8[3], $A8[4], $A8[5], $A8[6], $A8[7], $A8[8], $A8[9],
$A8[1] = $A8[0];
}
}
}

if ($tomado ==1) {
$tomado =0;
#print "$_\n";
s/[A-Z]/$nada/g;
@A4=split(" ",$_);
chop($A4[1]);
$A4[1]="\t$A4[1]";
#print "-.-.-$A4[0], $A4[1], $A4[2], $A4[3] \n";
}

if ($pepe==1) {
if (V VALUE) {
#print "-----$_\n";
chomp($reel);
s/$reel./$nada/g;
s/$espa/$nada/g;

#print "-.-.-.-$_\n";
s/[A-Z]/$nada/g;
@A4=split(" ",$_);
chop($A4[1]);
$A4[1]=$A4[1];
$A4[1]="\t$A4[1]";

if ($A4[1] eq $nada) {
$tomado =1;
$A4[1]="";
}
}
}

if ($rrr==1) {
if (FREE R VALUE) {
s/$espa/$nada/g;
@A9=split(" ",$_);
$rrr=0;
}
}

if (HETATM/ || /ATOM) {
#print "$_\n";
s/HETATM/HETATM/g;
#print "$_\n";
s/$espa/$nada/g;
@A10=split(" ",$_);
#$_=$A10[1];
s/[A-Z]/$nada/g;
#print ""$A10[1]\n";
}

if (CRYST1) {
chomp($reel);
s/$reel./$nada/g;
s/$espa/$nada/g;
}

```

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Apéndice II. Tablas comparativas de caracteres DIPA:

Base de datos.

Tabla A. Fructosa-1,6-bisfosfatasa

PDB-ID	RES (Å)	R	R _{free}	INT	No. REFLE	No. ATOM	No. PARAM	ESTADO	DAT/PAR	F.S
1fbt	2	0.22	0.28	*	27821	3267	16335	*	1.7	0
1frp	2	0.19	*	82.8	45437	6803	34015	T	1.34	1
1rdz	2.05	0.2	0.22	*	32329	5392	26960	T	1.2	0
1fpf	2.1	*	*	*	*	6514	32570	*	*	0
1fpd	2.1	*	*	*	*	6484	32420	*	*	0
5fyp	2.1	0.18	*	*	*	6850	34250	R	*	0
1fpi	2.2	0.19	*	95	37484	5064	25320	R	1.48	0
1dcu	2.2	0.19	0.25	*	62337	10106	50530	T	1.23	1
1rdy	2.2	0.2	0.23	*	25276	5324	26620	T	0.95	0
1spe	2.2	*	*	*	*	6517	32585	*	*	0
1eyk	2.23	0.22	0.27	86.1	30946	5457	27285	T	1.13	0
1cuq	2.27	0.17	0.23	77.6	13386	2717	13585	R	0.99	1
1eyj	2.28	0.2	0.26	89.8	29829	5479	27395	T	1.09	0
1bk4	2.3	0.18	*	93	16921	2491	12455	*	1.36	0
1fpl	2.3	0.19	*	88	30726	5071	25355	T	1.21	0
1fpi	2.3	0.2	*	84	29101	5055	25275	R	1.15	0
1fsa	2.3	0.18	0.23	65	19578	5349	26745	T	0.73	0
1fta	2.3	*	*	*	*	13023	65115	T	*	0
1fpg	2.3	*	*	*	*	6523	32615	*	*	0
1eyi	2.32	0.19	0.24	91.6	12784	2719	13595	R	0.94	0
1d9q	2.4	0.19	0.24	0	52266	10188	50940	R	1.03	1
1ff9	2.5	0.19	0.26	87.9	21385	5192	25960	*	0.82	0
1ff6	2.5	0.2	0.27	84.8	9424	2619	13095	R	0.72	0
1fbh	2.5	*	*	*	*	6380	31900	R	*	0
4fyp	2.5	0.17	*	*	*	13016	65080	T	*	0
1fyp	2.5	0.22	*	*	*	6030	30150	T	*	0
1dk4	2.6	0.33	0.27	96.3	9705	4108	20540	*	0.47	1
1fpb	2.6	*	*	*	*	5938	29690	*	*	0
1fbc	2.6	*	*	*	*	6209	31045	R	*	0
1dbz	2.65	0.24	0.29	*	38230	290	1450	R	26.36	0
1fbf	2.7	*	*	*	*	6052	30260	*	*	0
1rdx	2.75	0.22	0.3	*	12701	5225	26125	R	0.49	0
3fyp	2.8	0.19	*	*	*	5994	29970	R	*	0
1fbi	2.9	*	*	*	*	5920	29600	*	*	0
1fpk	3	0.23	*	73	13824	4788	23940	R	0.58	0
1fpg	3	*	*	*	*	5918	29590	*	*	0
1fbe	3	*	*	*	*	5920	29600	*	*	0

Tabla A: Continuación...

PDB-ID	G. ESPA	U ASIM	U BIOLÓGICA	DIMENSIONES DE CELDAS	ORGANISMO FUENTE	LIGANTES
1ft	P 1 21 1	A, B;	*	48.400 56.600 93.700 90.00 94.40 90	RATTUS NORVEGICUS	MSE MSE PO4 PO4
1frp	P 21 21 2	A, B;	*	60.950 166.300 80.000 90.00 90. 90	SUS SCROFA	FDP AMP ZN
1rdz	P 21 21 2	A, B; A,B	HOMOTETRAMER	61.060 166.780 79.920 90.00 90. 90	SUS SCROFA	F6P F6P AMP AMP
1fpf	P 21 21 2	A,B	*	61.100 166.600 80.100 90.00 90. 90	SUS SCROFA	MN MN AHG AMP
1fpd	P 21 21 2	A	*	61.100 166.400 79.900 90.00 90. 90	SUS SCROFA	MN MN AHG AMP
5fbp	P 32 2 1	A	*	131.100 131.100 69.700 90 90 120	SUS SCROFA	F6P F6P F6P
1fpi	P 21 21 2	A, B;	*	61.200 166.800 80.300 90.00 90 90	SUS SCROFA	TL TL AMP AHG
1dcu	P 1 21 1	A, B, C, D;	*	71.604 126.316 78.023 90 97.73 90	PISUM SATIVUM	
1rdy	P 21 21 2	A, B;	HOMOTETRAMER	61.200 166.750 79.840 90.00 90 90	SUS SCROFA	F6P F6P AMP AMP
1fpe	P 21 21 2	A, B;	*	61.000 166.500 79.900 90.00 90 90.	SUS SCROFA	MN AHG AMP
1eyk	P 21 21 2	A, B;	*	60.120 166.140 79.530 90.00 90. 90	SUS SCROFA	F6P ZN AMP PI
1cnq	I 2 2 2	A;	TETRAMER	52.340 82.820 166.740 90.00 90 90	SUS SCROFA	F6P ZN PI
1eyj	P 21 21 2	A, B;	*	59.860 165.820 79.510 90.00 90 90	SUS SCROFA	F6P MG AMP PI
1bk4	I 2 2 2	A;	*	73.790 80.050 131.820 90.00 90. 90	ORYCTOLAGUS CUNICULUS	MG SO4 SO4
1fpl	P 21 21 2	A, B;	*	61.100 166.900 80.200 90.00 90. 90	SUS SCROFA	TL TL TL AMP AHG
1fpi	P 21 21 2	A, B;	*	61.200 167.100 80.000 90.00 90. 90	SUS SCROFA	K K K AMP AHG
1fpa	P 21 21 2	A, B;	*	61.050 166.720 79.980 90.00 90. 90	SUS SCROFA	F6P AMP MN
1fta	P 21 21 21	A, B, C, D;	*	68.600 84.800 281.100 90.00 90 90.	HOMO SAPIENS	AMP
1fpg	P 21 21 2	A, B;	*	61.100 166.500 80.000 90.00 90. 90	SUS SCROFA	MN MN AHG AMP
1eyl	I 2 2 2	A;	*	52.120 82.510 165.490 90.00 90 90.	SUS SCROFA	F6P MG MG PI PI
1d9g	P 1 21 1	A, B, C, D;	*	78.940 113.990 94.810 90. 114.38 90	PISUM SATIVUM	
1f9	P 21 21 2	A, B;	*	59.820 165.480 79.290 90.00 90. 90	SUS SCROFA	F6P ZN AMP PI
1ff6	I 2 2 2	A;	*	52.380 82.470 165.590 90.00 90 90.	SUS SCROFA	F6P ZN ZN ZN PI PI
1fbh	P 32 2 1	A	*	131.200 131.200 69.300 90. 90 120	SUS SCROFA	AFP BFP AFP BFP
4fbp	P 21 21 21	A	*	78.500 88.500 211.100 90.00 90. 90	SUS SCROFA	AMP
1fbp	P 21 21 2	A	*	61.600 166.600 80.000 90.00 90. 90.	SUS SCROFA	F6P AMP MG
1dk4	P 21 21 21	A, B; AB	*	68.870 78.430 129.720 90.00 90. 90	SUS SCROFA	ZN ZN ZN PO4
1fpb	P 32 2 1	AB	*	131.400 131.400 68.600 90 90 120	SUS SCROFA	FDP FDP FDP
1fbc	P 32 2 1	AB	*	131.400 131.400 68.600 90 90 120	SUS SCROFA	AHG MG AHG MG
1lhz	P 1 21 1	A, B, C, D;	*	78.900 114.500 94.500 90. 114.50 90	PISUM SATIVUM	

<i>1bfj</i>	P 32 2 1	A, B;	*	131.400 131.400 69.200 90. 90. 120	SUS SCROFA	AHM MG AHM MG
<i>1rdx</i>	P 32 2 1	A, B;	HOMOTETRA R	131.310 131.310 66.400 90. 90. 120	SUS SCROFA	F6P F6P
<i>3fbp</i>	P 32 2 1	A	*	131.400 131.400 69.200 90. 90. 120	SUS SCROFA	FDP FDP
<i>1fbd</i>	P 32 2 1	A	*	131.600 131.600 68.300 90. 90. 120	SUS SCROFA	AHG MN MN
<i>1fpk</i>	P 32 2 1	A, B;	*	132.600 132.600 67.700 90. 90. 120	SUS SCROFA	TL TL TL TL TL TL
<i>1fbg</i>	P 32 2 1	5°	*	132.000 132.000 67.400 90. 90. 120	SUS SCROFA	AHM MN AHM MN
<i>1fbe</i>	P 32 2 1	3°	*	132.000 132.000 67.400 90. 90. 120	SUS SCROFA	AHG ZN ZN AHG ZN ZN

Tabla B: Triptofano Sintetasa.

PDB-ID	RES (Å)	R	R _{Free}	INT	No. REFLE	No. ATOM	No. PARAM	DAT/PAR	F.S
<i>1qop</i>	1.4	0.15	0.18	95	133915	5880	29400	4.55	1
<i>1k8y</i>	1.5	0.17	0.21	95.1	111900	5619	28095	*	0
<i>1k3u</i>	1.7	0.15	0.19	97.7	77570	5785	28925	2.68	1
<i>1k7x</i>	1.7	0.19	0.24	96.8	78258	*	*	*	1
<i>1k8z</i>	1.7	0.21	0.27	96.4	79408	5354	26770	*	1
<i>1qoq</i>	1.8	0.17	0.21	94	63650	5461	27305	2.33	1
<i>1ubs</i>	1.9	*	*	*	*	5188	25940	*	1
<i>2tys</i>	1.9	0.17	*	82.4	*	5321	26605	*	1
<i>1k7f</i>	1.9	0.2	0.25	93.8	53470	4964	24820	2.15	1
<i>1beu</i>	1.9	0.22	0.28	80.3	45259	5236	26180	1.73	1
<i>1a5a</i>	1.9	0.24	0.3	77.7	43791	5292	26460	1.65	1
<i>1ttq</i>	2	*	*	*	*	4981	24905	*	1
<i>1geq</i>	2	0.2	0.25	90.8	30701	4238	21190	1.45	0
<i>1cw2</i>	2	0.21	0.25	95.3	47194	5145	25725	1.83	1
<i>1a5b</i>	2	0.22	0.28	82.2	39737	5207	26035	1.53	1
<i>2trs</i>	2.04	0.21	0	76.1	36088	5156	25780	1.4	1
<i>1bks</i>	2.2	*	*	*	*	5233	26165	*	0
<i>1c8v</i>	2.2	0.21	0.27	92.6	35371	5120	25600	1.38	1
<i>1fuy</i>	2.25	0.17	0.22	0.9	32603	5189	25945	1.26	1
<i>1ttp</i>	2.3	*	*	*	*	4921	24605	*	1
<i>1k7e</i>	2.3	0.17	0.24	91	*	5219	26095	*	1
<i>1a5s</i>	2.3	0.18	0.25	93.8	30327	5035	25175	1.2	1
<i>1a50</i>	2.3	0.18	0.25	93.8	30327	5193	25965	1.17	0
<i>2wsy</i>	2.3	0.2	0.3	90.9	12850	4650	23250	0.55	0
<i>1c29</i>	2.3	0.21	0.28	91	29401	5122	25610	1.15	1
<i>1cx9</i>	2.3	0.21	0.28	91.9	29619	5117	25585	1.16	1
<i>1c9d</i>	2.3	0.21	0.27	93.9	31553	5149	25745	1.23	1
<i>2tsy</i>	2.5	0.19	*	89.5	23487	5085	25425	0.92	1

Tabla B: Continuación...

PDB-ID	G ESPA	U ASIM	U BIOLÓGICA	LIGANTES	DIMENSIONES DE CELDAS	PROGRAMA	ORGANISMO FUENTE
1qop	C 121	A;	.	IPL PLP NA	182.200 60.300 67.400 90. 94.70 90	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1k8y	C 121	A;	.	NA G3P PLP	183.142 60.465 67.440 90.00 94.63	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1k3u	C 121	A;	.	NA IAD PLP	182.409 59.718 67.177 90.0 94.52 90.	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1k7x	C 121	A;	.	PLP NA	184.006 59.986 67.537 90.00 94.65	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1k8z	C 121	A;	.	NA IAG PLP	184.420 61.035 67.534 90.00 94.69	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1qoq	C 121	A;	.	IGP PLP	182.742 60.055 67.098 90.00 94.48	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1ubs	C 24	A, B;	.	PLP NA	184.200 61.800 67.800 90.00 94.80	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
2tys	C 121	A, B;	TETRAMER	PLT NA	185.800 62.300 67.800 90.00 94.10	PROLSQ	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1k7f	C 121	A;	.	IAV PLP	183.664 59.074 67.467 90.00 94.70	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1beu	C 121	A, B;	TETRAMER	IPL PLS K	182.300 59.700 67.400 90.00 94.60	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1a5a	C 121	A, B;	TETRAMER	PLP K	183.500 59.400 67.300 90.00 94.60	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1ttq	C 24	A, B;	.	PLP K	185.000 61.300 67.700 90.00 94.70	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1geq	C 2221	A, B;	.		73.013 78.997 170.964 90.00 90	PROLSQ	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1cw2	C 121	A;	.	PLP NA HSP	183.340 59.920 67.710 90.00 94.55	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1a5b	C 121	A, B;	TETRAMER	PLP K IGP	182.600 59.700 67.400 90.00 94.60	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
2trs	C 121	A, B;	TETRAMER	IPL PLS NA	184.200 61.300 67.900 90.00 94.50	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1bks	C 121	A, B;	TETRAMER	PLP NA	184.580 62.065 67.610 90.00 94.69	PROLSQ	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1c8v	C 121	A;	.	PLP NA HE1	183.800 60.770 68.150 90.00 94.38	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1fuy	C 121	A;	.	NA FIP PLP	184.000 60.700 67.400 90.00 95.75	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1ttp	C 24	A, B;	.	PLP CSCS	185.300 61.300 68.100 90.00 94.80	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1k7e	C 121	A;	.	NA IAG PLP	182.651 59.081 67.300 90.00 94.55	REFMAC	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1a5s	C 121	A, B;	TETRAMER	FIP NA PLP	182.700 60.800 67.500 90.00 94.60	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1a50	C 121	A, B;	TETRAMER	PLP NA FIP	182.700 60.700 67.500 90.00 94.50	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
2usy	C 121	A, B;	TETRAMER	PLP NA	185.100 61.200 67.600 90. 94.70	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1c29	C 121	A;	.	PLP NA HE1	182.290 58.870 67.400 90.00 94.40	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1c9	C 121	A;	.	NA NHP PLP	182.650 59.340 67.300 90.00 94.50	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
1c9d	C 121	A;	.	PLP NA HF1	184.220 60.520 67.790 90.00 94.43	X-PLOR 3.851	SALMONELLA TYPHIMURIUM
2tsy	C 121	A, B;	.	G3P PLS NA	185.700 62.600 67.900 90.00 94.40	X-PLOR 3.1	SALMONELLA TYPHIMURIUM

Tabla C :Integrasa

PDB-ID	RES (Å)	R	R _{free}	INT	No. REFLE	No. ATOM	No. PARAM	DAT/PAR	F.S	G ESPA
1exq	1.6	0.25	0.27	97.2	35599	2344	11720	3.04	0	P 32 6
1hyv	1.7	0.22	0.26	*	39564	1250	6250	6.33	1	P31 2 1
1b9d	1.7	0.22	0.28	99.2	20854	1243	6215	3.36	0	P31 2 1
1b9f	1.7	0.24	0.28	95.3	22241	1237	6185	3.6	0	P31 2 1
1a5v	1.9	0.15	0.21	91.4	14653	1321	6605	2.22	1	P43 21 2
1a5x	1.9	0.16	0.21	93.3	14942	1317	6585	2.27	1	P43 21 2
1ae9	1.9	0.2	0.23	98.9	110468	2815	14075	7.85	0	H 3 18
1bis	1.95	0.2	0.26	93.8	20883	3287	16435	1.27	1	P 1 2
1biz	1.95	0.21	0.25	93.8	20883	2430	12150	1.72	0	P21 21 21
1a5w	2	0.15	0.22	89	12682	1280	6400	1.98	1	P43 21 2
1bl3	2	0.22	0.28	95.7	34702	3599	17995	1.93	1	C 1 2 1
1b92	2.02	0.23	0.29	98.5	13085	1239	6195	2.11	0	P31 2 1
1qs4	2.1	0.21	0.26	94.2	26564	4039	20195	1.32	0	C 1 2 1
1bhl	2.2	0.22	0.26	97.47	10359	1102	5510	1.88	0	P31 2 1
1itg	2.3	0.2	*	*	7487	1138	5690	1.32	0	P31 2 1
1hyz	2.3	0.24	0.29	*	15753	1245	6225	2.53	1	P31 2 1
1k6y	2.4	0.23	0.26	*	51553	6132	30660	1.68	1	P43 21 2
1bi4	2.46	0.23	0.27	96.8	10359	3595	17975	0.58	0	C 1 2 1
1biu	2.5	0.2	0.27	96	20883	4955	24775	0.84	0	C 1 2 1
1aih	2.5	0.21	0.27	97.47	34819	5549	27745	1.25	0	P21 21 21
2itg	2.6	0.2	*	79.8	5012	1293	6465	0.78	0	P31 2 1
1ex4	2.8	0.26	0.31	99.7	15580	3452	17260	0.9	0	P3 1 2

Tabla C:Continuación...

PDB-ID	U ASIM	U BIOLÓGICA	LIGANTES	DIMENSIONES DE CELDAS	PROGRAMA	ORGANISMO FUENTE
1exq	A, B;		CD CL SO4	48.886 48.886 103.644 90.00 90.00 120	: CNS	HIVIRUS
1hyv	A;		CAF SO4 CL TTA	72.010 72.010 65.600 90.00 90.00 120	: REFMAC	HIVIRUS
1b9d	A;		CAC SO4	72.350 72.350 65.720 90.00 90.00 120	: REFMAC	HIVIRUS
1b9f	A;	MONOMER	CAC SO4	72.440 72.440 65.420 90.00 90.00 120	: REFMAC	HIVIRUS
1a5v	*;		Y3 MN	66.444 66.444 81.065 90.00 90.00 90.00	: X-PLOR 3.1	AV. SARCO. VIRUS
1a5x	*;		Y3	66.443 66.443 81.282 90.00 90.00 90.00	: X-PLOR 3.1	AV. SARCO. VIRUS
1ae9	A, B;			107.320 107.320 108.710 90.00 90.00 120	: X-PLOR 3.851	PHAGE LAMBDA
1bis	A, B;	DIMER		45.090 45.080 49.430 68.82 64.74 62.63	: X-PLOR 3.1	HIVIRUS
1biz	A, B;	DIMER	CAC	50.840 71.340 91.880 90.00 90.00 90.00	: X-PLOR 3.1	HIVIRUS
1a5w	*;		Y3	66.707 66.707 81.019 90.00 90.00 90.00	: X-PLOR 3.1	AV. SARCO. VIRUS
1bl3	A, B, C;	MULTIMER	MG	99.100 72.500 79.400 90.00 108.00 90.00	: X-PLOR 3.851	HIVIRUS
1b92	A;		CAC SO4	72.260 72.260 65.600 90.00 90.00 120.00	: REFMAC	HIVIRUS
1qs4	A, B, C;		MG	76.233 46.735 141.361 90.00 105.55 90.	: CNS	HIVIRUS
1bhl	*;	MULTIMER	CAS	72.500 72.500 65.800 90.00 90.00 120.00	: X-PLOR 3.851	HIVIRUS

1itg	.	.	CAC	72.757 72.757 66.066 90.00 90.00 120	X-FLOR	HIVIRUS
1hyz	A;	.	CAP SO4 CL TTO	72.220 72.220 65.160 90.00 90.00 120	: REFMAC	HIVIRUS
1k6y	A, B, C;	.	ZN K PO4	102.710 102.710 280.560 90.00 90.00 90	: CNS 1.0	HIVIRUS
1bi4	A, B, C, D	MULTIMER		99.100 72.500 79.400 90.00 108.00 90	: X-FLOR 3.851	HIVIRUS
1biu	A, B, C;	DIMER	MG	76.220 46.910 140.270 90.00 105.13 90	: X-FLOR 3.1	HIVIRUS
1aih	A, B, C;	DIMER	SO4 MG	42.400 129.300 234.200 90.00 90.00 90	: X-FLOR 3.1	BAC.PHAGE HP1
2itg	;	.		72.400 72.400 65.560 90.00 90.00 120.00	: PROLSQ	HIVIRUS
1ex4	A, B;	.	CPS	103.990 103.990 101.380 90.00 90.00 120	: CNS 1.0	HIVIRUS

Referencias

Estructuras PDB de Fructosa-1,6-bisfosfatasa

- a)PDB ID: 1CNQ
Choe, J.Y., Fromm, H, Honzatko, R.
Crystal structure of fructose 1,6-bisphosphatase: Mechanismo of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes.
Biochemistry. 39 pp.8565-8574 (2000)
- b)PDB ID: 5FBP
Ke, H., Liang, J.-Y., Zhang, Y. & Lipscomb, W.N.
Conformational transition of fructose-1,6- bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form).
Biochemistry 30 pp.4412-4420. (1991)
- c)PDB ID: 1FRP
Xue, Y., Huang S., Liang J.Y., Zhang Y. & Lipscomb, W.N.
Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP and Zn²⁺ at 2.0Å resolution: Aspects of synergism between inhibitors.
Proc. Natl Acad. Sci. 91 pp. 12482-12486 (1994)

Estructuras PDB de Triptofano Sintetasa

- d)PDB ID: 1QOQ, 1QOP
Weyand Michael & Schlichting Ilme
Crystal structure of wild-type tryptophan synthase complexed with the natural substrate indole-3-glycerol phosphate.
Biochemistry. 38 pp. 16469-16480 (1999)
- e)PDB ID: 1A5A, 1A5B
Rhee, S.,Miles, E.W.,Davies, D.R. Cryo-crystallography of a true substrate, indole-3-glycerol phosphate, bound to a mutant (α d60n) tryptophan synthase α B₂ complex reveals the correct orientation of active site α glu49. *J Biol Chem* 273: 8553 (1998)
- f)PDB ID: 1K8Z
Weyand Michael, Schlichting Ilme, Herde Petra, Marabotti Ana & Mozzarelli Andrea.
Crystal structure of the β Ser¹⁷⁸Pro mutant of tryptophan synthase: a knock-out allosteric enzyme.
J Biol Chem 277 pp. 10653-10660 (2002)
- g)PDB ID: 1BK5
Hyde, C.C.,Parris K.D.,Bhat T.N.,Brown C.,Ahmed S.A.,Miles E.W.,Davies D.R. Refined structure of the native form of the tryptophan synthase multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*.
Biochemistry. 38 pp. 16469-16480 (1999)

Estructuras PDB de HIV-1 Integrasa

- h)PDB ID: 1HYV
MOLTENI, Valentina., Greenwald Jason, Rhodes Denise, Hwang Young, Kwiatkowski Witek, Bushman Frederic D., Siegel Jay S. & Choe Senyon.
Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP and Zn²⁺ at 2.0Å resolution: Aspects of synergism between inhibitors.
Biochemistry. 38 pp. 16469-16480 (1999)
- i)PDB ID: 1BIS
Goldgur, Y., dyda F.,Hickman A.B., Jenkins T.M., Craigie R., Davies D.R.
Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: An active site that binds magnesium.
Proc Natl Acad Sci 95 pp. 9150-9154 (1998)

Links en WWW

<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/elsevier.html>

<http://www.cienciahoy.org/hoy60/luz.html>

<http://www.pdb.org/>.

Bibliografía

1. ABAD-ZAPATERO, C. (2002) *Crystals and Life: A personal Journey*. International University Line. EUA.
2. AMADEI, A. Linsen A.B, Berendsen H.J. (1993) Essential dynamics of proteins. *Proteins* 17:412-425
3. ANDERSEN, C.A., Palmer A.G., Brunak S. & Rost B. (2002) Continuous assignment of secondary structure correlates with protein flexibility. *Structure* 10: 175-184
4. ANFINSEN, C.B. & Scheraga H.A. (1975) Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Advan Protein Chem* 29: 205-300
5. ARRINGTON, C.B, Robertson, A.D. (2000) Microsecond to minute dynamics revealed by EX1-type hydrogen exchange at nearly every backbone hydrogen bond in a native protein. *J. Mol. Biol.* 296:1307-1317
6. BAHAR, I., Atilgan, A.R., Demirel, M.C, Erman, B. (1998) Vibrational dynamics of folded molecules: significans of slow and fast motions in relation to function and stability. *Phys Rev Lett.* 80:2733-2736
7. BAHAR, I., Jernigan, R.L. (1999) Cooperative fluctuations and subunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry* 38: 3478-3490
8. BENKOVIC, S.J. de Maine, M.M. (1982) Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv Enzymol.* 53, 45-82.
9. BERMAN, H.M., Zardecki, C., et al. (2002) The Protein Data Bank. *Act. Cryst. Sec D* 899-907
10. BERMAN, H.M, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28:235-242
11. BROOKS, B.R., D. Janczic & M. Karplus (1995) Harmonic analysis of large systems. *J Comput Chem* 16:1522-1542
12. BRUNGER, A.T., Adams P.D, Clore G.M, Delano, W.L, Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W, Jiang J.S, Kuszewski J., Nilges N., Pannu N.S, Read R.J, Rice L.M, Simonson T. & Warren G.L. (1998) Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Act. Cryst. Sec D* 54: 905-921
13. BRUNGER, Axel T. & D Laue Ernest. (2000) Biophysical methods: New approaches to study macromolecular structure and function. *Curr Op in Struc Biol.* 10:557
14. CÁRCAMO, J.G., Yañez, A.J", Ludwig, H.C, León, O., Pinto, R.O., Reyes, A.M. & Slebe, J.C. (1999) The CI-C2 interface of fructose-1,6-bisphosphatase is critical for allosteric inhibition and AMP cooperativity. *FASEB J.* 13, A-1532 (1.1.54).
15. CCP4: Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) *Act. Cryst. Sec D* 50: 760-763
16. CHAPUIS, G. (2001) *Cristallographie en Suisse. Une Science a la pointe de la recherche*. Societe suisse de cristallographie.
17. CHEN, Zhi., Blanc Eric, Chapman, Michael S. (1999) Improved free R factors for cross-validation of macromolecular structure- importance for real-space refinement. *Act. Cryst. Sec D* 55:219-224
18. CHOE, J.Y, Poland, B.W., Fromm, H.J. & Honzatko, R.B. (1998) Role of dynamic loop in cation activation and a llosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase *Biochemistry* 37, 11441-11450
19. CHOE, J.Y., Fromm, H, Honzatko, R. (2000) Crystal structure of fructose 1,6-bisfosfatase: Mechanismo of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. *Biochemistry.* 39:8565-8574
20. CRUICKSHANK, D.W.J. (1965) *Act. Cryst.* 17: 754
21. DAUTER, Zbigniew. (1999) Data collection strategies. *Act. Cryst. Sec D* 55:1703-1717
22. ELLIS, R.J., Dobson C. & Hartl, U. (1998) Sequence does specify protein conformation. *Trends Biochem Sci.* 23: 468
23. FERSHT, A. (1999) *Structure and Mechanism in Proteins Science*. W. H" Freeman, New York.

- 24.FREIRE, Ernesto. (2000) Can Allosteric regulation be predicted from structure? *Proc Natl Acad Sci.* Vol. 97, no. 22:11680-11682
- 25.FREIRE, Ernesto & Luque Irene. (2000) Structural stability of binding sites: Consequences for binding affinity and allosteric effects. *Proteins* 4:63-71
- 26.GROOT, B.L., Hayward S, van Aalten D, Amadei A, Berndsén (1998) Domain motion in bacteriophage T4 lysozyme: A comparison between molecular dynamics and crystallographic data. *Proteins* 31:116-127
- 27.HAMMES Gordon G. (2002) Multiple conformational changes in enzyme catalysis. *Biochemistry* Vol.41, no.26: 8221-8228
- 28.HARRIS Gillian & Pickersgill Richard. (1992) The segmented anisotropic refinement of monoclinic papain by the application of the rigid-body TLS model and comparison to bovine ribonucleasa A. *Act. Cryst. Sec B* 48:67-75
- 29.HARRIS, Rodney M. & Dunn Michael F. (2002) Intermediate trapping via a conformational switch in the Na⁺-activated tryptophan synthase holoenzyme complex. *Biochemistry* 41: 9982-9990
- 30.HAYWARD, S., Kitao A, Berendsen HJC. (1997) Model-free methods of analyzing domain motions in proteins from simulations: A comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation. *Proteins.* 27:425-437
- 31.HAZES, B, Magnus K.A, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk K.H, Hol W.G.J. (1993) Crystal structure of deoxygenate *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution. *Protein Sci.* 2:597-619
- 32.HINSEN, K., Thomas A., Field M.J. (1999) Analysis of domain motions in large proteins. *Proteins.* 34:369-382.
- 33.HOLBROOK, S.R., Wang A.H.J., Rich A. & Kim, S.H. (1986) *J Mol Biol.* 187: 429-440
- 34.HORJALES, E., Åqvist J, Leijonmarck M & Tapia O. (1987) Aspects of model building applied to the C-terminal domain of the L12 protein from chloroplast ribosomes: A molecular dynamics study.
- 35.HORJALES, E., Altamirano M.M, Calcagno, M.L, Garrat R.C & Oliva, G. (1999) The allosteric transition of the glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure* 7: 527-537
- 36.HOWLIN, B., Butler S.A., Moss D.S, Harris G.W., Driessen H.P.C. (1993) *J Appli Cryst.* 26: 622-624
- 37.HYDE, C.C., Parris K.D., Bhat T.N., Brown C., Ahmed S.A., Miles E.W., Davies D.R. (1999) Refined structure of the native form of the tryptophan synthase holoenzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry.* 38: 16469-16480
- 38.IVERSEN, L.F., Brzozowski M., Hastruo S., Hubbard R., Kastrop J.S, Larsen I.K., Nrum L., Nørskov-Lauridsen L., Rasmussen P.B., Thim L., Wiberg F.C & Lundgren K. (1997) Characterization of the allosteric binding pocket of human liver fructose-1,6-bisphosphatase by protein crystallography and inhibitor activity studies. *Protein Sci.* 6: 971-982
- 39.IWATA, S, Kamata K, Yoshida S, Minova T, Ohta T. (1994) T and R states in the crystals of bacterial L-lactate dehydrogenase reveal the mechanism for allosteric control. *Nat Struct Biol* 1:176-185
- 40.JONES, T.A., Zou J.Y., Cowan S.W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Act. Cryst. Sec A* 47:110-119
- 41.JOTI, Yasumasa, Nakasako Mayayochi, Kidera Akinori & Go Nobuhiro. (2002) Nonlinear temperature dependence of the crystal structure of lysozyme: correlation between coordinate shifts and thermal factors. *Act. Cryst. Sec D* 58:1421-1432
- 42.KIDERA, Akinori & Go, Nobuhiro. (1990) Refinement of protein dynamic structure: Normal mode refinement. *Proc Natl Acad Sci* 87:3718-3722
- 43.KE, H., Zhang Y., Lipscomb W.N (1990) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc Natl Acad Sci.* 87:5243-5247
- 44.KE, H., Liang, J.-Y., Zhang, Y. & Lipscomb, W.N. (1991) Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form). *Biochemistry* 30, 4412-4420.
- 45.KESKIN, O. Durell S.R., Bahar I., Jernigan R.L., Covell D.G. (2002) Relating molecular flexibility to function: A case study of Tubulin. *Biophysical Journal.* 83:663-680
- 46.KOSHLAND, Jr. D. (1996) The structural basis of negative cooperativity: receptors and enzymes. *Curr Op in Struc Biol.* 6:757-761

47. KURBANOV, F.T., Choe, J.-Y., Honzatko, R.B. & Fromm, H.J. (1998) Directed mutations in the poorly defined region of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase significantly affect catalysis and the mechanism of AMP inhibition. *J. Biol. Chem.* 273, 17511-17516.
48. LARSEN, T.M., Lauguglin L.T., Holden H.M., Rayment I., Reed G.H. (1994) Structure of rabbit muscle pyruvate kinase with Mn^{2+} , K^+ , and pyruvate. *Biochemistry* 33:6301-6309
49. LIANG, J.Y., Zhang Y., Haung S. & Lipscomb W.N. (1993) Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 2132-2136
50. LIU, F. & Fromm, H.J. (1986) Kinetic studies on the mechanism and regulation of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol. Chem* 265 7401- 7406.
51. LIU, J., Tan H. Rust, B. (2002) Loopy proteins appear conserved in evolution. *J Mol Biol.* 322:53-64
52. LU, G., Williams, M.K., Giroux, L.E. & Kantrowitz, E.R. (1995) Fructose-1,6-bisphosphatase: arginine-22 is involved in stabilization of the T allosteric state. *Biochemistry* 34, 13272-13277.
53. LU, G., Stec, B., Giroux, E.L. & Kantrowitz, E.R. (1996) Evidence for an active T-state pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase: interface residue Lys-42 is important for allosteric inhibition and AMP cooperativity. *Protein Sci.* 5, 2333-2342.
54. LU, G., Giroux, E.L. & Kantrowitz, E.R. (1997) Importance of the dimer-dimer interface for allosteric signal transduction and AMP cooperativity of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 272: 5076-5081
55. MARABOTTI, A., De Biase D., Tramonti A., Bellati S. & Mozzarelli A. (2001) allosteric communication of tryptophan synthase: functional and regulatory properties. *J. Biol. Chem.* 276: 17747-17753
56. MARCUS, F., Edelstein, I., Reardon, I. & Heinrikson, R.L. (1982) Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl Acad. Sci.* 79, 7161-7165.
57. MAITOS, Carla. (2002) Protein-water interactions in a dynamic world. *TRENDS in Biochem Scien* Vol.27 no.4 203-208
58. MATTEVI, A., Bolognesi M, Valentini G. (1996) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett.* 389: 15-19
59. MATTEVI, A., Rizzi M, Bolognesi M (1996) New structures of allosteric proteins revealing remarkable conformational changes. *Curr Op in Struc Biol.* 6:824-829
60. MATTHEWS, Brian. (1997) Recent Transformation in Structural Biology. In *Methods in Enzymology.* Vol.276. Academic Press, Inc. UK
61. MILLAR, David, B. (1998) Negative cooperativity in tryptophan synthase a subunit dissociation is caused by the bound coenzyme: pyridoxal 5'-phosphate. *Analytical biochemistry* 264:271-278
62. MERRIT, Ethan. A. (1999) Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement. *Act. Cryst. Sec D* 55:1109-1117
63. MONOD, J., Wyman Jeffries, Changeaux Jean-Pierre (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol.* 12:88-118
64. MORRIS, J.G. (1982) *Fisicoquímica para Biólogos.* Editorial Reverté, España. p.p 277-320
65. MOULT, J & Melamud E. (2000) From fold to function. *Curr Op in Struc Biol.* 10: 384-389
66. MURRAY-RUST, Peter. (1998) The globalization of crystallographic knowledge. *Act. Cryst. Sec D* 54:1065-1070
67. MURRAY, Stewart. & Johnson, John (1998) Structural cell biology-functional integration in macromolecular assemblages. *Curr Op in Struc Biol.* 8:139-141
68. MURSHUDOV, G.N., Vagin A.A. & Dodson, E.J. (1997) *Act. Cryst. Sec D* 53: 240-253
69. MURZIN, A.C. (1996) Structural classification of proteins: new superfamilies. *Curr Op in Struc Biol.* 6: 386-394
70. NELSON, S.W., Kurbanov, F.T., Honzatko R. & Fromm, H. (2000) The N-terminal segment of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase participates in the allosteric regulation of catalysis. *J Biol Chem* 276: 6119-6124

71. NELSON, S.W., Choe, J.Y., Honzatko R. & Fromm, H. (2000) Mutations in the hinge of a dynamic loop broadly influence functional properties of fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 275: 29986-29992
72. NELSON, S.W., Iancu, C.v., Choe, J.Y., Honzatko R. & Fromm, H. (2000) Tryptophan fluorescence reveals the conformational state of a dynamic loop in recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 39: 11100-11106
73. NICHOLS, W.L., Rose G.D, Ten Eyck L.F., Zim B.H. (1995) Rigid domains in proteins: An algorithmic approach to their identification. *Proteins* 23:38-48
74. NIMMO, H.G. & Tipton, K.F. (1975) The allosteric properties of beef liver fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 58, 575-585.
75. OLIVA, G., Fontes M.R.M, Garrat R.C, Altamirano M.M, Calcagno M.L, Horjales E. (1995) Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å. *Structure*,3:1323-1332
76. PAN, Peng, Woehl Eilika & Dunn Michael F. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *TIBS* 22-27
77. PAPIZ, M.Z. & Prince S.M. (1996) *Proceedings of the CCP4 study Weekend. Macromolecular refinement*. Edited by E. Dodson pp.115-123 Daresbury.
78. PERACCHI, A., Bettati S., Mozzarelli A., Rossi G.L., Miles E.W. And Dunn, M.F. (1996) Allosteric regulation of tryptophan synthase: Effects of pH, temperature and α -subunit ligands on the equilibrium distribution of pyridoxal 5'-phosphate-L-serine intermediates. *Biochemistry* 35: 1872-1880.
79. PERUTZ, Max. (2002). *Los científicos, la ciencia y la humanidad: ojalá te hubiese hecho enojar antes*. Granica. España. pp.285-288, 341-390
80. PERUTZ, Max. (1985) Early days in Protein Crystallography. In *Methods in Enzymology*. Vol.114. Academic Press, Inc. UK
81. PILKIS, S.J., El-Maghrabi, M.R. & Claus, T.H. (1988) Hormonal. regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev Biochem.* 57: 755-783.
82. RHEE, S., Parris K.D., Hyde C., Ahmed S.A., Miles, E.W. & Davies, D.R. (1997) Crystal structures of a mutant (β K87I) tryptophan synthase $\alpha\beta_2$ complex with ligands bound to the active sites of the α and β subunits reveal ligand-induced conformational changes. *Biochemistry* 36: 7664-7680
83. RHEE, S., Miles, E.W., Davies, D.R. (1998) Cryo-crystallography of a true substrate, indole-3-glycerol phosphate, bound to a mutant (α d60n) tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex reveals the correct orientation of active site α glu49. *J Biol Chem* 273: 8553
84. RHODES, G. (2000) *Crystallography. Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. Second Edition. Academic Press, EUA.
85. RO, Hyeon-Su & Wilson Miles Edith. (1999) Catalytic mechanism of the tryptophan syntase $\alpha_2\beta_2$ complex: effects of pH, isotopic substitution and allosteric ligands. *J Biol Chem* 274: 31189-31194
86. ROSENFELD, R.E., Trueblood, K.N. & Dunitz J.D. (1978) *Act. Cryst. Sec A* 34: 828-829
87. ROSSMANN, Michael. & van Beek, Cornelis. (1999) Data processing. *Act. Cryst. Sec D* 55:1631-1640
88. RUDIÑO-PIÑERA, E. (2001) *Estudios Estructurales sobre el Mecanismo de Activación Alostérica de la Glucosamina-6-fosfato Desaminasa de Escherichia coli*. Tesis Doctoral por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Instituto de Biotecnología (IBT). México.
89. RUDIÑO-PIÑERA, E, Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P. & Horjales, E. (2002) Structural flexibility: an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Act. Cryst. Sec D* 58:10-20
90. SALI, A., Veerapandian B., Cooper J.B., Moss D.S, Hoffman T. & Blundell, T.L. (1990) *J Mol Biol*
91. SANDS, Donald E. (1975) *Introduction to crystallography*. Dover Publications, Inc. USA
92. SCHNEIDER, T.R., Gerhart Eva, Lee Minsu, Liang Po-Huang, Anderson Karen S. & Schlichting Ilme. (1998) Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry* 37: 5394-5406
93. SCHOMAKER, Verner & Trueblood K.N. (1967) On the rigid-body motions of molecules in crystals. *Act. Cryst. Sec B* 24:63-76
94. SCHULZ, G.E. (1991) Domain motions in proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 1:883-888
95. SHAPIRO, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., Hendrickson, A. (1995) *Nature* 374: 327.

96. SCHEFTLER, J.E. & Fromm, H.J. (1986) Regulation of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase by metals, nucleotides, and fructose-2,6-bisphosphate as determined from fluorescence studies. *Biochemistry* 25, 6659-6665.
97. SHYUR, L.F., Aleshin, A. & Fromm, H.J. (1996) A study of subunit interface residues of fructose-1,6-bisphosphatase by site directed mutagenesis: effects on AMP and Mg^{2+} affinities. *Biochemistry* 35, : 7492-7498.
98. SHYUR, L.F., Aleshin, A., Honzatko, R.B. & Fromm, H.J. (1996) Biochemical properties of mutant and wild type fructose-1,6-bisphosphatases are consistent with the coupling of intra and intersubunit conformational changes in the T and R-state transition. *J. Biol. Chem.* 271: 33301-33307
99. SHYUR, L-F., Poland, B.W., Honzatko, R.B. & Fromm, H.J. (1997) Major changes in the kinetic mechanism of AMP inhibition and AMP cooperativity attend the mutation of Arg49 in fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 272, 26295-26299.
100. SIXMA, T, Brejc K, Celie P, van Dijk W.J, Klaassen R.V, van der Oost J, Schuurmans M, Smit A.B. (2002) Insights in nicotinic receptors through acetylcholine binding protein structures. *Act. Cryst. Sec A 58* (supplement) Abstracts Volum II of XIX Congress and general assembly of the international union of crystallography. Geneva, Switzerland, August 6-15, 20002. p 190.
101. SRIVASTAVA, D.K., Bernhard, S.A. (1987) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16:175.
102. STEC, B., Zhou R. & Teeter M.M. (1995) *Act. Cryst. Sec D 51*: 663-681
103. STRATER, N, Hakansson K, Schnappauf G, Braus G, Lipscomb W.N (1996). Crystal structure of the T state of allosteric yeast chorismate mutase and comparison with the R state. *Proc Natl Acad Sci* 93:3330-3334
104. TEJWANI, G.A. (1983) Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity. *Adv Enzymol.* 54, 121-194.
105. TODD, A.E., Orengo C.A & Thornton, J.M. (2001) Evolution of function in protein superfamilies from a structural perspective. *J Biol Chem* 307: 1113-1143.
106. VILLERET, V., Huang, S., Zhang, Y. & Lipscomb, W.N. (1995) Structural aspects of allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase AMP: the binding of both the substrate analogue 2,5-anhydroglucitol-1,6-bisphosphate, and catalytic metal ions monitored by X-ray crystallography. *Biochemistry* 34, 4307-4315.
107. WEBER, K. (1968) A new structural model of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase and the amino acid sequence of the regulatory chain. *Nature*, 218:1116-1119
108. WEYAND, Michael & Schlichting Ilme (1999) Crystal structure of wild-type tryptophan synthase complexed with the natural substrate indole-3-glycerol phosphate. *Biochemistry*. 38: 16469-16480
109. WEYAND, Michael & Schlichting Ilme (2000) Structural basis for the impaired channeling and allosteric inter-subunit communication in the bA169L/bC170W mutant of tryptophan synthase. *J Biol Chem* 275: 41058-41063.
110. WEYAND, Michael, Schlichting Ilme, Herde Petra, Marabotti Ana & Mozzarelli Andrea. (2002) Crystal structure of the β Ser¹⁷⁹Pro mutant of tryptophan synthase: a knock-out allosteric enzyme. *J Biol Chem* 277: 10653-10660
111. WEISS (1999) Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*. 283:1676-1683
112. WEISSIG, H. and Bourne, P.E. (2002) Protein structure resources. *Act. Cryst. Sec D* 908-914
113. WILEY D.C., Lipscomb W. (1968) Crystallographic determination of the symmetry of aspartate transcarbamoylase. *Nature*. 218:1119-1121
114. WILSON, M.A. & Brunger A.T. (2000) *J Mol Biol.* 301: 1237-1256
115. WINN M.D, Isupov M.N & Murshudov G.N. (2000) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Act. Cryst. Sec D* 57:122-133.
116. WOEHL, Eilika & Dunn Michael F. (1999) Mechanism of monovalent cation action in enzyme catalysis: The tryptophan synthase α - β - and β -reactions. *Biochemistry* 38: 7131-7141.
117. XUE, Y., Huang S., Liang J.Y., Zhang Y. & Lipscomb, W.N. (1994) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP and Zn^{2+} at 2.0 Å resolution: Aspects of synergism between inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci.* 91: 12482-12486

118. ZHANG, Y., Liang, J.-Y., Huang, S. & Lipscomb, W.N. (1994) Toward a mechanism for the allosteric transition of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Mol. Biol.* 244:609-624.
119. ZHANG, Y., Villeret V., Lipscomb, W.N, Fromm H. (1995) Kinetics and mechanisms of activation and inhibition of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase by monovalent cations. *Biochemistry* 35: 3038-3043