



Universidad Nacional Autónoma de México
Licenciatura en Investigación Biomédica Básica.
Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica
Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas.

**Los cambios conformacionales terciarios de la
Glucosamina-6-fosfato
desaminasa de *Escherichia coli*, determinan al
componente cuaternario de la transición alostérica.**

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Investigación Biomédica Básica
presenta:

Roberto Jareth Vázquez Núñez

Director de tesis.
Dr. Mario L. Calcagno.

Miembros del jurado:
Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Dra. Adelar Rodríguez Romero
Dr. Héctor Riveros Rosas
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Ciudad Universitaria, Mexico D.F. 2013



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias.

La presente tesis está dedicada a toda mi familia:

A mis padres Bertila y Gabriel, quienes han sido un ejemplo para sus hijos, me dieron la vida y siempre han brindado toda su confianza y apoyo, se que siempre estarán ahí cuando lo necesite.

A mis hermanos Gabriel y Johalan, quienes han sido mis mejores amigos y las personas con quien se que siempre me podré desahogar, pero sobre todo compartir nuestras alegrías celebrando hasta más no poder.

A mi abuelito Gabriel, quien siempre me ha tenido paciencia y me ha dado todo su cariño sin importar las circunstancias o situaciones.

A mi compañera de camino Dana, que me ha enseñado por vez primera lo que es el amor, y me ha brindado todo su apoyo, cariño y paciencia, pero sobre todo me ha compartido parte de su vida. ¡Aún queda mucho camino por recorrer!

A mis primos Miguel y Roxana quienes siempre me han hecho sentir una persona feliz y han compartido con nosotros sus 3 mas valiosos tesoros que son mis sobrinas Mariana y Vale y mi sobrino Miguel.

Este trabajo también fue posible gracias a mucha gente que tiene un lugar muy especial en este paso importante de mi vida:

A Mario, mi tutor y maestro en todo el sentido de la palabra, pero sobre todo un gran amigo que ha tenido mucha confianza en mi y me ha apoyado incondicionalmente en situaciones difíciles. ¡Seguiremos adelante Mario!

A Sergio Zonszein quien ha sido la persona que me ha formado como joven investigador, quien ha tenido la paciencia de enseñarme y ayudarme a entender todo el trabajo que aparece en esta tesis, y con quien se que puedo contar en cualquier momento.

Quiero dedicar este trabajo también a toda la familia Díaz Jiménez, quienes me han hecho sentir parte de ellos, y me han hecho sentir una persona feliz, me han enseñado muchas cosas de la vida en general, y me han apoyado en todo momento incondicionalmente.

Agradecimientos.

A la M. en C. Laura I. Álvarez Añorve, quien amablemente me ayudo en la preparación de las cepas, sobreexpresión y purificación de las enzimas utilizadas en este trabajo.

A los miembros del jurado, quienes amablemente hicieron una revisión crítica de este trabajo.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, quien además de ser parte del jurado, nos brindó su apoyo en la parte teórica y desarrollo de los modelos utilizados en este trabajo.

A la coordinación de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, a la Lic. Cynthia Lima, quien me ha apoyado en todos los asuntos administrativos durante mis estudios.

Al SIN-CONACyT por brindarme el apoyo económico que me permitió realizar este trabajo.

Al PAPIIT quien nos brindo apoyo económico para llevar a cabo las investigaciones y experimentos.

A todos mis tutores de la carrera, al Dr. Julio Carrero, al Dr. Georges Dreyfus y al Dr. Enoch Baldwin por haber tenido la paciencia y dedicación de formar parte de mi crecimiento académico.

A todos los miembros del LFQIP por su apoyo y compañerismo.

Finalmente a mi alma mater la UNAM, que me abrió las puertas, no solamente a sus aulas, sino también las de otras instituciones fuera del país, y me ha formado como una persona competitiva.

“Nadie llega tan lejos sí no es para seguir”

Nacho Vegas, 2003

ÍNDICE

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS	8
1.2. ESTRUCTURA DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS	10
1.3. REGULACIÓN ALOSTÉRICA	11
1.4. COOPERATIVIDAD Y ALOSTERÍA	12
1.5. MODELOS DE COOPERATIVIDAD	13
1.6. LA ECUACIÓN DE HILL.	14
1.7. MODELO CONCERTADO DE MONOD, WYMAN & CHANGEUX (MWC)	16
1.8. EFECTOS HOMOTRÓPICOS Y HETEROTRÓPICOS.	18
1.9 ESTUDIO DE LAS TRANSICIONES TERCIARIAS	20
1.11 MODELO DE ESTUDIO: LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	21
1.12 ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	24
1.13 MARCAJE FLUORESCENTE SITIO ESPECÍFICO EN LA ECGNPDA	24
2. PLANTEAMIENTO	27
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVO	30
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS	31
5.2 MUTAGÉNESIS	31
5.3 SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN	32
5.4 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	32
5.5 ENSAYOS ENZIMÁTICOS	33
5.6 DETERMINACIÓN DE LA K_D MEDIANTE FLUORESCENCIA	33
5.7 NANOENCAPSULACIÓN DE LA PROTEÍNA EN GELES DE SÍLICE	34
5.8 FLUORESCENCIA DE LA PROTEÍNA NANOENCAPSULADA	35
5.9 COMPARACIÓN ENTRE LA FLUORESCENCIA DE LA ECGNPDA EN SOLUCIÓN Y NANOENCAPSULADA	35
5.10 CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LOS CONFÓRMEROS NANOENCAPSULADOS	36
5.11 MUTACIÓN <i>IN SILICO</i>	37
6. RESULTADOS	38
6.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA MUTANTE 165C/206W	38
6.2 TITULACIÓN DE 165C/206W CON GLCNAc6P MEDIDA CON FLUORESCENCIA	39
6.3 CAMBIO CONFORMACIONAL TERCIARIO EN GELES DE SÍLICE	41
6.4 RELAJACIONES DE LOS ESTADOS TERCIARIOS EN EL CONFÓRMERO T	43
6.5 RELAJACIÓN DE LOS ESTADOS TERCIARIOS EN EL CONFÓRMERO R.	45
6.6 CAMBIO EN LA K_{Obs} DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE GLCNAc6P.	49
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	57

9. NUEVAS PREGUNTAS **57**

10. BIBLIOGRAFÍA **59**

11. APÉNDICE **62**

Resumen

La glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPDA) cataliza la conversión de la glucosamina-6-fosfato a fructosa-6-fosfato y ion amonio. Es una enzima alostérica activada por *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). Muchos detalles estructurales se conocen bien gracias a que se cuenta con las estructuras resueltas por cristalografía de rayos X de sus dos conformaciones alostéricas T y R. También se conoce a detalle la cinética de catálisis de esta enzima, así como la activación alostérica por la GlcNAc6P, la cual se explica mediante un modelo de selección conformacional. La evidencia mostrada en trabajos previos y en las estructuras cristalográficas señalan que existen sub-estados terciarios, no obstante aún no se ha investigado su relación con los cambios estructurales cuaternarios. Para estudiar estos sub-estados, en el presente trabajo aislamos los cambios terciarios locales, impidiendo la transición cuaternaria mediante la nanoencapsulación en geles de sílice. Como reportero del cambio estructural, construimos una mutante con una cisteína en la posición 165 que apaga la fluorescencia de un triptofano colocado en a posición 206. Con esta mutante, estudiamos la cinética de relajaciones terciarias de los conformeros T y R. En general, encontramos que existen dos conformaciones terciarias al equilibrio, y que su estabilidad depende del estado de ligación y de la conformación cuaternaria. En el caso del conformero T, logramos conocer el mecanismo de unión y transición terciaria, llegando a la conclusión de que ésta opera como un sistema de ajuste inducido. Los resultados nos dan los primeros indicios del acoplamiento terciario-cuaternario de la transición alostérica, así como una metodología para el estudio de cinética de relajaciones que nos permitirá continuar entendiendo la alostería de la EcGNPDA.

1. Introducción

Las proteínas son polímeros de L-aminoácidos con una secuencia específica, la cual se encuentra codificada en el ADN. Estas macromoléculas son las encargadas de llevar a cabo la mayor parte de las funciones en las células, desde el soporte estructural hasta la catálisis de reacciones químicas, que son esenciales para el funcionamiento metabólico de los seres vivos [1].

Todas las proteínas están constituidas por 20 aminoácidos genéticamente codificados que actúan como bloques de construcción, los cuales determinan la forma y función a partir de la variación en la secuencia de los aminoácidos.

La gran variedad y versatilidad estructural y funcional de las proteínas radica en la diversidad de propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, entre ellas, la polaridad, la carga electrostática, el tamaño y los estados de protonación dependientes del pH (pK_a) [2].

Se considera proteína a un polímero de más de 100 aminoácidos, en otras palabras, la proteína más pequeña está constituida por 100 aminoácidos; por lo tanto, si al azar pudiera aparecer cualquiera de los 20 aminoácidos en cada una de las 100 posiciones, tendríamos 20^{100} posibles combinaciones. Aunque en realidad la secuencia de aminoácidos no es producto del azar, esto hace que la cantidad de proteínas diferentes que existen sea vasta y por ello son las moléculas predilectas para llevar a cabo la mayoría de los procesos celulares [2].

Así como la función de las herramientas convencionales, como una llave de tuercas, está determinada por su forma; en las proteínas hay una estrecha relación entre su estructura particular y la función específica que desempeñan. Sin embargo, las proteínas, a diferencia de las herramientas convencionales, son objetos dinámicos y pueden cambiar su forma al presentarse las condiciones adecuadas y alterar su función [1].

1.1. Estructura de las proteínas

Los diferentes niveles en la estructura de proteínas se clasifican como primario, secundario, terciario y cuaternario.

A la estructura tridimensional de la proteína, en donde le es posible ser funcional, se le conoce como estructura nativa. El proceso mediante el cual la proteína pasa de ser un polímero lineal de aminoácidos a la estructura nativa se le conoce como plegamiento [1]. La estructura nativa, también conocida como unidad biológica, puede contener los cuatro niveles de estructura mencionados anteriormente.

El primer nivel de complejidad estructural es la secuencia de aminoácidos, conocida como estructura primaria. A este nivel los aminoácidos se unen mediante un enlace covalente entre el grupo funcional carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro (enlace peptídico). Esta disposición le confiere a la secuencia una direccionalidad, desde el grupo amino terminal hasta el grupo carboxilo terminal al otro extremo de la secuencia. En consecuencia, el enlace peptídico da lugar a un esqueleto periódico, del cual las cadenas laterales que caracterizan a cada aminoácido quedan expuestos [2].

La conformación de los enlaces con capacidad de rotar en el esqueleto del polímero de aminoácidos, da lugar al siguiente nivel de organización conocida como estructura secundaria. La estructura secundaria de las proteínas se caracteriza por la estabilidad adquirida gracias a interacciones no covalentes como los puentes de hidrógeno. Existen dos clases principales de estructura secundaria: hélices α y láminas β plegadas. Las primeras son por lo común estructuras helicoidales dextrógiras, en las que cada 3.6 aminoácidos hay una vuelta completa. En ella cada cuatro residuos se forma un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el nitrógeno del esqueleto, quedando los grupos funcionales apuntando hacia el exterior de la hélice [1].

Las láminas β plegadas están compuestas por un arreglo lineal completamente extendido de la secuencia de aminoácidos conocida como hebra β ; al unirse varias hebras β mediante puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amino del esqueleto peptídico se obtiene una lámina β plegada. La orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos es perpendicular al plano que forman los esqueletos peptídicos de las hebras β [1].

El arreglo tridimensional preciso de las estructuras secundarias, y otras regiones que conforman a una proteína se conoce como estructura terciaria. Las hélices α o las láminas β plegadas pueden estar unidas por asas o regiones irregulares, que pueden orientarlas en la conformación nativa de la proteína mediante interacciones no covalentes, como puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones de Van der

Waals (interacciones hidrofóbicas) etc. Este arreglo tridimensional es el que finalmente le da la forma a la proteína para adquirir su función específica [1].

El último nivel de organización es la estructura cuaternaria en la que una cadena polipeptídica plegada interacciona con una o varias proteínas formando asociaciones conocidas como oligómeros. Cuando las cadenas polipeptídicas que interaccionan son idénticas entre sí se le denomina homooligómero, mientras que cuando son diferentes se conoce como heterooligómero. A cada cadena polipeptídica que forma parte de un oligómero se le conoce como subunidad. Dependiendo del número de subunidades, un oligómero puede formar desde dímeros (dos subunidades), hasta dodecámeros (doce subunidades) o incluso oligómeros más grandes. La organización de las proteínas como oligómeros es importante para cuestiones de estabilidad y sobre todo de regulación como en el fenómeno de cooperatividad que discutiré más adelante [1].

1.2. Estructura dinámica de las proteínas

El papel que juegan las interacciones no covalentes en la estructura tridimensional de las proteínas es fundamental. Este tipo de interacciones tienen energías de formación relativamente pequeñas, usualmente entre 1 y 5 kcal/mol, por lo que su ruptura y formación puede llevarse a cabo con relativa facilidad [3].

La visión moderna de las proteínas consiste en una estructura que fluctúa alrededor de la nativa. La rotación de ángulos de torsión y la vibración atómica hace que las proteínas estén en constante movimiento. Además de estas fluctuaciones, también existen movimientos grandes que ocurren de manera ordenada; tanto estos movimientos, como la estructura, son determinantes para la función. Algunos ejemplos de la importancia de la movilidad de las proteínas en los seres vivos son: El complejo V de la cadena respiratoria conocida como ATP sintasa, en la cual un movimiento rotatorio es el que hace posible la catálisis de la síntesis de ATP en la mitocondria [4]. También el complejo de la ADN polimerasa, el cual debe hacer movimientos muy grandes de la subunidad β para poder utilizar la hebra anti-sentido de ADN como molde [5]. Otro ejemplo de movimiento de las proteínas es el flagelo bacteriano, en el que un motor impulsado por la energía potencial electroquímica almacenada en un gradiente transmembranal de protones, gira para hacer rotar una

estructura helicoidal de flagelina que impulsa a la célula bacteriana hacia medios más ricos en nutrientes [6].

Existen más ejemplos del movimiento de las proteínas como elemento determinante de la función, pero lo que a este trabajo concierne es el fenómeno de cambio estructural conocido como alostería que a continuación se explica a detalle.

1.3. Regulación alostérica

La palabra alostería, del griego *allos* “distinto” y *stereos* “sólido” fue acuñada por Jaques Monod en el año de 1963 [7]. El término fue utilizado para describir el fenómeno de regulación de algunas proteínas en donde el ligando regulador no presentaba una inhibición clásica. En este sentido un fenómeno alostérico es aquel en el que la unión de una molécula reguladora (efector alostérico) en un sitio de la proteína (sitio alostérico), afecta a distancia las propiedades del sitio activo [7].

La manera en la que ocurre es a través de un cambio conformacional que implica una modificación en el arreglo de las interacciones no covalentes, que mantienen a la estructura terciaria fluctuando en el estado nativo. El cambio conformacional inducido por el efector o ligante alostérico se conoce como transición alostérica. La alostería en sentido amplio, al ser un cambio conformacional inducido por la unión de un ligante que altera las funciones de la proteína en un sitio diferente, se encuentra presente en un gran número de proteínas, incluso en algunas que son monoméricas [8].

La transición alostérica es el principio del funcionamiento de los receptores transmembranales que pueden unir a un ligando desde el exterior de la célula y provocar cambios al interior. Hay quienes incluso consideran como cambio alostérico a la fosforilación de proteínas para activarlas o inhibirlas, ya que en cierto modo cumplen una de las condiciones importantes de las transiciones alostéricas que debe ser un proceso reversible. En el caso de las fosforilaciones, las fosfatasas pueden quitar el grupo fosfato haciendo el proceso reversible [9].

El fenómeno alostérico es de gran relevancia para la regulación, no sólo de las proteínas, sino de la célula. Por ejemplo, el modelo del represor de lactosa (Lac I) a partir del cual Monod propuso la existencia de la alostería, en donde la regulación alostérica es determinante para la expresión de los genes del operón de lactosa [7].

Desde la regulación genética hasta la transducción de señales, la alostería es un proceso que por su relevancia biológica resulta interesante estudiarlo y entenderlo. Un fenómeno muy frecuentemente asociado a la regulación alostérica y que ocurre en proteínas oligoméricas, es la cooperatividad que a continuación se explica con detalle.

1.4. Cooperatividad y alostería

La cooperatividad y la alostería suelen ser conceptos que se llegan a confundir, y a pesar de ser dos fenómenos diferentes, existe una estrecha relación entre ellos. El fenómeno alostérico como se explicó en la sección anterior es muy amplio, mientras que la cooperatividad es una característica restringida al grupo de proteínas oligoméricas. Siendo así, la alostería da origen a la cooperatividad, pero no todos los fenómenos alostéricos son cooperativos [10].

La cooperatividad se define como un evento propagado entre las subunidades, que cambia la constante de disociación dependiendo del número de subunidades previamente ligadas. La cooperatividad no solo se observa en la unión de un ligando, sino también en la cinética de las reacciones de catálisis de las enzimas [11].

La cooperatividad en las proteínas se encontró al observar una distorsión en las curvas hiperbólicas de saturación o de velocidad en función del sustrato.

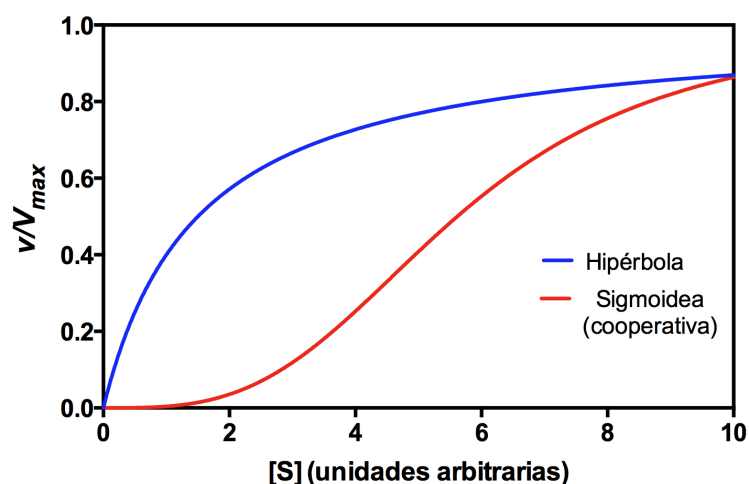
En ausencia de cooperatividad, la unión de un ligando o la velocidad de reacción de una enzima en función de la concentración de sustrato se explica a través de la ecuación de Michaelis-Menten, la cual parte del hecho de la existencia de un complejo entre la enzima (E) y el sustrato (S), ES. La ecuación 1 representa dicho modelo:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

En donde v_0 es la velocidad inicial de la reacción, V_{max} es la velocidad máxima posible (igual a $k_{cat} \times [E]_t$), $[S]$ es la concentración de sustrato y K_m es la constante de Michaelis-Menten, que representa la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima. La ecuación 1 describe una hipérbola equilátera, cuya asíntota es la V_{max} [12]. No obstante en las enzimas cooperativas, la forma de

la curva corresponde a una sigmoidea en vez de una hipérbola. La diferencia entre las curvas cooperativas y no cooperativas se representa en la Figura 1.

Figura 1. Curvas hipotéticas de la velocidad inicial de reacción de una enzima cooperativa (sigmoidea) y una enzima no cooperativa (hiperbólica), en función de la concentración de sustrato.



Dado que el modelo de Michaelis-Menten sólo se aplica a enzimas no cooperativas, se han hecho diferentes esfuerzos por crear modelos que se ajusten y ofrezcan una explicación física del fenómeno de la cooperatividad.

1.5. Modelos de cooperatividad

A pesar de la gran cantidad de proteínas que presentan cooperatividad, el paradigma del estudio de este fenómeno es la hemoglobina [13].

Por razones históricas la hemoglobina ha sido una de las proteínas más estudiadas y de la cual se conocen más detalles acerca de su estructura, su función y la relación entre ellas. En ella se hicieron las primeras cristalografías de difracción de rayos X, resueltas por Max Perutz [14]. También en ella se han basado la mayoría de los modelos de cooperatividad y alostería, particularmente los que serán descritos en este trabajo. Cabe destacar que los modelos están basados en la saturación o unión del ligando con la proteína, en este caso la unión del oxígeno o de monóxido de carbono a

la hemoglobina. Por ello los modelos originalmente no describen velocidades de reacción sino la fracción de saturación (\bar{y})

1.6. La ecuación de Hill.

Una de las primeras explicaciones de la cooperatividad en términos matemáticos fue propuesto por Archibald Hill, quien propuso una ecuación que se ajusta de manera precisa a las curvas de velocidad o de saturación cooperativas.

$$\bar{y} = \frac{[L]^h}{S_{0.5}^h + [L]^h} \quad (2)$$

En donde $[L]$ representa la concentración de ligando, $S_{0.5}$ es la concentración de ligando a la cual se alcanza la mitad de la saturación ($\bar{y} = 0.5$) y h es un exponente empírico, llamado coeficiente de Hill.

La versión de la ecuación de Hill para la velocidad de una enzima es la siguiente:

$$v_0 = \frac{V_{max}[L]^h}{S_{0.5}^h + [L]^h} \quad (3)$$

En la ecuación 3, ahora también se toma en cuenta el valor de la velocidad máxima (V_{max}), y los demás parámetros tienen el mismo significado.

Respecto al coeficiente de Hill, éste es un número positivo cuyo valor representa el tipo de cooperatividad. Cuando h es mayor que 1 significa cooperatividad positiva, en donde h no puede ser más grande que el número de subunidades que forman a la proteína. En el caso contrario en el que h es menor a 1, se interpreta como cooperatividad negativa, la cual se entiende como el pegado inicial a una de las subunidades de alta afinidad, es seguido por una disminución en la afinidad en la unión del ligando. El último caso es aquel en el que h es igual a 1, haciendo que la ecuación de Hill se simplifique a la ecuación de Michaelis-Menten, es decir, que no haya cooperatividad [10].

A pesar que la ecuación de Hill se ajusta de manera muy exacta a los datos experimentales de proteínas cooperativas, carece de un modelo físico, que le de sustento y significado a cada uno de los parámetros, en particular al coeficiente de Hill; por ello es que esta ecuación es empírica.

Sin embargo, la ecuación de Hill sigue siendo la primera manera de estudiar un fenómeno de cooperatividad en las proteínas, gracias al valor de coeficiente de Hill, el cual ha servido como parámetro para medir la cooperatividad de los fenómenos enzimáticos y de unión de ligando. La manera tradicional de determinar el coeficiente de Hill a partir de los datos experimentales fue utilizando el gráfico de Hill, en donde se utiliza la siguiente función:

$$\text{Log} \left(\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} \right) = h \log[L] - h \log(S_{0.5}) \quad (4)$$

Los parámetros de esta ecuación son los mismos a los de las ecuaciones 2 y 3. El gráfico resultante mostrado en la figura 2, corresponde a una línea recta, en la cual la pendiente es el coeficiente de Hill (h). A partir de este gráfico y el valor de la pendiente se puede discernir entre la existencia de cooperatividad positiva, negativa o la ausencia de ésta [10].

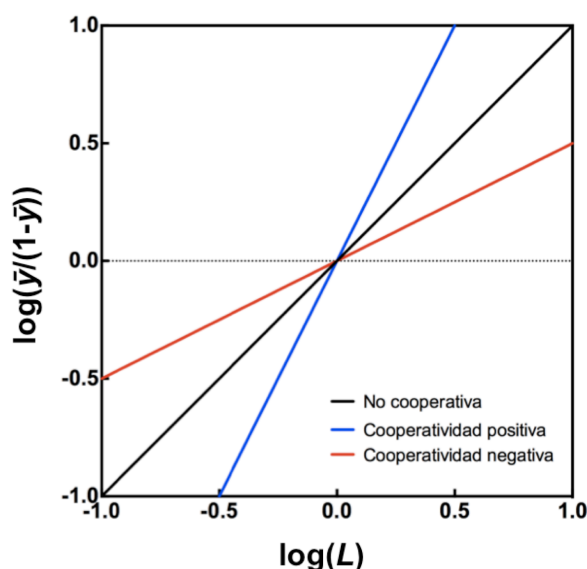


Figura 2. Gráfico de Hill, simulado a partir de las ecuaciones 3 y 4. En la imagen se representan los tres casos posibles, en donde exista cooperatividad positiva ($h > 1$), sin cooperatividad ($h=1$) y cooperatividad negativa ($0 < h < 1$).

1.7. Modelo concertado de Monod, Wyman & Changeux (MWC)

Uno de los modelos que se considera entre los más influyentes fue el propuesto en conjunto por Jaques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965 [15]. Como antecedentes al trabajo, Max Perutz ya había resuelto las estructuras de la *oxi* y la *deoxi* hemoglobina [14]. Para entonces Monod y colaboradores contaban con la evidencia que la hemoglobina existía en dos conformaciones estructuralmente diferentes y que existían dependiendo del estado de ligación con oxígeno; además se sabía que en ambas estructuras la organización de los monómeros era simétrica.

Con esta evidencia, el modelo MWC parte de las siguientes premisas:

La molécula debe poseer al menos un eje de simetría.

Cada subunidad de la proteína oligomérica posee sólo un sitio de unión al ligando.

A medida que se va uniendo el ligando a las diferentes subunidades, la simetría se mantiene.

La conformación de una subunidad está determinada por la interacción con otra subunidad.

Como consecuencia, la afinidad de un ligando en un oligómero se altera al ocurrir la transición de un estado a otro.

Cuando la proteína pasa de un estado a otro, su simetría se mantiene.

Hasta ahora, los estados a los que hacen referencia los postulados del modelo MWC corresponden a los dos estados estructurales que se observaron cristalográficamente al estar la hemoglobina con o sin oxígeno ligado. A cada estado se le conoce como *confórmero*. Al *confórmero* sin ligando se le llamó T por tenso, mientras que al *confórmero* con ligando se le llamó R por relajado. El modelo MWC asume que existen estos dos *confórmeros* en diferentes proporciones, cuyas constantes de asociación por el ligando son diferentes. T es el estado de baja afinidad por el oxígeno, mientras que R es el estado de alta afinidad y ambos *confórmeros* se encuentran en equilibrio. En ausencia de ligando el equilibrio favorece a la población de baja afinidad, T. Conforme la concentración de ligando aumenta, se induce el cambio conformacional que lleva a la proteína del estado T al estado R, y el equilibrio ahora favorece a la conformación de alta afinidad [15].

Esquemáticamente el modelo MWC se representa en la Figura 3.

A partir de los postulados precedentes, se dedujo la ecuación que describe al modelo (ecuación 5).

$$\bar{y} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n} \quad (5)$$

En donde α es igual a $\frac{[A]}{K_R}$, $[A]$ es la concentración de ligando y K_R es la constante de disociación de A correspondiente al conformero R; c es el cociente entre las constantes microscópicas de disociación de cada conformero ($\frac{K_R}{K_T}$), L_0 es conocida como la constante alostérica y representa la constante de equilibrio de $R \rightleftharpoons T$ en ausencia de ligando, $\frac{[T_0]}{[R_0]}$. Finalmente n es el número de sitios de unión al ligando de la proteína oligomérica.

En el caso en el que la constante c es igual a 1, es decir, que no exista diferencia en las afinidades de los conformeros T y R, o que la constante de equilibrio L sea cercana a 0, ésta ecuación se reduce a la forma:

$$\bar{y} = \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{[A]}{K_R + [A]} \quad (6)$$

Que corresponde a la ecuación 1 de Michaelis-Menten.

Con el sustento de un modelo, y basado en la evidencia estructural de la hemoglobina, los valores experimentales de saturación de oxígeno se ajustaron a la ecuación de MWC, e incluso los valores experimentales de otras proteínas también se ajustaron. De igual forma, el modelo se aplicó a la cooperatividad observada en enzimas a través de la siguiente ecuación.

$$v_0 = \frac{V_{max}(\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1})}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n} \quad (7)$$

En donde v representa la velocidad de la reacción y V_{max} la velocidad máxima a la que puede llegar a ocurrir la reacción [15].

El modelo MWC representó un avance el estudio de la hemoglobina utilizándose incluso en otras proteínas. Una de las grandes contribuciones del modelo MWC fue la

unificación de la cooperatividad y alostería en un solo modelo, siendo así evidente la estrecha relación entre ambos fenómenos.

Si bien el modelo MWC no alcanza a ser definitivo que explique a todas las proteínas cooperativas, representó un punto de partida en el desarrollo de modelos para explicar este fenómeno, con la ventaja de incluir cada vez más parámetros para explicar fenómenos como activación o inhibición.

1.8. Efectos homotrópicos y heterotrópicos.

Cuando la unión de un ligando en una de las subunidades de una proteína oligomérica afecta las propiedades de unión del mismo ligando en otra de las subunidades de la proteína, se dice que existe un efecto homotrópico [11]. Ejemplo de ello es la unión de oxígeno a la hemoglobina, que induce el cambio conformacional de T a R, aumentando la afinidad por sí mismo [13].

Existen también proteínas que pueden unir a más de un ligando en diferentes sitios. En este caso la unión puede afectar las propiedades del sitio de unión para el segundo ligando, ya sea aumentando (activación) o disminuyendo (inhibición) la afinidad por su ligando. A este fenómeno se le conoce como efecto heterotrópico [11].

El efecto heterotrópico es muy común para la regulación de las proteínas. Dicho de otra manera el efecto heterotrópico puede entenderse, en el caso de una inhibición, como la unión de una molécula que estabiliza al conformero T de baja afinidad, mientras que el caso contrario ocurre cuando el efector es un activador, puesto que estabiliza a la conformación R de alta afinidad.

Al modificar el equilibrio entre las especies T y R, en el modelo de MWC el parámetro afectado es la constante de equilibrio L , de tal manera que un efector heterotrópico provoca la desaparición de la cooperatividad [11].

En el caso de las enzimas, los efectores heterotrópicos pueden afectar solamente el equilibrio T/R observándose como una alteración en la afinidad por el sustrato sin cambiar la k_{cat} . Este comportamiento se conoce como sistema K .

En la Figura 4 se ejemplifica un sistema K . En los extremos, es decir, en condiciones saturadas de inhibidor o de activador, la ecuación 6 puede ser ajustada.

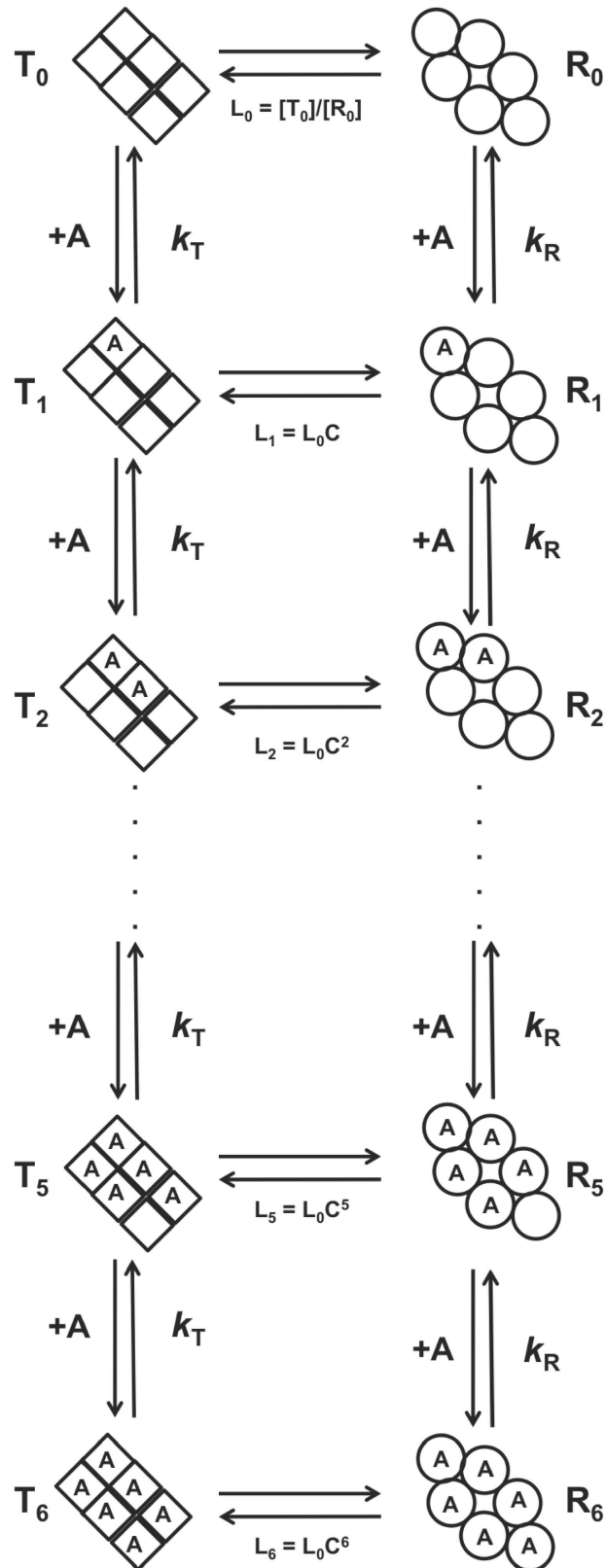


Figura 3. Esquema termodinámico del modelo en equilibrio MWC, en este caso representado para una proteína con 6 subunidades.

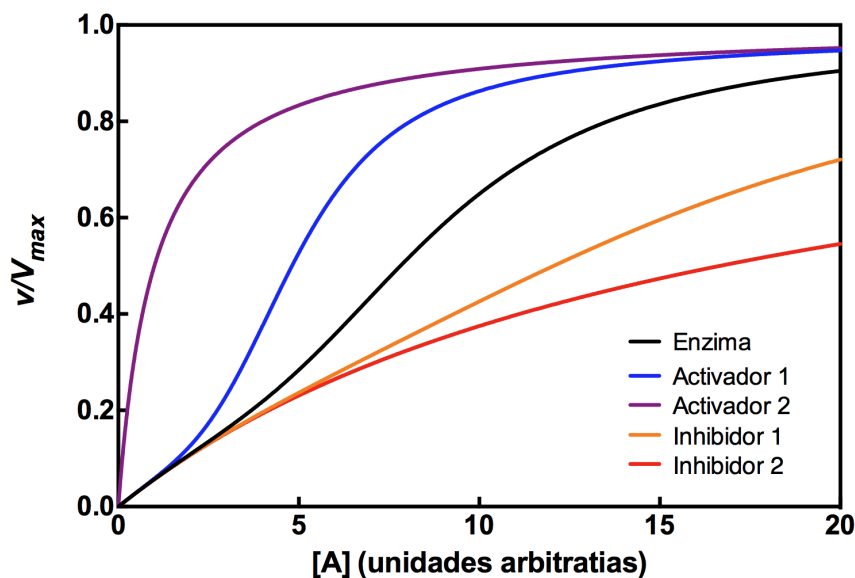


Figura 4. Efecto heterotrópico en un sistema *K*. Se muestran dos curvas hipotéticas simulando la ecuación 7, en presencia de dos concentraciones crecientes de inhibidor (Inhibidor 2 > Inhibidor 1), y de dos concentraciones crecientes de activador (Activador 2 > Activador 1).

1.9 Estudio de las transiciones terciarias

En el modelo de MWC, la simetría entre subunidades es uno de los criterios más importantes, es decir, el cambio conformacional que da origen a la cooperatividad es una transición cuaternaria.

Sin embargo, Max Perutz en 1970 propuso un análisis estructural del fenómeno alostérico en la hemoglobina. En su “mecanismo estereoquímico”, Perutz hace hincapié en la importancia de los cambios de la estructura terciaria, incluso en el modelo describe a detalle las interacciones no covalentes que se rompen y que se forman durante la transición de T a R [PERUTZ, 1970 #28].

Si bien es cierto que el modelo de MWC carece de un sustento estructural sólido, el modelo estereoquímico de Perutz propuso una explicación a ese nivel. La idea que se plantea es que la unión del ligando provoca cambios de estructura terciarios que se transmiten entre las subunidades y dan origen al cambio cuaternario. Para el caso de la hemoglobina en condiciones fisiológicas, ambos cambios están acoplados, al grado que el modelo MWC, que ignora los cambios estructurales terciarios, se ajusta adecuadamente al comportamiento cooperativo de la hemoglobina.

Pese a la evidencia cristalográfica que se tenía de los cambios terciarios, las propiedades de cada uno de ellos no podía ser estudiada debido al acoplamiento que tiene con la transición cuaternaria en solución. Una alternativa fue desacoplar los cambios terciarios y cuaternarios, de esta manera Mozzarelli estudió la unión de ligantes a la hemoglobina en cristales y describió las propiedades de unión en las diferentes conformaciones cuaternarias T y R [16]. Posteriormente hizo los estudios inmovilizando a la proteína a través de la nanoencapsulación en geles porosos de sílice y midió la recaptura de monóxido de carbono que había sido fotodisociado [17]. Para ello se nanoencapsuló a la hemoglobina en sus dos estados conformacionales cuaternarios T y R. Estos estudios permitieron concluir que existen estados terciarios con diferentes afinidades por el monóxido de carbono, “*t*” de baja afinidad y “*r*” de alta afinidad; estos estados terciarios pueden estar presentes en ambos conformeros cuaternarios. Se demostró además, que dependiendo del estado conformacional cuaternario hay conformaciones terciarias favorecidas. En el caso de T el estado terciario de baja afinidad *t* es favorecido, mientras que en R es el estado terciario de alta afinidad *r* [18].

Estas observaciones fueron la base experimental del modelo TTS (Two tertiary states) propuesto por Henry y colaboradores [19].

1.11 Modelo de estudio: la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*.

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa (EcGNPDA) de *Escherichia coli* (EC 3.5.99.6) es una enzima modelo para el estudio de las transiciones alostéricas y la cooperatividad.

La EcGNPDA pertenece al metabolismo de aminoazúcares, catalizando la reacción de isomerización y desaminación de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P), dando como productos fructosa-6-fosfato, la cual puede entrar a la vía glucolítica, y un ion de amonio [20].

Estructuralmente la EcGNPDA está formada por seis subunidades idénticas, organizadas en un dímero de trímeros. Posee un eje de simetría de orden tres y tres ejes de orden dos. La estructura tridimensional corresponde a un dominio α/β abierto, el cual consiste en siete hebras β que forman una lámina β plegada paralela, rodeada a

la vez por siete hélices α . En otra región de la proteína, también aparece un dominio estructural formado por tres hebras β con una hélice α intercalada (figura 5) [21].

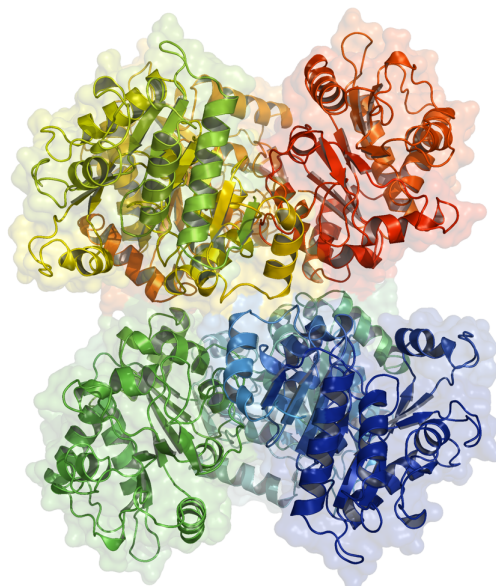


Figura 5. Estructura de la EcGNPDA en conformación T (PDB 1fs6), obtenida por cristalografía de rayos X [21].

Por cada subunidad, la EcGNPDA tiene un sitio catalítico y un sitio alostérico. En el sitio alostérico, el cual se forma en las interfase entre dos subunidades, se une el ligando N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). La GlcNAc6P funciona como activador alostérico, ya que la enzima en ausencia de esta molécula es cooperativa, mientras que al unir GlcNAc6P la cinética de la reacción sigue el modelo de Michaelis-Menten [20].

Para entender la transición alostérica a nivel estructural, se hicieron estudios de cristalografía de rayos X para determinar los dos conformeros de la EcGNPDA, que de acuerdo al modelo de MWC corresponden a las estructuras T (baja afinidad) y R (alta afinidad) [20].

En la figura 6 se muestran los dos conformeros obtenidos a partir de la cristalografía, el conformero T (PDB: 1fs6) y el conformero R (PDB: 1frz). Este último se obtuvo saturando a la enzima con activador alostérico (GlcNAc6P) [22].

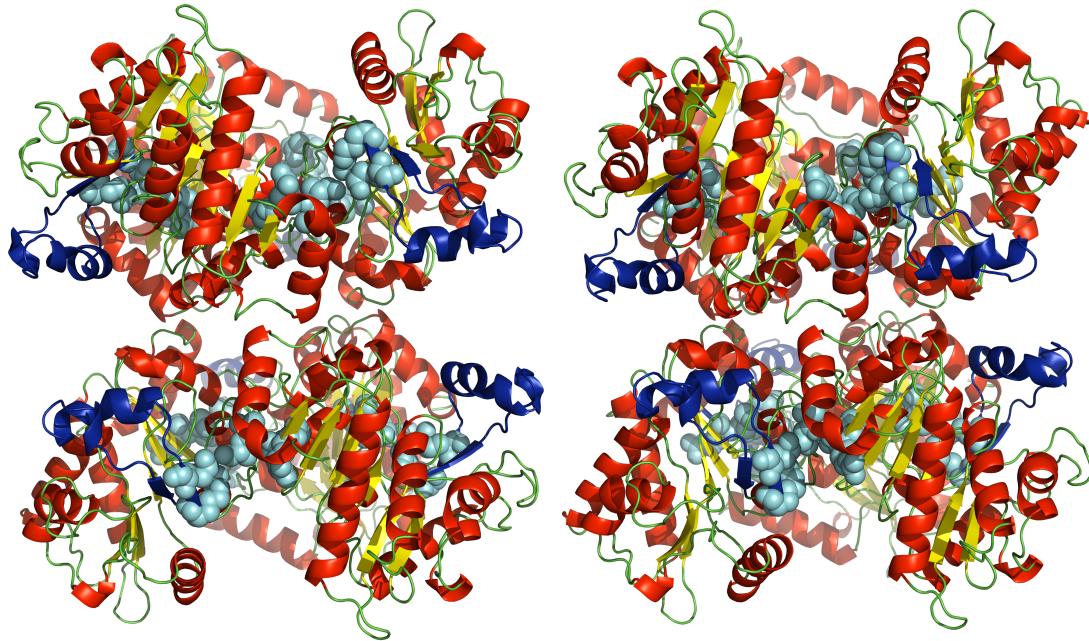


Figura 6. Estructuras cristalográficas de la EcGNPDA en sus dos conformaciones cuaternarias T (izquierda) y R (derecha). Se representa en rojo las hélices α , en amarillo las hebras β y en verde los giros. Entre ambas estructuras se representa en color azul la “tapa” del sitio activo, la cual es una de las regiones con mayor movilidad; se aprecia que en R la estructura se compacta. En esferas color cian, se representa al sitio alostérico formado en la interface de las subunidades de cada trímero.

A partir de las propiedades cinéticas y estructurales, se sabe que la EcGNPDA, puede ser llevada al estado conformacional cuaternario R a partir de efectos heterotrópicos (por la unión del ligando alostérico GlcNAc6P), el cual se comporta como un sistema K, o por efectos homotrópicos, es decir por el sustrato. Sin embargo, para estudiar esta última propiedad, se han llevado a cabo experimentos utilizando al inhibidor competitivo glucitolamina-6-fosfato (GlcN-ol-6P), molécula que se une al sitio activo con una $K_i = 2 \mu\text{M}$ y también lleva a la EcGNPDA al estado conformacional R [23]. Recientemente se han hecho estudios exhaustivos acerca de la transición alostérica de la EcGNPDA inducida por GlcNAc6P, utilizando la técnica de nanoencapsulación en geles de sílice.

A partir de analizar la cinética de la reacción de la EcGNPDA nanoencapsulada en los conformeros cuaternarios R y T; se encontró que se pierde la cooperatividad positiva; que la activación heterotrópica por GlcNAc6P se conserva, y que los valores de velocidad inicial de la reacción de catálisis ajustadas a la ecuación de Hill muestran cooperatividad negativa ($h < 1$). Esto último indica la existencia de subunidades con diferentes afinidades por el ligando.

Los resultados apoyan la existencia de estados terciarios en cada subunidad del hexámero, con diferentes afinidades por el sustrato. Visto desde la perspectiva de los principios de la alostería terciaria de Perutz y del modelo TTS, las subunidades pueden existir en estados *t* y *r* (tesis de doctorado Sergio Zonszein en curso).

1.12 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno espectroscópico de carácter radiativo. En algunas moléculas con características químicas particulares, los electrones excitados por la incidencia de un fotón, pasan a un nivel energético más alto; posteriormente al regresar los electrones a su estado energético basal, parte de la energía se emite en forma de fotones. Los fotones de emisión son de menor energía que los fotones de excitación, es decir la longitud de onda de excitación λ_{ex} es menor a la de emisión λ_{em} [24].

Las proteínas regularmente tienen fluorescencia intrínseca debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano). De estos aminoácidos el que presenta mayor rendimiento cuántico es el triptofano. El rendimiento cuántico es la fracción de fotones que se obtienen en la emisión al excitar a un fluoróforo. [25].

1.13 Marcaje fluorescente sitio específico en la EcGNPDA

La fluorescencia intrínseca de las proteínas es una propiedad de gran utilidad en el estudio de la estructura dinámica. Los cambios en la intensidad de fluorescencia (IF) o en el centro espectral de masas (CEM) son dependientes de alteraciones en la exposición del fluoróforo al solvente o a cambios en la polaridad del micro ambiente, tales circunstancias ocurren cuando se altera la estructura de la proteína en estudio.

En el caso de la EcGNPDA se han hecho estudios mediante marcaje fluorescente sitio específico, en los cuales mediante mutagénesis dirigida se han colocado residuos de triptofano en sitios particulares de la enzima que permiten seguir los cambios conformacionales alostéricos.

En 2005 Bustos-Jaimes et al. [23] encontraron que los mecanismos que desencadenan la transición alostérica desde el sitio activo y desde el sitio alostérico son diferentes, llegando a esta conclusión gracias a la observación que el cambio en el CEM al titular

a la EcGNPDA con GlcNAc6P o con GlcN-ol-6P mostraba comportamientos diferentes. Las posiciones que se utilizaron como monitores de la transición fueron Y254, K234 y F174, todas mutadas por triptofano [23].

En un trabajo posterior Sosa-Peinado et al. [26] encontraron que el estado cuaternario R al que se llega por el sitio activo o por el sitio alostérico, es diferente. En este caso el estudio también se realizó utilizando marcaje fluorescente sitio específico, aunque el procedimiento fue diferente al utilizado por Bustos-Jaimes et al. ya que en este caso se buscaron por métodos computacionales los residuos que tuvieran un mayor cambio de posición en la transición alostérica apoyándose en las estructuras cristalográficas. Las posiciones D165 y S206 fueron independientemente mutadas por cisteínas en un fondo mutante en el cual se cambiaron las cisteínas silvestres por residuos de serina, con el fin de llevar a cabo una reacción de derivatización del grupo tiol de la cisteína colocando un fluoróforo, en este caso se utilizaron tanto cloruro de 5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonilo (Dansilo) y Monobromobimano (mBBr), cuyas emisiones de fluorescencia se encuentran en el espectro de la luz visible.

Las posiciones 165 y 206 corresponden a los residuos que presentan mayor cambio en su distancia relativa durante la transición conformacional (de 10.58 Å a 5.36 Å) (Figuras 7 C y D) , su acercamiento se da durante la transición cuaternaria, ya que el par de residuos se encuentran en subunidades diferentes [26].

En el trabajo de tesis de maestría de González-Andrade M. estos residuos se usaron para colocar cisteínas por mutagénesis dirigida y formar puentes disulfuro al inducir el cambio conformacional alostérico; de esta manera se atraparían conformeros R.

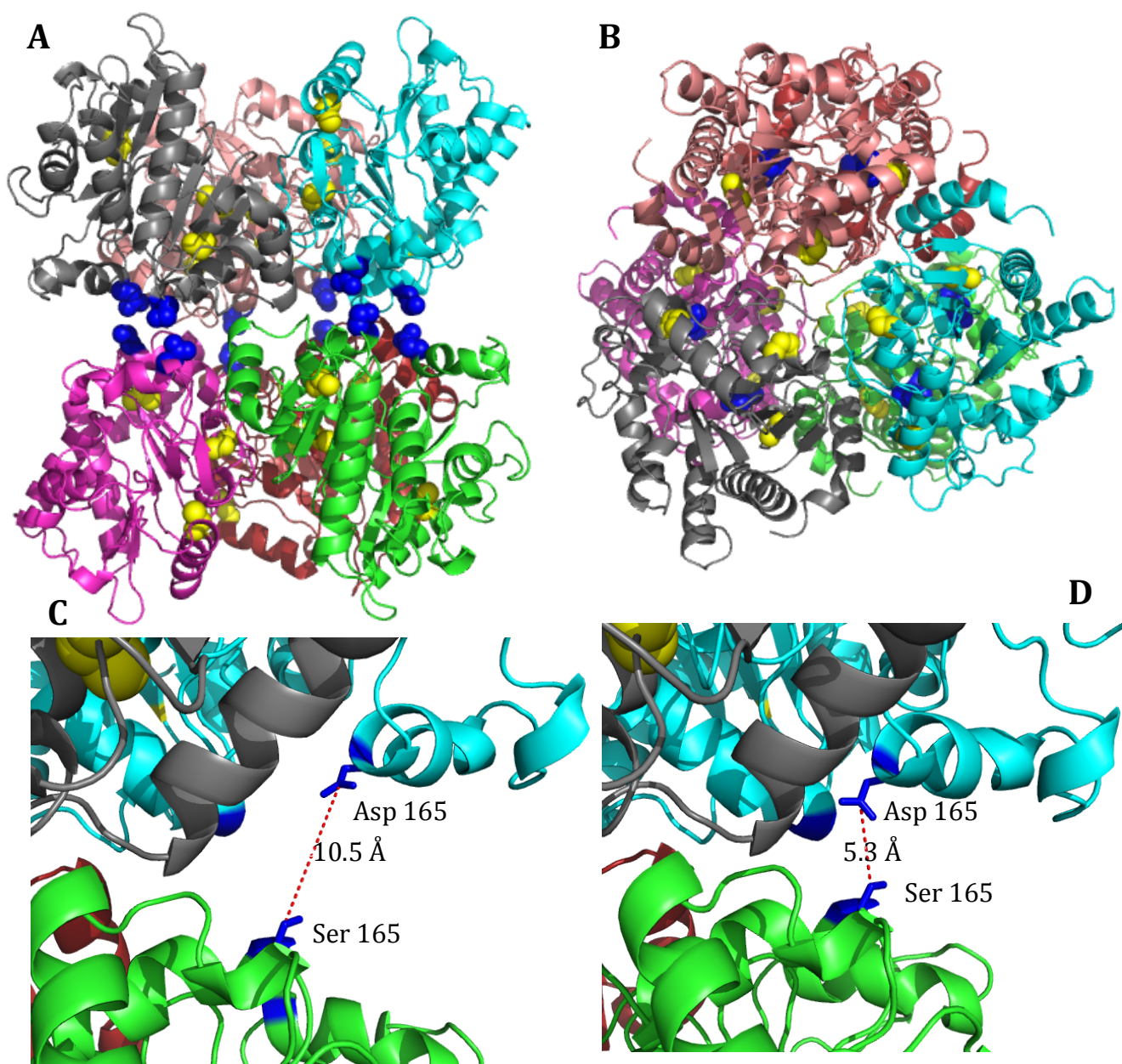


Figura 7. Esquema en caricatura de la estructura cristalográfica de la EcGNPDA. A) Vista lateral del hexámero, cada subunidad se representadas en un color diferente, en esferas amarillas se simbolizan las cisteínas silvestres que en el trabajo de Sosa-Peinado, fueron reemplazadas por serinas. En esferas azules se representan los residuos D165 y S206, que en el mismo trabajo fueron mutadas por cisteínas. B) Vista superior de la EcGNPDA. C) Enfoque de los residuos D165 y S206 en el confórmero T. Los residuos mencionados se representan como bastones azules, se representa también la distancia entre los residuos. Cada subunidad aparece en un color diferente. D) Enfoque de los residuos D165 y S206 en el confórmero R. Los residuos mencionados se representan como bastones azules, se representa también la distancia entre los residuos. Cada subunidad aparece en un color diferente.

2. Planteamiento

En la EcGNPDA el fenómeno de la cooperatividad es provocado por un cambio estructural alostérico en la proteína. La transición conformacional, dependiendo del ligando que la induzca, puede ser homotrópica o heterotrópica. En ambos casos se cuenta con evidencia cristalográfica de que existen dos conformaciones con diferente geometría en su estructura cuaternaria. Desde el punto de vista del modelo MWC la simetría es un factor determinante para poder explicar mediante un equilibrio termodinámico el comportamiento de las enzimas cooperativas y su activación o inhibición alostérica.

No obstante, los cambios cuaternarios deben ser inducidos por un rearrreglo de la estructura terciaria de cada una de las subunidades que unen al ligando. En principio el cambio de afinidad por el ligando está relacionado con las diferentes conformaciones terciarias.

Para poder estudiar la relación entre las diferentes conformaciones terciarias y las estructuras cuaternarias es necesario separarlas por técnicas como la nanoencapsulación en geles de sílice, y contar con una señal espectroscópica (absorbancia, fluorescencia, dicroísmo circular, etc.) que permita monitorear los cambios estructurales.

La EcGNPDA es un buen modelo para estudiar la cooperatividad y la alostería, ya que su reacción puede ser medida con bastante precisión, se cuenta con las estructuras cristalográficas de baja y alta afinidad (T y R) y su comportamiento se ajusta al modelo MWC; sin embargo las mismas estructuras cristalográficas indican que existen cambios en la estructura terciaria de los diferentes conformeros.

Desafortunadamente no se contaba con una señal espectroscópica que permitiera monitorear directamente los cambios conformacionales, tanto los cambios estructurales cuaternarios como terciarios, por ello es necesario obtener mutantes con fluoróforos en sitios particulares que nos sirvan como monitor. En particular los sitios 165 y 206, son los que más se alejan y se acercan durante la transición alostérica y a partir de esos sitios una mutante D165C/S206W puede darnos una señal de apagamiento de la fluorescencia del triptofano por el grupo tiol de la cisteína [27] que dependa de la transición alostérica. Este tipo de estudios analizados desde la perspectiva de la cinética de relajaciones, es decir del cambio de un estado de

equilibrio a otro, nos pueden dar una idea del mecanismo de acoplamiento terciario-cuaternario de la transición alostérica.

3. Hipótesis

Si existen estados conformacionales terciarios en la activación alostérica de la EcGNPDA cuya estabilidad dependa del estado conformacional cuaternario, entonces la mutante 165C/206W nos va a permitir estudiarlos mediante la nanoencapsulación en geles de sílice, y la cinética de relajaciones nos permitirá conocer el mecanismo de acoplamiento entre las transiciones terciarias y la cuaternaria.

4. Objetivo

Nanoencapsular a la mutante D165C/S206W en geles de sílice y estudiar, en ausencia de cambio cuaternario, el cambio estructural terciario de la activación alostérica heterotrópica.

4.1 Objetivos particulares

Construir la mutante D165C/S206W y utilizarla como modelo para estudiar el cambio conformacional alostérico de la EcGNPDA inducido por GlcNAc6P.

Utilizar la nanoencapsulación para impedir los cambios estructurales cuaternarios en la mutante 165C/206W.

Medir las velocidades de relajación de la enzima por medio del cambio en la intensidad de fluorescencia de la mutante 165C/206W nanoencapsulada en geles de sílice.

Comparar las constantes de velocidad y vida media de las transiciones terciarias medidas por el cambio en la intensidad de fluorescencia.

Proponer un mecanismo cinético de la transición terciaria en el conformero T.

5. Materiales y métodos

5.1 Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron DH5 α e IBPC590 Δ nag Δ lacI. La primera fue usada para obtener un alto número de copias de los plásmidos empleados para la mutagénesis dirigida y sobreexpresión. La segunda cepa carece del represor del operón de lactosa y del gen silvestre de la EcGNPDA. El plásmido sobre el cual se llevó a cabo la mutagénesis fue el pTZ18R, en el cual se encuentra clonado el gen *nagB* bajo el control del promotor del operón de lactosa. En este trabajo se utilizó un plásmido en el cuál ya se habían realizado 5 mutaciones puntuales sobre el gen *nagB*. Estas mutaciones sustituyeron al aspártico 165 y serina 206 por cisteínas ; y a las cisteínas 118, 228 y 239 por residuos de serina para evitar la formación de puentes disulfuro intermoleculares con las cisteínas expuestas mutantes. [26].

5.2 Mutagénesis

La mutagénesis dirigida se realizó sobre el plásmido pTZ18R*nagB*, en el cual el gen de la EcGNPDA tenía las 5 mutaciones puntuales mencionadas previamente. Se diseñaron oligonucleótidos específicos en los cuales se encontraba el codón para triptofano en la posición 206 en donde previamente se localizaba una cisteína. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas fueron:

Fw: 5`TTCTGCCAACCCAGCACCAGAAT 3` ,

Rv: 5`GGTTGGCAGAAAGCACTGCGACT 3` .

La polimerasa usada fue pfu, la cantidad de plásmido utilizada fue de 5 ng, mientras que de los oligonucleótidos fue de 125 ng. El programa de PCR consistió en 30 ciclos de 18 mins, de los cuales 1 min fue para la hibridación a 63 °C y 16 min fueron para la polimerización a 68 °C. 20 μ L de la reacción fueron utilizados para la digestión con *dpnI* (New England Biolabs) del el plásmido molde sin mutación. Posteriormente el producto de la digestión se utilizó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*. A

continuación se purificó el plásmido de tres colonias transformantes utilizando el kit QuiaPREP® miniprep (Quiagen). Finalmente, la mutación puntual se corroboró mediante secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular UNAM. Como resultado, el gen con 5 mutaciones codifica para la proteína sin cisteínas silvestres, con una cisteína en la posición 165 y con un triptofano en la posición 206. Me referiré a esta mutante como 165C/206W durante el presente trabajo.

5.3 Sobreexpresión y purificación

La cepa IBPC590 $\Delta nag \Delta lacI$ en donde la expresión de la proteína ocurre de manera constitutiva fue transformada con el plásmido con el gen mutante en. El método de purificación empleado fue el descrito por Calcagno M.L. [20] basado en cromatografía de afinidad por el sitio alostérico, utilizando un análogo del activador alostérico *N*- ϵ -aminocaproil-GlcN6P inmovilizado en agarosa. La proteína purificada se precipitó en sulfato de amonio a 50% de saturación. Antes de utilizarla para los ensayos, se dializó en presencia de fosfatasa alcalina para remover la GlcNAc6P utilizada en la elución y el sulfato de amonio. Posteriormente a la diálisis se agregó el agente reductor (tris-(2-carboxietil)fosfina) (TCEP) en una concentración final de 10 μ M, con el fin de mantener reducida la cisteína mutante superficial y evitar la reactividad intermolecular.

5.4 Concentración de proteína

Para determinar la concentración de la proteína mutante, se calculó el coeficiente de absortividad molar mediante el método de ácido bicinonínico [28]. Como referencia se utilizó a la EcGNPDA silvestre y se obtuvo un $\epsilon_{270}=17.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinada en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5.

5.5 Ensayos enzimáticos

Las constantes cinéticas de la mutante 165C/206W se determinaron midiendo la producción de fructosa-6-fosfato a través de un ensayo colorimétrico descrito por Calcagno M. L. [20]. La reacción se llevó a cabo en tris-HCl 50 mM pH 7.7 a 30 °C y se siguió durante 10 mins. Los datos obtenidos del ensayo posteriormente se capturaron y se analizaron en el programa Prism 5 (Graphpad), mediante una regresión no lineal ajustando a las ecuaciones correspondientes. La k_{cat} se obtuvo a partir del valor de V_{max} obtenido del ajuste, dividido entre la concentración de enzima, que para este ensayo fue de 5 nM.

5.6 Determinación de la K_D mediante fluorescencia

El ensayo de detección del cambio de fluorescencia se llevó a cabo en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL.). La concentración final de proteína empleada fue 1 μ M en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 a temperatura constante de 30 °C, en una celda de cuarzo Hellma de 10 mm de paso de luz (101-QS). La excitación de triptofano fue con una $\lambda = 295$ nm, y se colectó el espectro de emisión a entre 300 nm y 410 nm, obteniendo un máximo de emisión a 334 nm. Las rejillas de paso de luz tanto para emisión como para excitación fueron de 1 mm. La titulación con GlcNAc6P se hizo añadiendo cantidades crecientes de este ligando a la misma muestra; para cada cantidad añadida se hizo una medición del espectro de emisión de triptofano. El valor del cambio en el apagamiento de la intensidad de fluorescencia de todas las concentraciones a 334 nm fue transformado a fracción de saturación \bar{y} utilizando la ecuación:

$$\bar{y} = -\frac{\lambda_{obs} - \lambda_{max}}{\lambda_{max} - \lambda_{min}} \quad (8)$$

En donde λ_{obs} corresponde al valor de intensidad de fluorescencia registrado en la medición, λ_{max} representa el valor de intensidad de fluorescencia máximo, es decir de la muestra en ausencia de activador, y λ_{min} el valor de intensidad de fluorescencia mínimo, correspondiente al valor de la proteína a una concentración saturante de activador.

Los valores obtenidos se graficaron y ajustaron mediante regresión no lineal a la ecuación de Hill en el programa Prism 5 (Graphpad).

5.7 Nanoencapsulación de la proteína en geles de sílice

El procedimiento para la elaboración de geles de sílice fue adaptado del descrito por Bettati et. al. [29]. La polimerización alcalina del tetrametil-*O*-silicato (TMOS) se llevó a cabo en presencia de la proteína. En el caso de la encapsulación del conformero T de la EcGNPDA, la muestra de proteína sin ligando y a una concentración de 20 μM se mezcla con un volumen equivalente de la preparación de TMOS y se coloca como una lámina delgada sobre una ventana de cuarzo (Figura 8), obteniendo un gel en forma de monolito con una concentración final de enzima de 10 μM . Finalmente se almacenan en Tris-HCl 10 mM, TCEP 10 μM , pH 7.0 y se dejan madurar en el buffer por al menos 48 h.

El proceso de nanoencapsulación del conformero R es esencialmente el mismo que el descrito anteriormente, pero en este caso la enzima es incubada con GlcNAc6P 2 mM previo a la mezcla con TMOS. Además, la solución amortiguadora de maduración también contiene GlcNAc6P 2 mM. Después de las 48 h de maduración, el gel fue dializado contra el amortiguador de maduración pero sin activador, con el fin de disociar el activador de la proteína nanoencapsulada, y de esta manera obtener conformeros R sin ligandos, estructura inexistente en solución. El tiempo de la diálisis depende del tipo de experimento que se realiza y se especificará más adelante.

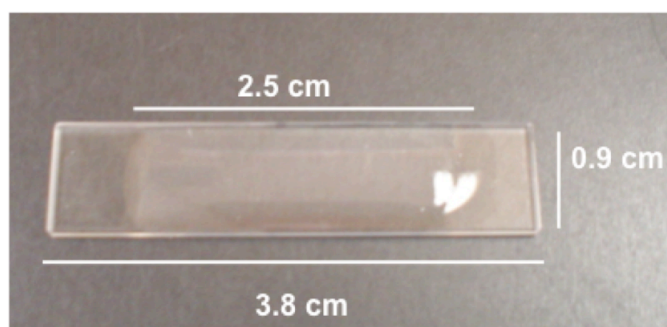


Figura 8. Gel de nanoencapsulación polimerizado sobre la ventana de cuarzo. Se muestran las dimensiones de la ventana y del gel.

5.8 Fluorescencia de la proteína nanoencapsulada

Las mediciones se llevaron a cabo empleando el mismo equipo utilizado en la fluorescencia en solución. En este caso los monolitos se colocaron dentro de una celda con base triangular (4-SB-Q-10 Starna Cells inc.), la ventana del gel se apoyó sobre la pared oblicua de la celda teniendo especial cuidado en la posición y orientación, ya que éste es un factor que hace variar la forma del espectro de emisión, debido a la superficie irregular de los geles. La celda se llenó con tricina-HCl 50 mM, TCEP 10 μ M, pH 7.8 a 30 °C. Una vez obtenido el espectro y estabilizado la señal (alrededor de 20 mins después de la primera medición) la posición de la celda y del gel no se alteraron durante el curso de los experimentos.

El análisis del cambio de la intensidad de fluorescencia del triptofano se hizo de la misma manera que el empleado para la proteína en solución, transformando a fracción de saturación utilizando la ecuación 8.

5.9 Comparación entre la fluorescencia de la EcGNPDA en solución y nanoencapsulada

Debido a la diferencia de intensidades entre los espectros de la EcGNPDA nanoencapsulada y en solución, los datos se compararon como porcentajes de cambio (%C) utilizando la siguiente ecuación:

$$\% C = \frac{100 (\lambda_{max} - \lambda_{min})}{\lambda_{max}} \quad (9)$$

Posteriormente el %C en solución se consideró como 100% y a partir de ese valor se calculó el porcentaje del cambio de fluorescencia de la proteína nanoencapsulada en términos de la proteína en solución (%C_s) mediante la ecuación:

$$\% C_s = \frac{\%C_{Gel}}{\%C_{solución}} \times 100 \quad (10)$$

De esta manera se pueden comparar la intensidad de los cambios observados en solución con los cambios observados en la proteína nanoencapsulada en geles.

5.10 Cinética de relajación de los confórmers nanoencapsulados

Para medir la transición terciaria del confórmero t al confórmero r en la estructura cuaternaria T, primero se colocó el gel en la posición adecuada para determinar el máximo de emisión, excitando el triptofano a una $\lambda = 295$. Posteriormente se observó durante 20 mins la señal de emisión de fluorescencia fijándola en el máximo obtenido. Una vez que la señal se estabilizó, se añadió una cantidad fija de GlcNAc6P para inducir la transición terciaria y se registró la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión durante 4 h. Las concentraciones de activador que se probaron fueron fijas para cada gel, es decir se utilizó un gel por cada concentración.

En el caso de la determinación de la cinética de la misma transición terciaria en geles con la estructura cuaternaria R atrapada, primero se eliminó el activador alostérico mediante diálisis consecutivas (3 cambios de amortiguador en total) y se dejó reposar durante 3 días para asegurar que prácticamente todas las subunidades se encontraran en el estado terciario t . A continuación se llevó a cabo el mismo procedimiento para medir la cinética de la transición que se empleó en el confórmero T.

Para seguir la cinética de la relajación de los confórmers terciarios $r \rightarrow t$ se utilizó un enfoque diferente al explicado previamente. En este caso, para la estructura cuaternaria T, primero se incubó la muestra con activador alostérico 2 mM durante toda la noche en amortiguador de maduración, mientras que para el confórmero R simplemente se tomó directamente de la solución amortiguadora de maduración que ya contenía GlcNAc6P 2 mM. A continuación se colocó el gel tal y como se describió previamente, pero en este caso el buffer dentro de la celda contenía GlcNAc6P 2 mM. La relajación se indujo añadiendo fosfatasa alcalina bovina (Roche, 20 mg/mL), a una concentración no limitante (3 μ M) con el fin de hidrolizar la GlcNAc6P rápidamente.

Los datos experimentales se ajustaron mediante regresión no lineal a una ecuación de decaimiento exponencial en el programa GraphPad Prism 5 para Mac:

$$IF = (IF_0 - Plateau) \times e^{-kt} + Plateau \quad (11)$$

En donde IF es la Intensidad de fluorescencia medida, $(IF_0 - Plateau)$ es la amplitud de la curva, k es la constante de velocidad de primer orden y t es el tiempo.

5.11 Mutación *in silico*

A partir de los archivos de las estructuras cristalográficas de la EcGNPDA en sus dos conformaciones cuaternarias, se sustituyeron los residuos de cisteína 118, 228 y 239 por serinas, y los residuos 165 y 206 por cisteína y triptofano respectivamente. La sustitución se hizo con el programa UCSF Chimera, utilizando la biblioteca de rotámeros de Dunbrack [30]. Lugo de la selección de los rotámeros adecuados, la estructura generada fue analizada y validada en el sitio MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Las estructuras obtenidas después de la validación se sometieron a 1000 pasos de minimización de energía en el programa UCSF Chimera para ajustar las distancias y ángulos.

6. Resultados

6.1 Caracterización cinética de la mutante 165C/206W

Para utilizar a la mutante 165C/206W como modelo de la enzima silvestre el primer paso fue obtener los parámetros cinéticos y compararlos con los reportados de la enzima silvestre [23]. En el gráfico de la Figura 9 se muestran las velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato en ausencia y en presencia de activador alostérico 0.2 mM. A partir del ajuste de los puntos experimentales a las ecuaciones 1, 3 y 7 se obtuvieron los parámetros cinéticos que se resumen en la Tabla 1.

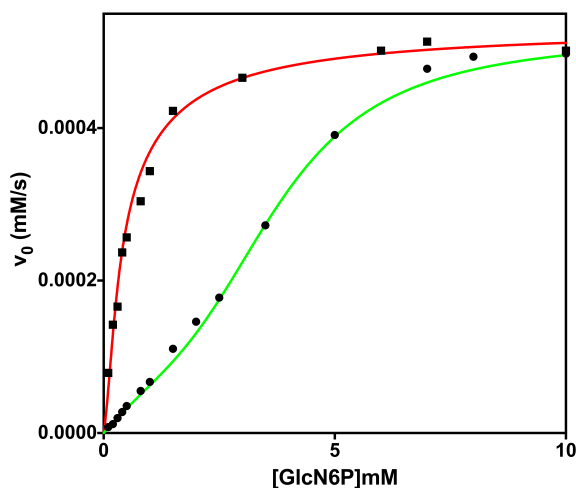


Figura 9. Velocidades iniciales de la reacción de formación de fructosa-6-fosfato y amonio de la mutante 165C/206W en función de la concentración de glucosamina-6-fosfato. Los círculos corresponden a la cinética en ausencia de activador alostérico. Los cuadrados corresponden a la cinética en presencia de 0.2 mM de activador alostérico.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la EcGNPDA silvestre obtenidos de [23] comparados con los obtenidos para la mutante 165C/206W.

	$K_m R^a$ (mM)	k_{cat}^b (s^{-1})	$S_{0.5}^b$ (mM)	h^b	L^c	c^c
EcGNPDA silvestre	0.55 ± 0.05	158 ± 8	5.5 ± 0.2	2.9 ± 0.1	$1 \times 10^6 \pm 10 \times 10^3$	0.025 ± 0.0002
165C/206W	0.44 ± 0.01	107 ± 1	4.1 ± 0.5	2.09 ± 0.1	$1 \times 10^5 \pm 10 \times 10^3$	0.056 ± 0.004

^a Obtenido a partir del ajuste a la ecuación 1 en presencia de GlcNAc6P 0.2 mM.

^b Obtenidos a partir del ajuste a la ecuación 3 en ausencia de activador alostérico. ^c Obtenido a partir del ajuste a la ecuación 7 en ausencia de activador alostérico.

Como se puede observar, a pesar de que algunas propiedades cinéticas de la mutante 165C/206W difieren respecto a las de la enzima silvestre; tanto la activación alostérica como la cooperatividad se conservan, lo cual valida el uso de esta mutante para el estudio de los cambios conformacionales inducidos por la activación alostérica.

6.2 Titulación de 165C/206W con GlcNAc6P medida con fluorescencia

Con la finalidad de observar el comportamiento de la fluorescencia del triptofano al ocurrir el cambio conformacional alostérico, se realizó una titulación de la mutante 165C/206W con GlcNAc6P. En el gráfico de la Figura 10 se muestran los espectros de emisión del triptofano obtenidos para algunas concentraciones de activador alostérico.

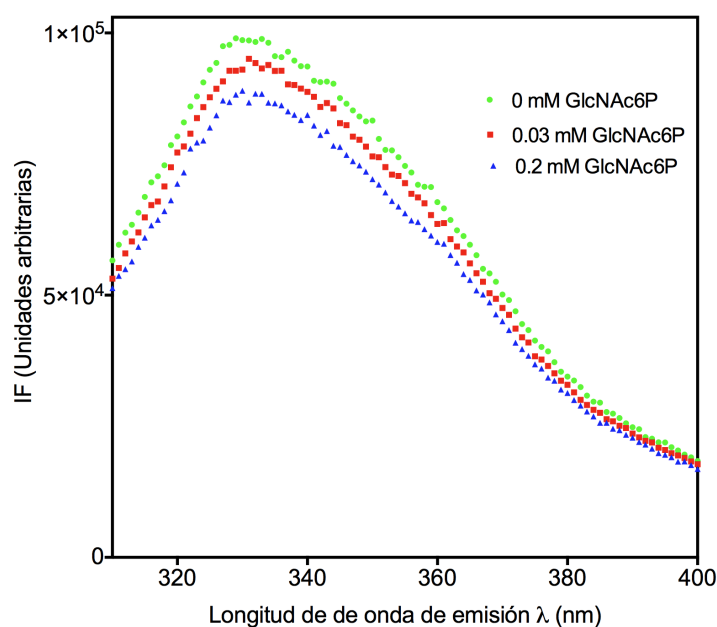


Figura 10. Espectros de emisión de triptofano de la mutante 165C/206W excitando a 295 nm.

Al transformar el valor máximo de intensidad de fluorescencia que es emitido a 334 nm, en la fracción de saturación \bar{y} y graficarlo en función de la concentración de GlcNAc6P, se obtuvo una curva sigmoidea (Figura 11).

Al ajustar los datos experimentales a la ecuación 2, obtuvimos una $S_{0.5}$ para la GlcNAc6P con un valor de 0.033 ± 0.001 mM (0.030 mM en la enzima silvestre) y un coeficiente de Hill de 2.5 ± 0.1 .

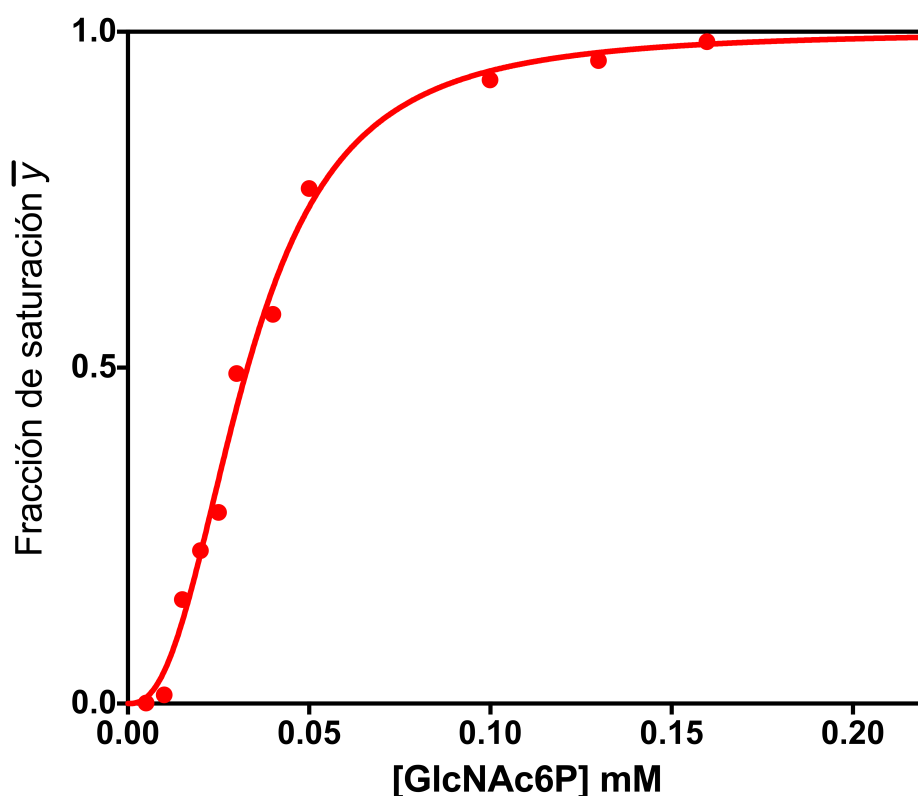


Figura 11. Fracción de saturación \bar{y} , en función de la concentración de GlcNAc6P. La línea continua corresponde al ajuste de los valores experimentales a la ecuación de 2.

Debido a que la fracción de saturación tiene forma sigmoidea, se propone que ésta señal proviene del cambio estructural cuaternario de la activación alostérica.

Para complementar esta observación, hicimos la titulación con activador alostérico en presencia del inhibidor competitivo GlcN-ol-6P a una concentración saturante (50 μ M) con la finalidad de inducir el cambio conformacional desde el sitio activo

(homotrópico). En la gráfica de la Figura 12 se muestra la fracción de saturación en función de la concentración de GlcNAc6P. Se observa que el activador no induce cambio en la señal fluorescente del triptofano 206, debido a que éste ocurrió por la presencia del inhibidor competitivo. De esta manera se concluye que la señal de apagamiento del triptofano 206 ocurre por el acercamiento de la cisteína 165 y que este cambio fluorescente es un buen monitor de la transición cuaternaria.

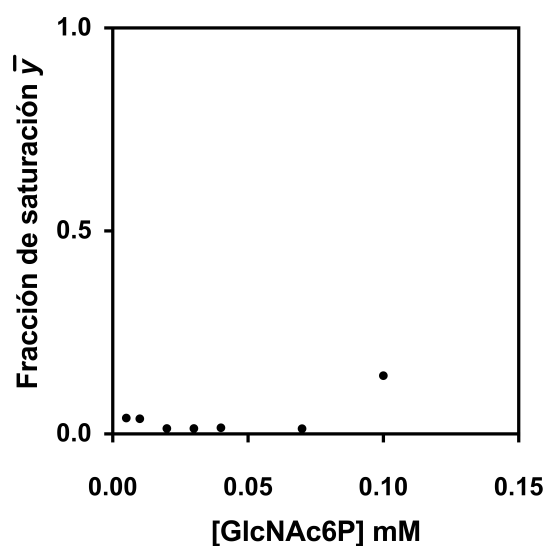


Figura 12. Máximo de intensidad de fluorescencia del triptofano 206 transformado a fracción de saturación en función de la concentración de GlcNAc6P. En este gráfico la mutante 165C/206W fue incubada con 50 μ M de GlcN-ol-6P, por ello es que los datos experimentales no muestran un cambio significativo.

6.3 Cambio conformacional terciario en geles de sílice

Para observar si la señal del triptofano 206 tiene un componente de cambio estructural terciario, se hicieron las titulaciones con GlcNAc6P en los conformeros cuaternarios R y T atrapados en geles de sílice con la finalidad de impedir los cambios estructurales cuaternarios. En las Figura 13 se graficaron las titulaciones de los conformeros T y R respectivamente. En la titulación se aprecia que la señal de apagamiento del triptofano 206 continúa presente, no obstante, la cooperatividad que se observó en solución está ausente en este sistema.

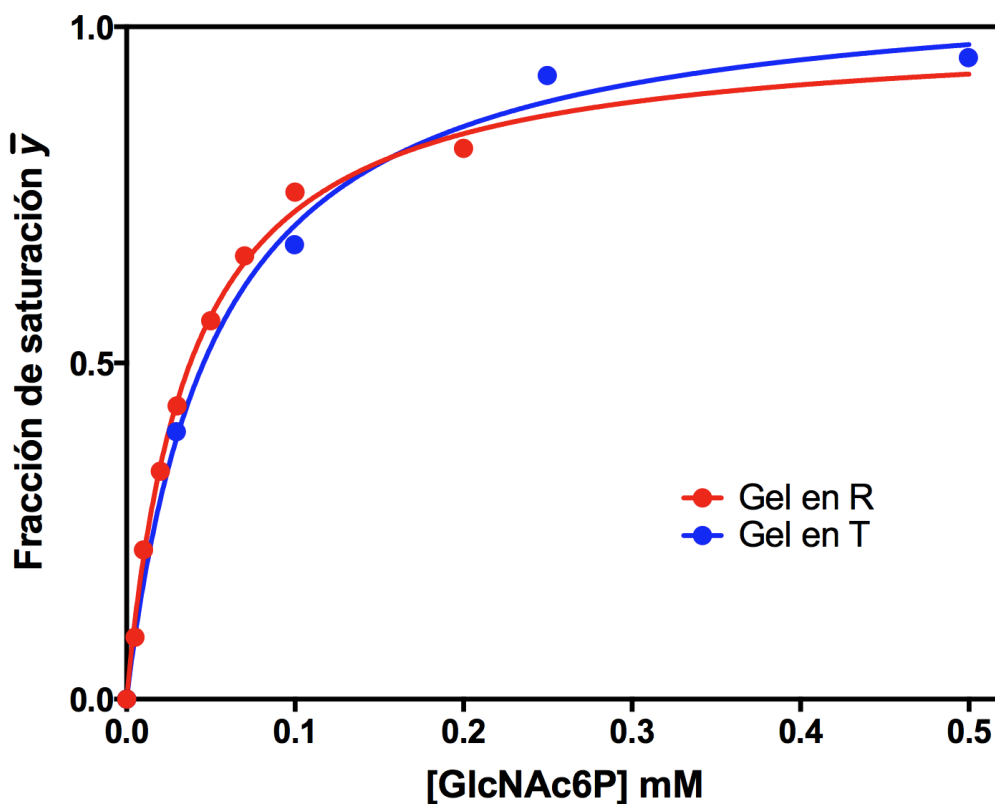


Figura 13. Fracción de saturación de 165C/206W nanoencapsulada en geles de sílice, graficado en función de la concentración de GlcNAc6P. Titulación de los conformeros T (azul), y R (rojo) nanoencapsulados; las líneas continuas corresponden al ajuste a la ecuación 2.

A continuación se hizo una comparación entre la señal fluorescente en solución y la señal en geles. En la Figura 14 A se comparan las gráficas en fracción de saturación, en las cuales es evidente la pérdida de la cooperatividad; mientras que en la Figura B se muestra la gráfica de las intensidades normalizadas mediante la ecuación de %Cs; en este caso se aprecia que el cambio de intensidad de fluorescencia observado en solución es mayor al observado en geles de sílice.

Para poder obtener la curva en el estado cuaternario T fue necesario esperar 4 horas para que llegara al equilibrio el sistema después de añadir las diferentes concentraciones de activador alostérico. Debido a esta relajación lenta, nos fue posible monitorear la cinética de relajación de las transiciones terciarias $r \rightleftharpoons t$ y

determinar la estabilidad de las conformaciones terciarias en los dos diferentes estados cuaternarios.

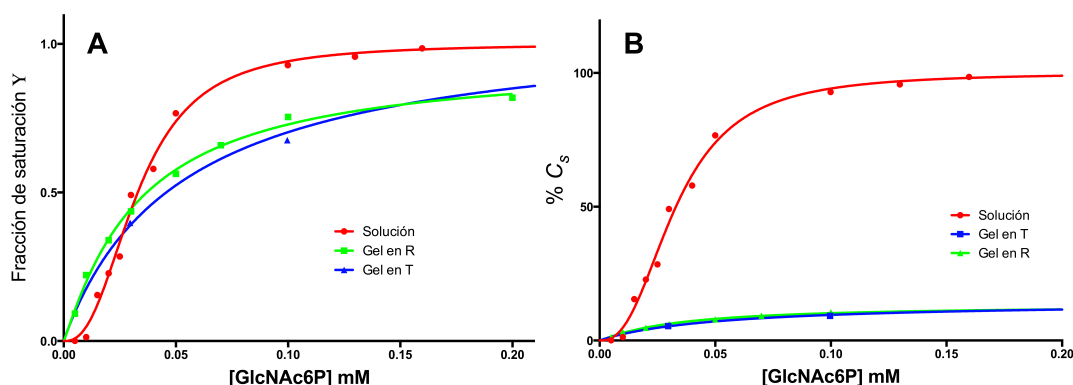


Figura 14. Comparación de los cambios en intensidad de fluorescencia para la proteína en solución y nanoencapsulada. A) Gráficos de fracción de saturación contra la concentración de GlcNAc6P en las distintas condiciones mencionadas. B) Grafico del %C_s ilustrando la magnitud de los cambios observados para cada condición. Las líneas azul, verde y roja corresponden al ajuste a la ecuación 2.

6.4 Relaciones de los estados terciarios en el conformero T

La relajación terciaria $t \rightarrow r$ provocada por la presencia de GlcNAc6P se midió a través de la fluorescencia del triptofano 206. El apagamiento tiene un decaimiento exponencial que se ajusta a una ecuación exponencial de primer orden (Figura 15). Los datos del ajuste nos permiten calcular una constante de velocidad aparente k_{obs} y la vida media del proceso. Los datos aparecen en la Tabla 2.

Para la relajación de $r \rightarrow t$, provocada por la disociación del activador alostérico, el cual fue hidrolizado con fosfatasa alcalina, la intensidad de fluorescencia aumenta, que al igual que el apagamiento, también se ajustó a una ecuación exponencial de primer orden (figura 16).

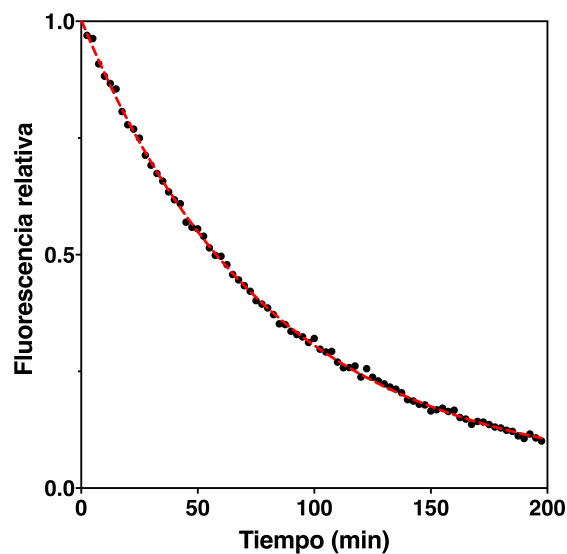


Figura 15. Relajación terciaria $t \rightarrow r$ en presencia de 2 mM de GlcNAc6P. La intensidad de fluorescencia se representa en una escala de 0 a 1, para facilitar el análisis y la comparación entre trazos. La línea roja corresponden al ajuste a la ecuación de decaimiento exponencial de primer orden.

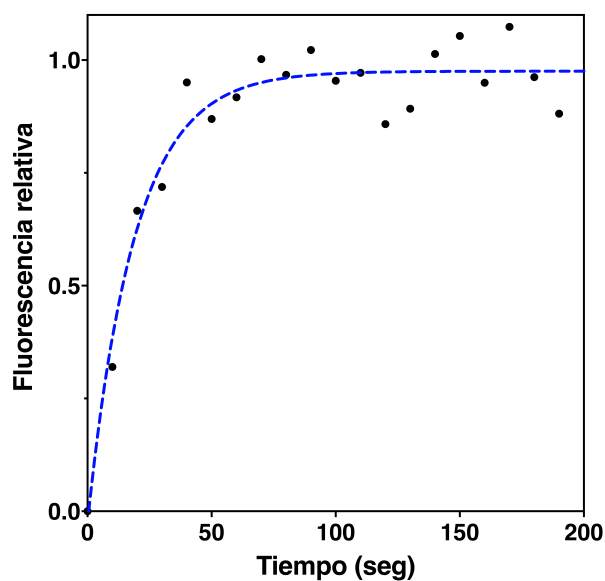


Figura 16. Relajación terciaria $r \rightarrow t$ en el estado cuaternario T. La relajación fue iniciada con fosfatasa alcalina en un gel incubado con 2 mM de GlcNAc6P. La intensidad de fluorescencia se representa en una escala de 0 a 1. La línea azul corresponde al ajuste de la ecuación de decaimiento exponencial de primer orden.

En este caso se obtuvo a partir de un gel incubado con una concentración saturante de activador (2 mM). En la Tabla 2 se resumen los valores de k_{obs} y vida media de la relajación $r \rightarrow t$. Al comparar los parámetros obtenidos entre los procesos de relajación terciaria, se observa que la relajación $r \rightarrow t$ es un proceso más rápido que la relajación $t \rightarrow r$ en el conformero cuaternario T. La diferencia de velocidades nos indica que la conformación t es más estable en el estado cuaternario T.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las relajaciones terciarias en el conformero T, obtenidos del ajuste a las ecuación de decaimiento y crecimiento exponencial de primer orden.

Relajación terciaria	k_{obs} (s^{-1})	Vida media (s)
$t \rightarrow r$	$2.07 \times 10^{-4} \pm 2.2 \times 10^{-6}$	3343.8
$r \rightarrow t$	$525 \times 10^{-4} \pm 6.4 \times 10^{-3}$	13.18

6.5 Relajación de los estados terciarios en el conformero R.

En el conformero R nanoencapsulado se midió la velocidad de relajación $t \rightarrow r$ con 2 mM de GlcNAc6P. La curva de la Figura 17 tiene un decaimiento que se ajustó a una curva exponencial de primer orden. Los parámetros obtenidos del ajuste se muestran en la Tabla 3.

La relajación de $r \rightarrow t$ provocada por la hidrólisis de GlcNAc6P al añadir fosfatasa alcalina, sigue una cinética que se ajusta a una curva exponencial (Figura 18). A partir de los ajustes se obtuvieron y compararon las k_{obs} los procesos de relajación terciaria (tabla 3).

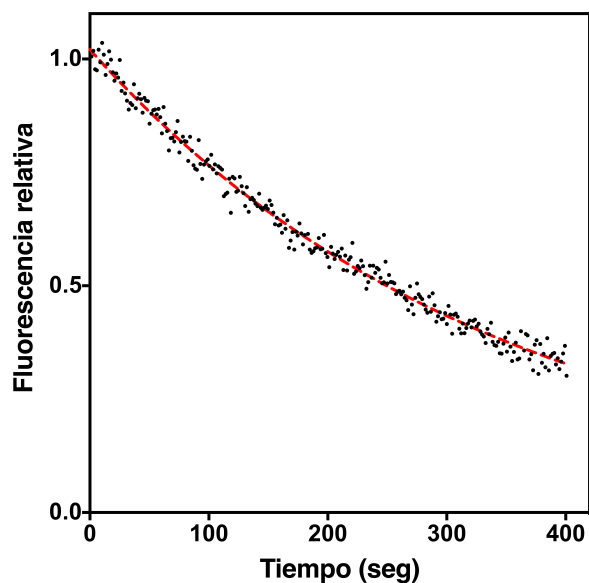


Figura 17. Relajación $t \rightarrow r$ en el conformero cuaternario R. La intensidad de fluorescencia se representa en una escala de 0 a 1 para facilitar el análisis y la comparación entre trazos. La línea roja corresponden al ajuste a la ecuación de decaimiento exponencial de primer orden.

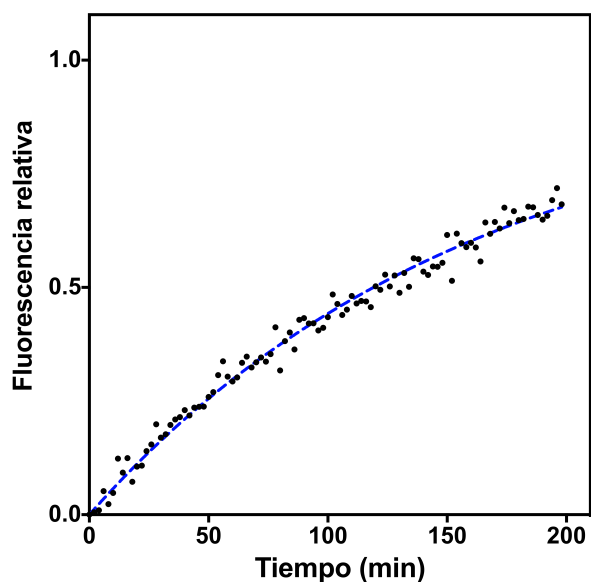


Figura 18. Relajación $t \rightarrow r$ en el conformero cuaternario R. El cambio fue inducido con fosfatasa alcalina en una enzima incubada en 2 mM de GlcNAc6P. La intensidad se representa en una escala de 0 a 1 y la línea azul representa el ajuste a la ecuación de decaimiento exponencial de primer orden.

En el confórmero R la velocidad de relajación $t \rightarrow r$ es mucho más rápida que la relajación $r \rightarrow t$, lo que indica que el estado terciario r es más estable en el confórmero R.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de las relajaciones terciarias en el confórmero R, obtenidos del ajuste a las ecuaciones de decaimiento y crecimiento exponencial de primer orden.

Relajación terciaria	k_{obs} (s^{-1})	Vida media (s)
$t \rightarrow r$	$29.5 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-4}$	235
$r \rightarrow t$	$1.03 \times 10^{-4} \pm 5.6 \times 10^{-6}$	6690

En la Tabla 4 y en la figura 19 se resumen las cuatro curvas de relajación terciaria y las constantes de velocidad k_{obs} obtenidas a partir de los ajustes.

Tabla 4. Constantes de velocidad k_{obs} de cada relajación calculadas a partir del ajuste a las ecuaciones de decaimiento y crecimiento exponencial de primer orden.

Confórmero cuaternario	k_{obs} (s^{-1}) $r \rightarrow t$	k_{obs} (s^{-1}) $t \rightarrow r$
T	$525 \times 10^{-4} \pm 6.4 \times 10^{-3}$	$2.07 \times 10^{-4} \pm 2.2 \times 10^{-6}$
R	$1.03 \times 10^{-4} \pm 5.6 \times 10^{-6}$	$29.5 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-4}$

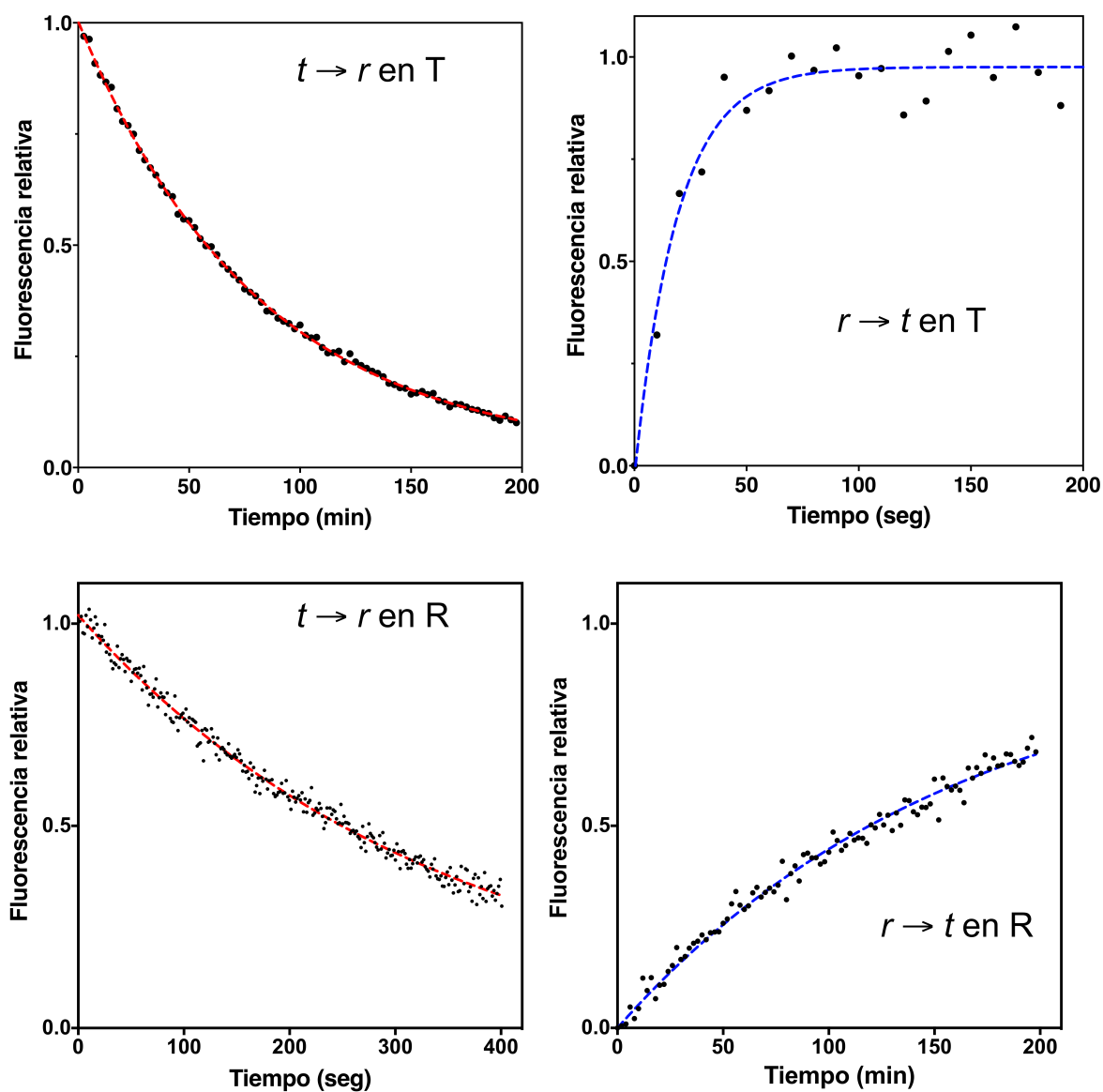


Figura 19. Relajaciones terciarias en los dos conformeros cuaternarios T y R. Las intensidades de fluorescencia se representan en una escala de 0 a 1 para su comparación y análisis. Las líneas rojas y azules representan el ajuste a las ecuaciones de decaimiento y crecimiento exponencial de primer orden.

6.6 Cambio en la k_{obs} dependiente de la concentración de GlcNAc6P.

Para conocer el posible mecanismo de unión del GlcNAc6P y de transición alostérica, se midió la relajación en sentido $t \rightarrow r$ en el confórmero T variando la concentración de ligando.

Para cada relajación se determinó la k_{obs} , que posteriormente fue graficada en función de la concentración de activador alostérico. En la Figura 20 se muestran una gráfica de los valores de k_{obs} obtenidos contra la concentración de GlcNAc6P, en la cual se puede observar que a concentraciones bajas hay una gran dependencia por el activador de la velocidad de relajación, mientras que a concentraciones altas tiende a ser constante. El comportamiento de los datos experimentales nos permitió compararlos con diferentes modelos.

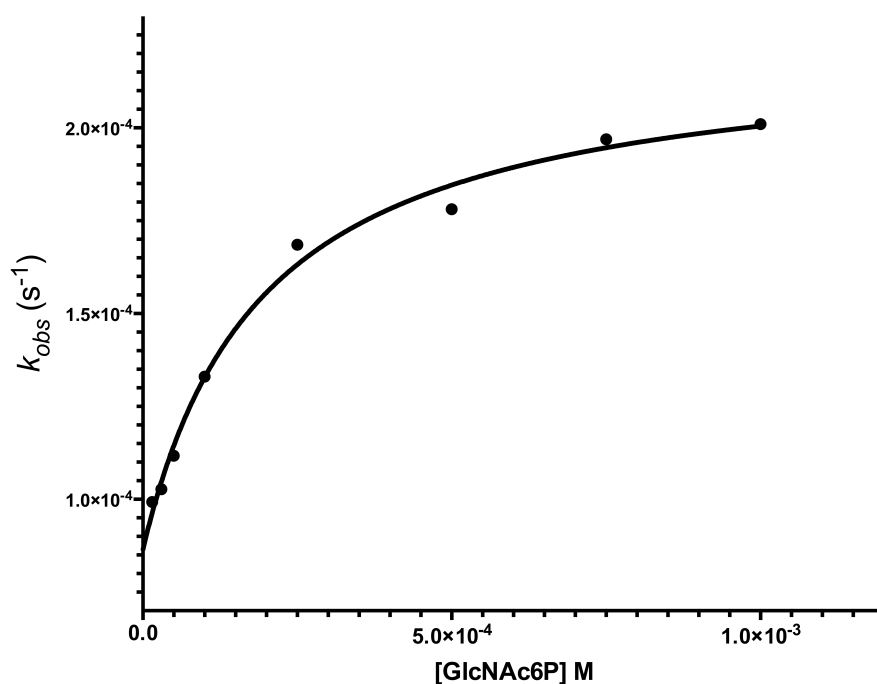


Figura 20. Valores de las constantes de k_{obs} de relajación $t \rightarrow r$, obtenidas de un ajuste a una función exponencial de primer orden medidas a diferentes concentraciones de GlcNAc6P. Los puntos experimentales se ajustaron a la ecuación de una hipérbola equilátera.

7. Discusión

En este trabajo se logró obtener una señal fluorescente a partir de colocar un triptofano en la posición 206 y una cisteína en la posición 165. En la transición alostérica, el acercamiento de los aminoácidos es evidente gracias a las estructuras cristalográficas que se tienen de cada conformero (figura 7). Pese a que el fenómeno de acercamiento entre aminoácidos es de carácter cuaternario ya que los residuos que participan están en subunidades diferentes, se encontró que existe también una señal de apagamiento de la fluorescencia proveniente de un cambio estructural terciario. Explicar a nivel molecular el fenómeno de apagamiento de la fluorescencia del triptofano a nivel terciario va más allá de los objetivos de este trabajo. Probablemente el fenómeno de apagamiento observado en los geles provenga de una reorientación del residuo de triptofano, tomando en cuenta que la proteína está inmovilizada y no se encuentra en un ambiente idéntico al que se encontraría en solución. Como primera aproximación utilizamos las mutantes *in silico* para observar las diferencias que tienen con respecto a la proteína silvestre. En las Figuras 21 A y B se muestran los residuos mutantes en rojo. En el panel A) que corresponde a la estructura en T se representa que el residuo de triptofano 206 se encuentra expuesto y orientado hacia el solvente. En comparación, se muestra en el panel B el conformero R. Además de los residuos mutantes, también se representan los residuos de histidina 164 y valina 168. Se aprecia el acercamiento de la cisteína 165 y aunado a ello, los residuos 164 y 168 también se aproximan de manera significativa al residuo de triptofano. Dada la naturaleza de estos dos residuos, probablemente cambien el ambiente del triptofano 206 afectando sus propiedades fluorescentes. Aparentemente la orientación del triptofano 206 no cambia considerablemente, sin embargo se puede ver una reorientación importante en el residuo de histidina 164. En el caso de la proteína nanoencapsulada probablemente el acercamiento de este grupo de residuos no sea la causa del cambio de fluorescencia del triptofano 206, pero se puede proponer que la reorientación de residuos como el de la histidina 164 puedan ser el origen del cambio de señal. En futuras investigaciones se plantea utilizar métodos computacionales como dinámica molecular, o la mutagénesis de otros residuos como la histidina 164 para entender el origen de la señal terciaria.

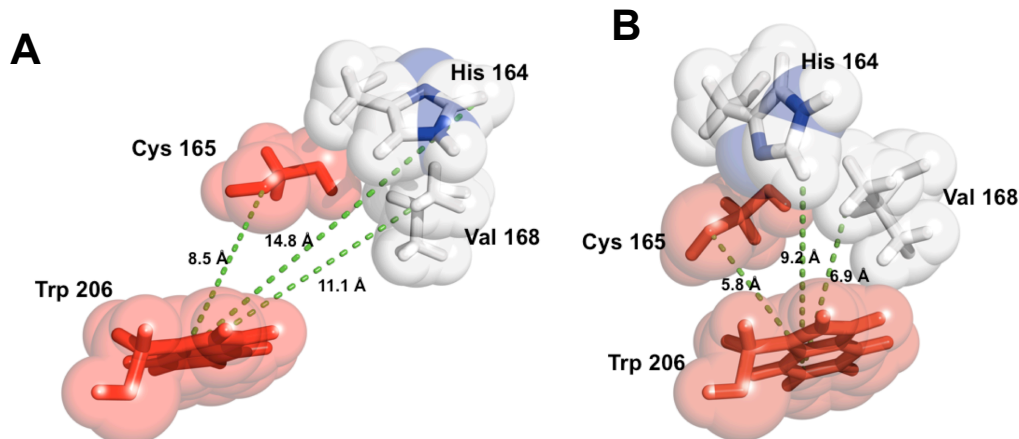


Figura 21. A) Residuos mutados Cys 165, Trp 206 en rojo y residuos His 164, Val 168 en gris. Se muestran las distancias en la conformación cuaternaria T. B) Residuos mutantes y silvestres en la conformación R, se representan las distancias con respecto al Trp 206.

Al nanoencapsular a la proteína, se consiguió impedir el cambio estructural cuaternario. Asimismo se lograron hacer más lentas las transiciones terciarias, permitiéndonos su estudio mediante la señal fluorescente del triptofano 206.

En la relajación $r \rightarrow t$, en la cual el activador alostérico se debe disociar de la interacción que tiene con la enzima, se utilizó fosfatasa alcalina para hidrolizar el grupo fosfato del carbono 6 de la GlcNAc6P, que se sabe es la parte de la molécula con la cual se lleva a cabo la interacción. Dos desventajas que puede tener este método son que la presencia de fosfatasa en el sistema afecte la señal de fluorescencia del triptofano 206, y que la velocidad de hidrólisis de la fosfatasa sea menor a la velocidad de cambio estructural terciario de la mutante 165C/206W, y en realidad lo que midamos sea la cinética de la reacción de la fosfatasa alcalina.

Con respecto a la alteración de la señal, medimos un espectro de la proteína nanoencapsulada sin ligando y posteriormente añadimos fosfatasa alcalina y se corroboró que el espectro conserva la misma intensidad y centro espectral de masas.

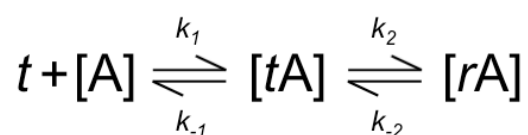
Para el supuesto de que la velocidad de hidrólisis de la fosfatasa alcalina pudiera ser un factor que interfiriera con la velocidad observada de la transición terciaria, utilizamos dos tipos de fosfatasas: fosfatasa antártica y fosfatasa alcalina bovina. En ambos casos no observamos diferencias significativas en las constantes calculadas.

Aunado a ello, en los experimentos de relajación en donde se utilizó fosfatasa alcalina, se observaron dos velocidades muy diferentes. La relajación de $r \rightarrow t$ en T en donde la vida media fue de ≈ 13.18 seg, fue mucho más rápida que la misma relajación en R, en donde la vida media fue ≈ 7506 seg. Debido a la gran diferencia de velocidades observadas para cada conformero, pensamos que la fosfatasa está actuando a una velocidad mayor a la de las transiciones medidas y por ello nos permite ver estos dos fenómenos en escalas temporales diferentes. No obstante, futuros experimentos en donde se varíe la concentración de fosfatasa, permitirán determinar si ésta no es limitante de la velocidad de relajación en el conformero T.

La diferencia de velocidades en las transiciones terciarias observadas entre los conformeros nanoencapsulados indica que existen dos estados que dependen de la presencia o ausencia del ligando alostérico, por lo tanto si observamos una velocidad de transición del estado t al estado r es sensato pensar que las subunidades en conformación t unen al activador alostérico.

Para comprobar qué mecanismo opera a nivel terciario, medimos las relajaciones en el conformero T variando la concentración de GlcNAc6P. El gráfico de los datos experimentales nos da la información necesaria para poder analizar en base a alguno de los modelos descritos en la literatura para sistemas de unión de ligando.

En primer lugar se considera que la constante de velocidad observada, k_{obs} , contiene a las constantes de velocidad de unión y disociación del ligando con la proteína (k_1 y k_{-1} respectivamente), y a las constantes de velocidad de las relajaciones $t \rightarrow r$ y $r \rightarrow t$ (k_2 y k_{-2} respectivamente), bajo el supuesto que existe un complejo intermediario formado por la proteína y el ligando se planteó el siguiente mecanismo:



En donde t representa a las subunidades de la EcGNPDA en estado terciario t ; $[A]$ es la concentración de activador alostérico; $[tA]$ es la concentración del complejo intermediario formado entre el activador y la subunidad t y $[rA]$ es la concentración del complejo formado por el activador y la subunidad en estado terciario r después de la transición conformacional [Fersht, 1999 #48].

A partir del modelo se puede deducir la ecuación que describe el comportamiento de la k_{obs} . Se parte de los supuestos de que la reacción que corresponde a la formación del complejo ocurre primero y es mucho más rápida que la segunda. Estos supuestos son razonables para el caso de la reacción que estamos midiendo en la EcGNPDA en donde la unión del activador debe ser un proceso rápido con relación a la transición, la cual ocurre más lento debido a la nanoencapsulación.

La k_{obs} por lo tanto está compuesta por la suma de las dos constantes involucradas en la formación del complejo rA , que es del cual obtenemos la señal de medición experimental.

De esta manera el modelo es expresado por la siguiente ecuación:

$$k_{obs} = k_{-2} + \frac{k_2 [A]}{K_D + [A]} \quad (12)$$

En donde $K_D = k_{-1}/k_1$. Bajo este modelo, en el caso donde la concentración de A (activador alostérico en nuestro caso) sea 0, valor de $k_{obs} = k_{-2}$. En el escenario en el que la concentración de A es infinita, entonces $k_{obs} = k_{-2} + k_2$.

En la Figura 22 se muestra de manera gráfica el ajuste de la ecuación a los datos experimentales, y la obtención de los valores para las constantes k_2 y k_{-2} representados en la tabla 5.

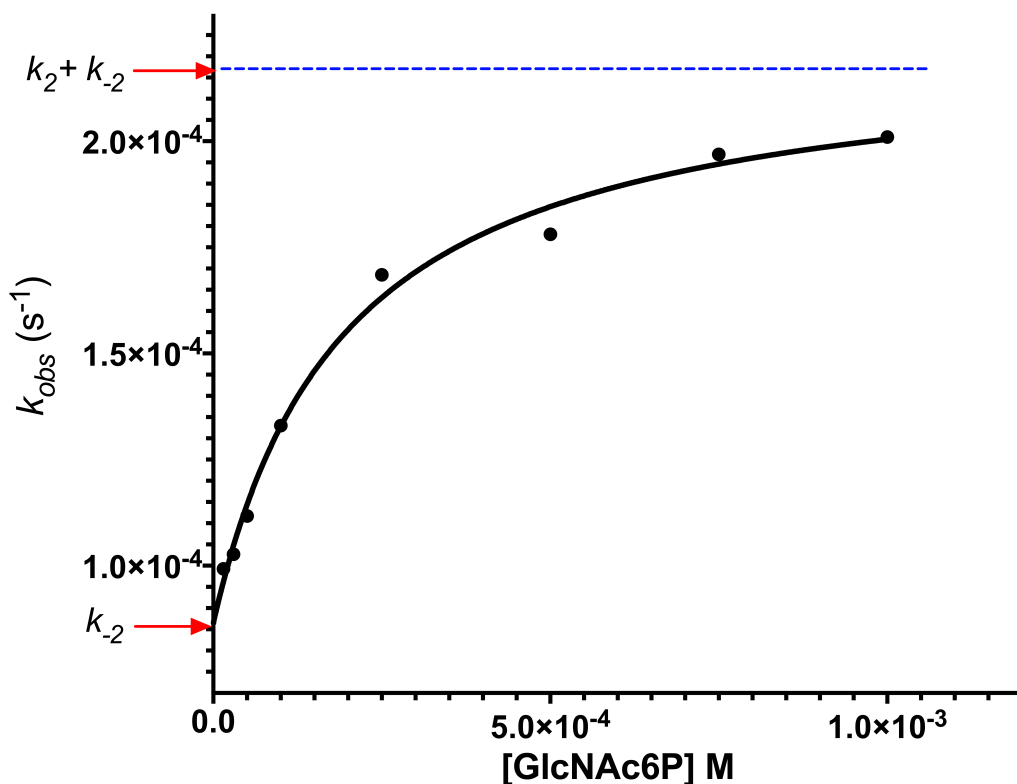


Figura 22. Gráfico de k_{obs} vs [GlcNAc6P]. La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación 12; las flechas rojas indican los componentes de la curva a partir de los cuales se calculan las constantes.

Tabla 5. Valores de las constantes calculadas a partir del ajuste por regresión no lineal al modelo de ajuste inducido.

k_2	k_{-2}	$K_D = (k_{-1}/k_1)$
$8.6 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$1.3 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$1.93 \times 10^{-4} \pm 7 \times 10^{-5} \text{ M}$

El ajuste del modelo apoya nuestras observaciones respecto a las relajaciones terciarias en el confórmero cuaternario T corresponden a un modelo de ajuste inducido. En este modelo, tal y como se describió, la unión del activador ocurre antes que el la transición alostérica y es mucho más rápido. Esto indica que las subunidades en estado conformacional t también son capaces de unir al activador alostérico.

Además del equilibrio de la transición terciaria, el modelo nos permite conocer la K_D que corresponde a la constante de disociación de la subunidad t por la GlcNAc6P. En el presente trabajo se calculó una constante de disociación aparente (K^*_D) a partir del ajuste a los datos experimentales de la figura 12 A. El valor calculado ($5.2 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-6}$) difiere del de K_D obtenido de la regresión no lineal al modelo de ajuste inducido, debido a que el equilibrio del segundo paso altera al equilibrio del primero. Con base en el modelo de ajuste inducido el valor de la K^*_D está dado por la siguiente ecuación

$$K^*_D = \frac{K_D}{1 + K2_{eq}} \quad (13)$$

En donde $K2_{eq} = k_{-2}/k_2$. Resolviendo la ecuación utilizando los valores de la tabla 5, el valor calculado de K^*_D es de 7.7×10^{-5} M muy cercano al valor calculado por los valores de fluorescencia al equilibrio (5.2×10^{-5} M) (figura 13 A). Este hecho es uno de los argumentos que apoyan a que este modelo es adecuado para el análisis de los datos y que este mecanismo de ajuste inducido opera a nivel terciario.

Esta observación es un paso importante para entender el mecanismo de alostería y cooperatividad de la EcGNPDA. Se sabe que la enzima a nivel cuaternario funciona bajo un equilibrio preexistente, de acuerdo a la teoría del modelo de MWC. Sin embargo, este trabajo demuestra que a nivel terciario ocurre un mecanismo en el que “se une primero y se mueve después”, lo cual implica que el origen de la alostería de la EcGNPDA sea terciario, y que las conformaciones cuaternarias estabilicen a los estados terciarios de alta y baja afinidad.

Respecto al mecanismo en el sentido de la relajación al estado t en T , sabemos que es un proceso rápido dada la K_{obs} obtenida en el experimento con fosfatasa alcalina. En principio se puede plantear un mecanismo en el cual se forma un cuadrado termodinámico que describa todo el sistema reversible en T . En el esquema de la figura 23 se muestra dicho cuadrado, en donde el lado superior y el derecho (parte sombreada) corresponden al modelo de ajuste inducido que se analizó. Los lados inferior e izquierdo son pasos teóricos, de los que en el presente trabajo no obtuvimos datos para sustentar su existencia. Cabe destacar que el mecanismo de relajación

provocado por la fosfatasa alcalina no necesariamente debe seguir los pasos teóricos propuestos; en principio puede operar por un mecanismo independiente. Es también por ello que la K_{obs} de r a t de la tabla 4 (5.25×10^{-2}) no tiene un valor aproximado con la k_2 del modelo de ajuste inducido (1.3×10^{-4}).

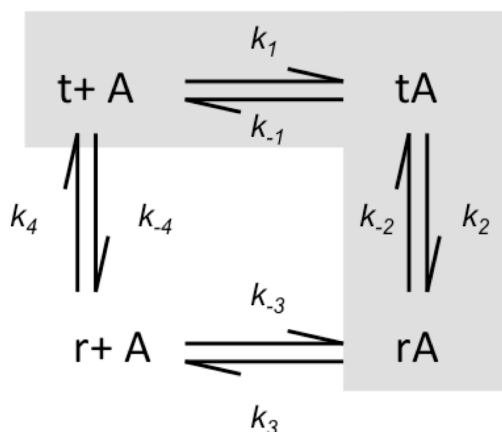


Figura 23. Cuadrado termodinámico del equilibrio terciario en T. La parte sombreada corresponde al modelo descrito en este trabajo (ajuste inducido). La parte clara se propone como mecanismo alternativo para la transición de r a t .

Para este trabajo no se consideró estudiar el mecanismo para el conformero R, debido a que la técnica de nanoencapsulación nos limita a obtener datos precisos que nos ayuden a determinar el orden y las velocidades de las reacciones involucradas. No obstante es materia de estudio de nuestro grupo de trabajo, y nuevas técnicas como la modificación química y la cinética rápida, nos permitirán describir el mecanismo para este conformero y continuar entendiendo el acoplamiento terciario-cuaternario de la alostería en la EcGNPDA.

8. Conclusiones

La señal de apagamiento del triptofano 206 causada por el acercamiento de la cisteína 165 tiene un componente cuaternario. El componente cuaternario desaparece en los experimentos de nanoencapsulación, siendo perceptible el componente terciario de la señal.

La señal terciaria muestra la existencia de dos estados conformacionales que llegan a equilibrio. El curso en el tiempo de las relajaciones terciarias se ajusta a una ecuación de de primer orden.

La estabilidad de los estados terciarios dependen del estado cuaternario. La unión del ligando, al menos en el conformero T, provoca que las subunidades en t (baja afinidad) cambien de conformación al estado r (alta afinidad), a través de un fenómeno de ajuste inducido, teniendo como resultado la activación alostérica de la enzima. En otras palabras, el origen de la alostería en la EcGNPDA es de carácter terciario.

9. Nuevas preguntas

¿Se pueden estimar las constantes de velocidad del cambio estructural terciario utilizando la señal de la mutante 165C/206W para el conformero R?

El comportamiento de la k_{obs} en función de la concentración de sustrato nos puede ayudar a conocer detalles sobre estas constantes. En principio, las obtenidas para el conformero T usando el modelo de ajuste inducido corresponden a este tipo de constantes. No obstante es importante conocer las correspondientes para el conformero R, y de esta manera relacionarlas con las observaciones globales en solución.

¿Se puede relacionar el mecanismo alostérico terciario con las observaciones en solución?

Una propuesta para intentar hacer esta relación es estudiar el mecanismo cinético de la transición alostérica en solución mediante el curso en el tiempo utilizando cinética rápida. Otra técnica que nos ayudaría a conocerlo es la calorimetría de titulación isotérmica. De esta manera, no solamente obtendríamos parámetros cinéticos, sino termodinámicos, con lo cual podríamos detallar el acoplamiento terciario cuaternario de la transición alostérica.

¿Cómo se pueden explicar a nivel estructural los mecanismos observados?

Se cuenta con las estructuras cristalográficas que nos permiten hacer una gran cantidad de experimentos *in silico*. Herramientas como la dinámica molecular nos permitirán conocer cómo se comportan las especies que no se pueden estudiar en solución (como los conformeros R sin ligando), y el papel de los aminoácidos involucrados en la transición conformacional.

10. Bibliografía

1. Petsko, G.A. and D. Ringe, *Protein structure and function*. 2004: Sinauer Associates Inc.
2. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 2010: Wh Freeman.
3. Huang, Y.J. and G.T. Montelione, *Structural biology: Proteins flex to function*. Nature, 2005. **438**(7064): p. 36-37.
4. Yoshida, M., E. Muneyuki, and T. Hisabori, *ATP synthase, a marvellous rotary engine of the cell*. Nature reviews molecular cell biology, 2001. **2**(9): p. 669-677.
5. McHenry, C., et al., *DNA polymerase III holoenzyme. Components, structure, and mechanism of a true replicative complex*. DNA, 1991. **266**(29).
6. Macnab, R.M., *The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(23): p. 7149-7153.
7. Monod, J., J.-P. Changeux, and F. Jacob, *Allosteric proteins and cellular control systems*. Journal of molecular biology, 1963. **6**(4): p. 306-329.
8. Peracchi, A. and A. Mozzarelli, *Exploring and exploiting allostery: Models, evolution, and drug targeting*. Biochimica et biophysica acta (BBA)-proteins and proteomics, 2011. **1814**(8): p. 922-933.
9. Barford, D., S.-H. Hu, and L. Johnson, *Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP*. Journal of molecular biology, 1991. **218**(1): p. 233-260.
10. Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of enzyme kinetics*. Vol. 3. 1995: Portland Press London.
11. Bustos-Jaimes L, D.A.-A.L., Caccagno ML., *Allostery and co-operativity in protein function*. Advances in protein physical chemistry, 2008. **37**(661): p. 219-248.

12. Michaelis, L. and M.L. Menten, *Die kinetik der invertinwirkung*. Biochem. z, 1913. **49**(333-369): p. 352.
13. Eaton, W.A., et al., *Evolution of allosteric models for hemoglobin*. IUBMB life, 2007. **59**(8,9): p. 586-599.
14. Muirhead, H. and M. Perutz, *Structure Of Hemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis of Reduced Human Haemoglobin at 5.5 Å Resolution*. 1963.
15. Monod, J., J. Wyman, and J.-P. Changeux, *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*. Journal of molecular biology, 1965. **12**: p. 88.
16. Rivetti, C., et al., *Oxygen binding by single crystals of hemoglobin*. Biochemistry, 1993. **32**(11): p. 2888-2906.
17. Ronda, L., et al., *Oxygen binding to heme proteins in solution, encapsulated in silica gels, and in the crystalline state*. Methods in enzymology, 2008. **437**: p. 311-328.
18. Viappiani, C., et al., *New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(40): p. 14414-14419.
19. Henry, E.R., et al., *A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin*. Biophysical chemistry, 2002. **98**(1): p. 149-164.
20. Calcagno, M., et al., *Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein structure and molecular enzymology, 1984. **787**(2): p. 165-173.
21. Oliva, G., et al., *Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from Escherichia coli at 2.1 Å resolution*. Structure, 1995. **3**(12): p. 1323-1332.
22. Rudino-Pinera, E., et al., *Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase*. Acta Crystallographica Section D: Biological crystallography, 2001. **58**(1): p. 10-20.

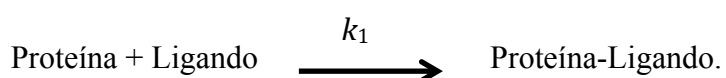
23. Bustos-Jaimes, I., et al., *Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase*. *Biochemistry*, 2005. **44**(4): p. 1127-35.
24. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2009: Springer.
25. Kosower, E.M. and N.S. Kosower, [12] *Bromobimane probes for thiols*. *Methods in enzymology*, 1995. **251**: p. 133-148.
26. Sosa-Peinado, A. and M. Gonzalez-Andrade, *Site-directed fluorescence labeling reveals differences on the R-conformer of glucosamine 6-phosphate deaminase of Escherichia coli induced by active or allosteric site ligands at steady state*. *Biochemistry*, 2005. **44**(46): p. 15083-92.
27. Chen, Y. and M.D. Barkley, *Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins*. *Biochemistry*, 1998. **37**(28): p. 9976-9982.
28. Smith, P., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Analytical biochemistry*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
29. Bettati, S. and A. Mozzarelli, *T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate, and chloride*. *Journal of chemistry*, 1997. **272**(51): p. 32050-32055.
30. Dunbrack, R.L., *Rotamer Libraries in the 21 st Century*. *Current opinion in structural biology*, 2002. **12**(4): p. 431-440.
31. Fersht, A., *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. 1999: Macmillan.

11. Apéndice

Modelos cinéticos de modificación de proteínas.

En este trabajo se utilizó un modelo cinético para explicar la cinética de relajaciones en el confórmero T. La ecuación se deduce a partir del modelo y puede ser aplicada para entender diversos fenómenos fisicoquímicos. En nuestro caso, el tipo de modelo y la interpretación de acuerdo al diseño experimental, sugieren que la enzima se comporta de acuerdo a la teoría del ajuste inducido. A continuación se describen los diferentes mecanismos con sus correspondientes ecuaciones en condiciones de pseudoprimer orden [31].

Mecanismo I. Formación irreversible del complejo “Proteína-ligando”.

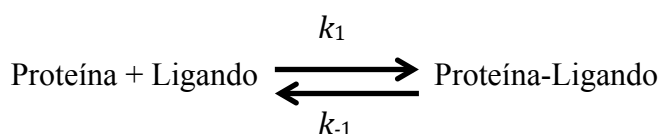


Para este mecanismo la k_{obs} depende de la concentración de ligando [L] y de la constante de velocidad k_1 , siendo la ecuación:

$$k_{obs} = k_1[L]$$

De tal forma que la k_{obs} depende de manera lineal de la concentración de ligando. Cuando [L] = 0, la $k_{obs} = 0$; por lo tanto el gráfico k_{obs} vs [L] corresponde a una línea con pendiente k_1 y ordenada al origen en (0,0).

Mecanismo II. Formación reversible del complejo “Proteína-Ligando”.



En este caso, en donde la reacción es reversible, la k_{obs} depende también de la velocidad de separación del complejo Proteína-Ligando, en donde la ecuación correspondiente es:

$$k_{obs} = k_1[L] + k_{-1}$$

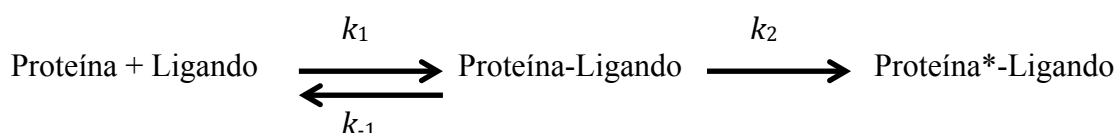
En este escenario el gráfico de k_{obs} vs. $[L]$ también corresponde a una línea recta, sin embargo, a diferencia del mecanismo anterior, cuando $[L] = 0$ entonces $k_{obs} = k_{-1}$, por lo tanto la línea recta tiene pendiente k_1 y ordenada al origen en $(0, k_{-1})$.

Cuando el sistema llega al equilibrio, se puede estimar la fracción de saturación de la enzima por el ligando, definida como $\bar{y} = [PL]_{eq}/[P]_t$, en donde $[PL]_{eq}$ es la concentración del complejo Proteína-Ligando cuando se alcanza el equilibrio, y $[P]_t$ es la concentración de proteína total, es decir la proteína libre $[P]$ más la proteína en complejo $[PL]$. A partir de estas definiciones se puede estimar \bar{y} mediante la siguiente ecuación:

$$\bar{y} = \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

En donde K_D es la constante de disociación del complejo $[EL]$ definida como $K_D = k_{-1}/k_1 = [P][L]/[PL]^{eq}$.

Mecanismo III: Formación reversible del complejo Proteína-Ligando, seguido de un cambio en la proteína.



En este mecanismo se incluye un segundo paso, que corresponde a una alteración en la proteína, ya sea un cambio conformacional (como el de la GNPDA descrito en esta tesis), así como inactivación, o modificación química. Los supuestos de este mecanismo, son que la unión del ligando es el primer paso, y que es más rápido que el

paso de alteración de la proteína, lo que significa que este llega al equilibrio antes que ocurra la segunda reacción.

De esta manera, ambas reacciones se pueden manejar por separado, por lo tanto la primera reacción al llegar al equilibrio se describe como en el modelo anterior.

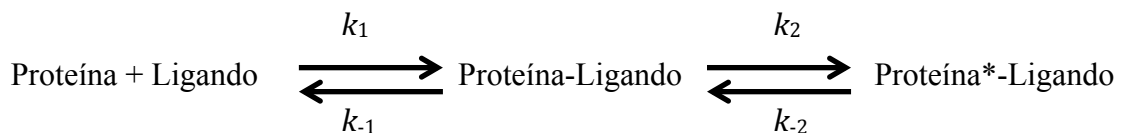
$$\frac{[PL]}{[P]_t} = \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

por lo tanto:

$$k_{obs} = \frac{k_2 [L]}{K_D + [L]}$$

El gráfico de k_{obs} vs $[L]$ corresponde a una hipérbola equilátera, con origen en (0,0). La k_{obs} máxima se alcanza cuando $[L]$ es infinita y corresponde al valor de k_2 .

Mecanismo IV: Formación reversible del complejo Proteína-Ligando, seguido de un cambio reversible en la proteína (ajuste inducido).



En este escenario los postulados del mecanismo III siguen se aplican; pero en este caso, dado que la segunda reacción es reversible, la k_{obs} es resultado de la suma de los dos pasos de formación de $[P^*L]$. En el mecanismo III se dedujo que la constante observada de formación de $[P^*L]$ es $k_2[L]/(K_D + [L])$, por lo tanto para este mecanismo la ecuación correspondiente es:

$$k_{obs} = k_{-2} + \frac{k_2 [L]}{K_D + [L]}$$

en donde $K_D = k_{-1}/k_1$

Por lo tanto cuando $[L] = 0$, entonces $k_{obs} = k_{-2}$; mientras que a concentración infinita de L, se alcanza la k_{obs} máxima $= k_{-2} + k_2$.

El gráfico de k_{obs} , corresponde por lo tanto a una hipérbola equilátera ascendente con origen en k_{-2}

La fracción de proteína transformada es $[P^*L]_{eq}/[E]_{tot}$.

En donde $[P]_{tot} = [P]_{eq} + [PL]_{eq} + [P^*L]_{eq}$ es decir, todas las formas de la proteína cuando se alcanza el equilibrio.

Dado que, $[P^*L]_{eq} / [PL]_{eq} = k_2 / k_{-2} = K_{eq2}$ en donde K_{eq2} es la constante de equilibrio del segundo paso, y que $[PL]_{eq} = [P]_{eq} [L] / K_D$, en donde K_D es la constante de disociación del primer paso, entonces:

$$\frac{[P^*L]}{[P]_{tot}} = \frac{[L] K_{eq2} / (1 + K_{eq2})}{K_D / (1 + K_{eq2}) + [L]}$$

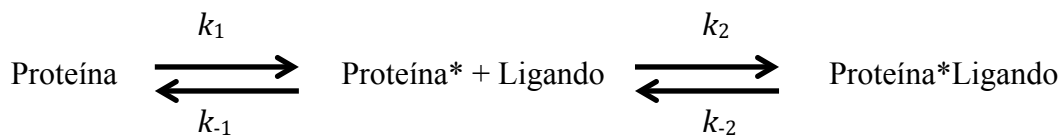
Lo que significa que la fracción de proteína modificada depende de la concentración de ligando. Cuanto más grande sea la K_{eq2} , mayor será la fracción de proteína modificada que se puede alcanzar.

Además se puede calcular una constante de disociación aparente (K_D^*), obtenida de ajustar los valores de fracción de saturación \bar{y} contra la concentración de L a una hipérbola equilátera. En este caso la K_D^* es mayor a la K_D (constante de disociación el complejo PL), la relación está dada por la siguiente ecuación:

$$K_D^* = \frac{K_D}{(1 + K_{eq2})}$$

Debido a que el segundo equilibrio afecta al primero, entonces entre más grande sea la K_{eq2} menor será el valor de la K^*_D .

Mecanismo V: La unión del ligando desplaza el equilibrio preexistente entre dos formas de la proteína (fijación exclusiva).



En este modelo de equilibrio preexistente, se plantea que existe un equilibrio entre dos formas de la proteína siendo este un proceso lento a comparación del segundo paso que corresponde a la unión del ligando a solo una de las formas de la proteína (proceso rápido). De tal forma que la k_{obs} corresponde a la primera reacción y depende de cantidad de proteína capaz de unir al ligando (P^*), por lo tanto del segundo equilibrio. Siendo así la ecuación de este mecanismo es la siguiente:

$$k_{obs} = k_1 + \frac{k_{-1}K_D}{K_D + [L]}$$

en donde $K_D = k_{-2}/k_2$ por lo tanto a $[L] = 0$, $k_{obs} = k_1 + k_{-1}$

En comparación con el mecanismo IV, en este caso la curva descrita por la ecuación, corresponde a una hipérbola descendente, y por lo tanto alcanza un valor mínimo que corresponde a k_1 .

Cuando se alcanza el equilibrio, la fracción de proteína en la forma $[P^*L]_{eq}$ depende de la concentración de ligando y está determinada por la siguiente ecuación.

$$\frac{[P^*L]}{[P]_{tot}} = \frac{[L]}{K_D(1 + K_{eq1}) + [L]}$$

En donde $K_{eq1} = k_1/k_{-1}$.