



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El mecanismo de activación alostérica de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de
Escherichia coli en conformación R

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Roberto Jareth Vázquez Núñez

Mario L. Calcagno Montáns
[Facultad de Medicina](#)

Daniel Alejandro Fernández Velasco
[Facultad de Medicina](#)

Julio Lenin Domínguez Ramírez
[Universidad de las Americas Puebla](#)

MÉXICO, D. F. julio, 2015



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.

Agradecimientos.

Al candidato a doctor Sergio Zonszein Strauss, por asesorarme y guiarme durante la realización e interpretación del presente trabajo.

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 coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Al PAPIIT (IN213312 y IN216615) y al CONACyT (CB-2008-01 y C0004-2009-01) quienes nos brindaron apoyo económico para llevar a cabo las investigaciones y experimentos.

A mi comité tutorial formado por los Doctores Daniel Alejandro Fernandez y Julio Lenin Dominguez, por guiarme en el curso de este trabajo.

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

Finalmente a mi alma mater la UNAM, que me abrió las puertas de sus aulas y me ha formado como una persona competitiva.

Dedicatorias

La presente tesis está dedicada a toda mi familia:

A mis padres Bertila y Gabriel, quienes han sido mi ejemplo, me dieron la vida y siempre me han brindado toda su confianza y apoyo incondicional.

A mis hermanos Gabriel y Johalan, quienes han sido mis mejores amigos y con quienes he celebrado los buenos y superado los malos.

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, quien me ha enseñado que es el amor, me ha enseñado a entender muchos aspectos de la vida y quien me conoce mejor que nadie. ¡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.

A toda la familia Díaz Jiménez, quienes me han brindado su cariño y un apoyo muy especial en momentos muy difíciles en esta etapa de mi vida.

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, y mi gran amigo que ha tenido mucha confianza en mi y me ha apoyado incondicionalmente en todas las circunstancias.

A Sergio Zonszein quien ha sido la persona que me ha formado como joven investigador, por la enorme paciencia de enseñarme discutir cualquier tema académico y no académico.

Índice

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMIENTOS. | 2 |
| DEDICATORIAS | 3 |
| RESUMEN. | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN. | 8 |
| 1.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS. | 8 |
| 1.2 ESTRUCTURA DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS. | 9 |
| 1.3 PROTEÍNAS ALOSTÉRICAS. | 9 |
| 1.4 PROTEÍNAS COOPERATIVAS. | 10 |
| 1.5 RUTAS TERMODINÁMICAS DE LA TRANSICIÓN ALOSTÉRICA. | 11 |
| 1.6 MODELOS CINÉTICOS PARA EL MECANISMO DE UNIÓN A LIGANTE Y CAMBIO CONFORMACIONAL. | 13 |
| 1.6.1 FORMACIÓN IRREVERSIBLE DEL COMPLEJO “PROTEÍNA-LIGANTE”. | 13 |
| 1.6.2 FORMACIÓN REVERSIBLE DEL COMPLEJO “PROTEÍNA-LIGANTE”. | 14 |
| 1.6.3 FORMACIÓN REVERSIBLE DEL COMPLEJO “PROTEÍNA-LIGANTE”, SEGUIDO DE UN CAMBIO CONFORMACIONAL EN LA PROTEÍNA. | 15 |
| 1.6.4 FORMACIÓN REVERSIBLE DEL COMPLEJO “PROTEÍNA-LIGANTE”, SEGUIDO DE UN CAMBIO CONFORMACIONAL REVERSIBLE EN LA PROTEÍNA (AJUSTE INDUCIDO). | 16 |
| 1.6.5 LA UNIÓN DEL LIGANTE DESPLAZA EL EQUILIBRIO PREEXISTENTE ENTRE DOS CONFORMACIONES DE LA PROTEÍNA (SELECCIÓN CONFORMACIONAL). | 18 |
| 1.7 MODELO DE ESTUDIO: LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> . | 20 |
| 1.8 ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LA ECGNPDA | 21 |
| 1.9 EL ORIGEN TERCIARIO DE LA ACTIVACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ECGNPDA EN EL CONFÓRMERO T. | 22 |
| 1.10 ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ECGNPDA POR MEDIO DE CANDADOS MOLECULARES. | 29 |
| 2. PLANTEAMIENTO. | 31 |
| 3. HIPÓTESIS. | 32 |
| 4. OBJETIVO GENERAL. | 33 |
| 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. | 33 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS. | 34 |
| 6. RESULTADOS. | 43 |
| 6.1 RELAJACIÓN TERCIARIA DEPENDIENTE DE TEMPERATURA EN LA MUTANTE F NANOENCAPSULADA. | 43 |
| 6.2 RELAJACIÓN TERCIARIA DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE GLCNAC6P. | 44 |
| 6.4 CONSTANTE DE DISOCIACIÓN DE LA GLCNAC6P EN CONDICIONES DE EQUILIBRIO. | 47 |
| 6.5 MECANISMOS DE UNIÓN DE LA GLCNAC6P EN CONDICIONES FUERA DEL EQUILIBRIO. | 48 |
| 6.6 RESTRICCIÓN CONFORMACIONAL POR MEDIO DE CANDADOS MOLECULARES. | 52 |
| 6.7 SEÑAL DE DICROÍSMO CIRCULAR DE LA TYR 254 EN LA MUTANTE L. | 54 |
| 6.8 FLUORESCENCIA DE LA TYR254 EN LA MUTANTE L. | 55 |
| 7. DISCUSIÓN. | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 7.1 RELAJACIÓN TERCIARIA DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA EN EL CONFÓRMERO R NANOENCAPSULADO. | 57 |
| 7.2 RELAJACIÓN TERCIARA DEPENDIENTE DE GLCNAC6P. | 58 |
| 7.3 UNIÓN DE LA GLCNAC6P EN CONDICIONES FUERA DEL EQUILIBRIO. | 60 |
| 7.4 INTERPRETACIÓN GENERAL. | 62 |
| 7.5 RESTRICCIÓN CONFORMACIONAL POR MEDIO DE CANDADOS MOLECULARES. | 66 |
| 8. CONCLUSIÓN. | 69 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 70 |

Resumen.

La glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPDA), es una enzima homohexamérica que cataliza de manera cooperativa la desaminación e isomerización de la GlcN6P y es activada alostéricamente por la GlcNAc6P. Con el estudio del conformero cuaternario T, utilizando la nanoencapsulación en geles de sílice para impedir la transición cuaternaria de la enzima, se encontró que la activación alostérica ocurre principalmente por un cambio conformacional terciario. Esto se explicó mediante un modelo mínimo de dos estados terciarios con diferentes afinidades por el activador alostérico, t de baja afinidad y r de alta afinidad. Se descubrió que la activación alostérica de T ocurre por un mecanismo de ajuste inducido, a diferencia de lo que se ha reportado para la hemoglobina, en la cual el mecanismo de unión del ligante presenta un comportamiento de selección conformacional.

En el presente trabajo se estudió el mecanismo de activación del conformero R de la EcGNPDA, utilizando la misma estrategia experimental de nanoencapsulación y el análisis de las cinéticas de relajación obtenidas de la mutante F, que tiene un triptofano como reportero fluorescente. Descubrimos que en este conformero, aparentemente los mecanismos de ajuste inducido y selección conformacional ocurren de manera independiente o simultáneamente, dependiendo de las condiciones experimentales. Esto se logró observar gracias a que la transición alostérica contiene un componente entrópico importante, cuyo equilibrio t - r depende de la temperatura, favoreciendo en el equilibrio a la forma r a 30 °C, y a la forma t a 4 °C. En condiciones de equilibrio a 30 °C, se encontró que aun en ausencia de activador existe una fracción de subunidades en forma r ; en condiciones de saturación de activador las subunidades en conformación t pasan a r con un mecanismo de ajuste inducido.

Cuando cambiamos simultáneamente la temperatura (4 a 30 °C) y la concentración de ligante, observamos los dos mecanismos simultáneamente. Esto demuestra que la activación alostérica para la forma R puede ocurrir por la ruta de selección conformacional, ausente en la forma T. También se presenta evidencia experimental de que los mecanismos de ajuste inducido y de selección conformacional no son excluyentes, como se había propuesto de manera teórica en algunos trabajos previos.

Abstract.

Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* (EcGNPDA) is a homohexameric protein that catalyzes the deamination and isomerization of GlcN6P in a cooperative reaction. This enzyme also is allosterically activated by GlcNAc6P. The low affinity quaternary state (T) has been characterized by using silica gel nanoencapsulation. This technique abolishes the quaternary structural changes and slows down the tertiary ones. In this conformer was described that the allosteric activation occurs at tertiary level. The results were analyzed using, as a minimal model, the existence of two tertiary states with different affinities for the allosteric activator, the low affinity *t* state, and the high affinity *r* state. It was also found that this allosteric activation is consistent with an induced-fit mechanism, differing with the conformational selection mechanism described for the hemoglobin.

In this work we characterized the allosteric activation mechanism for the high affinity R, quaternary state. We resort to the same experimental strategy used for T: nanoencapsulation and relaxation kinetics, using the mutant F of the EcGNPDA, a mutant with a fluorescent reporter. We discovered in this conformer, that the mechanisms of induced fit and conformational selection occur separated or simultaneously depending on experimental conditions. It happens because, in absence of ligand, the *t-r* equilibrium has temperature dependence, favoring the *r* state at 30 °C, and the *t* state at 4 °C. In equilibrium condition at 30 °C, there are some subunits in the *t* state that reaches the *r* state via an induced fit mechanism. Moreover, when temperature is changed (4 to 30 °C) and simultaneously the ligand concentration is raised, we observed that either induced fit and conformational, selection occur with different rate constants allowing us their separate analysis.

These findings demonstrate that the conformational selection mechanism, for the allosteric activation of the EcGNPDA, occurs in the R quaternary conformer, and is absent in the T form of the enzyme. Additionally, it is a new experimental evidence for the compatibility of the induced fit and conformational selection mechanisms, previously proposed as a possible scenario.

1. Introducción.

Las proteínas son cadenas polipeptídicas sintetizadas en los ribosomas a partir de una secuencia específica codificada en el ADN. Los aminoácidos, que son los componentes esenciales de las proteínas, presentan características fisicoquímicas particulares, dependiendo del grupo funcional que los componga. En total son 21 los aminoácidos que forman parte de las proteínas sintetizadas en las células. Esta variedad de aminoácidos le confiere una gran versatilidad de funciones a las proteínas.

En las proteínas, la secuencia, la estructura y la dinámica, son características esenciales para su función. Con respecto a la dinámica, se conoce que la estructura tridimensional de las proteínas no es rígida, sino que presenta fluctuaciones estructurales que permite adaptar la posición de ciertos aminoácidos de acuerdo a las necesidades funcionales [1].

1.1. Estructura de las proteínas.

La biología estructural es una rama de la biología que se encarga de estudiar la relación que existe entre la estructura de los componentes celulares y la función que ellos desempeñan. En el caso de las proteínas, la determinación de las diferentes estructuras que éstas puedan adoptar ha sido de gran ayuda para comprender en detalle su función biológica.

Desde mediados del siglo XX cuando se determinó la estructura de la hemoglobina, por cristalografía de rayos X, la cantidad de moléculas de las cuales se conoce su estructura ha crecido considerablemente hasta la fecha.

Los avances técnicos en el área de la cristalografía de rayos X, así como el desarrollo de otras técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear, o la microscopía electrónica, han permitido contar con un número extenso de estructuras de proteínas, que a su vez han sido clasificadas de acuerdo al tipo de plegamiento que presentan.

En algunas proteínas la estructura biológicamente funcional es la cuaternaria. En este nivel de complejidad estructural, varias cadenas polipeptídicas interactúan formando oligómeros. Los oligómeros pueden estar constituidos por subunidades iguales, en tal caso se denominan homooligómeros, mientras que aquellos formados por subunidades diferentes se les llama heterooligómeros [2].

1.2 Estructura dinámica de las proteínas.

Desde el punto de vista termodinámico, la estructura nativa es el estado de menor energía libre y por lo tanto el de mayor estabilidad. Sin embargo, se ha propuesto que la estructura nativa no solamente consiste en un estado, sino en múltiples pozos energéticos que la proteína puede visitar en periodos de tiempo cortos, o que se pueden estabilizar por agentes externos como la temperatura, o la presencia de ligantes.

Estas fluctuaciones en los estados energéticos, le confieren a las proteínas una dinámica que, en muchos de los casos, está relacionada con su funcionalidad [3].

El movimiento de las proteínas puede estar confinado a una región específica, como en el caso de la teoría de ajuste inducido, en donde el sitio de unión de ligante tiene algunos reordenamientos al momento de unir a un ligante. Por otra parte existen movimientos que involucran otro nivel de complejidad, como cambios en la estructura cuaternaria tales como el movimiento de la ATP sintasa para la formación de ATP [4], o el giro del motor del flagelo bacteriano [5]. En cualquiera de los casos, el movimiento de las proteínas es crucial para su función.

1.3 Proteínas alostéricas.

Algunas proteínas pueden unir a más de un ligante. En el caso de las enzimas que tienen esta característica, pueden unir a uno o a varios ligantes además de su sustrato (o sustratos). El efecto alostérico (del griego *allos* “otro” y *stereos* “sólido”) ocurre cuando ambos sitios están termodinámicamente acoplados, es decir, la unión de un ligante afecta, a través de un cambio conformacional, las propiedades de unión del sitio para el segundo ligante [6].

El fenómeno alostérico fue descubierto por Jacques Monod y François Jacob en 1962, mientras realizaban estudios sobre la regulación del operón de lactosa. En este caso la proteína represora de la expresión de genes, LacI, tiene dos sitios acoplados, uno de ellos para la unión de la molécula de lactosa, mientras que el otro sitio reconoce a una secuencia específica de ADN. Cuando LacI se encuentra unida a la molécula de lactosa, pierde afinidad por la secuencia de ADN, provocando que el promotor del operón de lactosa pueda

ser reconocido por el factor σ^{70} e iniciar la transcripción, mientras que en ausencia de lactosa LacI permanece unida a la secuencia específica de DNA [6].

El represor LacI fue el primer ejemplo de una proteína alostérica, desde entonces se encontró que una gran cantidad de proteínas presentan este fenómeno para su regulación dentro de la célula.

1.4 Proteínas cooperativas.

Existen proteínas oligoméricas en donde los sitios en cada una de las subunidades que las conforman están acoplados mediante un cambio conformacional, es decir, el fenómeno alostérico ocurre también en los oligómeros acoplando los sitios en cada subunidad.

La cooperatividad es el fenómeno en donde la unión de un ligante en una de las subunidades, favorece (aumenta la afinidad) la unión del ligante en otra de las subunidades [7]. A medida que la proteína se satura con el ligante, esta presenta poca afinidad a bajas concentraciones, mientras que al aumentar la concentración del ligante incrementa la afinidad.

El fenómeno se aprecia en la forma sigmoide de las curvas de saturación de una proteína por su ligante (o velocidad en el caso de una enzima).

En la figura 1 A, se muestra la curva de saturación de una proteína que no presenta cooperatividad, también llamada curva de saturación hiperbólica, debido a que el fenómeno se puede ajustar a la ecuación de una hipérbola, que en el caso de una enzima, se obtiene a partir del mecanismo de Michaelis-Menten [8]. En la figura 1 B, se representa la curva de saturación de una proteína cooperativa. A diferencia de la saturación hiperbólica en la que el mecanismo de Michaelis-Menten es suficiente para deducir la ecuación que puede explicar el fenómeno observado, en la saturación cooperativa no existe, hasta el momento, un mecanismo general que pueda explicar el fenómeno en cualquier proteína.

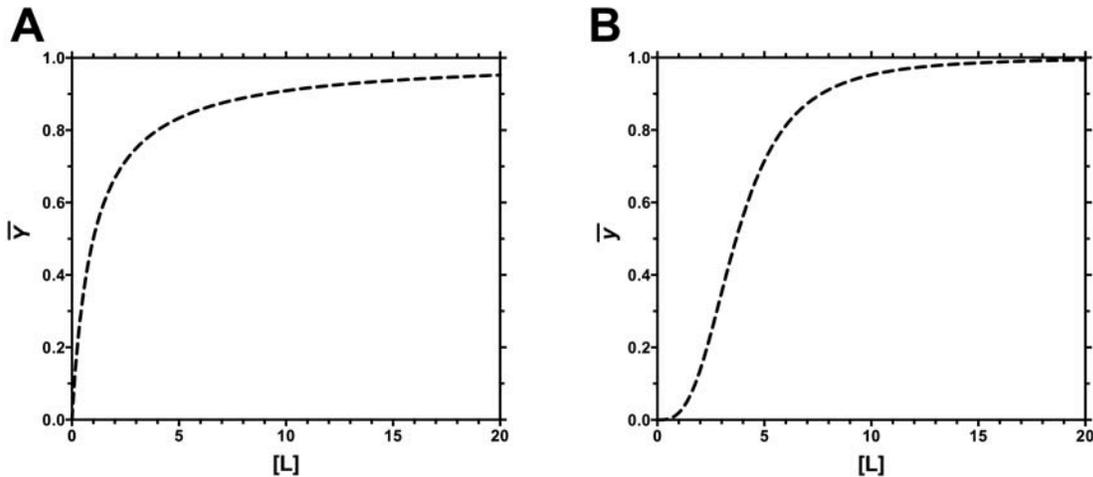


Figura 1. Gráficas de fracción de saturación \bar{Y} en función de la concentración de ligante. A. Para una proteína con saturación hiperbólica. B. Para una proteína cooperativa, con saturación sigmoideal.

Históricamente la unión de ligante y cambio conformacional se ha analizado por dos mecanismos: la selección conformacional y el ajuste inducido. El primero corresponde a la teoría que sustenta al modelo clásico de Monod, Wyman y Changeux (MWC) [9], mientras que el segundo sustenta al modelo propuesto por Koshland, Nemethy y Filmer (KNF) [10]. En ambos casos se considera que la proteína existe en dos estados conformacionales, T (baja afinidad) y R (alta afinidad), la diferencia radica en que en la selección conformacional el cambio conformacional precede a la unión del ligante, mientras que en el ajuste inducido el cambio conformacional es posterior a la unión del ligante.

1.5 Rutas termodinámicas de la transición alostérica.

Desde el punto de vista termodinámico, la transición alostérica es el paso de una conformación con cierto nivel de energía a un nuevo estado conformacional con un nivel de energía más bajo. Como función de estado, no importa el valor de ΔG de la transición, puesto que éste es independiente de la ruta que siga (selección conformacional o ajuste inducido).

La estabilidad de cada uno de los conformeros depende del estado de ligación. En ausencia de ligante la conformación más estable es la de menor afinidad llamada T, mientras que en presencia de ligante la más estable es la de mayor afinidad llamada R. Como en cualquier

reacción química, existe una barrera de energía que separa ambos estados conformacionales. De acuerdo al modelo MWC, el estado conformacional R puede existir en ausencia de ligante, sin embargo este estado es de muy alta energía y por lo tanto inestable. De igual forma el estado T saturado con ligante puede existir, pero en un estado energético inestable.

Tomando en cuenta la hipótesis del ajuste inducido del modelo KNF, existen diferentes especies heterogéneas con distintos niveles energéticos, los cuales tienen menor energía a medida que se saturan y se convierten en R.

Zhuravlev y Papoian, propusieron un paisaje energético para dos estados conformacionales cuaternarios [11]. En él se muestra que las rutas de selección conformacional y de ajuste inducido, no son excluyentes. En ambos casos se parte del mismo estado inicial y se llega al mismo estado final, y la proteína cooperativa tiene la alternativa de visitar diferentes estados energéticos durante la transición. La figura 2 está basada en la propuesta de Zhuravlev y Papoian, y representa en el paisaje energético las rutas de selección conformacional (MWC) y de ajuste inducido (KNF).

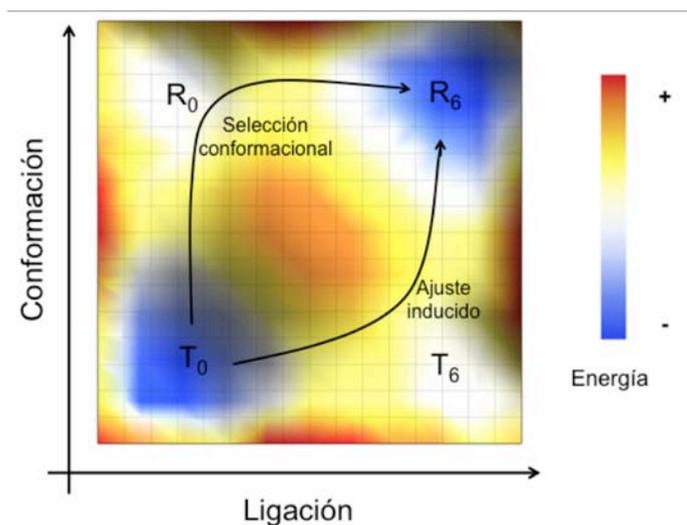
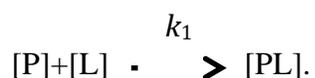


Figura 2. Gráfica de estado conformacional en función del estado de ligación. Las formas T_0 y R_0 corresponden a los conformeros de alta y baja afinidad respectivamente en ausencia de ligante. Las especies T_6 y R_6 ejemplifican a los conformeros saturados, en este caso para un oligómero con 6 sitios de unión. El gradiente de color simboliza el nivel energético. En el mapa también se representan las dos rutas posibles para la transición conformacional [11].

1.6 Modelos cinéticos para el mecanismo de unión a ligante y cambio conformacional.

Desde el punto de vista cinético, existen diversos mecanismos por los cuales una proteína puede unir al ligante y tener un cambio conformacional. Algunas de las características que distinguen a un mecanismo de otro son las temporalidades y orden en las que ocurre la unión del ligante y el cambio conformacional. El análisis cinético del mecanismo permite conocer estas diferencias que son imposibles de determinar en sistemas al equilibrio. A continuación se hace una revisión de los modelos más relevantes y se hace énfasis en los modelos de selección conformacional y de ajuste inducido [12].

1.6.1 Formación irreversible del complejo “Proteína-ligante”.

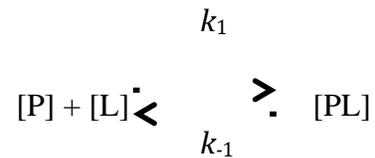


En este mecanismo [P] representa la concentración de proteína y [L] es la concentración de ligante. La k_{obs} depende de la concentración de ligante [L] y de la constante de velocidad k_1 , siendo la ecuación:

$$k_{obs} = k_1[L] \quad (1.1)$$

De tal forma que la k_{obs} depende de manera lineal de la concentración de ligante. 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).

1.6.2 Formación reversible del complejo “Proteína-ligante”.



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

$$k_{obs} = k_1[L] + k_{-1} \quad (1.2)$$

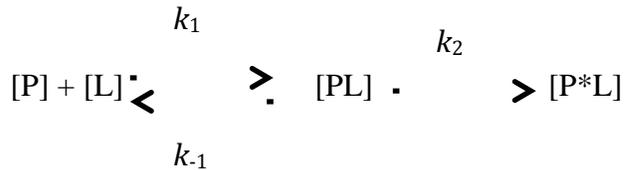
En este escenario el gráfico de k_{obs} vs. [L] también corresponde a una línea recta, sin embargo, a diferencia del mecanismo anterior, cuando [L] = 0 entonces $k_{obs} = k_{-1}$, por lo tanto la línea recta tiene pendiente k_1 y ordenada al origen en $(0, k_{-1})$.

Cuando el sistema llega al equilibrio, se puede estimar la fracción de saturación de la enzima por el ligante, definida como $\bar{y} = [PL]_{eq}/[P]_t$, en donde $[PL]_{eq}$ es la concentración del complejo Proteína-Ligante 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:

$$\bar{y} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (1.3)$$

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

1.6.3 Formación reversible del complejo “Proteína-ligante”, seguido de un cambio conformacional en la Proteína.



En este mecanismo se incluye un segundo paso, que corresponde a una alteración en la proteína, en este caso se refiere a un cambio conformacional. Los supuestos de este mecanismo, son que la unión del ligante es el primer paso, y que es más rápido que el cambio de conformación de la proteína, lo que significa que este llega al equilibrio antes que ocurra la segunda reacción (equilibrio rápido).

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.

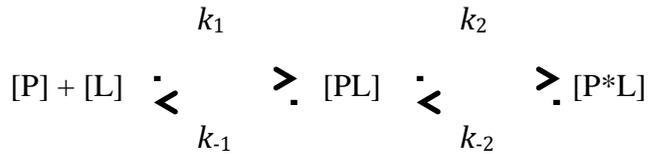
$$\frac{[PL]}{[P]_t} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (1.4)$$

por lo tanto:

$$k_{obs} = \frac{k_2 [L]}{K_D + [L]} \quad (1.5)$$

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 .

1.6.4 Formación reversible del complejo “Proteína-ligante”, seguido de un cambio conformacional reversible en la Proteína (ajuste inducido).



En este escenario los postulados del mecanismo anterior se siguen aplicando; 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 anterior 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:

$$k_{obs} = k_{-2} + \frac{k_2 [L]}{K_D + [L]} \quad (1.6)$$

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} (figura 3)

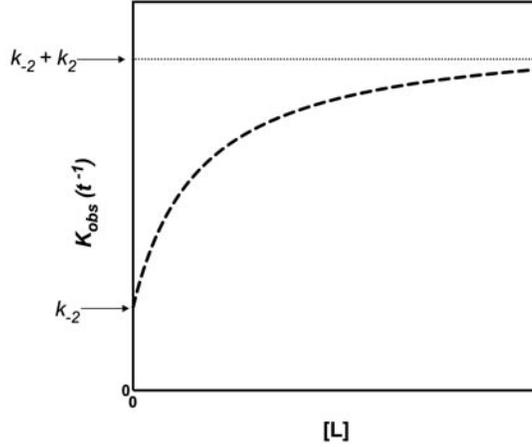


Figura 3. Gráfica de K_{obs} en función de la concentración de ligante L . El mecanismo representado es un ajuste inducido y se muestran la ordenada al origen y la asíntota a partir de las cuales se pueden obtener las constantes de velocidad del cambio conformacional.

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

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:

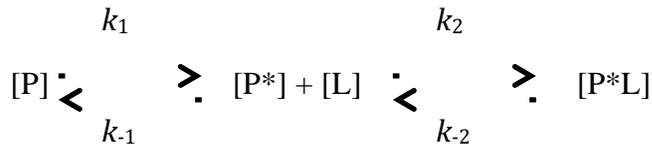
$$\frac{[P^*L]}{[P]_{tot}} = \frac{[L] K_{eq2} / (1 + K_{eq2})}{K_D / (1 + K_{eq2}) + [L]} \quad (1.7)$$

Esto significa que la fracción de proteína modificada depende de la concentración de ligante. 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^{app}), obtenida de ajustar a una hipérbola equilátera los valores de fracción de saturación \bar{y} contra la concentración de L . En este caso la K_D^{app} es mayor a la K_D (constante de disociación el complejo PL) y la relación está dada por la siguiente ecuación:

$$K_D^{app} = \frac{K_D}{(1 + K_{eq2})} \quad (1.8)$$

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^{app} .

1.6.5 La unión del ligante desplaza el equilibrio preexistente entre dos conformaciones de la Proteína (selección conformacional).



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 ligante 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 la cantidad de proteína capaz de unir al ligante (P^*), por lo tanto del segundo equilibrio. Considerando esto, la ecuación de este mecanismo es la siguiente:

$$k_{obs} = k_1 + \frac{k_{-1}K_D}{K_D + [L]} \quad (1.9)$$

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

En comparación con el mecanismo de ajuste inducido, 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 (figura 4).

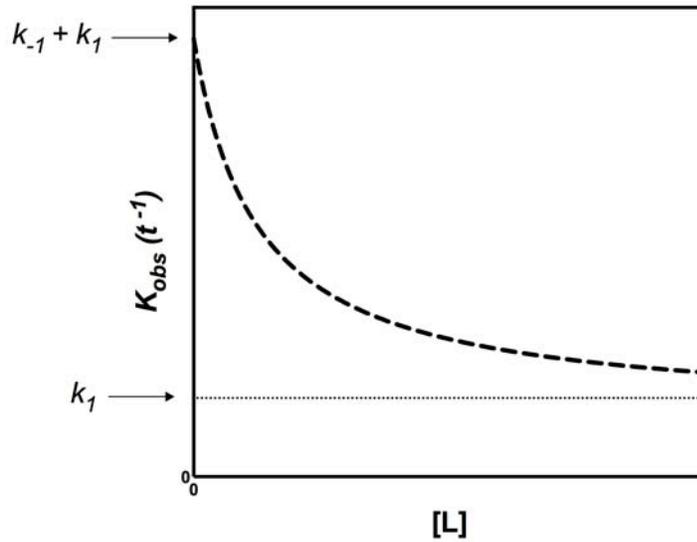


Figura 4. Gráfica de K_{obs} en función de la concentración de ligante L . El mecanismo representado es de selección conformacional y se muestran la ordenada al origen y la asíntota a partir de las cuales se pueden obtener las constantes de velocidad del cambio conformacional.

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

$$\frac{[P^*L]}{[P]_{tot}} = \frac{[L]}{K_D(1 + K_{eq1}) + [L]} \quad (1.10)$$

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

1.7 Modelo de estudio: La Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*.

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* (EcGNPDA) es una enzima que cataliza la reacción de desaminación e isomerización de la glucosamina-6-fosfato (GlcN6P), produciendo fructosa-6-fosfato y ion amonio. La cinética de la reacción de catálisis de la EcGNPDA presenta cooperatividad positiva homotrópica [13].

Esta enzima, también tiene un sitio de unión para un activador alostérico que es la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). La enzima por lo tanto también presenta un efecto de activación heterotrópico. En la figura 5 se muestran las curvas de velocidad con respecto a la concentración de sustrato, a concentraciones variables de activador alostérico. En ellas se observa la cooperatividad y el efecto de activación alostérica.

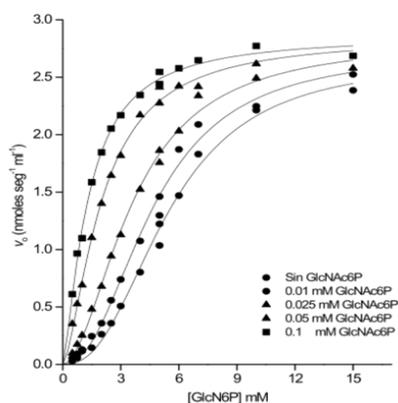


Figura 5. Grafica de velocidades iniciales de la reacción catalizada por la EcGNPDA silvestre. Cada curva se obtuvo a concentraciones variables de activador alostérico GlcNAc6P, como se indica en la leyenda [13].

1.8 Aspectos estructurales de la EcGNPDA

La EcGNPDA es un homohexámro de 266 aminoácidos por subunidad, con una organización de dímero de trímeros. Actualmente se cuenta con las estructuras cristalográficas en la forma T (PDB:1fs6) y en la forma R con ligante alostérico (PDB:1frz). En la figura 6 se muestra la estructura en conformación T.



Figura 6. Esquema de cintas del hexámero de la EcGNPDA en conformación T (PDB:1fs6). Cada subunidad se presenta de diferente color.

La EcGNPDA posee un sitio activo y un sitio alostérico por cada subunidad. Los sitios alostéricos están formados por las interfaces en el eje de orden 3. En la figura 7 se representan las posiciones tanto del sitio activo como del sitio alostérico en la EcGNPDA.

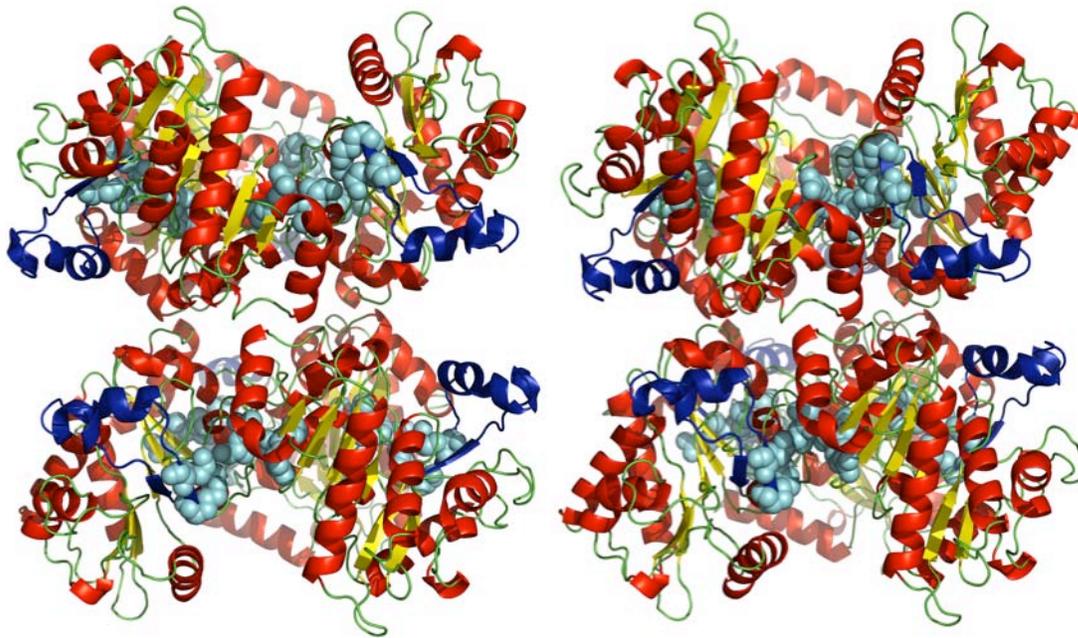


Figura 7. Hexámero de la EcGNPDA. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo las hebras β , y en verde los segmentos sin estructura secundaria periódica. En azul aparecen los residuos que forman parte del dominio llamado “tapa” del sitio activo. En esferas turquesa se muestran los residuos que conforman el sitio alostérico. La figura del lado izquierdo corresponde a la EcGNPDA en conformación T, mientras que la del lado derecho corresponde a la conformación R.

1.9 El origen terciario de la activación alostérica de la EcGNPDA en el confórmero T.

El fenómeno de cooperatividad y de activación alostérica en la EcGNPDA ha sido estudiado y analizado con el modelo MWC. Los parámetros que se obtienen del ajuste de los datos experimentales de cinética enzimática a la ecuación del modelo MWC, son consistentes con datos obtenidos por otros métodos. Por ejemplo, a partir de los datos cinéticos ajustados a la ecuación MWC, se puede calcular una constante de disociación por el activador alostérico, esta misma constante se puede obtener por métodos de unión como diálisis al equilibrio, en ambos casos las constantes calculadas son equivalentes [14]. Esto prueba que la cinética puede ser analizada como un equilibrio rápido y que las K_M son verdaderas constantes de disociación. El hecho de que la K_M derivada de un ajuste

hiperbólico sea iguala a la K_R (constante de disociación de la forma R) del modelo MWC indica que la GlcNAc6P es un ligante de fijación exclusiva a R.

A pesar de que el modelo MWC había sido bastante consistente con las observaciones en la EcGNPDA, hubo algunas observaciones que estaban fuera del alcance del análisis con este modelo. En particular, a través de la modificación química del *N*-terminal, el cual forma parte del sitio alostérico, se consiguió separar la activación alostérica de la cooperatividad. En esta enzima modificada, se observó que las curvas de cinética de velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato ya no eran cooperativas, sin embargo aun respondieron a la presencia de activador alostérico. Esto se explica porque cambio conformacional causado por la unión del activador alostérico no pudo propagarse a las subunidades vecinas, debido a la alteración en una interacción importante para tal fenómeno en la que participa el *N*-terminal [15].

En otro trabajo, basado en datos estructurales, se utilizó la mutagénesis dirigida para cambiar el residuo de tirosina 254 (Y254). La Y254 también participa en los contactos entre subunidades en el sitio alostérico y por lo tanto se pensó que al mutarla la conectividad entre subunidades se vería afectada, en forma similar a lo conseguido con la modificación del *N*-terminal. En este caso los resultados fueron muy parecidos, ya que la mutante perdió gran parte de la cooperatividad y conservó la activación alostérica [16].

Ambos trabajos dieron la pauta para pensar que el fenómeno cooperativo en la EcGNPDA depende del cambio en estructura cuaternaria, sin embargo la activación alostérica no depende de la comunicación entre las subunidades y por lo tanto es un fenómeno a nivel de estructura terciaria.

Con los antecedentes de la hemoglobina que dieron sustento al modelo TTS (modelo de dos estados terciarios), en donde la diferencia de afinidad de la hemoglobina por el oxígeno depende del cambio estructural terciario [17], se planteó la hipótesis para la EcGNPDA en la que también podrían existir al menos dos estados terciarios con diferentes afinidades por el sustrato y que dependen de la presencia del activador alostérico.

Para confirmar esta hipótesis, se utilizó la metodología empleada previamente para la hemoglobina, que consistió en nanoencapsular a la EcGNPDA en geles de sílice. Para comenzar el estudio, se encapsuló al confórmero T de la enzima, en ausencia de ligantes. Con este método se estudió la cinética de la enzima y se encontró que al estar inmovilizada

cuaternariamente, se pierde la cooperatividad, sin embargo la proteína aun presenta activación alostérica, hecho que confirmó que la afinidad por el sustrato depende de un cambio estructural a nivel terciario [18].

Además de observar activación alostérica, también se registró que a concentraciones subsaturantes de activador alostérico, las curvas ajustadas a la ecuación de Hill tuvieron coeficientes de Hill menores a 1, lo que se describió como cooperatividad negativa aparente.

El fenómeno de cooperatividad negativa aparente ocurre cuando se tiene un mezcla de dos especies de una enzima que catalizan la misma reacción, pero su afinidad por el sustrato es diferente. Esto hace que primero se saturen las especies de mayor afinidad y después las de menor afinidad.

En el caso de las curvas de la EcGNPDA encapsulada, en ausencia de GlcNAc6P, todas las subunidades están en conformación terciaria de baja afinidad llamada *t*, por lo que el coeficiente de Hill es 1 (figura 8). A medida que aumenta la concentración de activador alostérico, algunas subunidades cambian de conformación al estado terciario de alta afinidad llamado *r* por haber unido a la GlcNAc6P, mientras que las subunidades vacías permanecen en conformación *t*. Esto provoca una heterogeneidad de especies terciarias que da como resultado un coeficiente de Hill menor a 1. Cuando la concentración de GlcNAc6P es saturante, todas las subunidades están en conformación *r*, y se observa nuevamente una sola especie y un coeficiente de Hill igual a 1 [18].

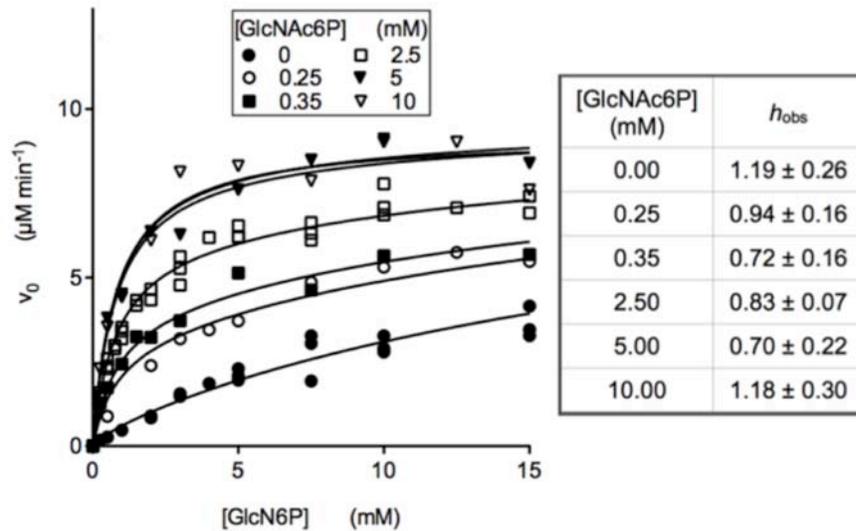


Figura 8. Gráfica de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato *GlcN6P* a concentraciones variables de activador alostérico *GlcNAc6P*, para la *EcGNPDA* nanoencapsulada en conformación *T*. Las concentraciones de *GlcNAc6P* se indican en la leyenda. Las líneas continuas corresponden al ajuste a la ecuación de Hill. En la tabla se muestran los coeficientes de Hill calculados (h_{obs}) a partir del ajuste (figura tomada de [18]).

Hasta este punto, los resultados obtenidos con la *EcGNPDA* fueron esencialmente consistentes con el modelo TTS, y mostraron una gran similitud con las observaciones hechas para hemoglobina. Para corroborar si, al igual que en la hemoglobina, preexistía un equilibrio entre las conformaciones terciarias *t* y *r*, o si por el contrario la activación era causada por un ajuste inducido, se hicieron experimentos de cinética de relajación con la finalidad de deducir el mecanismo.

Como se describió en la sección anterior, cuando se obtiene una constante de velocidad observada (k_{obs}) de la reacción global de unión de ligante y el cambio conformacional y se determina la dependencia que ésta tiene con respecto a la concentración de ligante, es posible conocer el mecanismo por un análisis gráfico.

No obstante, en la *EcGNPDA* no se cuenta con una señal espectroscópica que permita seguir el curso temporal de la reacción. Para poder hacerlo se diseñó una mutante con un triptofano en la posición 206 y una cisteína en la 165. Este par de residuos son uno de los que tienen un acercamiento mayor al pasar de un estado conformacional a otro, lo que provoca que al ocurrir la transición la fluorescencia del triptofano se apague por la cercanía de la cisteína. En la figura 9 se representa el lugar escogido para realizar las mutaciones.

Cabe mencionar que además de mutar los residuos mencionados, también se mutaron las cisteínas superficiales de la enzima, con la finalidad de evitar la formación de agregados por la reacción entre cisteínas de diferentes moléculas.

La nueva mutante, llamada mutante F (*fluorescente*), presentó parámetros cinéticos similares a los de la enzima silvestre [19], y lo más importante fue que conservó la cooperatividad y la activación alostérica.

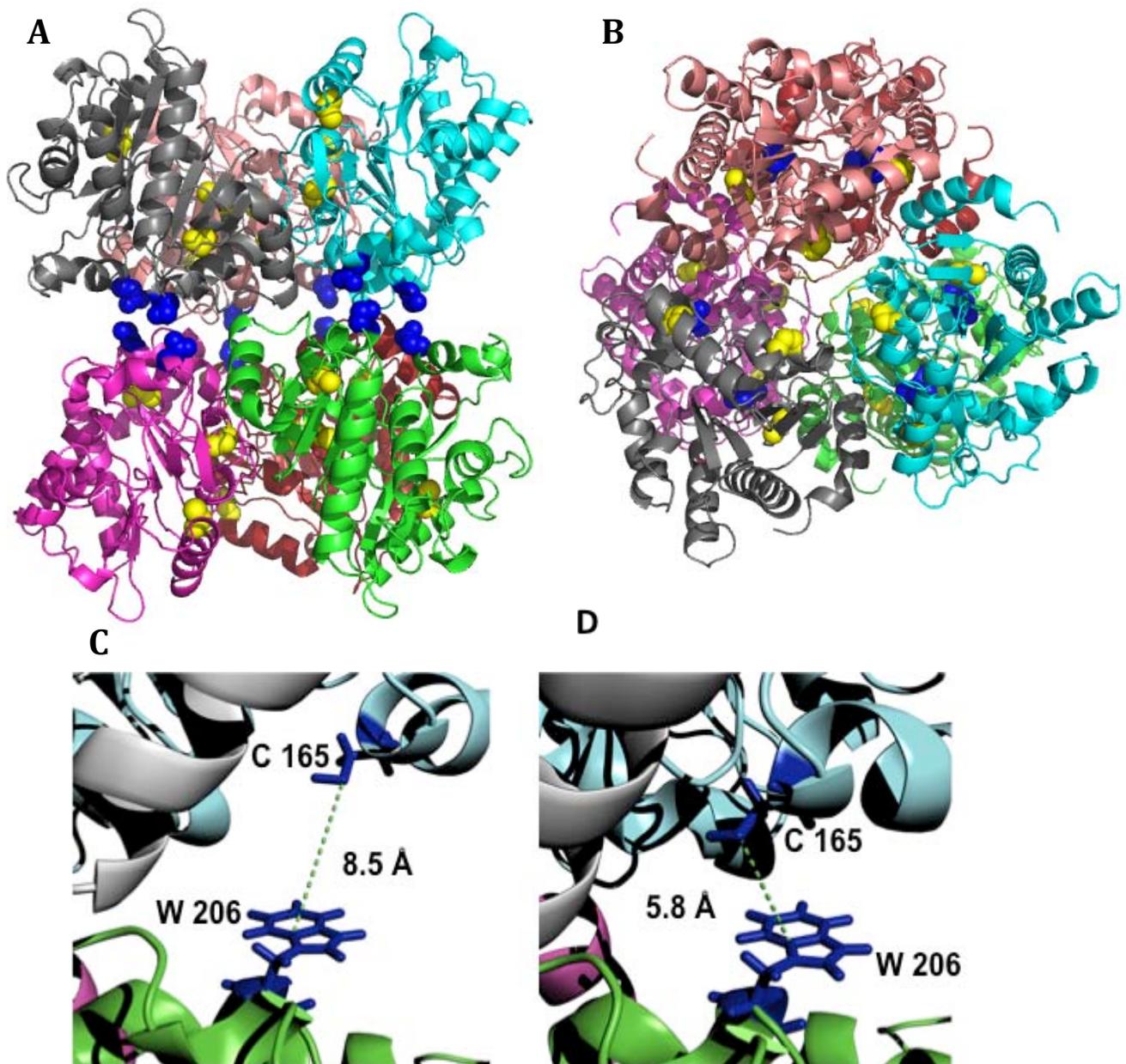


Figura 9. Esquema en caricatura de la estructura cristalográfica de la EcGNPDA. A) Vista lateral del hexámero, cada subunidad se representadas en un color diferente, en esferas amarillas se simbolizan las cisteínas silvestres que en el trabajo de Sosa-Peinado, fueron reemplazadas por serinas. En esferas azules se representan los residuos D165 y S206, que en el mismo trabajo fueron mutadas por cisteínas. B) Vista superior de la EcGNPDA. C) Acercamiento de los residuos 165C y 206W en el conformero T de la mutante F. Los residuos mencionados se representan como bastones azules, se representa también la distancia entre los residuos. La representación se obtuvo a partir de una mutante in silico reportada en D) Acercamiento de los residuos 165C y 206W en el conformero R de la mutante F. Los residuos mencionados se representan como bastones azules, se representa también la distancia entre los residuos. La representación se obtuvo de una mutante in silico reportada en [19].

Al encapsular a la mutante F en geles de sílice, se siguió la señal de apagamiento de la fluorescencia del triptofano como reportera del cambio estructural terciario. Cabe recordar que los geles enlentecen los cambios conformacionales terciarios, lo que permite obtener los cursos en el tiempo por métodos fluorométricos convencionales.

A partir de los cursos en el tiempo de la mutante F encapsulada en conformación T, se pudieron calcular los valores de k_{obs} a concentraciones variables de GlcNAc6P. Se encontró que el gráfico correspondió a una hipérbola ascendente con ordenada positiva al origen, consistente con el mecanismo de ajuste inducido (figura 10). Esto significó que la activación alostérica, es decir, la transición de t a r , contrario a lo que se reportó para la hemoglobina, ocurre por un mecanismo de ajuste inducido, similar a lo que propone el modelo KNF.

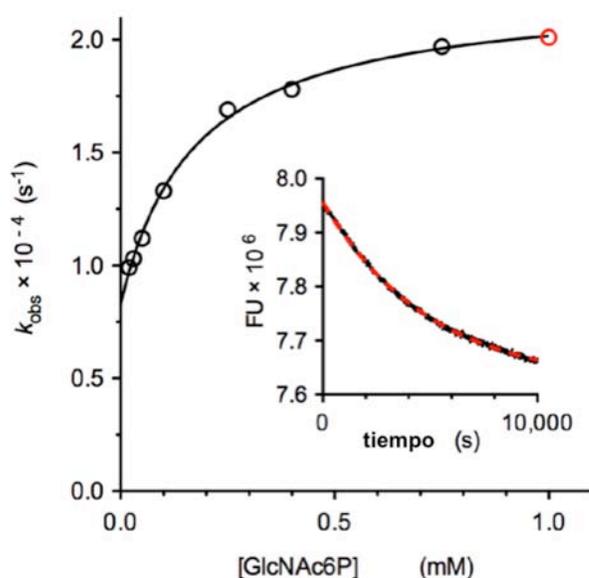


Figura 10. Efecto de la GlcNAc6P en la cinética de relajación de la mutante F nanoencapsulada en conformación T. Los valores de K_{obs} se obtuvieron a partir de los decaimientos de fluorescencia ajustados a la ecuación de reacción de primer orden. En la gráfica insertada se muestra un ejemplo de un curso temporal que corresponde al punto rojo en la gráfica principal. La línea continua representa el ajuste a la ecuación del modelo de ajuste inducido, a partir del cual se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad del cambio conformacional (figura obtenida de [18]).

1.10 Estudio de la activación alostérica de la EcGNPDA por medio de candados moleculares.

En un trabajo previo, se utilizó una mutante similar a la mutante F, en la cual en lugar de tener un triptofano, tiene otra cisteína en la posición 206, lo que dio como resultado que al llevar a la enzima al estado conformacional R, ésta formó un puente disulfuro y mantuvo atrapado en solución a dicho conformero [20].

Estudiando la cinética de catálisis de esta mutante se encontró que sin formar el puente disulfuro (condiciones reductoras), tuvo un comportamiento diferente al de la enzima silvestre. Sin embargo, cuando se estudió la cinética en condiciones oxidantes (formando el puente disulfuro) se observó un comportamiento hiperbólico. Cuando se realizaron los experimentos cinéticos en presencia de activador alostérico se encontró que la enzima presentó activación, aumentando la afinidad por el sustrato y la velocidad máxima.

La desventaja de trabajar con esta metodología es el manejo de las cisteínas en una región superficial, lo que obliga a trabajar constantemente en un ambiente reductor, y cuando se requiere cambiar a un ambiente oxidante, pueden ocurrir reacciones intermoleculares entre los grupos tiol.

Una alternativa para solucionar este problema, es utilizar agentes químicos que entrecrucen las cisteínas cercanas y formen enlaces covalentes irreversibles. Uno de estos compuestos es el ácido 2,3-dibromopropiónico (DBPA). Esta molécula reacciona con la cisteínas dejando un espacio de dos carbonos entre ellas con un ácido carboxílico como grupo funcional (figura 11).

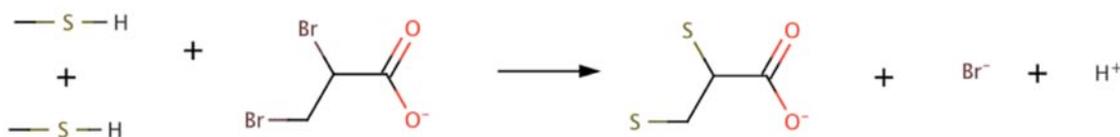


Figura 11. Esquema de reacción de dos grupos tioles con una molécula de ácido-2,3-dibromopropiónico (DBPA).

A esta mutante con la modificación con DBPA se le llamó para este trabajo mutante L (*locked*). El estudio de la mutante L es una alternativa para caracterizar la activación alostérica , similar a lo que se consigue mediante la nanoencapsulación.

2. Planteamiento.

La cooperatividad y la alostería son dos fenómenos que aparecen ligados en las proteínas con este tipo de regulación. En el caso de la hemoglobina, que ha sido el paradigma de este tipo de proteínas, se han propuesto dos mecanismos: la selección conformacional y el ajuste inducido. Desde el punto de vista termodinámico ambos mecanismos son equivalentes, sin embargo se encontró experimentalmente que existe un equilibrio de conformaciones terciarias llamadas t y r , con diferentes afinidades por el oxígeno [21]. Este tipo de equilibrios es consistente con la selección conformacional considerado en el modelo TTS. Aunado a ello se propuso que los conformeros cuaternarios favorecen a alguno de los estados terciarios: t es más estable en T y r es más estable en R.

En el caso de la EcGNPDA nanoencapsulada, se encontró que el modelo que postula la existencia de dos estados terciarios es adecuado. El cambio estructural terciario da origen a la activación alostérica, es decir, cada subunidad puede unir al ligante alostérico, cambiar de conformación y aumentar la afinidad en su sitio activo, sin necesidad de comunicarse con las demás subunidades. Este fenómeno se caracterizó hasta el punto de encontrar que dicha activación, a diferencia de la hemoglobina, ocurre por un mecanismo de ajuste inducido. Todo esto sucede cuando la proteína está nanoencapsulada en el estado cuaternario T [18].

Sin embargo, aun no se conocía cómo ocurre este fenómeno si la enzima se nanoencapsula en estado conformacional R. En esta condición la enzima se nanoencapsula en presencia de GlcNAc6P y posteriormente se dializa para poder estudiarla sin ligantes.

Utilizando la misma metodología, esto es, estudiando las relajaciones terciarias con la mutante F, puede ser posible conocer el mecanismo de activación alostérica para este conformero cuaternario.

Bajo la idea que en la EcGNPDA la hipótesis de que el estado cuaternario estabiliza a los estados terciarios, es posible que incluso sin ligante en el conformero R exista una parte de subunidades en r , lo que sugiere que el mecanismo de selección conformacional puede ser una posibilidad. Además, como lo propuso Zhuraviev y Papoian, las rutas de selección conformacional y ajuste inducido no son excluyentes, quizás el conformero R de la EcGNPDA sea evidencia de esta propuesta.

3. Hipótesis.

Al restringir el cambio del conformero cuaternario R de la EcGNPDA, donde el estado terciario más estable es r , entonces esta conformación terciaria puede estar presente en ausencia de ligantes y dar origen a un componente de selección conformacional en el mecanismo de activación alostérica.

4. Objetivo General.

Describir el mecanismo de activación alostérica del conformero cuaternario R de la EcGNPDA utilizando la mutante F.

4.1 Objetivos específicos.

- Utilizar la nanoencapsulación en geles de sílice en monolitos y atrapar a la mutante F en estado cuaternario R, para obtener los cursos en el tiempo de la relajación terciaria por el cambio de fluorescencia.
- Estandarizar el método de nanoencapsulación en placas de 96 pozos, para automatizar las medidas utilizando el fluorómetro POLARstar.
- Obtener las constantes de velocidad del cambio conformacional terciario en presencia y ausencia de ligante alostérico.
- Estandarizar el método de modificación química en columna y obtener la mutante L por este método.
- Buscar una señal espectroscópica de la mutante L que sirva como reportera del cambio conformacional terciario.

5. Materiales y métodos.

5.1 Cepas y plásmidos.

La cepa DH5 α se utilizó en este trabajo para transformarla con el plásmido producto de PCR y obtener un alto número de copias del mismo.

Para la sobreexpresión de las diferentes mutantes se utilizó un sistema formado entre la cepa IBPC590 Δ nag Δ lacI y el plásmido PtZ18R. Esta cepa tiene mutado tanto al represor del operón lactosa, LacI, como al operón nagBACD, en el cual se encuentra codificada la EcGNPDA. Por otra parte el plásmido pTZ18R con cualquiera de los genes mutantes de la EcGNPDA mantiene el control transcripcional mediante regiones operadoras para el represor LacI. Dado que la cepa IBPC590 Δ nag Δ lacI carece del represor, la sobreexpresión de la EcGNPDA es constitutiva.

5.2 Mutagénesis.

Mutante L: Esta mutante para el estudio de los candados moleculares fue producida en un trabajo previo por el Dr. Martín Gonzalez Andrade [20]. La cepa contiene 5 mutaciones puntuales que se hicieron de manera consecutiva utilizando el kit Quick change (Stratagene, La Jolla, CA. USA) siguiendo el protocolo del vendedor. Las reacciones de PCR se hicieron con 50 ng del plásmido pTZ18R con el gen silvestre de la EcGNPDA, 125 ng de oligonucleótidos, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto y polimerización a 68 °C por 10 minutos. Los oligonucleótidos utilizados fueron: Para la mutante C118S fueron 5'-GAC GCC GAG AGC CGC CAG TAT-3' y 5'-ATA CTG GCG GCT CTC GGC GTC-3'; para la creación de la doble mutante C118S/C228S los oligonucleótidos fueron: 5'-ATC ATG GTG AGC GAT GAA CCT TC-3' y 5'-GA AGG TTC ATC GCT CAC CAT GAT-3', para la creación de la triple mutante C118S/C228S/C239S los oligonucleótidos fueron: 5'-ATC ATG GTG AGC GAT GAA CCT TC-3' y 5'-GA AGG TTC ATC GCT CAC CAT GAT-3'; para la creación de la mutante cuádruple con cisteína en la posición 206 (C118S/C228S/C239S/S206C) los

oligonucleótidos fueron: 5'CGCT GGG TTG CCA GAA AGC AC -3' y 5'-GTG CTT TCT GGC AAC CCA GC-3'. Para mutar la quinta posición en 165 (C118S/C228S/C239S/S206C/D165C) los oligonucleótidos fueron: 5'-ACC CTG ACT CAT TGC ACT CGC GTC GCA AAC-3' y 5'-GTT TGC GAC GCG AGT GCA ATG AGT CAG GGT-3'.

Sobre este fondo mutante (mutante L), se hizo la mutante F cambiando la cisteína de la posición 206 por un triptofano. En este caso la reacción de PCR se hizo 30 ciclos de hibridación por 1 minuto a 63 °C y 16 minutos de polimerización a 68 °C. Los oligonucleótidos para la mutación fueron 5' -TTC TGC CAA CCC AGC ACC AGA AT-3' y 5' -GGT TGG CAG AAA GCA CTG CGA CT-3'.

En todas las mutaciones el producto de PCR se digirió con la enzima *dpnI* (New England Biolabs). A continuación el producto de la digestión se utilizó para transformar por medio de electroporación a la cepa DH5 α , posteriormente se seleccionaron las colonias transformadas y se utilizaron para purificar el plásmido con el kit QuiaPREP® miniprep (Quiagen). Finalmente las mutaciones puntuales se corroboraron mediante secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.3 Sobreexpresión y purificación.

Los plásmidos mutantes se utilizaron para transformar a la cepa IBPC590 Δ nag Δ lacI. Las cepas transformadas crecieron durante toda la noche y se cosecharon para posteriormente aplicarles ultrasonido y obtener la fracción citosólica soluble en donde se encuentra la proteína sobreexpresada. Del extracto celular se siguió el protocolo de purificación para la EcGNPDA descrito por Calcagno M.L [13]. El método consiste en una columna de afinidad por el sitio alostérico, la cual se compone de *N*- ϵ -aminocaproil glucosamina-6-fosfato inmovilizado en una matriz de agarosa entrecruzada (sepharose). Respecto a la mutante F, esta se eluyó de la columna de afinidad con 10 mM de GlcNAc6P después de realizar el paso de lavado. Para el caso de la mutante L, se hizo la modificación química con DBPA previo a la elución, como se describirá más adelante.

Las proteínas obtenidas se precipitaron en 50% de sulfato de amonio para almacenarlas. Antes de llevar a cabo cualquier experimento con las proteínas puras, estas se dializaron en

presencia de fosfatasa alcalina para remover la GlcNac6P utilizada en la elución, y se precipitaron con sulfato de amonio. En el caso de la mutante F, se añadió en la diálisis el agente reductor tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 μM para mantener reducida a la cisteína superficial 165 y evitar la reactividad intermolecular.

5.4 Concentración de proteína.

La concentración de las mutantes se determinó para cada experimento mediante absorbancia utilizando su coeficiente de absorptividad molar (ϵ). Para obtener este parámetro se utilizó el método de ácido bicinónico usando como referencia a la EcGNPDA silvestre. Los valores obtenidos fueron: para la mutante F $\epsilon_{270} = 17.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; y para la L, $\epsilon_{277} = 18 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El parámetro para ambas mutantes se obtuvo en Tris-HCl 50mM, pH 7.7.

5.5 Modificación química de la mutante L.

Para poder hacer el candado con DBPA entre las cisteínas 165 y 206, se llevó a cabo la reacción de la enzima mutante con un exceso molar de DBPA. Para ello se aprovechó la inmovilización de la enzima en la columna de afinidad por el sitio alostérico durante la purificación; la interacción con la matriz de afinidad mantiene a la enzima en R, esto favorece a la formación del puente. Después de pasar el extracto celular de la sobreexpresión por la columna y lavar con Tris-HCl 50 mM pH 8, se pasaron dos volúmenes de columna de una solución 30 mM de DBPA disuelto en Tris-HCl 50 mM pH 8. La columna equilibrada con este reactivo se dejó toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se lavó con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para quitar el exceso de DBPA. Finalmente la enzima modificada se eluyó con 10 mM de GlcNac6P. En la figura 12 se resume este procedimiento de modificación química.

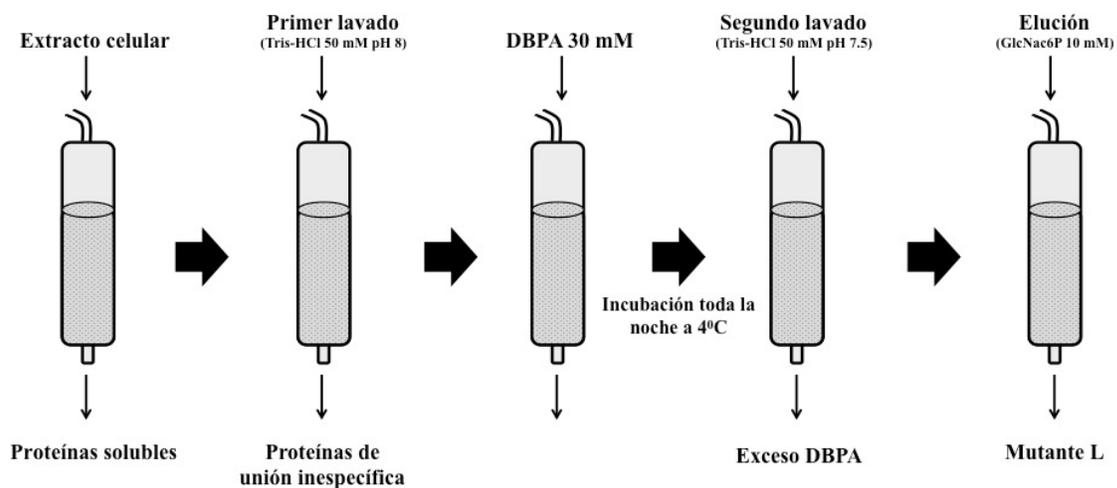


Figura 12. Diagrama de flujo de la purificación y modificación química de la mutante L en una columna de afinidad.

5.6 Ensayos enzimáticos.

La actividad enzimática de las mutantes se midió determinando la concentración de Fru6P producida a diferentes concentraciones de sustrato (GlcN6P) y de activador alostérico (GlcNAc6P) después de 10 minutos de incubación (tiempo en el cual el grado de avance de la reacción es lineal) a 30 °C, en tris-HCl 50 mM pH 7.7 y a una concentración de 5 nM de enzima. La concentración de Fru6P se cuantificó por un método colorimétrico al reaccionar con resorcinol y HCl. Los detalles del método se encuentran descritos en [13].

5.7 Nanoencapsulación de la mutante F.

5.7.1 Preparación de geles en monolitos.

La encapsulación de la mutante F se logró al polimerizar en condiciones alcalinas al tetrametil-*o*-silicato (TMOS) en presencia de la proteína a una concentración final de 5 μM. El protocolo que se siguió está basado en el descrito por Bettati et al. [22], con excepción de la preparación de enzima, la cual se dializó en 100 mM de tris-HCl pH 7.5 y 4 mM de

GlcNAc6P para asegurar la encapsulación del estado cuaternario R. La mezcla de TMOS con la enzima se dejó polimerizar sobre láminas de cuarzo. El volumen de mezcla por placa fue de 120 μL . Al polimerizar el gel sobre la placa se obtuvo un monolito con la enzima encapsulada y con una porosidad y actividad óptica suficiente para la adecuada difusión de los ligantes. En el siguiente esquema de la figura 13 se especifican las dimensiones del monolito con la enzima encapsulada.

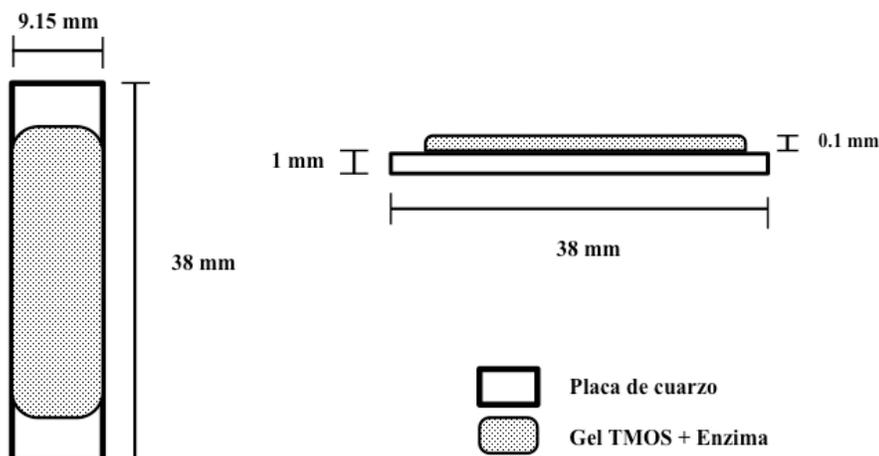


Figura 13. Esquema de las dimensiones de un gel de TMOS con proteína nanoencapsulada sobre una ventana de cuarzo.

5.7.2 Preparación de geles en pozos.

Las condiciones de polimerización del TMOS en presencia de la mutante F fueron las mismas que las descritas para la preparación de geles en monolitos, la diferencia fue que, en este caso, se colocaron 50 μL de la mezcla en el fondo de una placa de 96 pozos (GRENIER μClear). En la figura 14 se muestran las dimensiones de la placa y de los pozos.

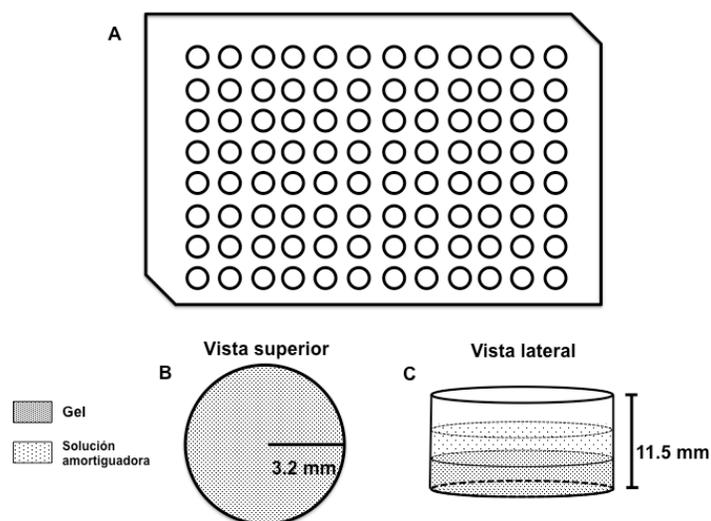


Figura 14. Esquema de dimensiones de geles de TMOS con proteína sobre los pozos de una placa de 96 pozos.

5.8 Ensayos de fluorescencia con la mutante F nanoencapsulada en monolitos.

Para poder utilizar los geles de la enzima nanoencapsulada en R, se dializaron en Tricina 50 mM pH 7.7 con la finalidad de quitar la GlcNAc6P utilizada durante la encapsulación. La diálisis se hizo en 2 cambios de 2 litros cada uno. Los geles en monolito se colocaron dentro de una canastilla de plástico suspendida en el recipiente con los dos litros de buffer a 4 °C durante toda la noche en agitación ligera. Posterior a la diálisis los geles se dejaron en Tricina 50 mM pH 7.7 durante 2 días a 4 °C.

Los ensayos de fluorescencia se hicieron en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL.). Para obtener el espectro correspondiente de emisión de fluorescencia, se colocó el monolito con el gel dentro de una celda prismática como se muestra en el siguiente diagrama de la figura 15.

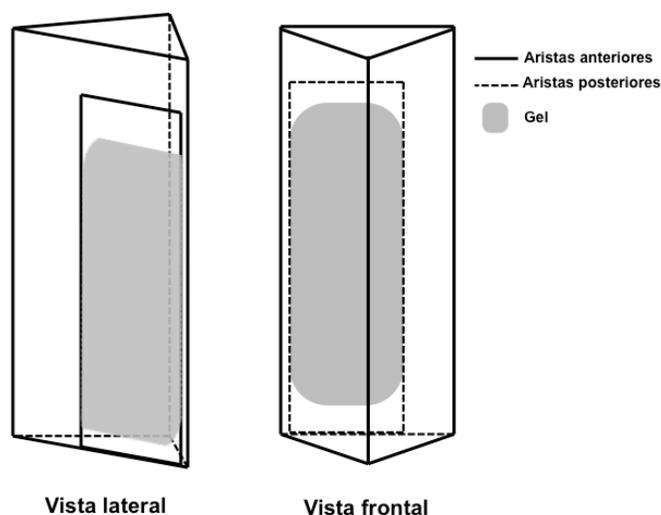


Figura 15. Esquema de la posición del monolito en una celda prismática para mediciones espectroscópicas de la proteína nanoencapsulada.

El volumen de la celda se completó con Tricina 50 mM pH 7.7 dando como resultado un volumen total en la celda de 1.5 mL (incluyendo el volumen del gel).

La muestra de proteína nanoencapsulada se excitó a 295 nm y se registró el espectro de 300 a 330 nm, obteniendo un máximo a 320 nm. Las ranuras de paso de luz tanto de excitación como de emisión fueron de 0.5 mm. El número de iteraciones por medición fue de 10. La temperatura del ensayo fue de 30 °C.

5.9 Ensayos de fluorescencia con la mutante F nanoencapsulada en pozos.

Para dializar los geles en pozos, se adhirió la placa sobre una base redonda de cristal con cinta adhesiva y se colocó en el fondo del recipiente con 2 litros de Tricina 50 mM pH 7.7. La diálisis se dejó toda la noche a 4 °C en agitación ligera y se le hicieron 2 cambios en el proceso.

La medición se llevó a cabo en un espectrofluorómetro de placas Omega POLARstar, utilizando un filtro de excitación a 295 nm y un filtro de emisión de 330 nm. Utilizando las fibras de excitación y emisión del fondo del pozo.

Las condiciones de medición se detallan a continuación:

Modo de escaneo: Orbital.

Diámetro de escaneo: 3 mm.

Ganancia: 1000.

Número de ciclos: 240.

Tiempo de ciclo: 30 s.

Número de flashes por pozo: 13.

Los experimentos se llevaron a cabo en Tricina 50 mM pH 7.7. El volumen final por pozo fue de 200 μ L.

El aparato fue programado para inyectar la cantidad necesaria de GlcNAc6P para llegar a la concentración requerida en cada pozo. En este ensayo se estudió la cinética de relajación provocada por la GlcNAc6P y se probó una concentración de esta molécula por cada pozo.

5.10 Dicroísmo circular de la mutante L en solución.

La mutante L se diluyó a una concentración de 5 μ M en Tris-HCl 50 mM pH 7.7. Para obtener los espectros de dicroísmo circular, se colocó la muestra en una celda de cuarzo y se utilizó el espectropolarímetro Jasco J-715 con un paso de luz de 5 mm. El espectro se registró en el UV cercano (para aminoácidos aromáticos). La temperatura del ensayo fue de 30 $^{\circ}$ C. Para cada concentración de GlcNAc6P se obtuvo un espectro de dicroísmo que se restó como blanco a los espectros de la proteína.

5.11 Fluorescencia de la mutante L en solución.

La mutante L se diluyó a una concentración final de 1 μ M en Tris 50 mM pH 7.7. El ensayo se llevó a cabo en el espectrofluorómetro ChirascanTM (Applied Photophysics) utilizando una celda de cuarzo Hellma (101-QS) de 10 mm de paso de luz.

La longitud de onda de excitación fue 275 nm y se hizo un espectro para encontrar el máximo de emisión el cual se localizó a 310 nm. Las ranuras de paso de luz fueron de 3 mm para excitación y emisión.

Para medir el cambio en intensidad de fluorescencia, se hizo una titulación añadiendo cantidades crecientes de GlcNAc6P a la misma muestra y se registro un espectro de emisión para cada concentración de activador alostérico.

Los datos del cambio en intensidad de fluorescencia se transformaron a fracción de saturación utilizando la siguiente ecuación:

$$\bar{y} = - \frac{\lambda_{obs} - \lambda_{max}}{\lambda_{max} - \lambda_{min}}$$

En donde λ_{obs} corresponde al valor de intensidad de fluorescencia registrado en cada medición, λ_{max} es el valor máximo de fluorescencia (en ausencia de activador alostérico), y λ_{min} es el valor mínimo de intensidad registrado (en condición de saturación).

5.12 Análisis de datos.

Los datos experimentales y los regráficos fueron procesados y ajustados a las diferentes ecuaciones por medio de regresión no lineal en el programa Graphpad Prism 6 para Mac.

6. Resultados.

6.1 Relajación terciaria dependiente de temperatura en la mutante F nanoencapsulada.

La mutante F nanoencapsulada en monolitos se mantuvo incubada entre 0 y 4 °C antes de comenzar los experimentos. Al inicio del ensayo el gel se colocó en la posición adecuada para la medición y se registró un espectro de emisión inicial. Mediante el perfil del espectro de emisión se determinó la posición correcta del gel. Posteriormente a la obtención del espectro, se continuó con el registro del curso en el tiempo en el máximo de emisión.

El amortiguador en la celda y la cámara de medición del fluorómetro se mantuvieron previamente equilibradas a 30 °C desde el inicio de la medición.

En la figura 16 se muestra un curso en el tiempo del apagamiento del máximo de fluorescencia (trazo rojo). Este fenómeno corresponde a una relajación de la estructura terciaria de la proteína nanoencapsulada provocada por el cambio de temperatura (de 0 °C a 30 °C).

El curso en el tiempo presentó una sola fase de decaimiento, por lo que se ajustó a la ecuación de primer orden y se obtuvo la constante de velocidad observada k_{obs} de $1.14 \times 10^{-4} \pm 0.006 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Para conocer si este fenómeno de relajación provocado por la temperatura es exclusivo para el confórmero R nanoencapsulado, se hizo el mismo experimento de medición de fluorescencia con la mutante F nanoencapsulada en T. En el trazo verde de la figura 16 se compara el cursos en el tiempo de la mutante F encapsulada en el confórmero cuaternario T. Se aprecia que en este confórmero, también hay una relajación, pero con una amplitud de un orden de magnitud menor a la registrada para R. También se puede observar que la señal inicial de fluorescencia en el confórmero T es mayor a la medida para el confórmero R. De acuerdo a los experimentos reportados en este fenómeno de relajación de baja intensidad en T no altera de manera cuantificable la relajación dependiente de GlcNAc6P. Por otra parte, en este experimento se observa una clara diferencia entre las propiedades de los confórmeros R y T atrapados en geles.

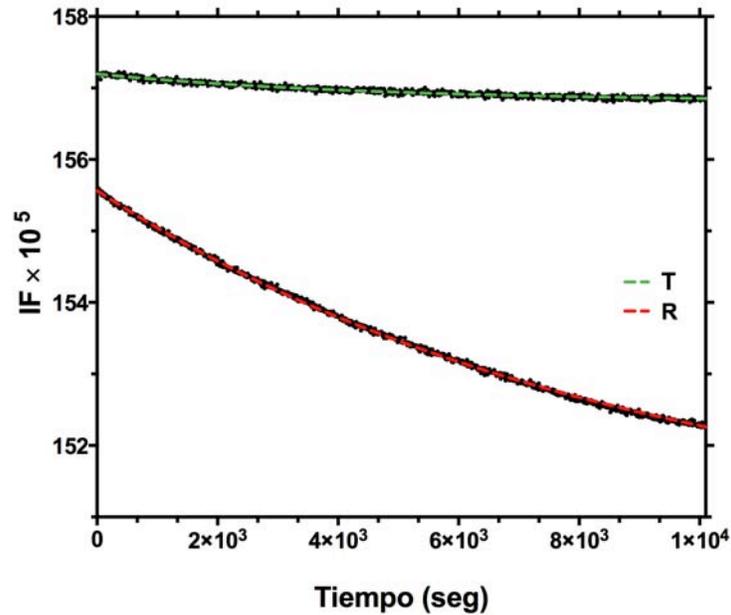


Figura 16. Cursos en el tiempo del apagamiento en la intensidad del máximo de fluorescencia para mutante F, encapsulada en los estado cuaternarios T y R. Los puntos experimentales se muestran en negro para ambos conformémeros. La línea verde punteada corresponde al ajuste a la ecuación de primer orden de reacción para la mutante F encapsulada en T. La línea roja punteada corresponde al ajuste a la ecuación de primer orden de reacción para la enzima atrapada en conformación R.

6.2 Relajación terciaria dependiente de la concentración de GlcNAc6P.

Después de medir la relajación por temperatura, se llegó a un nuevo estado de equilibrio en el cual se hizo un experimento para determinar si aun podía ocurrir un nuevo cambio estructural causado por la unión de la GlcNAc6P. En estos experimentos en equilibrio, se estudiaron diferentes concentraciones de activador en cada uno de los geles y se registró el curso en el tiempo de la intensidad de fluorescencia.

En la figura 17 se muestra una curva representativa de la relajación producida por la GlcNAc6P, posterior a la relajación por temperatura. Observamos un cambio que se ajustó a una ecuación de primer orden, a partir de la cual obtuvimos un valor de k_{obs} . Comparando la relajación medida por temperatura, en ésta segunda relajación la amplitud es 30 veces menos intensa y un orden de magnitud más rápida.

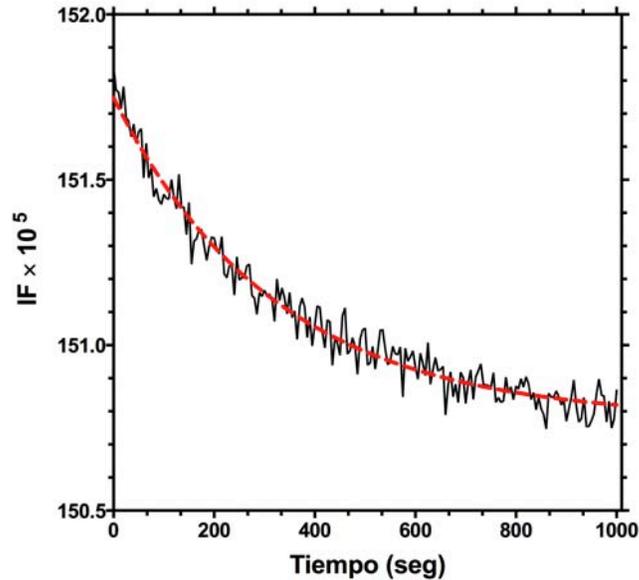


Figura 17. Curso en el tiempo del apagamiento de la intensidad de fluorescencia en la mutante F, producido por GlcNAc6P 150 μ M. La relajación ocurrió posterior al cambio de señal dependiente del aumento de temperatura.

6.3 Mecanismo de unión de la GlcNAc6P al conformero R.

Para conocer el mecanismo de unión de la GlcNAc6P al conformero R una vez que éste llegó al equilibrio por la temperatura, se estudió la dependencia de la k_{obs} con respecto a la concentración de ligante.

Cada constante se midió en un gel independiente después de registrar la relajación por temperatura durante 5 horas a 30 $^{\circ}$ C. Todas las curvas se ajustaron a una ecuación de primer orden y se graficaron tanto los valores de las constantes, como los errores de los ajustes.

La tendencia de los puntos experimentales muestran un comportamiento que se ajusta a la ecuación de una hipérbola ascendente con ordenada positiva al origen (figura 18). Dicha ecuación corresponde a un mecanismo de ajuste inducido, caso en el cual la unión del

ligante precede a la transición conformacional. En la tabla 1 se muestran los valores de las constantes calculadas del ajuste a la ecuación mencionada.

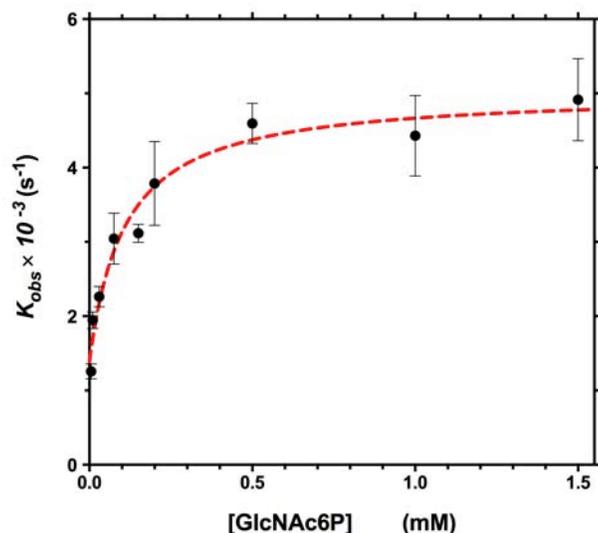


Figura 18. Gráfico de las constantes observadas en función de la concentración de activador alostérico. Los puntos fueron obtenidos de los cursos en el tiempo de la relajación terciaria dependiente de GlcNAc6P. Las barras en cada punto experimental indican el error calculado en el ajuste de los cursos en el tiempo a la ecuación de primer orden de reacción. La línea roja punteada corresponde al ajuste a la ecuación del modelo de ajuste inducido.

Tabla 1 Parámetros de la cinética de relajación de la mutante F nanoencapsulada en el confórmero R, iniciada por la concentración de GlcNAc6P a concentraciones variables.

| k_2 | k_{-2} | K_{dis}^{app} | K_{dis} |
|--|--|--|---|
| $3.6 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ | $1.3 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ | $10.8 \times 10^{-5} \pm 3.6 \times 10^{-5} M$ | $7.9 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-5} M$ |

Parámetros obtenidos del ajuste a la ecuación de ajuste inducido de los datos presentados en la figura 18.

6.4 Constante de disociación de la GlcNAc6P en condiciones de equilibrio.

A partir del análisis del cambio conformacional causado por el activador alostérico que ocurre después de la relajación por temperatura, podemos obtener el valor de la constante de disociación de dos maneras. La primera de ellas es la calculada en el experimento descrito anteriormente y que se muestra en la tabla 1. Ésta constante se obtiene del mecanismo de ajuste inducido y, de acuerdo a la ecuación del mecanismo es una constante de disociación aparente. Para poder calcular la constante microscópica es necesario considerar el efecto del equilibrio del paso lento (transición conformacional). Al considerarlo, el valor que se obtiene es $7.9 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-5}$ M (también mostrado en la tabla 1).

Por otra parte, podemos calcular la constante de disociación si observamos el cambio de fluorescencia cuando este llega al nuevo estado de equilibrio en presencia de GlcNAc6P. Si comparamos las amplitudes de las curvas de relajación, entonces podemos graficarlas y obtener una constante del ajuste a la ecuación de una hipérbola. En la figura 19 se muestra dicho gráfico de los valores relativos de las amplitudes. Los valores de las amplitudes se normalizaron utilizando como referencia a la señal total de fluorescencia de la proteína, es decir, la señal total se consideró como 1 y el cambio se calculó con respecto a este valor.

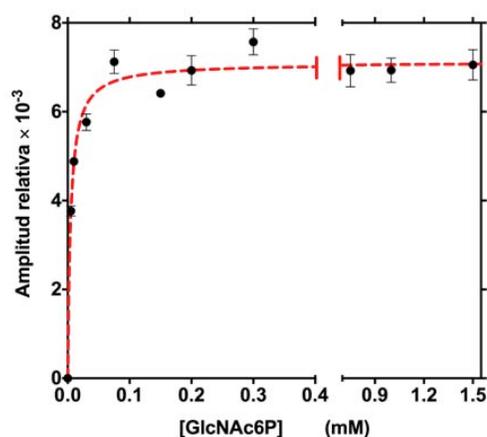


Figura 19. Gráfico de la amplitud relativa con respecto a la concentración de GlcNAc6P. Los valores se obtuvieron del ajuste de los cursos en el tiempo normalizados con respecto a la fluorescencia máxima. Las barras corresponden al error del ajuste por regresión no lineal. La línea roja punteada representa el ajuste a la ecuación de una saturación hiperbólica.

Se observó que la constante calculada en el ajuste de los datos a la ecuación de la hipérbola, tuvo un valor de $4 \times 10^{-6} \pm 0.6 \times 10^{-6}$ M. Este valor es más pequeño al calculado por el modelo de ajuste inducido en la figura 18. Esto significa que en un caso (ajuste inducido) podemos obtener la constante de disociación microscópica para las subunidades en t , mientras que al observar al fenómeno global hasta alcanzar el equilibrio, la constante aparente que se puede medir es la de r .

6.5 Mecanismos de unión de la GlcNAc6P en condiciones fuera del equilibrio.

Para poder estudiar cual es el mecanismo de unión de la GlcNAc6P cuando ocurren simultáneamente el cambio conformacional dependiente de temperatura y el dependiente de GlcNAc6P, se diseñó un experimento utilizando el fluorómetro de placas POLARstar. La ventaja de utilizar este sistema es que la inyección y mezcla del ligante se hace de manera automatizada. Sin embargo, la sensibilidad que tiene este aparato con respecto al fluorómetro ISS-PC1 es menor, lo que provoca un aumento en los valores de error experimental.

La primera observación que se realizó, fue el escaneo de la superficie del gel para comprobar la homogeneidad de los mismos. Este tipo de control no es posible realizarlo en el fluorómetro ISS-PC1, sin embargo este aparato nos da la ventaja de poderlo observar. En la figura 20 se muestra una serie de escaneo de 12 geles. Se puede apreciar que en general los geles son homogéneos lo que nos permite su comparación.

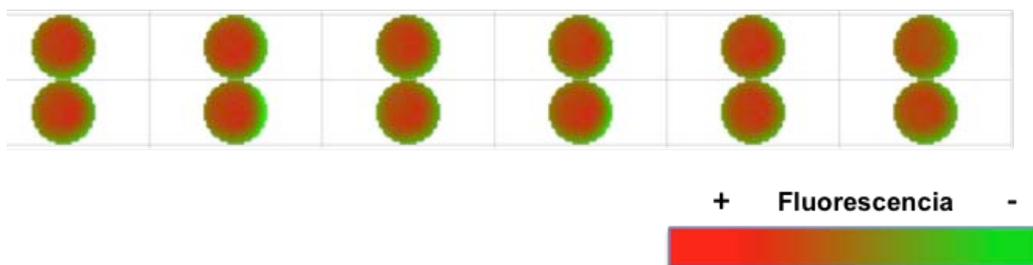


Figura 20. Escaneo de 12 pozos con la mutante *F* nanoencapsulada en estado *R*. La coloración indica la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de proteína.

A continuación se buscaron las condiciones adecuadas para medir el cambio de fluorescencia con respecto al tiempo, dichas condiciones se encuentran descritas en materiales y métodos.

Los primeros cursos en el tiempo que se registraron fueron con los geles nanoencapsulados en la conformación *T*. Este experimento nos sirvió para corroborar la reproducibilidad y comparación de resultados entre el fluorómetro de placas y el fluorómetro ISS-PC1. En la figura 21 se muestra una comparación entre la curva de relajación de la proteína atrapada en *T* medida en el fluorómetro de placas y de la enzima atrapada en *T* medida en los monolitos con el fluorómetro convencional. Se aprecia que, a pesar del aumento en el error experimental, el valor de las constantes es muy parecido.

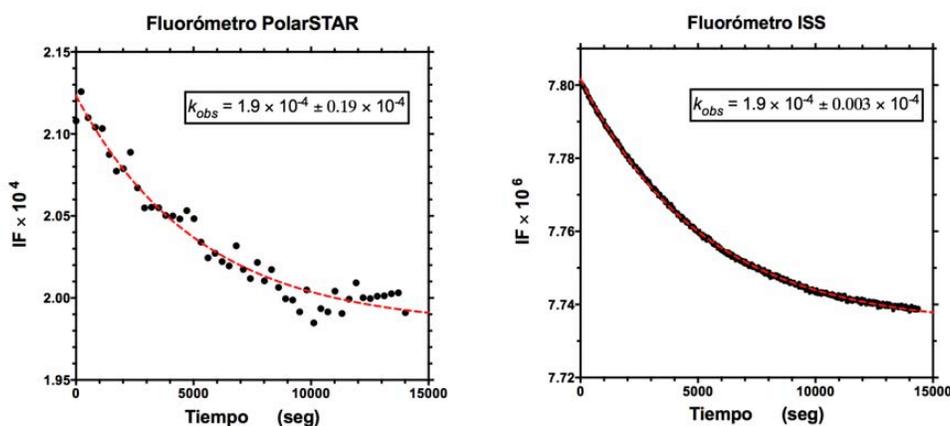


Figura 21. Cursos en el tiempo de la proteína atrapada en el conformero *T* obtenidas a una concentración de 1 mM de GlcNAc6P. A la izquierda se muestran los puntos experimentales obtenidos en el aparato PolarSTAR, la línea roja punteada corresponde al ajuste a la ecuación de reacción de primer orden. En la figura de la derecha se muestra el registro obtenido en el aparato ISS publicada en [18]. La línea roja punteada corresponde al ajuste a la ecuación de reacción de primer orden.

A continuación se midieron las relajaciones de la mutante F nanoencapsulada en conformación R. En este experimento se ensayó una concentración de activador por cada pozo. El cambio de temperatura y la inyección de GlcNAc6P fueron simultáneas y a partir de ese momento se registró el cambio de intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo. En la figura 22 Se muestra un curso en el tiempo representativo. En este caso la curva obtenida se ajusta a una función exponencial doble con dos constantes de velocidad de reacción que corresponden a una fase rápida y una lenta. Entre ambas constantes hay un orden de magnitud de diferencia.

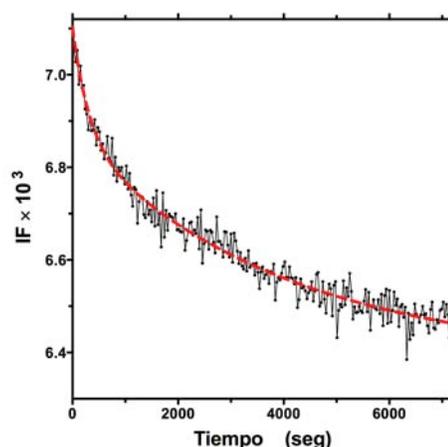


Figura 22. Curso en el tiempo de la Mutante L atrapada en estado conformacional R a 30 °C en presencia de 1 mM de GlcNAc6P. La línea roja punteada corresponde al ajuste de los datos experimentales a una ecuación doble exponencial.

Ambas constantes aparentes presentan una dependencia de la concentración de ligante, por lo tanto obtuvimos un regráfico para cada constante. En la figura 23 Se muestran ambos regráficos; el panel A corresponde al regráfico de la constante rápida. En este caso la gráfica muestra una disminución del valor de la constante a medida que aumenta la concentración de ligante. Esta dependencia se ajustó a la ecuación de una hipérbola descendiente, correspondiente al modelo de selección conformacional. En el panel B se muestra el gráfico de los valores de la constante lenta obtenidas para cada concentración de

ligante. En esta constante el comportamiento es el de una hipérbola ascendente, consistente con un mecanismo de ajuste inducido.

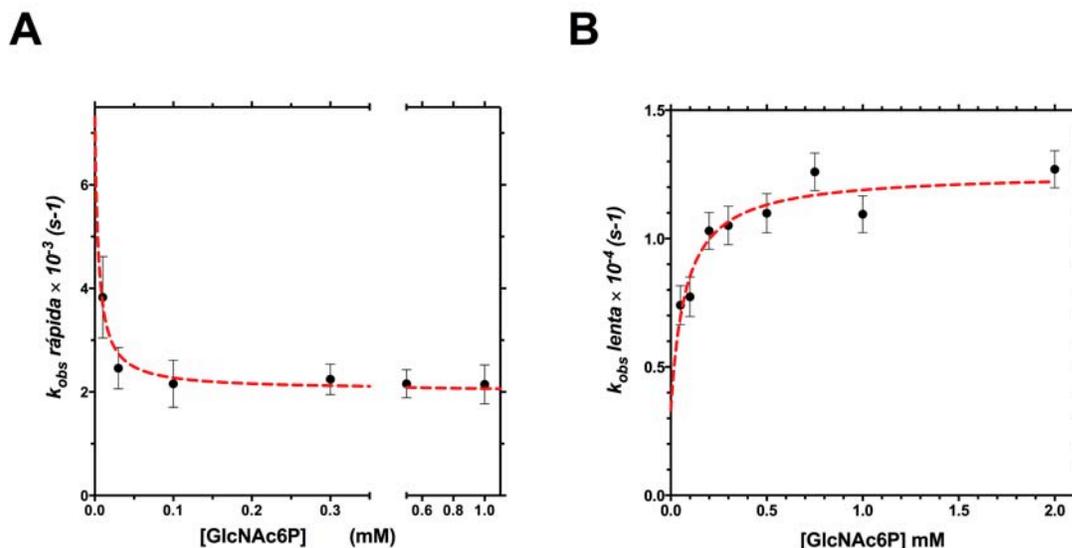


Figura 23. Gráficas de la dependencia de K_{obs} con respecto a la concentración de GlcNAc6P. Los puntos experimentales se obtuvieron por los cursos temporales del cambio en intensidad de fluorescencia, ajustados a la ecuación de dos exponenciales. En el panel A se muestran los puntos experimentales de las constantes de velocidad rápidas, la línea roja discontinua corresponde al ajuste de la ecuación del mecanismo de selección conformacional, las barras simbolizan el error calculado por el ajuste a cada curva de los cursos temporales. En el panel B se muestran los valores de K_{obs} correspondientes a las constantes lentas, la línea roja discontinua representa el ajuste a la ecuación del modelo de ajuste inducido, las barras corresponden al error calculado por el ajuste a cada curva de los cursos temporales.

En la tabla 2 Se indican los valores de las constantes de velocidad calculadas a partir de cada modelo y de las constantes observadas.

Tabla 2 Parámetros de la cinética de relajación de la mutante F nanoencapsulada en el confórmero R, iniciada por la concentración de GlcNAc6P y el cambio de temperatura a concentraciones variables.

| k_1 rápida | k_{-1} rápida | K_{dis}^{app} | K_{dis} rápida |
|--|---|---------------------------------|--------------------------------|
| $2 \times 10^{-3} \pm 0.09 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | $5.2 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | | $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ |
| k_2 lenta | k_{-2} lenta | K_{dis}^{app} lenta | K_{dis} lenta |
| $0.8 \times 10^{-4} \pm 0.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ | $0.4 \times 10^{-4} \pm 0.08 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ | $10.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ | $7.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ |

Parámetros obtenidos del ajuste a las ecuaciones de los modelos de selección conformacional (rápidas) y de ajuste inducido (lentas). Los valores de constante de disociación, en ambos ajustes, se fijaron en la regresión no lineal, tomando el valor de los datos presentados en la tabla 1.

6.6 Restricción conformacional por medio de candados moleculares.

Otro método para poder atrapar al estado conformacional R, es el entrecruzamiento de los residuos que en la mutante F e participan en la generación de la señal fluorescente, el D165 y S206. De esta forma restringimos el cambio conformacional que da origen a la cooperatividad y mantenemos un margen de activación alostérica. En la figura 24 se muestran las curvas de velocidad inicial de catálisis de la mutante L en ausencia y en saturación de activador alostérico. Como se puede observar, las curvas son totalmente hiperbólicas y se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten. A partir de ese ajuste obtuvimos los parámetros cinéticos de esta mutante. En la tabla 3 se muestran dichos parámetros calculados, comparándolos con los correspondientes a la enzima silvestre y de la mutante con el puente disulfuro. Esta enzima por lo tanto, perdió la cooperatividad y mantuvo la activación alostérica.

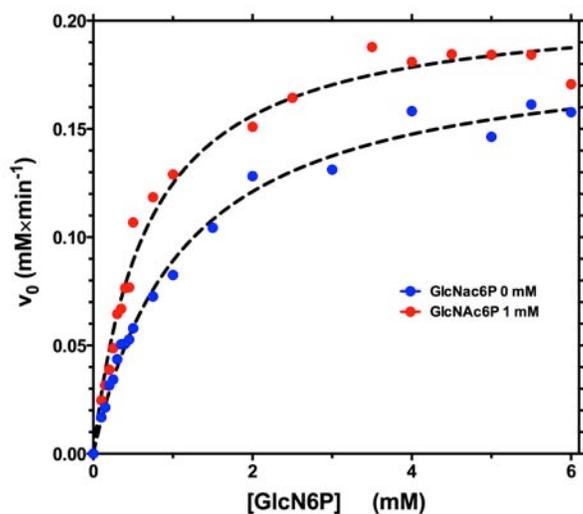


Figura 24. Gráfica de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato para la mutante L, en ausencia y en presencia de 1 mM de GlcNAc6P. Las líneas negras discontinuas corresponden al ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten. Los parámetros del ajuste se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la mutante L, comparados con la enzima silvestre y la mutante 165C/206C.

| | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat} (s^{-1}) (1 mM GlcNAc6P) | K_M (mM) | K_M (mM) (1 mM GlcNAc6P) |
|-------------------|------------------------|--|-------------------|----------------------------|
| Silvestre | 158 ± 8 | --- | 0.55 ± 0.05 | --- |
| 165C/206C oxidada | 51 ± 0.28 | 53.65 ± 0.56 | 1.175 ± 0.122 | 0.67 ± 0.075 |
| Mutante L | 52 ± 1.2 | 57.9 ± 1.3 | 1.12 ± 0.073 | 0.67 ± 0.053 |

Los parámetros de la enzima silvestre se obtuvieron de [13], los de la mutante 165C/206 oxidada de [20], y los de la mutante L se obtuvieron en este trabajo a partir del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

6.7 Señal de dicroísmo circular de la Tyr 254 en la mutante L.

Con base en la señal de CD que se obtiene en la enzima silvestre al titularla con GlcNAc6P, se buscó si dicha señal se mantenía presente en la mutante L, con la finalidad de utilizarla como reportera del cambio conformacional terciario. En la figura 25 Se muestran algunos de los espectros de CD en el UV cercano. En el panel A, aparecen los datos sin procesar, en los cuales se observa el cambio en la zona de 270 nm. En el panel B se muestra un regráfico del espectro diferencial, en donde se aprecia un claro cambio de elipticidad entre 270 y 275 nm. Este cambio, al igual que en la proteína silvestre, corresponde a la Y254, lo cual podría servirnos como reportero del cambio conformacional en la enzima.

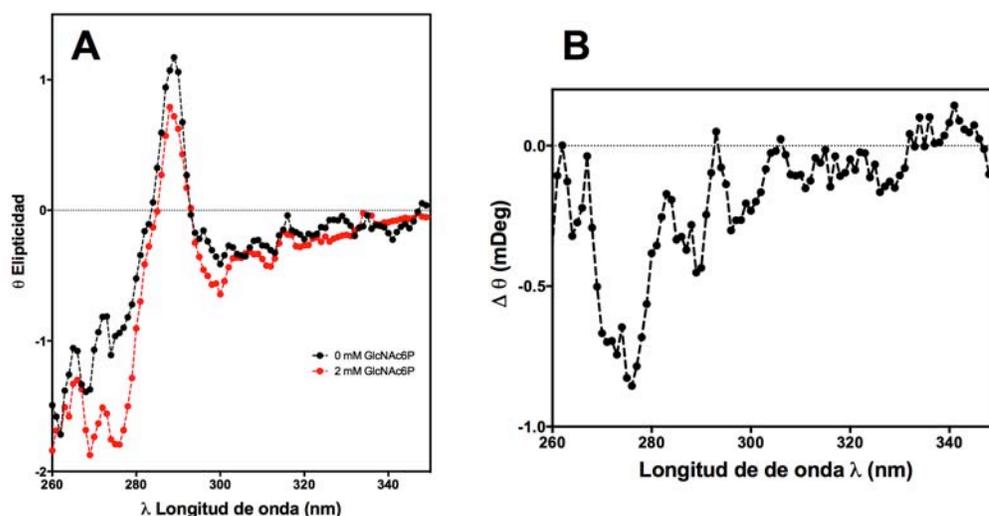


Figura 25. A. Espectros de dicroísmo circular en el UV-cercano de la mutante L, en ausencia y presencia de 2 mM de GlcNAc6P. B Espectro diferencial obtenido de la resta de los espectros del panel A.

A continuación se llevó a cabo una titulación de la enzima utilizando como reportera de la transición alostérica a la señal de CD a 270 nm. En la figura 26 se muestra el gráfico del cambio en elipticidad con respecto a la concentración de ligante. Los datos experimentales no pudieron ser ajustados a la ecuación de la hipérbola, para poderlos ajustar utilizamos la ecuación de Hill. Se destaca que el coeficiente de Hill estimado es menor a 1 ($h = 0.46 \pm 0.07$), lo que significa que puede existir una heterogeneidad de especies que unen a un

mismo ligante con diferentes afinidades. Para conocer el valor aproximado de las constantes de disociación de las posibles dos especies, los datos se ajustaron a la ecuación de la suma de dos hipérbolas, con un factor de cambio, como la utilizada en la ecuación 1 de [18].

La constante de alta afinidad fue de $13.15 \pm 0.725 \mu\text{M}$, mientras que la constante de baja afinidad fue de $1165 \pm 126 \mu\text{M}$.

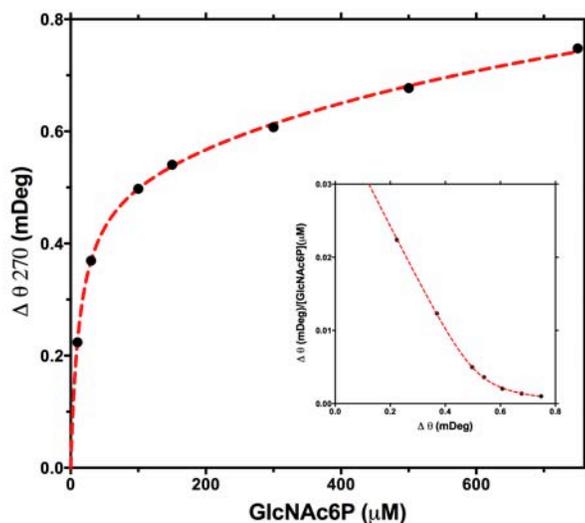


Figura 26. Gráfica del cambio en la elipticidad a 270 nm de la mutante L, en función de la concentración de GlcNAc6P. La línea roja discontinua corresponde al ajuste a la ecuación de la suma de dos hipérbolas. En la gráfica del recuadro se muestra la transformación de Scatchard de la gráfica principal. Se observa una concavidad hacia abajo, lo que indica en este tipo de regráfico la presencia de dos constantes de disociación.

6.8 Fluorescencia de la Tyr254 en la mutante L.

Debido a que la señal de CD es poco sensible para poder obtener cursos en el tiempo que nos permitan deducir el mecanismo de unión y transición conformacional en la enzima, recurrimos a la búsqueda de una señal fluorescente.

Medimos la señal de fluorescencia en el espectrofluorómetro ISS, y observamos que al excitar a las tirosinas ($\lambda = 270$ nm) obtuvimos un máximo de emisión a 310 nm que presentó un apagamiento en intensidad a medida que se añadió la GlcNAc6P.

A continuación, hicimos una titulación con GlcNAc6P y graficamos el cambio en intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de ligante. En la figura 27 Se presentan los valores experimentales. Este gráfico lo comparamos con el obtenido por medio de la señal de CD y nos podemos dar cuenta que, en este caso, los datos se pueden ajustar a la ecuación de una hipérbola con una sola constante de disociación ($K_d = 5.5 \pm 0.5$).

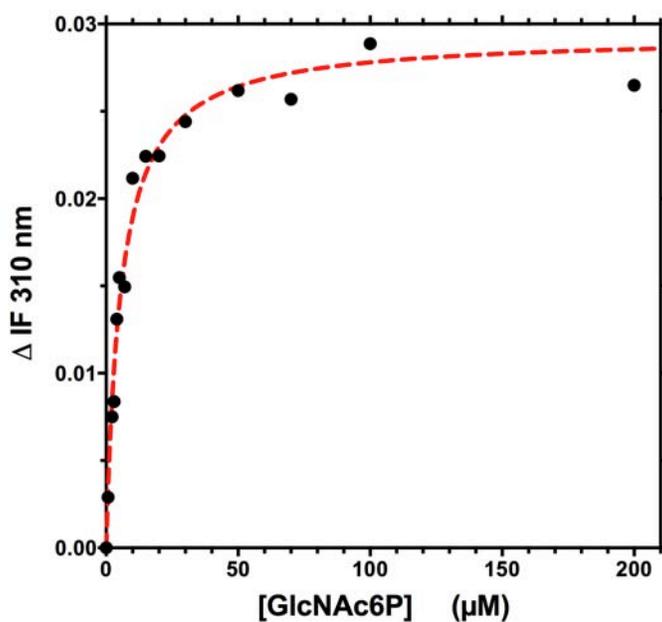


Figura 27. Gráfica de la dependencia de la intensidad de fluorescencia a 310 nm a concentraciones variables de GlcNAc6P. La línea roja corresponde al ajuste a la ecuación de una saturación hipérbolica.

7. Discusión.

7.1 Relajación terciaria dependiente de la temperatura en el confórmero R nanoencapsulado.

El proceso espontáneo de relajación en la enzima nanoencapsulada es un fenómeno exclusivo del confórmero R. En reportes anteriores se ha demostrado, por medio de otras técnicas espectroscópicas, que los confórmeros cuaternarios nanoencapsulados tienen características significativamente diferentes. Este evento de relajación es uno de ellos y permite, en primera instancia, hacer notar de manera cualitativa la diferencia entre los dos estados cuaternarios extremos de la EcGNPDA.

Para explicar este evento que ocurre en la enzima, proponemos que prácticamente todas las subunidades están en conformación *t* después de dializar a la enzima y manteniéndola a 4 °C. Posteriormente, al cambiar la temperatura para comenzar el ensayo, hay una transición conformacional terciaria que lleva a algunas subunidades al estado conformacional *r*. La población que sufre este cambio conformacional está determinada por el estado cuaternario de la enzima. Ya que este fenómeno está ausente en la enzima atrapada en conformación T, significa que en esa condición la conformación *t* es más estable, como se ha propuesto para la hemoglobina.

Por el contrario, cuando la EcGNPDA se encuentra nanoencapsulada en el estado cuaternario R y a temperaturas mayores *r* es la conformación terciaria más estable como se verificó a 30 °C. No obstante, el proceso de nanoencapsulación se lleva a cabo a 4 °C al igual que la diálisis. Para mantener el estado cuaternario R durante el proceso de nanoencapsulación, se utiliza una concentración saturante de GlcNAc6P. Una vez que la enzima queda atrapada en el gel, se somete a diálisis para retirar a la GlcNAc6P. Esta condición hace que el equilibrio conformacional terciario, en la forma libre de ligante a 4 °C favorezca al estado *t* aun cuando la enzima esté atrapada en el estado cuaternario R.

Para apoyar nuestro argumento sobre los diferentes equilibrios conformacionales que pueden existir debido a la temperatura, hacemos referencia a dos trabajos previos en esta enzima.

El primero de ellos, fue un trabajo termodinámico, en el cuál se estudió la dependencia de la constante L del modelo MWC con respecto a la temperatura [23]. Cabe recordar que la constante L es una constante de equilibrio, que de acuerdo al modelo MWC describe al equilibrio conformacional cuaternario. En los datos obtenidos para dicho trabajo, se encontró que la transición conformacional es un proceso guiado por entropía y por tanto presenta una dependencia significativa con respecto a la temperatura. Todo el estudio se llevó a cabo con la proteína en solución, razón por la cual las constantes de equilibrio calculadas incluyen a los componentes tanto cuaternarios como terciarios de la transición conformacional. Algo importante a destacar de este trabajo es que, al saturar a la enzima con ligante alostérico, se observó que a temperaturas cercanas a 30 °C la población se enriqueció en la conformación R. A su vez, al disminuir la temperatura a 4 °C, el equilibrio fue equitativo para ambas conformaciones, es decir se recorrió en gran parte hacia T, a pesar que en presencia de la GlcNAc6P favorece al estado R. Aunado a ello, en ausencia de ligante, la enzima se encuentra en conformación T incluso a 30 °C.

Estos datos apoyan nuestras observaciones en las que dependiendo del estado conformacional cuaternario, la temperatura juega un papel determinante en los equilibrios conformacionales terciarios. Además, apoyan nuestra premisa sobre la estabilidad de dichos estados con respecto al estado conformacional cuaternario: T estabiliza a t , y R estabiliza a r .

Otros experimentos que apoyan nuestra interpretación, son los de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Las medidas del cambio de entalpía asociado a la unión del ligante alostérico revelan que éste es un proceso exotérmico [20]. El ΔG puede ser negativo debido al importante componente entrópico de la de la transición conformacional, lo que explica su gran dependencia con respecto a la temperatura.

7.2 Relajación terciara dependiente de GlcNAc6P.

Esta relajación pudo ser estudiada de forma aislada después de que ocurrió la relajación por temperatura y se alcanzó el equilibrio. Cuando la enzima ha llegado al equilibrio, éste puede perturbarse por la unión del activador alostérico y es posible estudiar cinéticamente esta relajación. En estas condiciones la señal producida por la unión del activador

alostérico, al igual que la obtenida por el cambio de temperatura, consiste en el apagamiento en la intensidad de fluorescencia. Como se mencionó, este cambio es aproximadamente 30 veces de menor amplitud que el cambio registrado por efecto de la temperatura. Esto sugiere que por el cambio de temperatura lleva a una gran cantidad de subunidades de *t* a *r* sin ligante, hasta que se alcanza un nuevo equilibrio. Luego, al unir GlcNAc6P algunas subunidades que aun estaban en *t* adquieren el estado *r*. La cantidad de subunidades que sufren esta transición es menor que las que habían adquirido la conformación *r* por acción de la temperatura.

El efecto retardador del gel sobre la velocidad de la transición terciaria, nos permitió estudiar el curso en el tiempo de este fenómeno causado por la unión de la GlcNAc6P. La velocidad de la transición desencadenada por la unión del activador alostérico, fue un orden de magnitud mayor que la causada por el cambio de temperatura. Por otra parte, los cursos en el tiempo se ajustaron a una ecuación de cinética de primer orden, lo que es congruente con un cambio conformacional entre dos estados.

La dependencia de la velocidad de reacción con respecto a la concentración de ligante, demuestra que el mecanismo de unión y cambio conformacional, corresponde a un mecanismo de ajuste inducido.

Las observaciones de relajación por temperatura, así como las de relajación por ligante alostérico, nos hacen pensar que los eventos pueden ocurrir de la siguiente manera: La proteína se encuentra con prácticamente todas las subunidades en *t* en ausencia de ligante y a 4 °C. Al momento de cambiar la temperatura de 4 a 30 °C, la enzima llega a un nuevo equilibrio en el cual gran parte de las subunidades tienen una transición de *t* al estado *r*, el cual es más estable en el conformero R cuaternario a dicha temperatura. Cuando la proteína alcanzó el nuevo equilibrio y se le añade activador alostérico, éste se une a aquellas subunidades que ya están en *r* y posteriormente se une a las que permanecían en *t*. La unión de GlcNAc6P a las subunidades que aun están en *t* nos da una señal de apagamiento de fluorescencia a partir de la cuál podemos deducir el mecanismo de unión, que en este caso corresponde a un ajuste inducido. Por otra parte, si nosotros comparamos las amplitudes de las curvas de velocidad a diferentes concentraciones de ligante, observamos el segundo equilibrio que se alcanza, en el cuál la enzima ya está a 30 °C y ligada con el activador alostérico. La observación de este segundo equilibrio a través de las amplitudes nos

permitió encontrar una constante de disociación para las formas r que se produjeron por efecto de la temperatura y que posteriormente unieron el ligante (figura 28).

Los experimentos cinéticos nos permitieron obtener los datos para encontrar el mecanismo de ajuste inducido y la constante de disociación para las formas t que unen al ligante, por otro lado, a partir de las observaciones al equilibrio, fue accesible encontrar el valor de la constante de disociación para las formas r que ya ese encontraban en la enzima por efecto de la temperatura.

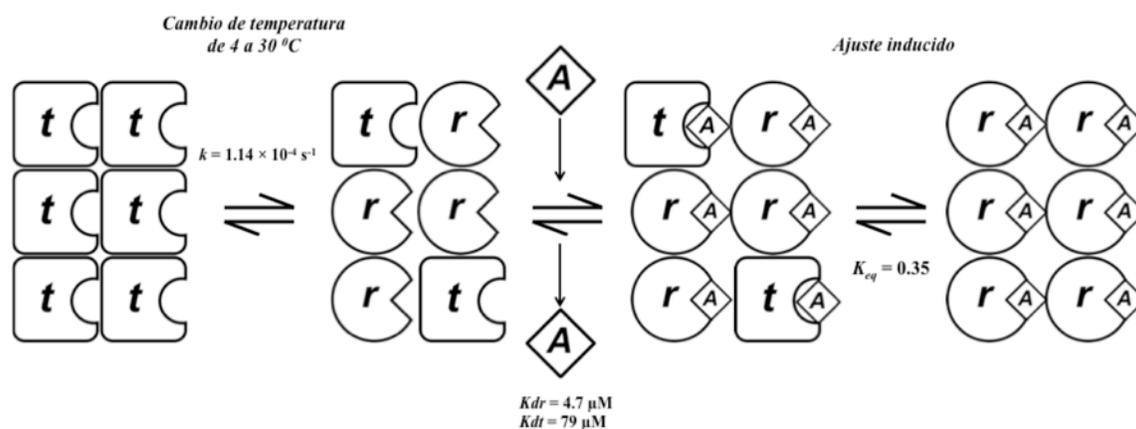


Figura 28. Esquema del cambio conformacional y unión de ligante en los experimentos en condiciones de equilibrio, ilustrado con un hexámero de la EcGNPDA. En el primer equilibrio se representa el cambio conformacional causado por el cambio de temperatura, se muestra el valor de la constante de velocidad en sentido de la transición t a r . En el segundo equilibrio se indica la presencia de activador alostérico GlcNAc6P, en este paso se muestra el valor de las constantes de disociación para la forma r (K_{dr} obtenida a partir de las amplitudes de las cinéticas de relajación) y para la forma t (K_{dt} obtenida a partir del modelo de ajuste inducido). En el tercer equilibrio se muestra la constante de cambio conformacional para las subunidades que aun estaban en conformación t después del cambio de temperatura.

7.3 Unión de la GlcNAc6P en condiciones fuera del equilibrio.

En los experimentos que se llevaron a cabo en el fluorómetro de placas, se produjo el cambio conformacional causado simultáneamente por el aumento de la temperatura y por el activador alostérico. Dado que las velocidades de ambos fenómenos difieren en un orden

de magnitud, los cursos en el tiempo de apagamiento de la fluorescencia se ajustaron a una curva de decaimiento exponencial doble. De esta forma pudimos separar las dos constantes de velocidad observadas. Debido al diseño experimental, encontramos que en presencia de activador alostérico, la transición más lenta presenta una dependencia con respecto a la concentración de GlcNAc6P, al igual que la fase rápida. En este experimento fuera del equilibrio, la dependencia de la fase rápida con respecto a la concentración de activador alostérico es consistente con un modelo de selección conformacional, mientras que para la constante lenta, el modelo adecuado es el de ajuste inducido.

Comparando este experimento con el que se realizó en condiciones de equilibrio, es decir, esperando a que ocurriera la relajación por temperatura para posteriormente añadir el activador alostérico, podemos observar que las velocidades de la fase lenta se encuentran en el rango de la velocidad de relajación por efecto de la temperatura. En el caso de la constante de velocidad rápida en los experimentos fuera del equilibrio, la velocidad también está en el rango de la observada cuando se añadió ligante alostérico después de la transición por temperatura. Esto indica que el tipo de transición que observamos en los dos experimentos es la misma. Proponemos que la transición de t a r puede ocurrir por una ruta de alta velocidad o por una ruta de baja velocidad.

Por otra parte el ajuste a los modelos de selección conformacional y de ajuste inducido nos dan una constante de disociación por el activador alostérico. En los experimentos fuera del equilibrio, la constante que se encontró al ajustar los datos las fases rápidas al mecanismo de selección conformacional fue de $4.7 \mu\text{M}$ (igual a la que se obtuvo en las fases rápidas de los experimentos en equilibrio). En el caso de la dependencia de las relajaciones lentas con respecto a la concentración de GlcNAc6P, se encontró la constante de $79 \mu\text{M}$ obtenida en los experimentos al equilibrio como constante de baja afinidad.

Para estos experimentos en condiciones fuera del equilibrio proponemos que la proteína tiene todas sus subunidades en estado t cuando se encuentra a 4°C , al cambiar la temperatura a 30°C , algunas subunidades comienzan a presentar una transición de t a r .

Aquellas subunidades que llegan a r unen al activador alostérico y desplazan el equilibrio conformacional favoreciendo la transición a r por un aparente mecanismo de selección conformacional, siendo ésta la ruta de alta velocidad. Dado que al comienzo del experimento la mayoría de las subunidades están en t , éstas también pueden unir al

activador alostérico y llegar al estado r por el mecanismo de ajuste inducido, que pudimos observarlo como la ruta de baja velocidad (figura 29). Por ello es que el ajuste a los diferentes mecanismos es posible con constantes de disociación diferentes. En la selección conformacional es consistente la constante para las formas r y en el ajuste inducido lo es la constante para las formas t .

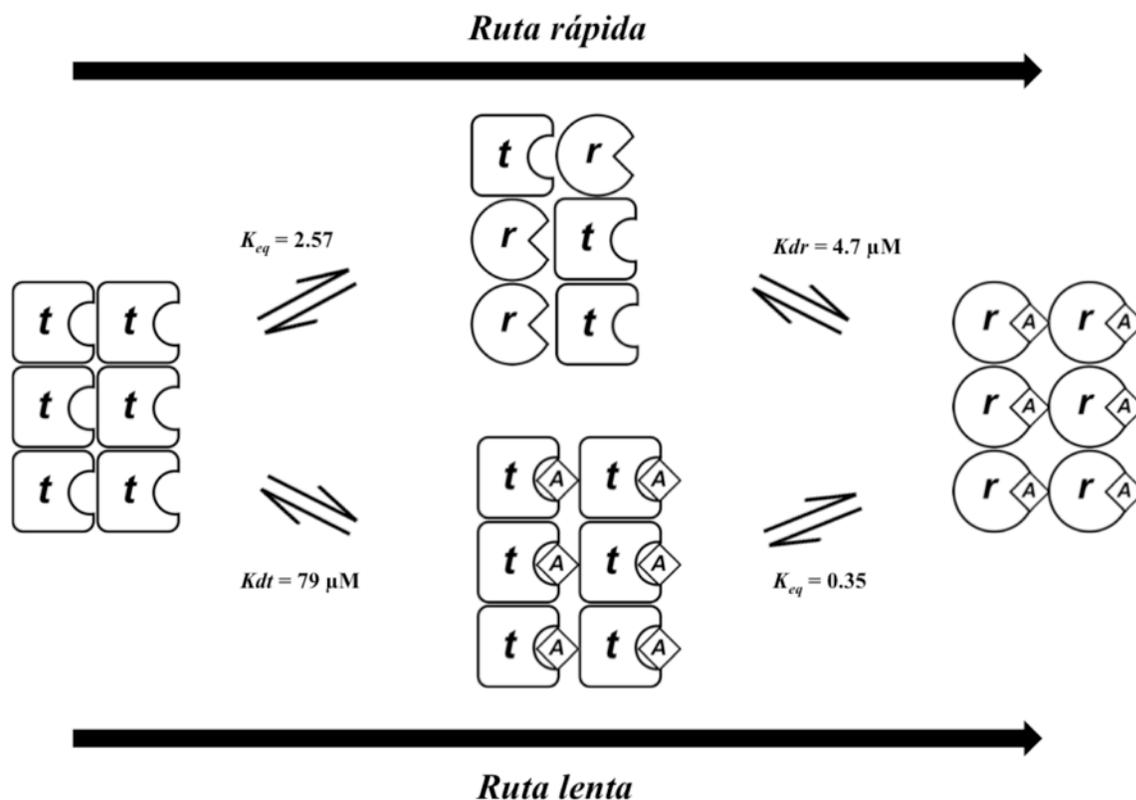


Figura 29. Esquema del mecanismo observado en los experimentos en condiciones fuera del equilibrio. En este caso al variar la temperatura y la concentración de activador alostérico simultáneamente, son evidentes dos posibles rutas: la ruta de selección conformacional (rápida) y la ruta de ajuste inducido (lenta).

7.4 Interpretación general.

Los experimentos en condiciones de equilibrio, así como los experimentos fuera del equilibrio, resultaron tener consistencia entre sí. Estos datos permiten construir un cuadrado termodinámico, en el cual las rutas de selección conformacional y de ajuste inducido pueden llevar a las subunidades de la EcGNPDA del estado t sin ligante al estado

r con ligante. La velocidad de cada una de las rutas dependerá de la presencia de activador alostérico. En la figura 30 Se muestra el cuadrado termodinámico propuesto; las constantes de equilibrio de cada uno de los pasos se obtuvieron en los experimentos en equilibrio y fuera del equilibrio.

Cuando los experimentos se llevan a cabo en condiciones de equilibrio, es posible calcular con mayor certeza las constantes de disociación por el activador alostérico. Como se mencionó, de acuerdo a nuestros datos experimentales, la constante de disociación para la forma *t* es de 79 μM , mientras que para la forma *r* es de 4.6 μM . En los experimentos en equilibrio se pudo obtener también la constante de equilibrio conformacional para el mecanismo de ajuste inducido ($K_{eq} = \frac{k_{-2}}{k_2}$) cuyo valor fue de 0.36 ± 0.05 . En el caso de los experimentos fuera del equilibrio, esta ruta (ajuste inducido) es evidente al graficar las constantes de baja velocidad. La constante de equilibrio calculada de esos experimentos es de 0.35 ± 0.12 , prácticamente igual a la obtenida en los experimentos en equilibrio.

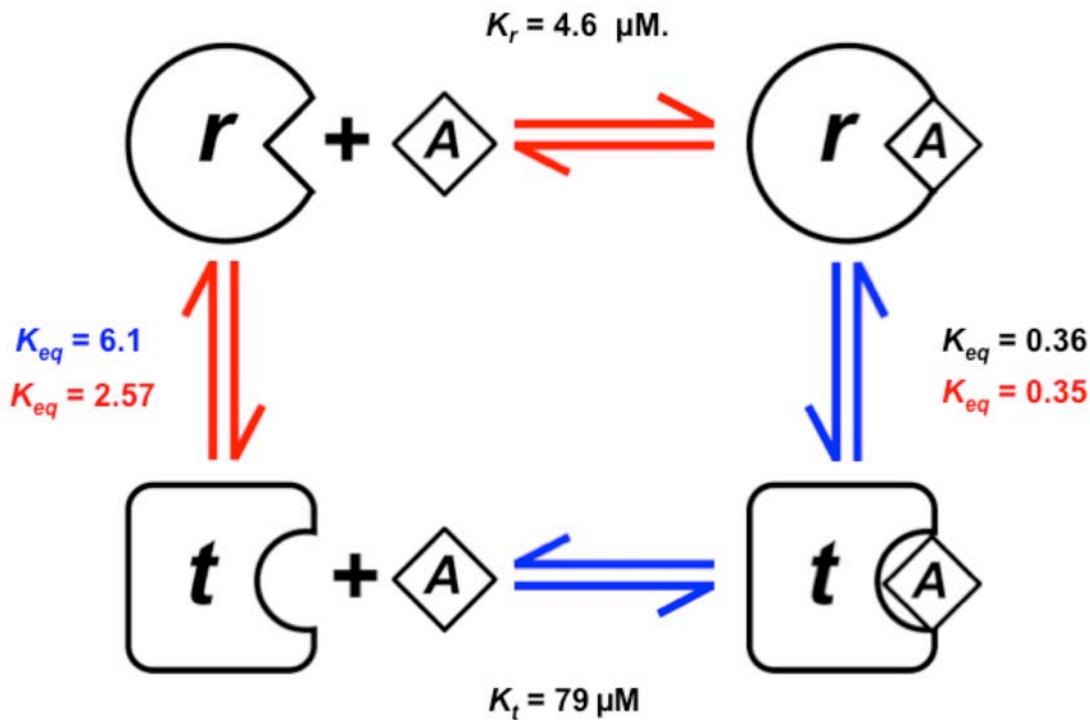


Figura 30. Cuadrado termodinámico de la activación alostérica de la EcGNPDA en el conformero R. Las flechas en color azul corresponden a los equilibrios del mecanismo de ajuste inducido, las flechas de los equilibrios en color rojo, representan los pasos del mecanismo de selección conformacional. El valor de las constantes de equilibrio en color negro se obtuvieron de los experimentos en equilibrio. Las constantes indicadas en color rojo se obtuvieron de los experimentos fuera del equilibrio. La constante en color azul, es el valor teórico, calculado a partir de los valores de las demás constantes calculadas en condiciones de equilibrio.

Esta semejanza nos indica que estamos viendo el mismo cambio conformacional por la misma ruta en ambos diseños experimentales. No obstante en los experimentos en equilibrio las constantes de ajuste inducido son las de alta velocidad debido a que la población está enriquecida en formas r , mientras que en los experimentos fuera del equilibrio son las de baja velocidad. Al parecer esta inversión en las velocidades se debe a un posible efecto sinérgico entre la temperatura y la presencia de activador alostérico. Para entender este efecto hay que tomar en cuenta las condiciones en las que inicia la unión de ligante en ambos experimentos. En los experimentos fuera del equilibrio térmico prácticamente todas las subunidades están en t , al cambiar la temperatura y añadir ligante alostérico algunas subunidades comienzan a tener la transición de t a r por acción de la

temperatura, estas subunidades en r que unen al ligante desplazan el equilibrio conformacional. Esto significa que el mecanismo de selección conformacional es una ruta aparente que solo se produce cuando la enzima esta transitando de t a r por acción de la temperatura. Este mecanismo, por lo tanto, sería imperceptible en solución. Debido a que r tiene mayor afinidad por la GlcNAc6P que t , solo algunas subunidades en t unen al activador alostérico y éstas llevan a cabo la transición a r lentamente por la ruta de ajuste inducido. En los experimentos en equilibrio la mayoría de subunidades ya tuvo la transición de t a r por el cambio de temperatura. Al añadir GlcNAc6P, ésta se une a las subunidades que ya están en r , que por lo tanto ya no presentarán transición, sin embargo, al unirse a las t que aún quedan, estas subunidades solo pueden llegar a r por el mecanismo de ajuste inducido, y al no tener restricciones por cambio de temperatura u otro factor, el nuevo equilibrio se establece rápidamente.

En la literatura, solamente se ha reportado un caso en donde las k_{obs} que aumentan respecto a la concentración de ligante son las de baja velocidad, mientras que las que disminuyen son la de alta velocidad [24]. La interpretación que se encontró para ese fenómeno fue consistente únicamente con un mecanismo que considera a la selección conformacional y al ajuste inducido como parte del mismo sistema [25]. En ese mecanismo ocurren dos cambios conformacionales, uno previo y otro posterior a la unión de ligante. Este mecanismo también es consistente con nuestro sistema, en donde la temperatura genera un equilibrio preexistente y el ligante un ajuste inducido.

En los experimentos en equilibrio no fue posible calcular la constante de equilibrio entre t y r en ausencia de activador alostérico, que corresponde a la aparente ruta de selección conformacional. Postulando la existencia de este cuadrado termodinámico el valor teórico para esta constante de equilibrio es equilibrio es de 6.1.

En los experimentos fuera del equilibrio, se obtuvo para este equilibrio, una constante de 2.57 ± 0.35 . Este valor es menor comparado con el valor teórico calculado. Las posibles causas de esta discrepancia pueden ser, en primer lugar, el alto error experimental que se presenta al obtener datos utilizando el fluorómetro de placas, lo que impide obtener valores certeros de las constantes de velocidad rápidas a concentraciones bajas de GlcNAc6P. En segundo lugar, es posible que el mecanismo sea más complejo que un cuadrado y que

existan otras rutas o más especies conformacionales estables que nos impidan analizar los datos como procesos de dos estados.

Para poder resolver el problema, se propone continuar con los experimentos del cambio por temperatura, en este caso obteniendo la velocidad al enfriar a la EcGNPDA, es decir, de la transición r a t pasando de 30 a 4 °C. En este trabajo presentamos la velocidad de transición t a r , en ausencia de ligante, si se consigue en futuros experimentos, determinar la velocidad del proceso reverso, se podrá obtener la constante de equilibrio y comparar el valor obtenido con el teórico.

Otra alternativa es mejorar las condiciones experimentales utilizando el fluorómetro de placas, para determinar altas velocidades con mayor certidumbre y comprobar o mejorar el valor de la constante de equilibrio calculada hasta el momento.

En la tabla 4, se resumen los valores de las constantes de equilibrio calculadas.

Tabla 4 Constantes de equilibrio calculadas para los mecanismos de activación alostérica de la EcGNPDA atrapada en conformación R.

| | Ajuste inducido | | Selección conformacional aparente | |
|-----------------------------|---|-----------------|---|---------------------|
| | K_t (M) | K_{eq} | K_r (M) | K_{eq} |
| Equilibrio | $7.9 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-5}$ | 0.36 ± 0.05 | $4.6 \times 10^{-6} \pm 0.6 \times 10^{-6}$ | 6.1 (valor teórico) |
| Fuera del equilibrio | ---- | 0.36 ± 0.12 | ---- | 2.57 ± 0.35 |

Los parámetros fueron obtenidos a partir de los ajustes por regresión no lineal a las ecuaciones de los mecanismos de selección conformacional y de ajuste inducido. En los experimentos fuera del equilibrio las constantes K_t y K_r fueron fijadas en el ajuste, tomando como referencia las obtenidas en los experimentos en equilibrio.

7.5 Restricción conformacional por medio de candados moleculares.

Llevamos a cabo entrecruzamientos entre regiones específicas de las interfaces de las subunidades en el hexámero de la EcGNPDA, con la intención de estudiar al confórmero cuaternario R en solución y compararlo con las observaciones del mismo confórmero encapsulado.

En un trabajo previo se llevó a cabo la formación del candado mediante puentes disulfuro, sin embargo, es técnicamente difícil trabajar con tioles reactivos expuestos en la superficie de la molécula porque pueden oxidarse fácilmente. Para evitar este inconveniente, nos dimos a la tarea de buscar una estrategia diferente para lograr el entrecruzamiento entre las cisteínas 165 y 206. La molécula que sirvió como puente entre las cisteínas fue el ácido 2,3 dibromopropiónico. La ventaja de este compuesto es la solubilidad, lo que facilita llevar a cabo la reacción durante la purificación (ver en métodos).

La cinética de catálisis de la mutante L presentó un patrón similar al observado en el trabajo previo cuando se hizo el entrecruzamiento a través de un puente disulfuro, lo que sugiere que la reacción de entrecruzamiento ocurrió adecuadamente. Esto fue confirmado por la determinación de tioles libres con DTNB.

No obstante, el margen de activación de la mutante L es muy corto comparado con el que se ha observado en la EcGNPDA encapsulada en conformación R (Sergio Zonszein, comunicación personal).

Para caracterizar la activación de la mutante utilizamos el cambio de espectro de dicroísmo circular de la tirosina 254 que previamente ha sido caracterizado como reportero de ocupación del sitio alostérico. La curva de titulación a partir del cambio de señal nos muestra un patrón no hiperbólico con un coeficiente de Hill característico de cooperatividad negativa, este hecho sugiere la presencia de dos especies conformacionales que unen al ligante con diferentes afinidades.

Para poder describir el mecanismo de unión y determinar si es consistente con las observaciones descritas en este trabajo para la proteína nanoencapsulada, buscamos una señal de fluorescencia de tirosinas en la mutante L. Este tipo de señal no ha sido reportada en ningún trabajo de la EcGNPDA. En este estudio encontramos una señal de apagamiento al excitar a 270 nanómetros en presencia de activador alostérico a la mutante L. Esta señal en la enzima silvestre corresponde a un corrimiento en el centro espectral de masas.

En el presente trabajo nos limitamos a describir el fenómeno de apagamiento a través de la titulación con GlcNAc6P, sin embargo el origen de la señal está fuera de los objetivos de esta tesis. No obstante su caracterización puede ser complicada debido a que la enzima tiene ocho tirosinas.

Comparando la titulación monitoreada por la señal de dicroísmo circular (en la cual gracias a los estudios previos sabemos que proviene de la tirosina 254) con la señal de fluorescencia de las tirosinas, se observan patrones diferentes. En el caso de la señal fluorescente la curva es hiperbólica y no se presenta el fenómeno de cooperatividad negativa. Por otra parte la constante de disociación determinada por la señal fluorescente es de $5.5 \mu\text{M}$, mientras que por dicroísmo circular fue de $13.1 \mu\text{M}$. Esto sugiere que la señal fluorescente es producto de otra tirosina o de un conjunto de ellas.

Independientemente del origen de la señal, la constante observada por medio de fluorescencia es muy parecida a la observada para las subunidades *r* de la enzima nanoencapsulada en R reportadas en este trabajo ($4.7 \mu\text{M}$).

Finalmente esta señal se intentó seguir por medio de cinética rápida, no obstante la estandarización de la técnica para esta mutante nos limitó para poder encontrar las condiciones para poder registrar los cursos en el tiempo.

En futuros estudios se puede buscar el origen de la señal, así como las condiciones para la caracterización del mecanismo de activación alostérica en esta mutante en solución.

8. Conclusión.

En este trabajo demostramos que el mecanismo de activación alostérica terciaria en el confórmero cuaternario R, es diferente al reportado previamente para el confórmero cuaternario T.

En el confórmero R existe una heterogeneidad de estados terciarios lo que permite que ambos mecanismos de activación, la selección conformacional y el ajuste inducido, puedan operar de manera simultánea.

De acuerdo a los valores de las constantes de equilibrio calculadas en este trabajo, en ausencia de ligante el equilibrio terciario favorece a *t* ($K_{eq} = 2.57 \pm 0.35$), mientras que en presencia de ligante el equilibrio favorece a *r* ($K_{eq} = 0.36 \pm 0.05$) para el confórmero R encapsulada. Esta propiedad es el fundamento del acoplamiento terciario-cuaternario de la EcGNPDA en solución.

Es posible bloquear la cooperatividad de la enzima por medio de entrecruzamientos covalentes de sus subunidades, sin embargo es complicado diseñar una señal espectroscópica que permita el estudio de la activación terciaria en solución.

9. Bibliografia

- [1] Petsko GA and Ringe D. Protein structure and function. Sinauer Associates Inc, 2004.
- [2] Nelson DL and Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. Wh Freeman, 2010.
- [3] Huang YJ and Montelione GT. Structural biology: Proteins flex to function. Nature. 2005; 438: 36-7.
- [4] Yoshida M, Muneyuki E and Hisabori T. ATP synthase, Äa marvellous rotary engine of the cell. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2001; 2: 669-77.
- [5] Macnab RM. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. Journal of bacteriology. 1999; 181: 7149-53.
- [6] Jacob F. and Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. Journal of molecular biology. 1961; 3: 318-56.
- [7] Bustos-Jaimes L DA-AL, Cakcagno ML. Allostery and co-operativity in protein function. Advances in Protein Physical Chemistry. 2008; 37: 219-48.
- [8] Michaelis L and Menten ML. Die kinetik der invertinwirkung. Biochem z. 1913; 49: 352.
- [9] Monod J, Wyman J and Changeux J-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. Journal of molecular biology. 1965; 12: 88.
- [10] Koshland Jr D, Nemethy G and Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. Biochemistry. 1966; 5: 365-85.
- [11] Zhuravlev PI and Papoian GA. Protein functional landscapes, dynamics, allostery: a tortuous path towards a universal theoretical framework. Quarterly reviews of biophysics. 2010; 43: 295-332.
- [12] Fersht A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. Macmillan, 1999.
- [13] Calcagno M, Campos PJ, Mulliert G and Su $\sqrt{\text{°}}$ stegui J. 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: 165-73.

- [14] Bustos-Jaimes I, Ramirez-Costa M, De Anda-Aguilar L, Hinojosa-Ocana P and Calcagno ML. Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. 2005; 44: 1127-35.
- [15] Lara-González S, Dixon HB, Mendoza-Hernández G, Altamirano MM and Calcagno ML. On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*. 2000; 301: 219-27.
- [16] Montero-Morán GM, Horjales E, Calcagno ML and Altamirano MM. Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. 1998; 37: 7844-9.
- [17] Henry ER, Bettati S, Hofrichter J and Eaton WA. A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin. *Biophysical chemistry*. 2002; 98: 149-64.
- [18] Zonszein S, Álvarez-Añorve LI, Vázquez-Núñez RJ and Calcagno ML. The Tertiary Origin of the Allosteric Activation of *E. coli* Glucosamine-6-Phosphate Deaminase Studied by Sol-Gel Nanoencapsulation of Its T Conformer. *PloS one*. 2014; 9: e96536.
- [19] Vázquez-Núñez RJ. Los cambios conformacionales terciarios de la Glucosamina-6-fofato desaminasa de *Escherichia coli*, determinan al componente cuaternario de la transición alostérica. Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [20] Martín GA. Marcaje sitio específico de proteínas para estudiar cambios conformacionales en solución. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México., 2006.
- [21] Viappiani C, Bettati S, Bruno S, 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: 14414-9.
- [22] Bettati S and Mozzarelli A. T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate, and chloride. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 32050-5.

[23] Bustos-Jaimes I and Calcagno ML. Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001; 394: 156-60.

[24] James, L. C., & Tawfik, D. S. (2005). Structure and kinetics of a transient antibody binding intermediate reveal a kinetic discrimination mechanism in antigen recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12730-12735.

[25] Vogt, A. D., & Di Cera, E. (2013). Conformational selection is a dominant mechanism of ligand binding. *Biochemistry*, 52(34), 5723-5729.