

00591

29/10/01 14

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE EL MECANISMO DE
ACTIVACIÓN ALOSTÉRICA DE LA GLUCOSAMINA-6-
FOSFATO DESAMINASA DE *Escherichia coli***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
(DENTRO DEL PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS)

PRESENTA

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

OCTUBRE DE 2001



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Eduardo Horjales Reboredo en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante el proyecto doctoral Enrique Rudiño Piñera recibió una beca-crédito del CONACyT y un complemento de beca de la DGEP, UNAM.

A Carmen, Enrique y Santiago.

A Rosa Alba, Enrique, Maritza y Edson.

A DIOS.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA de MÉXICO.

Al Instituto de Biotecnología.

Al Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (Brasil), al Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas (Instituto de Química, UNAM).

Al CONACyT por otorgarme una beca-crédito para realizar mis estudios de doctorado.

A la DGEF de la UNAM por otorgarme una beca complementaria para realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Mario Luis Calcagno Montans y su grupo por compartir a la desaminasa.

A los miembros del examen de candidatura:

Dra. Alejandra Bravo de la Parra, Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. Ruy Pérez Montfort, Dr. Jean Louis Charli Casalonga, Dra. Carmen Beltrán Nuñez, Dr. Agustín López Munguía Canales.

A los integrantes del comité tutorial:

Dr. Mario Luis Calcagno Montans, Dr. Eduardo Horjales Reboredo, Dr. Roberto Pablo Stock Silberman

A los miembros del comité tutorial ampliado:

Dr. Mario Luis Calcagno Montans, Dr. Eduardo Horjales Reboredo, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Roberto Pablo Stock Silberman

A los miembros del jurado:

Dr. Enrique Morett Sánchez, Dr. Eduardo Horjales Reboredo, Dr. Wilhelm Hansberg Torres, Dra.

Rosario Muñoz Clares, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Xavier Soberon Mainero.

A la Bióloga Sonia Patricia Rojas Trejo por el apoyo técnico en la cristalización de la GlcN6P desaminasa silvestre y las proteínas mutantes K160E y Y254F.

A María del Carmen Santillán Valverde, por estar siempre a mi lado y por compartir, más que este grado, la vida entera.

A Enrique y a Santiago por darme el orgullo de ser su papá.

A Rosa Alba, Enrique y Maritza por ser mucho más que mi familia.

A la junta militar uruguaya, al gobierno militar brasileño, al alto comisionado para los refugiados políticos de la ONU, al gobierno sueco, a Carl Branden, a la Universidad de la República Oriental del Uruguay, a la Universidad de São Paulo, al Instituto de Química de la UNAM; por haber permitido que Eduardo Horjales estuviera en el Instituto de Biotecnología de la UNAM al momento en que yo planeaba empezar mi doctorado.

A los Horjales-Araújo (Eduardo, Stella, Ximena, Inés y Emilia) por ser nuestros amigos y nuestra familia local.

A Rodrigo Arreola Alemón, Sonia Patricia Rojas Trejo, Sandra Morales Arrieta, Barbara Selisko, Gabriela Cosío Juárez, Ana Bernarda Delgado Campos, María de la Luz Morante Román, Rosario Colín Romero y Eduardo Guzmán Olea; por ser excelentes compañeros y por tomar parte en múltiples discusiones sobre mi tesis.

Al personal de docencia y de la unidad de cómputo del IBT.

A todos ellos GRACIAS.

CONTENIDO

RESÚMEN	7
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN	11
Algunas consideraciones sobre el alosterismo y los modelos alostéricos	11
Hemoglobina, la primera proteína alostérica	12
El modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC).....	13
El modelo secuencial simple de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF).....	15
Teoría alostérica	17
Simetría y cooperatividad	18
Algunas consideraciones técnicas sobre la cristalografía	19
Resolución y función biológica	19
Parámetros de desplazamiento isotrópicos y anisotrópicos	19
Número de datos, resolución y afinamiento	21
Reemplazo molecular	24
Métodos basados en la función de Patterson o en la probabilidad	25
La función de rotación	26
La función de traslación	27
Afinamiento	27
Antecedentes sobre la estructura de la GlcN6P desaminasa de <i>E. Coli</i>	29
Estructura de la GlcN6P desaminasa	29
OBJETIVOS	34
Objetivo General	34
Objetivos Particulares	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Purificación	35
Cristalización y determinación estructural	36
Cristales forma R nativa con GlcNAc6P (2.20 Å de resolución)	36
Cristales forma R nativa con GlcNAc6P (1.73 Å de resolución).....	36
Cristales forma R nativa con Fru6P (2.15 Å de resolución).....	36
Cristales forma R nativa con Fosfatos y MetAmonio (1.67 Å de resolución).....	36

Cristales forma T nativa remojados en Fru6P (2.20 Å de resolución).....	36
Cristales forma T nativa remojados en GlcNol6P (2.70 Å de resolución).....	36
Cristales forma T (1.90 Å de resolución).....	36
Cristales forma T nativa remojados en MetAmonio (2.50 Å de resolución).....	36
Cristales forma R mutante K160E con GlcNol6P (2.10 Å de resolución).....	37
Cristales forma T mutante K160E (2.20 Å de resolución).....	37
Cristales forma R mutante Y254F con GlcNAc6P (2.10 Å de resolución).....	37
Cristales forma R mutante Y254F con GlcNol6P (2.60 Å de resolución).....	37
Cristales forma T mutante Y254F (2.20 Å de resolución).....	37
Cristales forma T mutante F174A (2.02 Å de resolución)	37
¿Afectan los contactos cristalinos la conformación o la flexibilidad molecular?.....	38
Intentos de obtener una estructura T con moléculas ligables	39
Construcción de conformaciones alternas para la tapa del sitio activo de la forma R heterotrópica ...	39
Afinamiento anisotrópico de la forma T a 1.9 Å de resolución	40
Afinamiento de conformaciones alternas para la tapa del sitio activo y el carboxilo terminal de la forma T a 1.9Å de resolución	41
Simetrías no cristalográficas	43
Proteínas mutantes Y254F, F174A y K160E	43
Cristalización de la proteína mutante F174A	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Relación entre el grupo amino terminal y las propiedades alostéricas	46
Contactos cristalinos y vibración atómica	48
Fru6P: ruta catabólica y un probable activador alostérico alternativo	49
Comportamiento de los valores B isotrópicos: cambios vibratorios asociados a la unión del sustrato.....	52
Transformación alostérica y vibración isotrópica	53
Forma R con el sitio activo libre: conformaciones alternas en la tapa del sitio activo	58
Afinamiento posterior de la forma T: afinamiento anisotrópico y conformaciones alternas	59
Reacción inversa y unión del ion amonio	62
Proteína mutante K160E	65
Proteína mutante Y254F	68
Proteína mutante F174A	69
Modelo alostérico concertado y la GlcN6P desaminasa de <i>E. Coli</i>	70

Discusión general.....	73
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	79
BIBLIOGRAFÍA	80
APÉNDICE - A (Glosario de términos cristalográficos)	84
Afinamiento	84
Anisotropía	84
Celda unitaria	84
Constreñir o fijar parámetros ("constraint")	84
Cristal	85
Datos	85
Diagrama de Ramachandran	85
Dispersión anómala con múltiples longitudes de onda (MAD)	85
Fase	85
Factor de temperatura (factor B, factor de Debye-Waller o parámetro atómico de desplazamiento) ..	86
Factor R	86
Gráfica de Luzzati	86
Grupo espacial	87
Mapa de densidad electrónica	88
Modelo experimental	88
Modelo versus estructura	88
Mosaicidad ("mosaicity")	88
Ocupación (valor q, "occupancy")	89
Parámetros estructurales	89
Precisión de las posiciones atómicas	89
Problema de fase	89
Reemplazo isomórfico múltiple (MIR)	89
Reemplazo molecular (MR)	89
Regiones desordenadas	90
R _{free}	90
Restringir o limitar parámetros ("restraint")	90
Resolución	90

Simetrías no cristalográficas	90
Unidad asimétrica	91
APÉNDICE - B (lista de acrónimos y abreviaturas empleados)	92
APÉNDICE - C (direcciones en la red de interés cristalográfico)	93
Sociedades	93
Bancos de datos	93
Programas	94
Fuentes sincrotrón	96
Institutos, Instituciones y Universidades	96
Educativos y funcionales	97
APÉNDICE - D (Códigos de una y tres letras para aminoácidos)	100
APÉNDICE - E (Estructuras depositadas y artículos escritos)	101

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	(Esquema simplificado del modelo MWC)	14
Figura 2	(Esquema simplificado del modelo KNF)	16
Figura 3	(Relación apariencia tridimensional - valor de la anisotropía)	23
Figura 4	(Gráfica anisotropía versus fracción de átomos en una estructura correctamente afinada dentro del modelo anisotrópico)	23
Figura 5	(Gráfica anisotropía versus fracción de átomos de 67 estructuras depositadas en el PDB)	24
Figura 6	(Mapa de Patterson generado a partir de un grupo de átomos)	26
Figura 7	(Mapa de Patterson resaltando los vectores intermoleculares)	27
Figura 8	(Topología y estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa de <i>E. Coli</i>)	32
Figura 9	(Hexámero R y T de la GlcN6P desaminasa de <i>E. Coli</i>)	33
Figura 10	(Estructura hexamérica en detalle)	33
Figura 11	(Mapa de diferencia y estructuras alternas de la tapa del sitio activo)	40
Figura 12	(Morfología cristalina de las formas R, T y mutante F174A con fosfatos)	45
Figura 13	(Gráfica, valores B isotrópicos y número de residuos)	47
Figura 14	(Gráfica, valores B isotrópicos y número de residuos entre los dos monómeros de la unidad asimétrica de la forma R)	49
Figura 15	(Fru6P en el sitio activo y alostérico)	51
Figura 16	(Fru6P: ¿lineal o cíclica?)	51
Figura 17	(Factores B isotrópicos y rotación)	53
Figura 18	(Tapas alternas en la forma R con el sitio activo libre de ligables)	58
Figura 19	(Forma T: ajuste anisotrópico y conformaciones alternas)	60
Figura 20	(Parvati: validación del afinamiento anisotrópico)	61
Figura 21	(Metil amonio, Reacción inversa y canales de acceso al sitio activo)	63
Figura 22	(Metil amonio, canal de acceso y aguas cristalográficas)	64
Figura 23	(Sitio alostérico de la enzima silvestre y de la proteína mutante K160E)	65
Figura 24	(Gráfica de factores B isotrópicos y mutantes de la GlcN6P desaminasa)	

	de <i>E. Coli</i>)	66
Figura 25	(Sobreposición de los monómeros R y T, nativos y mutantes)	67
Figura 26	(Hipótesis general de la transformación homo y heterotrópica en la GlcN6P desaminasa de <i>E. Coli</i>)	75
Tabla 1	(Estructuras previamente determinadas de la GlcN6P desaminasa de <i>E. Coli</i>)	31
Tabla 2	(Sobreposiciones de C α de las formas R y T)	42
Tabla 3	(Condiciones de cristalización y morfología cristalina, proteína mutante F174A)....	44
Tabla 4	(Comparaciones de los promedios de los factores de temperatura en distintas secciones de la estructura)	48
Tabla 5	(Detalles de colecta y afinamiento de las estructuras determinadas en esta tesis) .	55
Tabla 6	(Ajuste anisotrópico y de tapas del sitio activo múltiples en la forma T)	62
Tabla 7	(Constantes cinéticas nativas y de la proteína mutante Y254F)	69
Tabla 8	(Interacción en la interfase, formas R y T)	71

RESÚMEN

La 2-amino-2deoxy-D-glucosa-6-fosfato amino-hidrolasa o glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6, anteriormente EC 5.3.1.10) juega un papel central en la utilización de los amino-azúcares, siendo la única enzima alostérica de esta ruta. Esta enzima cataliza la isomerización-desaminación de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) y una molécula de agua para formar el ion amonio y la fructosa 6-fosfato (Fru6P). Como muchas enzimas alostéricas, excluyendo algunos fenómenos alostéricos en las proteínas monoméricas de la membrana celular, la GlcN6P desaminasa forma una partícula funcional polimérica, en este caso homohexamérica. Cada monómero de 266 residuos tiene un sitio activo y un sitio alostérico, este último en la interfase con el monómero vecino. Su activador alostérico es la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). El activador se une exclusivamente a la forma R, mostrando un comportamiento cinético que corresponde a los sistemas enzimáticos tipo K.

Debido a la relativa simplicidad de su sistema alostérico, sobre todo comparado con el de otras enzimas alostéricas de estructura cristalográfica conocida, como la aspartato transcarbamoilasa, la GlcN6P desaminasa nos permite dilucidar más sobre el comportamiento alostérico a un nivel estructural. Por otro lado, la GlcN6P desaminasa ha sido estudiada desde hace 30 años desde el punto de vista genético, cinético y estructural, por lo que se cuenta con suficiente información para sustentar una teoría estructural sobre la transformación alostérica, la catálisis y los procesos relacionados.

En cuanto a los estudios estructurales, nuestro grupo ha publicado las estructuras T (código PDB 1cd5) y R de la GlcN6P desaminasa. Sin embargo, en cuanto a la forma R, las estructuras reportadas (códigos PDB 1dea, 1hor y 1hot) contienen compuestos unidos tanto en el sitio activo como en el alostérico. En base a estas estructuras se han descrito los cambios estructurales que ocurren en la transformación alostérica de T (grupo espacial P6₃22 y un monómero en la unidad asimétrica, en todos los casos, incluyendo esta tesis) a R (grupo espacial R32 y un dímero en la unidad asimétrica, en todos los casos, incluyendo esta tesis), en particular la rotación de algunos motivos estructurales con respecto a un eje paralelo al eje cristalográfico de orden tres* de la estructura homohexamérica. Sin embargo, la observación de las estructuras publicadas (T y R) nos permite concluir que el comportamiento vibratorio de las estructuras no es el mismo, en particular en la tapa del sitio activo (residuos 158 a 187). En la

forma T, la tapa del sitio activo vibra con un valor promedio de 75 \AA^2 , mientras que en la forma R, con compuestos unidos en ambos sitios, la misma estructura vibra con un valor promedio de 33 \AA^2 . Considerando que la tapa del sitio activo contiene residuos que participan tanto en el sitio activo como en el alostérico, el comportamiento estructural de la tapa puede estar directamente relacionado con la catálisis y con la transformación alostérica. Para probar esta hipótesis, en el presente trabajo se determinaron 15 estructuras tridimensionales de la GlcN6P desaminasa en sus formas R y T, dando como resultado a la fecha seis nuevas estructuras depositadas en el "Protein Data Bank" (PDB) (1fq0, 1fsf, 1frz, 1fs5, 1fs6 y 1jt9), y cinco más que se planean depositar en dicho banco tras la escritura de uno o varios artículos nuevos.

** Un eje de orden tres implica que en un plano y alrededor de un eje, una estructura de tres componentes idénticos se pueda generar usando solo uno y rotándolo dos veces cada 120° .*

Con relación a los modelos R determinados, se cristalizó la enzima en presencia de moléculas ligables al sitio activo: Fru6P, el sustrato de la reacción inversa; el 2-desoxi-2-amino D-glucitol-6-fosfato (GlcNol6P), un inhibidor competitivo; y el metil amonio (MetAmonio), como un análogo del ion amonio, que al contar con un grupo metilo nos permite diferenciar en una nube electrónica al ion amonio de una molécula de agua; y la N-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P), el activador alostérico, como ligable del sitio alostérico, obteniendo así estructuras R con ligantes sólo en el sitio activo (homotrópicas). Y estructuras R con ligables sólo en el sitio alostérico (heterotrópicas). En cuanto a la forma T, se intentó co-cristalizar a la enzima con un compuesto unido en los sitios alostérico o activo. A pesar de varios intentos, no se logró obtener una estructura en forma T ligada. Además, se resolvieron las formas T y R de las proteínas mutantes Y254F, K160E y la forma T de la proteína mutante F174A.

En cuanto a la resolución de las estructuras, en el presente trabajo se obtuvo una resolución máxima de 1.67 \AA para la forma R (la resolución máxima de las estructuras resueltas previamente es de 2.10 \AA) y de 1.90 \AA para la forma T (la resolución máxima de la estructura resuelta previamente es de 2.20 \AA). Esto nos permitió tener datos suficientes para poder afinar la estructura de la forma T en un modelo anisotrópico de vibraciones atómicas. Para las demás estructuras, sólo se han obtenido datos suficientes para afinar los factores de temperatura en un modelo isotrópico. Se resolvieron en paralelo algunas estructuras R (homotrópica y heterotrópica) y T, que tenían conformaciones alternas en las zonas que presentan vibraciones atómicas mayores a 65 \AA^2 .

Con las estructuras resueltas, se pudo concluir que la forma T de la enzima no tiene la capacidad para unir moléculas en ninguno de sus dos sitios (activo o alostérico). Y que la forma R siempre tiene

ocupado al menos uno de los sitios. Se detectó que la tapa del sitio activo en la forma R heterotrópica presenta una vibración atómica 20 \AA^2 mayor que la misma estructura en la forma R con los dos sitios ocupados. Esto evidencia la existencia de un componente vibratorio de la tapa del sitio activo, que es atribuible sólo a la ligadura de moléculas en el sitio activo. Además, la forma R heterotrópica permite afinar un modelo con tres posiciones de la tapas del sitio activo que abre y cierra la cavidad activa de la enzima. Se encontró que, en la forma R, el ion amonio tiene un canal de acceso al sitio activo que es diferente al canal de entrada de los ligantes fosfatados, de acuerdo con un análisis de las cargas superficiales. También se encontraron dos sitios de unión para el amonio, uno en cada extremo del canal. Se comprobó que la Fru6P se une al sitio activo en su forma abierta, ya que no existe espacio suficiente para albergar la forma cíclica. Por ello la reacción inversa de la enzima debe estar limitada por la apertura espontánea en solución de la forma cíclica de la Fru6P. Esto último es coherente con los resultados cinéticos obtenidos por otro grupo (Calcagno, M.L. comunicación personal). También se evidenció, en este trabajo, la función de propagador de la transformación alostérica que tiene el asa compuesta por los residuos 144 a 154, los cuales sufren un efecto inducido ("*induced fit*") durante la transformación.

En cuanto al ajuste anisotrópico de los valores de vibración atómica en la forma T, se demostró que la estructura monomérica presenta una vibración atómica colectiva que, de acuerdo a la dirección de los ejes mayores de los elipsoides anisotrópicos*, genera una rotación global de la zona externa que tiene un eje de rotación igual al de la transformación alostérica de T en R. Esto se corroboró afinando la misma estructura en un modelo isotrópico, generando tantas conformaciones alternas como los mapas de densidad electrónica ($2fo-fc$) y de diferencia de densidad ($fo-fc$) permitieran, tanto del carboxilo terminal como de la tapa del sitio activo. El análisis de las vibraciones atómicas isotrópicas muestra que la zona de menor vibración es justamente la propuesta como el centro del eje de rotación durante la transformación alostérica.

** si se afinan los factores de temperatura con el modelo anisotrópico. se obtiene un elipsoide, el cual, indica la dirección del movimiento electrónico del átomo en cuestión con la dirección de su eje mayor.*

En resumen, con los datos estructurales generados en esta tesis, se propone que la transformación de la forma T en la forma R parte de una estructura T oscilante que, con una baja ocurrencia, llega a la forma R sin compuestos unidos. Esta hipótesis puede ser extensiva a otros sistemas alostéricos.

SUMMARY

The allosteric homohexameric enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* (EC 3.5.99.6, formerly EC 5.3.1.10) catalyses the conversion of D-glucosamine 6-phosphate and a water molecule into D-fructose 6-phosphate and ammonia. It is allosterically activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate.

The new crystallographic structure of the free active-site R conformer of the allosteric enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*, coupled to previously reported structures of the T and R conformers, generates a detailed description of the heterotropic allosteric transition in which structural flexibility plays a central role. The T conformer's external zone presents higher B-values than in the R conformers [Horjales *et al.* (1999) *Structure*. 7, 527-536]. The ligand-free enzyme (T conformer) undergoes an allosteric transition to the free active-site R conformer upon binding of the allosteric activator. The high B-values of this structure indicates three alternate conformations of the active-site lid (residues 158-187), by comparison to the unique conformation of the T conformer. One of these R conformations corresponds to the active-site lid found when the substrate is bound. The disorder associated with the alternate conformations can be related to the biological regulation of the K_m of the reaction, which is metabolically needed to maintain adequate concentrations of the activator, which holds the enzyme in its R state. Seven alternate conformations for the active-site lid and three for the C-terminus were refined on the T structure using isotropic B-factors. Some of these conformers approach in geometry that of the R conformer. Furthermore, the direction of the atomic vibrations obtained with anisotropic B refinement supports the hypothesis of an oscillating rather than a tense T state. The concerted character of the allosteric transition is also analyzed in view of the apparent dynamics of the conformers.

Additionally, the crystallographic structure of the enzyme in its R state with bound methyl ammonium shows the existence of two channels communicating the active site to the solvent, one for the phosphate and other for the ammonium. This fact explains kinetical data generated by Dr. Mario Calcagno's group. Finally the structures of both T and R states of the protein mutants Y254F and K160E were also determined, stressing the main role of the atomic flexibility in this enzyme.

INTRODUCCIÓN

Algunas consideraciones sobre el alosterismo y los modelos alostéricos.

Existen fundamentalmente tres formas mediante las cuales se pueden controlar las reacciones catalíticas en la célula. Primero, la catálisis se puede controlar por la concentración de la enzima, que es determinada por la cantidad de enzima sintetizada y la cantidad de enzima desechada. Este tipo de control se llama "regulación metabólica a largo plazo" debido a que el proceso toma varios minutos para que la concentración de la enzima cambie significativamente. Segundo, la actividad de la enzima puede ser controlada por medio de modificaciones covalentes. Estas modificaciones pueden fijar a la enzima en una condición estable de actividad o inactividad. Tercero, la tasa de una reacción puede ser controlada por medio de moléculas pequeñas, llamadas efectores. Un cambio en la concentración de los efectores puede, de un momento a otro, modificar la tasa de una reacción metabólica. Un ejemplo de este último tipo de control es la modulación de la actividad en las enzimas alostéricas.

Las enzimas alostéricas fueron descubiertas cuando se intentaba elucidar los mecanismos de control por retroalimentación en las rutas metabólicas. Se encontró que la enzima que cataliza la primera reacción en algunas rutas metabólicas puede ser inhibida específicamente por el producto final de la misma ruta. Tomando como base el hecho de que el producto final de la ruta y el substrato de la primera enzima no son iso-estéricos (de la misma forma) sino alo-estéricos (de forma distinta), Monod, Wyman y Changeux (7) propusieron el concepto de efector alostérico. El efector alostérico requiere un sitio regulatorio (alostérico) distinto al sitio donde se lleva a cabo la función catalítica (activo). Por definición, las interacciones alostéricas ocurren cuando la unión de una molécula pequeña a un sitio específico de la proteína es afectada por la unión de otra molécula pequeña en un sitio diferente. Cuando las moléculas unidas son iguales se conoce como efecto homotrópico; cuando las moléculas son diferentes se conoce como efecto heterotrópico.

Poco tiempo después del descubrimiento de las enzimas alostéricas, Monod, Wyman y Changeux (7) (MWC) y Koshland, Nemethy y Filmer (8) (KNF) propusieron sus modelos cinéticos para explicar las interacciones alostéricas.

NOTA 1: En particular, los modelos de alosterismo son modelos de pegue-despegue de compuestos a las proteínas, en las cuales, la catálisis es un "accidente" posterior. Por lo tanto y dado que estos modelos se basaron en la hemoglobina (la cual no es una enzima propiamente dicha), algunos puntos de la teoría podrían (o deberían) modificarse.

Hemoglobina, la primera proteína alostérica. La hemoglobina es una proteína alostérica que se encuentra en los glóbulos rojos: Es responsable del transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos y de transportar el dióxido de carbono de regreso a los pulmones. El término "hemoglobina" fue utilizado por primera vez por Félix Hoppe-Seyler en 1862 para describir los pigmentos rojos que encontró en la sangre. El nombre hemoglobina deriva de la combinación de los términos globina o proteína y hemo, el grupo prostético que liga el oxígeno y es responsable de su distintivo color rojo. Georges Strokes reportó en 1864 un cambio en el espectro de absorción de la hemoglobina cuando esta cambiaba de oxi a desoxi-hemoglobina. El fue el primero en mostrar la unión reversible del oxígeno. Posteriormente, Teichman, usando ácido acético glacial, fue capaz de separar el grupo hemo, obteniendo cristales que, al ser difractados y resueltos por Kluster, mostraron contener hierro. Gilbert S. Adair desarrolló un método para determinar el peso molecular de la hemoglobina, resultando en un valor de 67,000 Daltones, que corresponde aproximadamente a 580 aminoácidos. Trabajos realizados por Rhinesmith *et al.* y Brauntizer revelaron que la hemoglobina era en realidad un tetrámero compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas, designadas como alfa y beta. En 1960, M. F. Perutz y colaboradores, reportaron la estructura tridimensional cristalina de la hemoglobina, trabajo que le significó a Perutz el Premio Nobel en 1962.

Con la información que se tenía de la hemoglobina, y sobre todo de su estructura espacial, se inició la investigación sobre la función biológica como una proteína respiratoria. Christian Bohr *et al.* demostraron en 1904 la forma sigmoidal que presenta la curva de equilibrio del oxígeno y su modulación por la concentración del dióxido de carbono y del pH. Pocos años después, Archibald Hill propuso que la curva sigmoidal era el resultado de la unión del oxígeno a cada subunidad y a las interacciones entre ellas que expresó en términos matemáticos como una ecuación, conocida como la ecuación de Hill. Los trabajos de Hill se pueden considerar los primeros reportes sobre cooperatividad. En 1935, Linus Pauling concluyó que la unión de un átomo de oxígeno causa cambios estructurales en la proteína que facilitan la unión de más moléculas de oxígeno. El modelo de Pauling para el alosterismo de la hemoglobina fue el primero en explicar su naturaleza cooperativa. A partir de estos resultados, se desarrollaron los modelos de Monod-Wyman-Changeux y Koshland-Nemety-Filmer. La hemoglobina, sin ser propiamente una enzima dio la base de los conocimientos sobre alosterismo.

El modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC). El modelo MWC, también conocido como modelo concertado o simétrico, se basa en varios conceptos sobre la estructura de una proteína oligomérica capaz de unir moléculas de una manera cooperativa.

- 1) Las proteínas alostéricas son oligómeros de protómeros que están asociados de tal manera que ocupan posiciones equivalentes. Esto implica que la molécula posee al menos un eje de simetría.
- 2) Cada subunidad en la proteína es capaz de existir en dos estados conformacionales, que se llamaron T (tenso y menos afín al sustrato) y R (relajado y más afín al sustrato), aún antes de que se adicione un compuesto capaz de unirse.
- 3) En un determinado instante todas las subunidades del oligómero de proteína están en la misma conformación, ya sea todas en T o todas en R. Los estadios mixtos no se generan debido a que las subunidades en distintos estados (T o R) tienen interacciones poco favorables. Las dos formas conformacionales de la proteína están en equilibrio en ausencia de moléculas unidas, por lo que el equilibrio (tendiente a T) se rompe por la adición de estas moléculas (equilibrio hacia R). Es decir, el ligante se une selectivamente a la forma R, desplazando el equilibrio de T a R.
- 4) Las constantes de asociación de una molécula ligable para las formas T y R son diferentes.
- 5) Cuando una proteína alostérica va de un estado al otro, se conserva su simetría molecular.

En el modelo MWC, también se propone la existencia de tres clases de comportamientos que pueden esperarse en los sistemas alostéricos.

a) "Sistemas K": la unión de un efector a la enzima cambia la constante de afinidad por el sustrato. Ya que tanto el efector como el sustrato tienen diferentes afinidades por las formas T o R, la presencia del efector modificará la afinidad aparente de la proteína por el sustrato, pero sin afectar la V_{max} de la reacción. A altas concentraciones, el sustrato puede funcionar como activador alostérico.

b) "Sistemas V": el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados. De esta manera, la unión del efector no modifica la afinidad de unión aparente del sustrato, pero produce un cambio en la V_{max} . Si el efector tiene afinidad máxima por la forma activa (R) o por la inactiva (T), funcionará como un activador (sistemas V positivos) o como inhibidor (sistemas V negativos). El sustrato no funciona como activador alostérico en ninguna concentración.

c) "Sistemas mixtos K-V": todos los sistemas que no son completamente V o K.

Figura 1

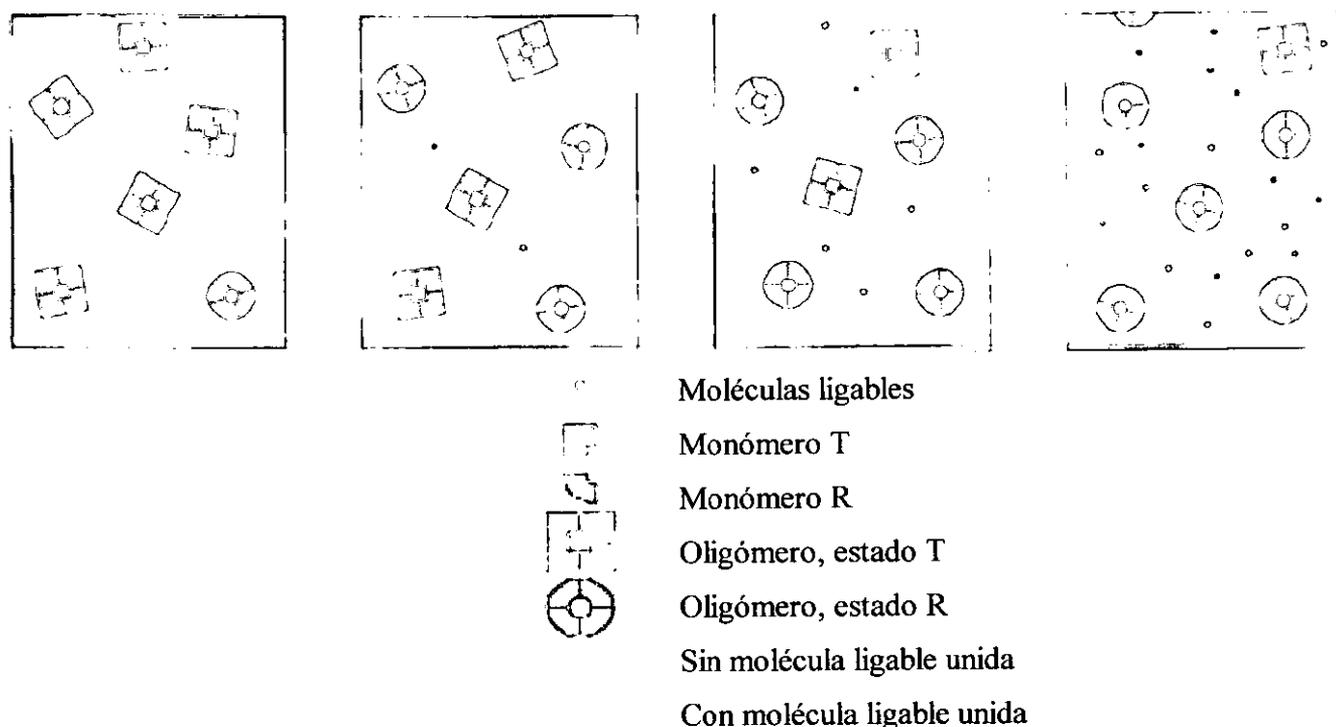


Figura 1: Esquema simplificado que resume los postulados del modelo MWC. Tomado de www.nd.edu/~aseriann/knf.html

Utilizando este modelo, se pueden hacer varias afirmaciones:

- 1) En un sistema alostérico enzimático, un efector debe mostrar interacciones cooperativas homotrópicas.
- 2) En aquellos sistemas en que el sustrato muestra diferente afinidad entre los dos estados, el sustrato debe mostrar interacciones cooperativas homotrópicas.
- 3) En aquellos sistemas en que el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados, el sustrato no muestra interacciones cooperativas homotrópicas.
- 4) El mecanismo de cambio conformacional es debido simplemente al diferencial de energías de unión entre los dos estados.
- 5) El modelo MWC hace predicciones simples basándose en sólo dos parámetros físicos: la constante de equilibrio o constante alostérica, L , que representa la proporción de los estados T a R en ausencia de cualquier molécula ligable ($L=T_0/R_0$) y el coeficiente de pegado no

exclusivo, c , que es la proporción de las constantes de disociación de los estados R y T ($c=K_T/K_R$).

6) No puede explicar la cooperatividad negativa.

El modelo MWC define también las propiedades de los sistemas alostéricos:

- 1) La mayoría de las proteínas alostéricas son poliméricas, o mas bien oligoméricas, contando con varias unidades idénticas.
- 2) Las interacciones alostéricas frecuentemente parecen estar correlacionadas con alteraciones en la estructura cuaternaria de las proteínas (como alteraciones en la unión entre las subunidades).
- 3) Mientras que los efectos heterotrópicos pueden ser tanto positivos como negativos (cooperativo o antagonista), los efectos homotrópicos parecer ser siempre cooperativos.
- 4) Muy pocos de los sistemas alostéricos presentan solamente efectos heterotrópicos. En otras palabras, los efectos cooperativos homotrópicos se observan invariablemente para al menos una de las moléculas ligables del sistema.
- 5) Las condiciones, los tratamientos o las mutaciones que alteran las interacciones heterotrópicas, también pueden alterar las homotrópicas.

Además MWC definen la terminología usada para el alosterismo, la cual vale la pena tener en mente:

a) Una proteína polimérica que contiene un número finito, relativamente pequeño, de subunidades idénticas es llamada oligómero.

b) Las subunidades idénticas asociadas dentro de una proteína oligomérica se llaman protómeros.

c) El término monómero describe al protómero completamente disociado, o a una subunidad de una proteína que no tiene subunidades idénticas.

d) El término "*subunidad*" se usa para referirse a cualquier entidad sub-molecular química o físicamente identificable dentro de la proteína, ya sean idénticas o diferentes de otros componentes de la proteína.

El modelo secuencial simple de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF). Una forma de extender el modelo MWC consiste en relajar la cooperatividad y la simetría absolutas, permitiendo que coexistan ambas conformaciones alostéricas en el mismo oligómero. La posibilidad de que existan subunidades adyacentes con una conformación diferente se puede modelar añadiendo a la ecuación un término que modifique la energía de interacción. Incluso si el valor de la energía de interacción es casi

infinito, se obliga a que la transición sea concertada y se obtiene el modelo MWC. Este modelo más general puede tomar formas interesantes, así, si la energía de interacción es cero, no habría cooperatividad. Igual que en el modelo MWC, la cooperatividad sigue siendo debida a la interfase entre los monómeros. Este modelo secuencial también se conoce como modelo KNF, secuencial simple o de "induced fit" y su característica principal es que permite la existencia de oligómeros mixtos, o híbridos (T y R), los cuales tienen más de una conformación por oligómero. En este modelo:

Figura 2

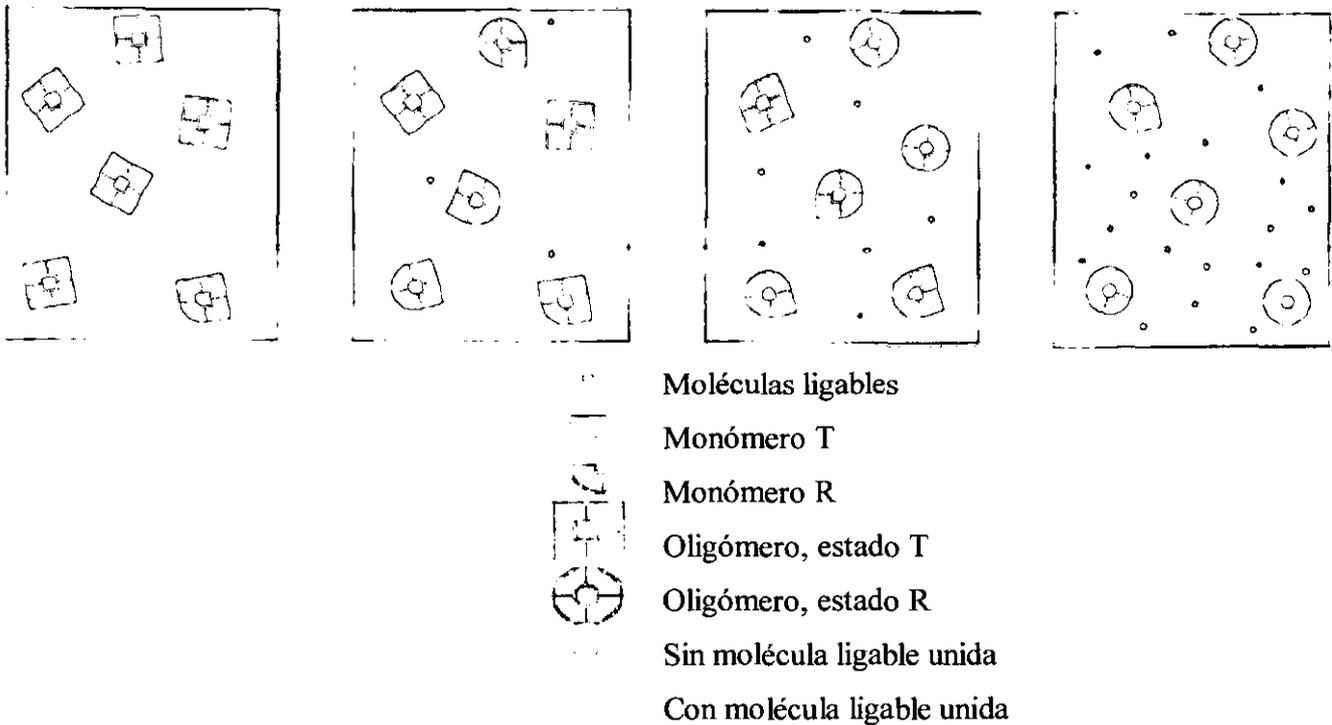


Figura 1: Esquema simplificado que resume los postulados del modelo KNF. Tomado de www.nd.edu/~aseriann/knf.html

- 1) Cada subunidad, dentro del oligómero funcional, puede unir a distintas moléculas y experimentar cambios conformacionales independientemente de las subunidades vecinas.
- 2) Existen interacciones entre las subunidades que modifican la forma en que se unen los ligandos adicionales.
- 3) Debido al gran número de parámetros en este modelo, las predicciones del comportamiento enzimático no son claras, como en el modelo MWC.

4) Puede explicar los fenómenos de cooperatividad negativa.

Teoría alostérica. El modelo alostérico MWC se puede dividir en dos procesos, la unión de la molécula ligable a su sitio de unión estereo-específico en la proteína y la transición estructural en la proteína. De hecho, un elemento central en la teoría alostérica es la separación de estos dos procesos. Ambos procesos se pueden combinar de muchas maneras para generar una gran variedad de modelos teóricos. La unión de una molécula ligable es un proceso bi-molecular descrito como un equilibrio:



en el cual R_0 representa la proteína con su sitio de unión desocupado y R_1 la misma proteína con su sitio ocupado por la molécula ligable L . En el equilibrio, las concentraciones de las especies están relacionadas por la expresión:

$$[R_1] / [L][R_0] = K \quad (2)$$

en la cual K es la constante de equilibrio, que también se llama constante de *afinidad*. El cambio en la energía libre durante la unión del ligable está dado por:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3)$$

Esta energía libre surge de los contactos como puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas entre la molécula ligable y algunos residuos específicos en la proteína. La naturaleza no-covalente de estos contactos hace que tanto la unión del ligable, como la activación del receptor sean procesos reversibles.

El otro elemento, la transición en la proteína que modifica su estado conformacional, es llamada transición (o transformación) alostérica. La transición alostérica se lleva a cabo entre dos conformaciones, llamadas estados alostéricos.



Las letras T y R se usan por razones históricas, ya que Monod *et al.* (7) pensaron en los estados como "tenso" y "relajado". En el equilibrio, las concentraciones de los estados T y R se describen por la expresión:

$$[R] / [T] = K \quad (5)$$

Aquí, la constante de equilibrio, K , es la de la transición alostérica, mientras que el cambio de energía libre está dado por la ecuación 3.

Aún no se entienden bien los procesos físicos relacionados con la transición alostérica. Se puede

pensar que involucran rotaciones sobre algunos enlaces de la cadena principal o de los radicales laterales de la cadena polipeptídica. También podemos considerar que algunos enlaces no-covalentes, como los puentes salinos, los puentes de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos se rompan, y formen nuevos enlaces durante la transición. El mismo tipo de enlaces no-covalentes juega un papel central estabilizando tanto la unión de la molécula ligable como la transición conformacional. Esencialmente, los ligables se mantienen en su posición por las mismas interacciones físicas que son responsables de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína. Esto significa que tanto la unión del ligable como la transición alostérica, pueden tener cambios de energía libre del mismo orden, permitiendo que un proceso influya al otro.

Simetría y cooperatividad. La oligomerización permite que las enzimas formen interacciones entre las subunidades que desembocan en fenómenos cooperativos.

Los argumentos de simetría tienen un papel central en el concepto de regulación alostérica. Los dos estados, T y R, difieren en su conformación y afinidad por los sustratos, sin embargo, dentro de cada estado las subunidades guardan una relación de simetría. En el modelo MWC, los oligómeros se mueven entre dos estados simétricos, ya sea R o T, y suponiendo una simetría estricta, un modelo matemático simple puede describir el comportamiento del sistema. En cambio el modelo KNF propone un modelo secuencial, formando una serie de intermediarios asimétricos entre los extremos simétricos (todos T o todos R). El modelo matemático en este caso es más complicado.

Las regulaciones alostéricas requieren una geometría molecular que permita la influencia de una subunidad sobre la otra, o mejor aún, de una subunidad al resto. Perutz resaltó que *a priori* existen pocos límites para los movimientos posibles, incluso para una transición entre dos estados simétricos. Debido a que todas las subunidades se mueven de manera similar con respecto a los ejes de simetría, la simetría general se mantiene durante la transformación alostérica.

Las subunidades de muchas enzimas alostéricas conforman dos anillos rígidos, que al asociarse alrededor de un eje que es perpendicular al eje de simetría de orden dos producen un complejo. La regulación alostérica ocurre por rotación de estos dos anillos y/o transmitiendo el movimiento a lo largo del eje. La Fructosa-1,6-bifosfatasa, un tetrámero con simetría, presenta grandes movimientos de este tipo. El tetrámero está formado por dos dímeros estables y la transición R a T involucra una rotación de 15° alrededor del eje de orden dos. La hemoglobina también se ajusta a este modelo, con sus dos pares de a-b rotando como unidades independientes.

Otras enzimas utilizan un movimiento de "tenazas" similar al que presentan los represores de la transcripción en bacterias. En estos represores, el efector se une en la interfase de las dos subunidades del dímero, haciendo que la molécula se flexione y ponga en una posición adecuada los elementos de unión al ADN. Un movimiento similar se observa en la regulación heterotrópica de algunas proteínas alostéricas con simetría dimérica. El efector se une en o cerca de la interfase dimérica, produciendo la flexibilización de las dos subunidades, lo cual genera cambios en la conformación que se propagan al sitio activo, que se puede encontrar muy lejos del sitio del efector.

Algunas consideraciones técnicas sobre la cristalografía

Resolución y función biológica. Tanto los biólogos como los bioquímicos que intentan entender la relación estructura-función de las proteínas, buscan obtener estructuras tridimensionales a la mayor resolución posible. El término "alta resolución" que se aplica a la estructura cristalina de algunas proteínas, por muchos años ha significado que los datos de difracción de rayos X permitieron una resolución cercana a 2 Å. Solamente en algunos casos era posible obtener datos completos con una resolución de más de 2 Å. Los avances tecnológicos recientes y el uso de los sincrotrones han modificado mucho la colecta de datos. No todos los cristales de proteína difractan con una resolución mayor a 2 Å, pero ahora es posible obtener una colecta completa de datos para un sorprendente número de moléculas (con un solo cristal y a esa resolución). El resultado de esto es un incremento dramático en el número de estructuras que se han refinado a resolución atómica (mejor que 1.2 Å) o casi atómica. Con estas resoluciones se obtiene una diferencia cuantitativa y cualitativa en el análisis cristalográfico que permiten una descripción anisotrópica de la posición de cada átomo en la estructura. En contraste, el afinamiento con una resolución menor no permitía más que afinamientos isotrópicos de los factores de temperatura.

Parámetros de desplazamiento isotrópicos y anisotrópicos. El poder que un átomo tiene para difractar los rayos X decrece con el aumento en el ángulo de difracción, debido al tamaño finito de la nube electrónica alrededor del núcleo. Para un número dado de electrones, entre más grande sea la nube de electrones ^{nota 2} más rápidamente cae el poder difractingo con el ángulo de difracción. Con el fin de tomar en cuenta este comportamiento de los átomos en un cristal, se debe agregar a la

contribución difracting de cada átomo un término dependiente del ángulo (f), que se suma para obtener las intensidades difractadas (F^2_{calc}). Esta corrección tiene la siguiente forma:

$$f = f_0 \exp(-2\pi^2 \langle u^2 \rangle \mathbf{h}^T \mathbf{h}) = f_0 \exp[-8\pi^2 \langle u^2 \rangle (\sin^2 \theta / \lambda^2)], \quad (1)$$

donde $\langle u^2 \rangle$ es el promedio al cuadrado de la amplitud de la vibración del átomo, \mathbf{h} es el vector del espacio recíproco, θ es el ángulo de difracción y λ es la longitud de onda de los rayos X. Si consideramos que de acuerdo a su posición y sus interacciones, un átomo puede estar más o menos "estabilizado" dentro de una molécula, entonces, la nube electrónica de un átomo vibrante, promediada en el tiempo, sería mayor que la de un átomo similar en reposo. Debido a que la magnitud de la vibración esta en función de la temperatura, el parámetro u se llama parámetro térmico o factor de temperatura. Esto es engañoso, ya que la deslocalización de la nube electrónica no es consecuencia solamente de la vibración térmica sino también de la localización estocástica (azarosa) de un centro atómico en la celda unitaria del cristal. El término correcto sería "parámetro de desplazamiento" (Trueblood *et al.*, 1996). En cristalografía de macromoléculas es más común reportar el parámetro relacionado $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$.

NOTA 2: Dado que la longitud de onda de los rayos X usados para determinar las estructuras tridimensionales es semejante a la longitud de los enlaces, es posible determinar las distancias entre los átomos y por tanto la forma de las nubes electrónicas existentes.

En la ecuación (1) se describe una nube electrónica que es uniforme en todas direcciones, por lo que el parámetro u se convierte en un parámetro de desplazamiento isotrópico asociado al átomo en cuestión. Pero los modos vibratorios de los átomos unidos no son isotrópicos, por lo que (1) es sólo una aproximación del comportamiento real de los átomos proteicos en el cristal. Para relacionar las intensidades difractadas con la dirección, se puede expandir el parámetro u a un tensor simétrico de 3×3

$$\begin{matrix} U^{11} & U^{12} & U^{13} \\ U^{12} & U^{22} & U^{23} \\ U^{13} & U^{23} & U^{33} \end{matrix}$$

El término corregido, ahora anisotrópico, se convierte en:

$$f = f_0 \exp(-2\pi^2 \langle u^2 \rangle \mathbf{h}^T \mathbf{U} \mathbf{h}).$$

Los seis términos independientes ($U^{11}, U^{12}, U^{13}, U^{22}, U^{23}, U^{33}$) del tensor, U^{ij} , representan el desplazamiento anisotrópico de este átomo. Describen la distribución probable de la densidad electrónica como una curva de Gauss tridimensional. Cuando se presenta esta distribución en una

superficie, en la cual la densidad electrónica tiene un valor fijo, se obtiene un elipsoide.

Número de datos, resolución y afinamiento. La complejidad de un modelo afinado está limitada por la cantidad de datos disponibles, o con mayor precisión, por el cociente entre el número de observaciones (los datos) y el número de parámetros a afinar en el modelo (la complejidad). Cualquier aumento en este cociente mejora la calidad del modelo estructural afinado, obteniendo una mejor estimación de los parámetros individuales en el modelo. En cristalografía el número máximo de observaciones depende de la calidad del cristal y el límite de resolución. Para los cristales de proteína, el número de observaciones normalmente es insuficiente para hacer un afinamiento libre del modelo. Para superar este problema, el modelo estructural se puede simplificar reduciendo el número total de parámetros en el modelo. Los beneficios de un modelo estructural simplificado es la base muchas técnicas cristalográficas, como el afinamiento de cuerpo rígido, las simetrías no cristalográficas (47) y el afinamiento torsional (48). Como alternativa, el número efectivo de parámetros en el modelo se pueden reducir imponiendo límites ("*restraints*") a los valores permitidos. Esta alternativa, propuesta por Konnert en 1974 (49), continúa siendo fundamental para tener éxito en muchos afinamientos de proteínas ^{nota 3}. Por supuesto, la precisión de un modelo simplificado o limitado depende de la validez de la simplificación y de los límites impuestos.

NOTA 3: De hecho, la propuesta de Konnert no cambia la relación datos-parámetros, ni los grados de libertad del modelo. Simplemente acota la variación de los parámetros para evitar una divergencia de las soluciones con respecto a la conformación química.

Por el contrario, en algunos casos afortunados, el cociente observaciones - parámetros se puede mejorar aumentando el número de observaciones. Por ejemplo, para pasar de una resolución de 2 Å a una de 1 Å, se requiere un aumento de ocho veces en el número de intensidades medidas (datos experimentales). El incremento en el número de observaciones mejora mucho la calidad y el detalle del modelo estructural, ya que permite incluir en el afinamiento algunos parámetros adicionales que describen con más detalle la estructura. En particular, permite la descripción de cada átomo con el grupo de seis parámetros anisotrópicos de desplazamiento (PAD). Esto incrementa el número total de parámetros en el modelo de cuatro (los tres parámetros de posición y el parámetro térmico) a nueve (los tres parámetros de posición más los seis parámetros térmicos). Al incluir los PAD se logran mejoras globales en el modelo, como reducir los valores R y R_{free} , "limpiar" la densidad electrónica residual en los

mapas y reducir los errores en la posición de los átomos. Además, permite analizar cuantitativamente las características locales (o globales) de la estructura, como vibraciones torsionales de las cadenas laterales o los movimientos globales de algunas zonas de la estructura. Por supuesto, al adicionar los PAD en el modelo se reduce nuevamente el cociente observaciones - parámetros, pero las mejoras en el modelo bien lo valen. Aún así, existe una zona (que Merritt llama "la zona gris") que cubre el intervalo entre 1.9 Å y 1.2 Å, en la cual existen dudas sobre si incrementar el número de observaciones es suficiente para justificar el aumento de parámetros en el modelo (44).

El aumento pobre en el cociente observaciones - parámetros que se logra en "la zona gris" puede ser sustentado poniendo límites a los PAD durante el afinamiento. Entre más observaciones existan para determinar los valores verdaderos de los PAD, menor la necesidad de limitarlos. Por lo tanto, en el extremo inferior de la zona gris (de 1.6 Å a 1.9 Å de resolución), el cociente observaciones - parámetros para un modelo anisotrópico con nueve parámetros por átomo, es casi el mismo que existe en muchas proteínas ajustadas isotrópicamente a resoluciones entre 2 Å y 2.3 Å de resolución. De hecho sólo el uso de límites geométricos estrictos (sobre x , y , z) permite que el modelo isotrópico sea afinado correctamente en esta faja de resolución (2.0 Å a 2.3 Å). Para lograr un ambiente equivalente en el extremo de "la zona gris" se requiere un grupo de restricciones ("*restraints*") sobre los parámetros térmicos, los cuales pueden ser retirados parcial o totalmente de acuerdo al comportamiento del afinamiento.

¿Existe un punto fino en cuanto a aplicar límites en el afinamiento del modelo con PAD?, es decir: ¿los límites se deben aplicar a cada parámetro individual o a alguna cantidad derivada de la unión de varios parámetros? Una posibilidad es emplear el parámetro llamado anisotropía neta de un átomo (A); este parámetro, propuesto por Merritt en 1999 (44), se define como el cociente entre el valor propio ("*eigenvalue*") mínimo y el máximo de una matriz 3 X 3 de parámetros anisotrópicos de desplazamiento. Si el cociente es 1.0 el átomo se comporta con un desplazamiento isotrópico (esférico), mientras que si el valor tiende a cero, se incrementan las características anisotrópicas (con una dirección claramente preferida). Un dato importante es que átomos con el mismo valor B (parámetro derivado de u y usado en los archivos PDB) pueden presentar valores claramente diferentes en A , los cuales pueden estar relacionados con direcciones preferentes de movimiento y con la función biológica) (Figura 3).

Figura 3

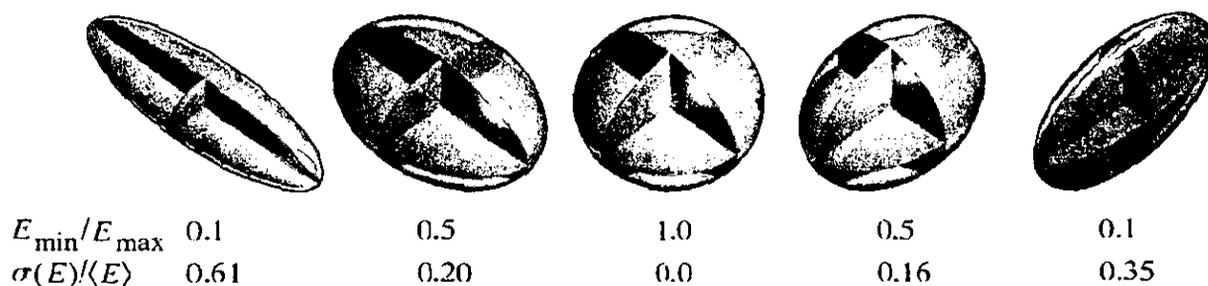


Figura 3: forma tridimensional que presenta un elipsoide anisotrópico con relación al valor de la anisotropía neta ($A=E_{\min}/E_{\max}$). Tomada de www.bmsc.washington.edu/parvati/parvati.html

Figura 4

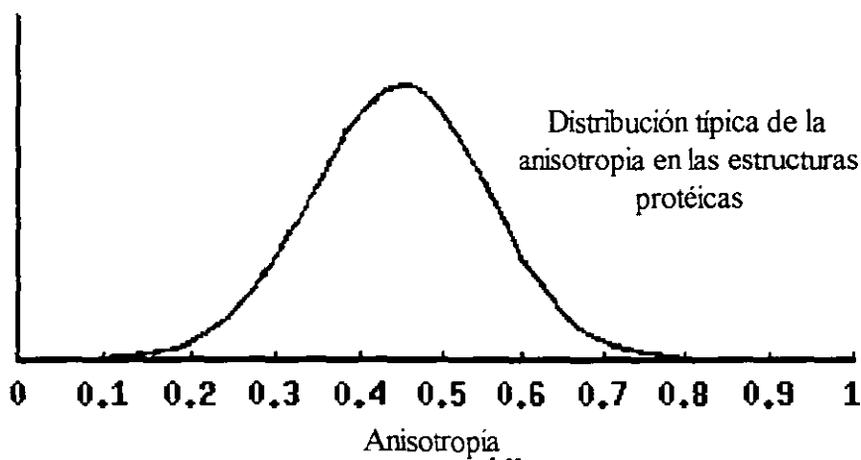


Figura 4: gráfica de la anisotropía neta contra la fracción de átomos que comparten este valor de anisotropía en una proteína correctamente afinada según el modelo anisotrópico. Tomada de www.bmsc.washington.edu/parvati/parvati.html

Cuando el valor de A se gráfica contra la fracción de átomos que en un modelo completo presenta un determinado valor de anisotropía se obtienen gráficas como en la figura 4. Donde normalmente se obtiene una curva de Gauss (o algo tendiente a una gaussiana). Cuando Merrit (44) tomó 67 coordenadas depositadas en el PDB, afinadas con un modelo anisotrópico y en el intervalo de resolución entre 1.2Å y 1.6Å, obtuvo las distribuciones de la figura 5.

Figura 5

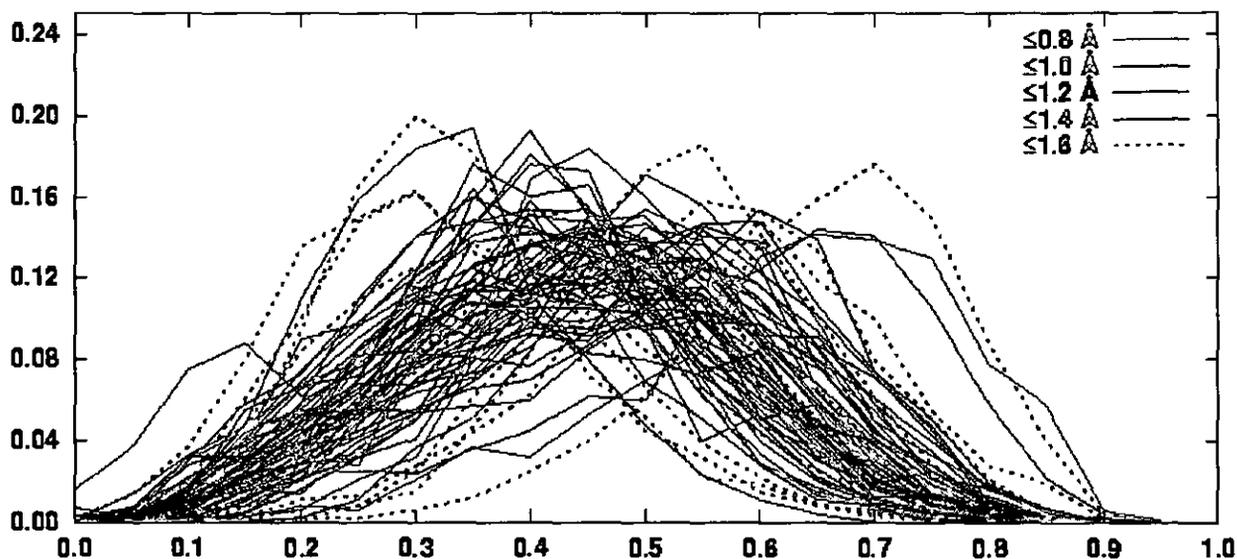


Figura 5: distribución de la anisotropía neta versus la fracción de átomos que comparten ese valor de anisotropía, usando 67 estructuras depositadas en el PDB (enero de 2001). Tomada de www.bmsc.washington.edu/parvati/parvati.html

Tras analizar las gráficas obtenidas y los cocientes datos - parámetros empleados en cada modelo, concluyó que aquellas estructuras con mejor relación datos - parámetros tienden a presentar distribuciones gaussianas con valores promedios de A entre 0.4 y 0.6. De hecho propone que si esto no se cumple se apliquen límites ("*restraints*") durante el afinamiento anisotrópico, los cuales mejoran la distribución anisotrópica. Pareciera que este tipo de análisis permite saber cuándo y cómo (con o sin "*restraints*") se puede aplicar un ajuste anisotrópico a un grupo de datos, pero, ¿no será que en vez de considerar sólo a la resolución, se debería considerar también como importante a la relación datos - parámetros como factor para decidir usar ajustes anisotrópicos?

Reemplazo molecular. Una forma de resolver el problema de la fase consiste en tener un modelo atómico, con el cual estimar las fases. Este modelo se puede obtener al conocer las estructuras relacionadas con la proteína problema, o incluso la misma proteína en otro sistema cristalino. Pero para construir un modelo atómico en una forma cristalina nueva, es necesario orientar el modelo y

posicionarlo en la nueva celda. El reemplazo molecular es la técnica que resuelve este problema.

El reemplazo molecular se puede usar para resolver una estructura cuando existe un modelo que represente una fracción razonable de la estructura en el cristal. Ya que los bancos estructurales (PDB o NDB) aumentan día a día, este método puede ser útil para un gran número de proteínas nuevas. Por supuesto, es también útil (con o sin variaciones o simplificaciones) para realizar estudios de complejos formados por proteínas cuya estructura fue determinada previamente.

El nivel de semejanza entre dos estructuras protéicas correlaciona con el nivel de identidad en la secuencia, lo que significa que se puede tener una buena idea de si un reemplazo molecular tendrá éxito o no antes de intentarlo. Como regla, un reemplazo molecular tendrá más posibilidad de éxito si el modelo es casi completo (número de residuos) en relación a la estructura nueva y comparten entre sí al menos un 25 - 40 % de identidad a nivel de secuencia, repartido aleatoriamente en toda la cadena. El problema se complica progresivamente mientras el modelo es menos completo o la identidad disminuye o se concentra en una sección de la secuencia.

Métodos basados en la función de Patterson o en la probabilidad: Los métodos tradicionales en el reemplazo molecular están basados en la función de Patterson. Estos métodos son aún usados casi universalmente. En contraste, los métodos basados en probabilidad están apenas desarrollándose. Probablemente jueguen un papel que tiende a aumentar, particularmente para casos difíciles.

La función de Patterson es importante ya que podemos calcularla sin información sobre las fases, por lo que es posible calcular una función de Patterson de un modelo y compararlo con otra generada a partir de datos experimentales. Entonces, si el modelo es orientado y colocado en la posición correcta con respecto a la celda nueva, los dos Patterson deben ser casi idénticos (o al menos similares). En esta simple aproximación, el problema del reemplazo molecular tiene seis dimensiones (tres parámetros para especificar la orientación y tres para la posición). Afortunadamente el mapa de Patterson puede ser dividido en partes que son sensibles a sólo algunos de esos parámetros. La estrategia más común consiste en analizar segmentos por separado, reduciendo el tamaño del problema.

Una manera de dividir el problema consiste en determinar primero la orientación (tres parámetros) y luego la translación (tres parámetros de posición). Ya que un mapa de Patterson es un mapa vectorial, los picos representan vectores entre los átomos de la celda unitaria (figura 6).

Figura 6

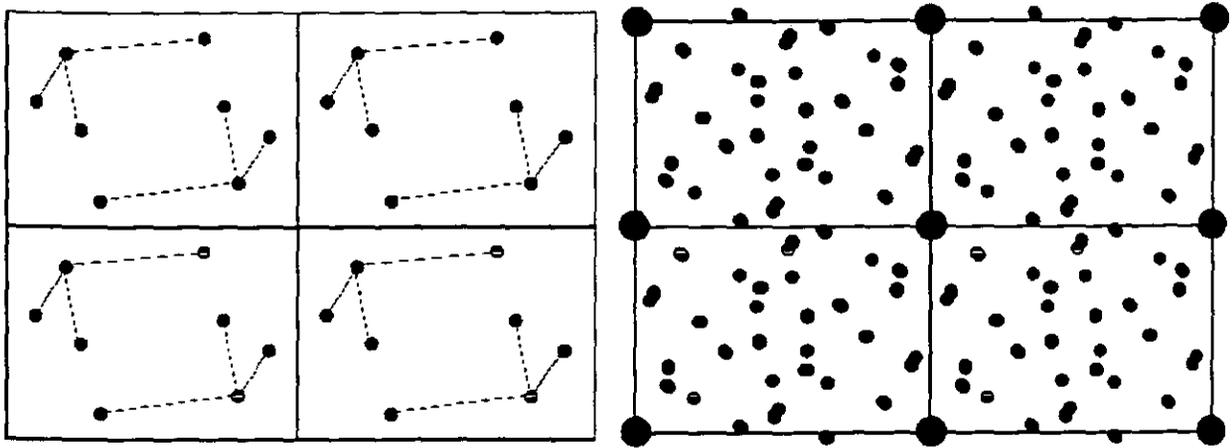


Figura 6: en la figura se ven los átomos en una celda unitaria (izquierda) y el mapa de Patterson generado a partir de las distancias entre átomos (derecha).

A pesar de que los vectores generados por moléculas del tamaño de una proteína son casi insolubles, la forma en que se acumulan pueden representar una "firma" de la estructura protéica. Los vectores en el mapa de Patterson pueden dividirse en categorías: vectores intra e intermoleculares. Los vectores intramoleculares (de un átomo a otro en la misma molécula), dependientes sólo de la orientación de la molécula y no por su posición en la celda unitaria, son usados en la función de rotación. Los vectores intermoleculares dependen tanto de la orientación como de la posición de la molécula, por lo que una vez que la orientación es conocida pueden ser usados en la función de translación.

La función de rotación. Esta función explota el hecho de que los vectores intramoleculares dependen de la orientación de la molécula y no de la posición en la celda unitaria. Es decir, cuando una molécula se traslada dentro de la celda unitaria los átomos dentro de la molécula se mantienen relacionados entre sí, y los vectores entre ellos se mantienen sin cambio.

El uso de vectores intramoleculares para orientar una molécula funciona comparando a la molécula en el cristal en una posición al azar con sus vectores intramoleculares.

Figura 7

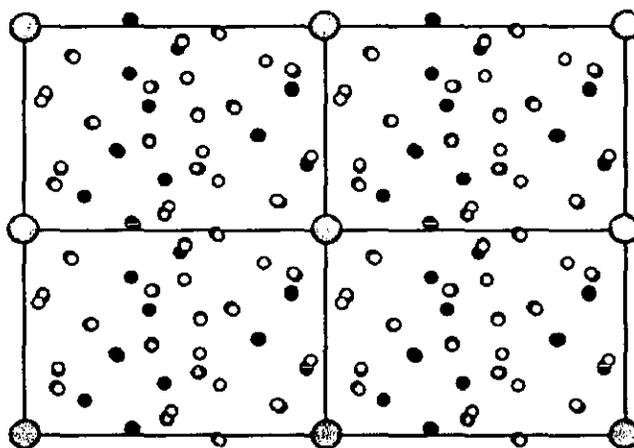


Figura 7: mapa de Patterson generado a partir de las posiciones atómicas de la figura 6. Los vectores intermoleculares se representan en azul claro.

Si la molécula rota, los vectores intramoleculares rotan en la misma forma. Entonces, es posible orientar el grupo de vectores para que ajusten con los picos en el mapa de Patterson.

En promedio los vectores intramoleculares son más cortos que los intermoleculares, por lo tanto la rotación puede ser calculada usando la parte del Patterson cercana al origen.

La función de traslación. Esta función compara dos grupos de vectores intermoleculares (que dependen de la posición de la molécula en la celda unitaria) con los observados en el Patterson. Por ejemplo, el modelo correctamente orientado se coloca en cualquier posición dentro de la celda unitaria. Partiendo de este modelo, es posible generar un grupo de vectores intermoleculares, los cuales son comparados con los generados a partir de los datos experimentales hasta lograr un ajuste que permita suponer que la molécula problema esta ahora en la misma posición que tiene el modelo (dentro de la celda unitaria).

Afinamiento. El objetivo principal del afinamiento consiste en generar mapas de densidad nuevos, que permitan examinar y corregir al modelo (manual o automáticamente). Los mapas provenientes del afinamiento son típicamente mejores que aquellos mapas iniciales que cuentan sólo con las fases experimentales, y siguen mejorando conforme mejora el modelo. Esto es particularmente cierto

si las fases experimentales son usadas en el afinamiento (como normalmente se hace). De los mapas generados durante al afinamiento resaltan dos tipos:

- 1) Mapas de densidad electrónica, " $2F_{obs} - F_{calc}$ "; estos muestran un estimado de la densidad electrónica para la estructura, es el mapa donde el modelo debe ser acoplado.
- 2) Mapas de diferencia, " $F_{obs} - F_{calc}$ ", estos mapas muestran el estimado de la diferencia entre los datos estructurales y el modelo. Idealmente, densidades positivas indican zonas donde deben agregarse átomos al modelo. Las densidades negativas muestran zonas del modelo que deben ser eliminadas, ajustadas, sometidas a revisión en sus parámetros térmicos o de ocupación. La existencia de pares positivos/negativos indican que los átomos del modelo se deben mover alternativamente entre estas dos posiciones, o bien que se necesita un ajuste fino en la posición de la cadena.

Durante los ajustes que se realizan en el proceso del afinamiento, es útil desplegar al mismo tiempo el mapa de $2fo-fc$, y los contornos positivos y negativos del mapa de diferencias. En general, los detalles en el mapa de diferencia muestran que algo está mal o faltando en el modelo, y el mapa de $2fo-fc$ dice qué hacer. En las etapas iniciales del afinamiento es importante usar el mapa experimental inicial o generar uno con al menos una sección del modelo faltante (mapas de zona omitida), para de esta manera evitar al máximo que el modelo converja a un modelo erróneo.

Es común que algunas zonas de la estructura estén pobremente definidas, y por lo tanto sea difícil (o imposible) mejorar el modelo. El mayor problema consiste en densidades presentes pero no interpretables, las cuales probablemente representen zonas de conformaciones múltiples sobrepuestas, y al momento no existen herramientas para solucionar el problema. Es usual encontrar zonas que ajusten perfectamente en el modelo seguidas de zonas pobres, es claro que estas áreas están fuertemente influenciadas por sus parámetros de desplazamiento, una solución consiste en hacer ajustes anisotrópicos (si se tienen suficientes datos), aunque el uso de conformaciones alternas basadas en los mapas de diferencia y los ajustes anisotrópicos, considero, no han sido exploradas lo suficiente.

Las moléculas de agua son una parte importante de la estructura: un grupo de aguas bien ordenadas contribuye más al poder dispersante sobre los rayos X que una zona de la proteína pobremente ordenada. Las moléculas de agua son claramente visibles en los mapas de densidad y, de manera particular, en los mapas de diferencia (al menos en resoluciones medias y altas). A resoluciones peores que 2.8 Å o 3.0 Å, las moléculas de agua no pueden colocarse de manera precisa en el modelo, sólo aquellas altamente conservadas y que siempre tienen que ver en las funciones biológicas como

cualquier otro residuo de la proteína. El factor residual R (R_{free}) es una buena herramienta para saber cuando la adición de aguas mejora o no al modelo, y también para saber a que nivel del procesamiento se pueden adicionar moléculas de agua al modelo, evitando así construir moléculas de agua en el lugar en que se pueden colocar otras moléculas como: moléculas unidas, cadenas laterales, iones, etc. De hecho siempre es mejor corroborar una a una las moléculas de agua adicionadas al modelo.

Durante y después del afinamiento, se pueden usar varios controles para encontrar errores en el modelo. Muchos de estos controles comparan al modelo con propiedades comunes de otras macromoléculas similares o moléculas pequeñas. Estas propiedades reflejan la energía de la conformación molecular, por lo que, normalmente, una región del modelo que se desvíe significativamente de los valores normales es errónea, o bien, con una conformación altamente energética y por lo tanto importante para la macromolécula ^{nota 4}. Valores que son limitados durante el afinamiento, como las distancias y los ángulos de enlace no son buenos parámetros de control, ya que son satisfechas automáticamente. Los ángulos de torsión, que no son generalmente limitados, pueden ser objeto de revisión.

NOTA 4: Probablemente la predilección de los estados energéticos menores es una necesidad funcional que fue mantenida debido a la presión evolutiva.

Pero, ¿cuando puede considerarse que un afinamiento ha concluido? La verdad es que el afinamiento puede extenderse todo lo que el cristalógrafo quiera. El objetivo es explicar todos los picos que se encuentre en los mapas de $2fo-fc$ y de diferencia, pero al ser esto casi imposible la mayoría de la gente afina *ad tedium*, o más formalmente hasta que se llegue a una convergencia.

Antecedentes sobre la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*

Esta sección trata de sintetizar los conocimientos previos sobre la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa, con el fin de establecer un lenguaje común básico que será utilizado durante esta tesis.

Estructura de la GlcN6P desaminasa. Se han determinado tres complejos de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* en su conformero R (12): uno de ellos está formado por la proteína unida a dos

iones fosfato (por monómero) uno en el sitio activo y otro en el alostérico (con una resolución de 2.1 Å); los otros dos son complejos de la enzima con su activador alostérico (GlcNAc6P) en el sitio alostérico y un ion fosfato en el sitio activo, determinada con una resolución de 2.4 Å y la enzima con el inhibidor competitivo (GlcNol6P) en el sitio activo y un ion fosfato en el sitio alostérico, determinada con una resolución de 2.4 Å. Las tres estructuras están depositadas en el PDB con los códigos 1dea, 1hot y 1hor (respectivamente).

En 1999 se reportó la estructura del conformero en su forma T, con una resolución de 2.3 Å (11). Encontrándose tanto el sitio activo como el alostérico vacíos (código PDB 1cd5).

El monómero de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* es una estructura típica α/β abierta formada por siete hebras β paralelas que constituyen una hoja β central rodeada de ocho hélices α y una hélice de doble vuelta 3_{10} (Figura 8). Una segunda hoja β anti-paralela de tres hebras aparece como continuación de la hebra β C por su C-terminal.

En general la topología del monómero de esta enzima se parece a un dominio de unión de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) modificado con tres segmentos adicionales: el N-terminal hasta el residuo 35, el C-terminal (residuos 243 a 266) y los aminoácidos 141 a 188. Un dominio de unión de NAD^+ consiste en una hoja abierta de seis hebras paralelas, formada por dos partes iguales con motivos estructurales β - α - β - α - β cada uno. A cada una de las partes iguales se les denomina motivo de unión del mononucleótido, debido a que cada mitad une uno de los nucleótidos del NAD. A esta estructura también se le conoce como plegamiento tipo Rossmann, en honor a Michael Rossmann, de la Universidad de Purdue, quien descubrió en 1970 este plegamiento en la lactato deshidrogenasa (50).

Dentro de las modificaciones que presenta la GlcN6P desaminasa en relación con un plegamiento tipo Rossmann, el N-terminal participa en la formación del sitio alostérico del hexámero, el segundo segmento formado por los residuos 141 a 188 contiene un asa que esta involucrada en el mecanismo catalítico y también tiene un motivo formado por la hebra B', hélice 5 y la hebra C'. Las hebras B' y C' forman parte de la hoja β anti-paralela. Los residuos 158 y 160 en la hebra B' son parte del sitio alostérico de la enzima, mientras que en la hélice 5, la arginina 172 es uno de los residuos de unión al sustrato. El C-terminal, contiene dos estructuras adicionales: el asa 243 a 250, involucrada en los contactos entre las subunidades, y la hélice 8. Cada mononucleótido del NAD^+ está formado por una ribosa, un fosfato y una base nitrogenada. Finalmente, y como resultado de estas diferencias, la GlcN6P desaminasa difiere de un dominio de unión de NAD^+ en que solo une un azúcar fosfatada, pero la forma

de unirla es similar.

Dos iones fosfato por monómero fueron identificados en la estructura depositada con el código ldea, uno de ellos está unido por un puente salino a la lisina 208 y la arginina 172, y también está conectado por puentes de hidrógeno al asa formada por los residuos 40 a 44 del sitio activo; el segundo fosfato está unido por un puente de hidrógeno al nitrógeno de la cadena principal del residuo 152 y al O γ de la serina 151 y está unido a través de puentes salinos a la arginina 158, a la lisina 160, y a su vez también se encuentra unido en la interfase entre los dos monómeros con el grupo amino N-terminal del monómero vecino (sitio alostérico).

Tabla 1

<i>Código PBD</i>	<i>Confórmero</i>	<i>Gpo. Espacial</i>	<i>Resolución</i>	<i>Ligables del Sitio Activo</i>	<i>Ligables del Sitio Alostérico</i>
ldea	R	R32	2,1Å	Ion fosfato	Ion fosfato
lhor	R	R32	2,4Å	GlcNol6P	Ion fosfato
lhot	R	R32	2,4Å	Ion fosfato	GlcNAc6P
lcd5	T	P6 ₂ 2	2,3Å	nada	nada

Tabla 1: las estructuras determinadas previamente (11 y 12) de la GlcN6P desaminasa de E. coli en sus formas R y T. Nótese que en las formas R, en ningún caso, alguno de los sitios (activo o alostérico) está libre de moléculas ligables. En estas estructuras se detectó que la movilidad de la tapa del sitio activo tenía fuertes cambios entre la forma R y la forma T. Esto generó la hipótesis inicial de un componente entrópico en la transformación alostérica.

Figura 8

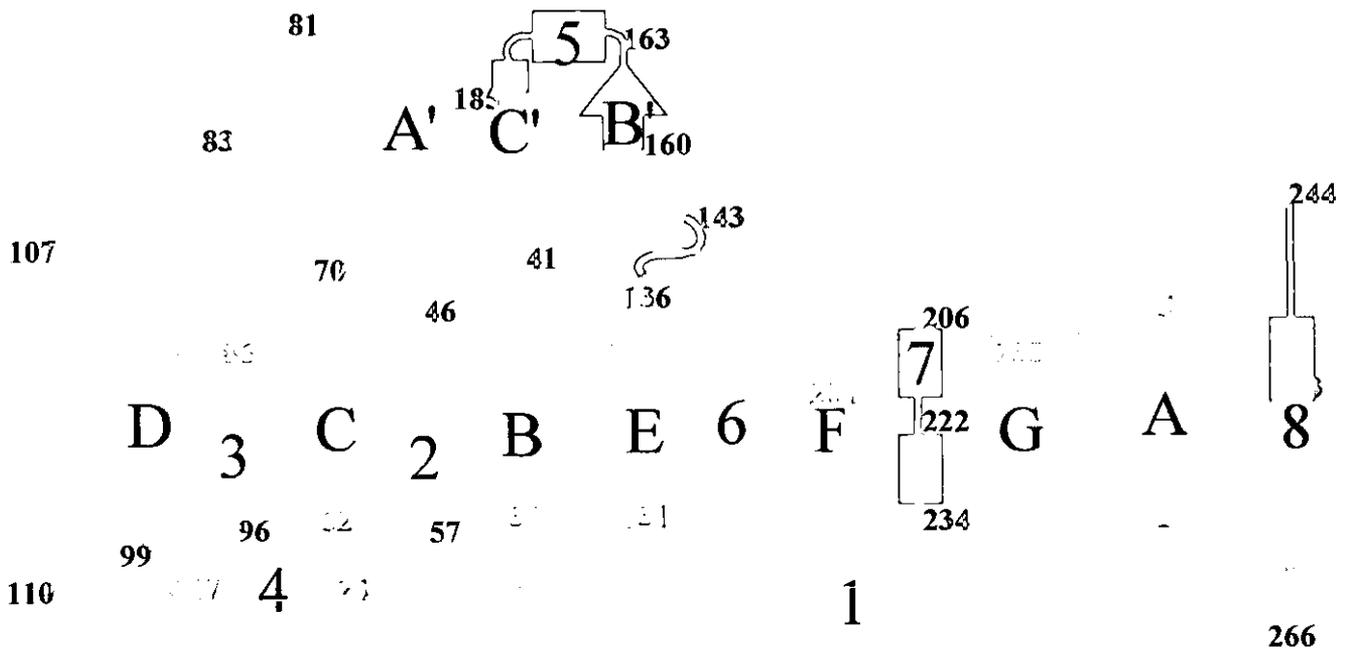


Figura 8: la GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli*, se puede dividir estructuralmente en 2 zonas generales: la zona interna y la zona externa. La zona interna (en azul) es responsable de la mayoría de los contactos inter-monoméricos del hexámero funcional y consta de tres segmentos: un motivo hélice-asa-hélice (residuos 207 a 233) que une el hexámero en la zona del eje de orden 3, un asa-hélice que establece los contactos inter-monoméricos cerca del eje de orden 2 (residuos 244 a 253) y una vuelta que esta unida por puentes de hidrógeno al fragmento anterior (residuos 137 a 143). Los residuos restantes (residuos 1 a 136, 144 a 206, 234 a 243 y 254 a 266) forman la zona externa (amarillo), la cual (a diferencia de la zona interna) rota durante la transformación alostérica. La tapa del sitio activo, un subgrupo de la zona externa esta en color magenta. Arriba se ve un diagrama de topología de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, en la cual 7 hojas β -paralelas (D, C, B, E, F, G y A) están rodeadas por 8 alfas hélices (1 a 8), dando lugar a una típica estructura a/b abierta, que, en este caso, tiene además 3 hebras en una hoja β -anti-paralela (A', C' y B'). A la derecha se ve la estructura tridimensional de un monómero en su forma R (Agradezco a Rodrigo Arreola Alemón por cederme la figura de la topología).

Figura 9

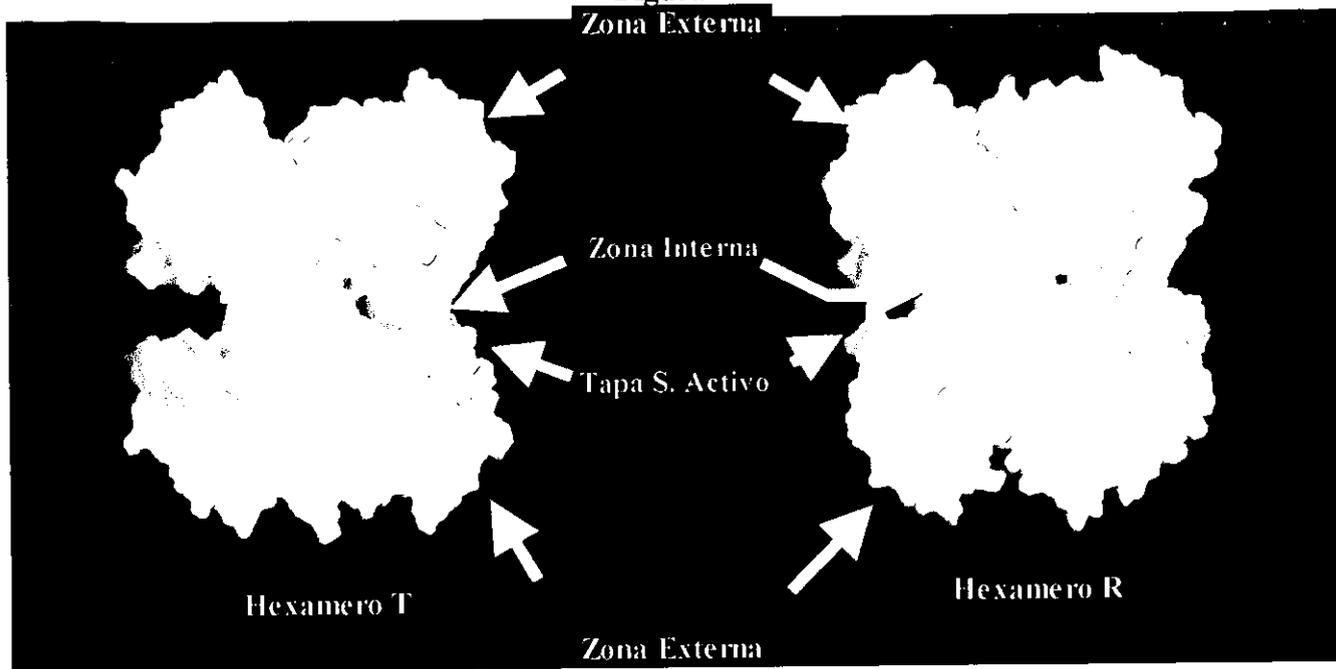
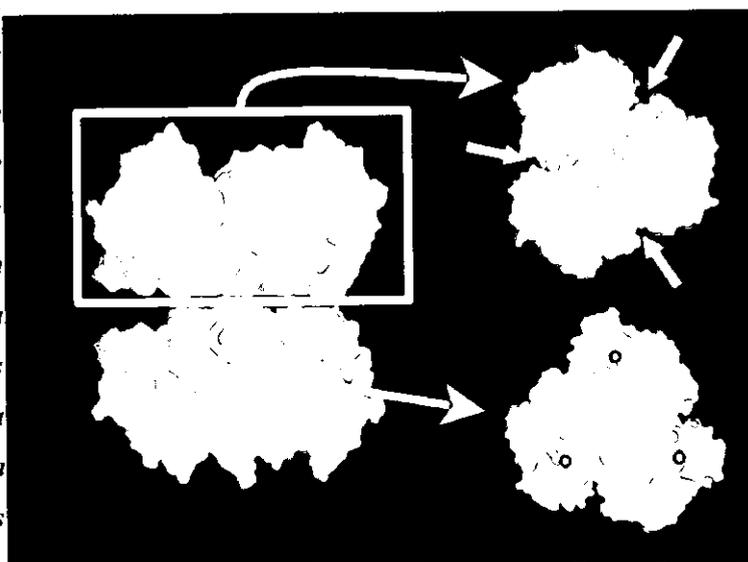


Figura 9: la GlcN6P desaminasa de E. coli forma una unidad funcional formada por un homo-hexámero. Al ser ésta una enzima alostérica existen dos estados oligoméricos: la forma T (poco afin al sustrato) y la forma R (afin al sustrato). En esta enzima la transformación alostérica T a R mantiene los contactos de la zona interna (azul), pero produce una rotación de 13° de la zona externa (amarillo).

Figura 10

Figura 10: la estructura homo-hexamérica de la GlcN6P desaminasa de E. coli es fundamental para su función alostérica y por tanto para su comportamiento cooperativo. En la figura se ve el hexámero (forma R) con el eje de simetría 3 paralelo al plano de la figura (izquierda) y con el eje perpendicular al plano de la figura (derecha). En esta última se observan dos puntos de vista: desde el solvente (derecha arriba) y desde la zona interna (derecha abajo). En estas vistas, se observan los sitios activos (puntos rojos) y los alostéricos (flechas



verdes). El hexámero está arreglado como un dímero de trímeros con un eje cristalográfico de orden 3 y tres ejes de orden 2 perpendiculares al eje de orden 3, obteniéndose una simetría interna 32.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Proponer un modelo estructural para la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*, que explique tanto los procesos de transformación alostérica homotrópica como heterotrópica, así como el papel de la flexibilidad molecular sobre el alosterismo y la función biológica. Con los datos generados se pretende evidenciar los componentes estructurales que determinan la oligomerización y el alosterismo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar las estructuras cristalográficas del conformero R de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* en presencia de las siguientes moléculas ligables del sitio activo: D-Fructosa 6-fosfato, 2-desoxi-2amino D-glucitol-6-fosfato, ion fosfato y metil amonio.
2. Determinar las estructuras cristalográficas del conformero R de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* en presencia de las siguientes moléculas ligables del sitio alostérico: N-acetil-D-glucosamina 6-fosfato.
3. Determinar la estructura cristalográfica del conformero T de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* con una resolución superior a 2.3Å, y ver si es posible encontrar estructuras de los conformeros T con las siguientes moléculas ligables: Fructosa 6-fosfato y 2-desoxi-2amino D-glucitol-6-fosfato.
4. Determinar las estructuras cristalográficas de los conformeros R y T de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* de la proteína mutante Y254F.
5. Determinar las estructuras cristalográficas de los conformeros R y T de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* de la proteína mutante K160E.
6. Explorar la probable función que tiene la deslocalización de los residuos de la tapa del sitio activo (residuos 158 al 187) sobre la transformación alostérica y la función biológica.
7. Explorar la relación que tienen los residuos previos y posteriores a la tapa del sitio activo (residuos 158 al 187), con la posible existencia de un engranaje de propagación de la transformación alostérica al hexámero.
8. Analizar la relación entre la vibración atómica y la transformación alostérica y su función biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación: En 1984 fue reportado por Calcagno *et al.*, tanto el proceso de purificación, como la caracterización fisico-bioquímica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (16), pero este método sufrió algunas modificaciones como resultado de la determinación de la estructura secundaria por espectroscopia de dicroísmo circular (37).

La enzima pura fue cedida por el laboratorio del Dr. Mario L. Calcagno. Al momento de afinar la estructura es muy importante conocer la "historia" de la muestra, ya que como suele suceder en cristalografía de rayos - X, las proteínas tienen "memoria", es decir, densidades electrónicas que se pueden deber a las moléculas pequeñas adicionadas durante la purificación.

La enzima se purificó a partir de un cultivo (en fermentador, medio Luria y ampicilina a 100 µg/ml) de la cepa de *Escherichia coli* K12, previamente transformada para sobreexpresar el gen de la GlcN6P desaminasa. Las células, colectadas durante la fase de crecimiento exponencial, son centrifugadas y sonicadas. El extracto se fracciona con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 - 50% de saturación) a pH 7.9 y 4°C. El precipitado se disuelve en un amortiguador de fosfato de potasio (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) 0.2 M pH 7.5, obteniéndose una solución con 5 - 20 mg/ml de proteína. La solución se aplica directamente a una columna con una matriz de afinidad de N-ξ-amino-n-caproil-D-glucosamina-6-fosfato agarosa (1ml de gel por cada 10 mg de proteína pura esperada). La columna se lava con el mismo amortiguador, mientras que la proteína se eluye por medio de un gradiente lineal (con seis volúmenes de columna) de 0 a 5 mM de GlcNAc6P preparada en la misma solución de fosfatos.

La enzima eluye como un pico de actividad y de proteína único y electroforéticamente homogénea. La solución de desaminasa se precipita entonces con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (55% de saturación) y se conserva a 4°C hasta utilizarse en los ensayos cinéticos y de cristalización.

Ya en nuestro laboratorio, la enzima se dializa exhaustivamente, a 4°C y con agitación continua contra 5 cambios de un amortiguador HEPES 100 mM, pH 7.0 (cada uno con una relación volumen de solución de proteína : volumen de solución amortiguadora de 1:1000). El tiempo entre cada cambio fue de cuatro, doce, cuatro, cuatro, cuatro y doce horas, los cuales son necesarios para eliminar de la solución tanto GlcNAc6P como iones sulfato, que se unen a los sitios activo y alostérico de la misma manera que los iones fosfato lo hacen (11). La solución final de enzima es entonces usada para los

ensayos de cristalización.

Cristalización y determinación estructural. Los distintos conformeros T y R de la GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli*, incluyendo muestras nativas y mutadas, fueron cristalizados utilizando el método de gota colgante con gotas de 5 a 10 μl conteniendo 15 mg/ml de proteína. En todos los casos la morfología del cristal, su tamaño y el tiempo de crecimiento fueron iguales a los previamente reportados (11 y 12). A continuación se enuncian las condiciones de cristalización de los cristales difractados, determinados y afinados en esta tesis:

1. **Cristales forma R nativa con GlcNAc6P (2.20 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (Acetato de Sodio) 2.8 M, HEPES 100 mM pH 7.5 ^{nota 5}.

2. **Cristales forma R nativa con GlcNAc6P (1.73 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ (Tartrato de Sodio y Potasio) 0.75 M, HEPES 200 mM pH 7.5 y GlcNAc6P 50 μM .

3. **Cristales forma R nativa con Fru6P (2.15 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (Acetato de Sodio) 2.8 M, HEPES 100 mM pH 7.5 y Fru6P 27 mM.

4. **Cristales forma R nativa con Fosfatos y MetAmonio (1.67 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (solución reguladora de pH) 1.5 M pH 8.0 y metilamina 100 μM .

5. **Cristales forma T nativa remojados en Fru6P (2.20 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (Acetato de Sodio) 2.45 M, HEPES 100 mM pH 6.8. Posteriormente, los cristales ya formados se sumergieron en una solución con Fru6P 10 mM durante un día y se expusieron a los rayos X.

6. **Cristales forma T nativa remojados en GlcNol6P (2.70 Å de resolución):** fueron crecidos a 4°C en $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (Acetato de Sodio) 2.60 M, HEPES 200 mM pH 7.5. Posteriormente, los cristales ya formados se sumergieron en una solución con GlcNol6P 100 μM durante un día y se expusieron a los rayos X.

7. **Cristales forma T (1.90 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (Acetato de Sodio) 2.45 M, HEPES 100 mM pH 6.8.

8. **Cristales forma T nativa remojados en MetAmonio (2.50 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (Acetato de Sodio) 2.45 M, HEPES 100 mM pH 6.8. Posteriormente, los cristales ya formados se sumergieron en una solución con MetAmonio 100 mM y se expusieron a los rayos X.

9. **Cristales forma R mutante K160E con GlcNol6P (2.35 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en C₄H₄KNaO₆ (Tartrato de Sodio y Potasio) 0.95 M, HEPES 100 mM pH 7.0 y GlcNol6P 0.6 mM.

10. **Cristales forma T mutante K160E (2.20 Å de resolución):** fueron crecidos a 4°C en C₂H₃O₂Na (Acetato de Sodio) 2.275 M, HEPES 100 mM pH 7.0.

11. **Cristales forma R mutante Y254F con GlcNAc6P (2.10 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en C₄H₄KNaO₆ (Tartrato de Sodio y Potasio) 1.0 M, HEPES 100 mM pH 6.8 y GlcNAc6P 5 mM.

12. **Cristales forma R mutante Y254F con GlcNol6P (2.60 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en C₄H₄KNaO₆ (Tartrato de Sodio y Potasio) 0.9 M, HEPES 100 mM pH 7.2 y GlcNol6P 5 mM.

13. **Cristales forma T mutante Y254F (2.20 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en C₂H₃O₂Na (Acetato de Sodio) 1.75 M, HEPES 100 mM pH 6.8

14. **Cristales forma T mutante F174A (2.02 Å de resolución):** fueron crecidos a 18°C en C₂H₃O₂Na (Acetato de Sodio) 2.90 M, HEPES 100 mM pH 7.0 y GlcNAc6P 5 mM.

NOTA 5: en el caso de la prueba número 1, la presencia de GlcNAc6P fue una sorpresa, ya que no se adicionó en la prueba de cristalización. Sin embargo, el proceso de diálisis al que se sometió la enzima fue "corto", por lo que la presencia de la molécula de activador alostérico es debida a un mal proceso de diálisis.

Los datos de difracción fueron obtenidos en las líneas 7-1 y 9-1 del *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL, Estados Unidos)*, en la línea de cristalografía de macromoléculas en el *Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Brasil)* y en el *Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas (LAUE, Instituto de Química-UNAM, México)*. En todos los casos la colecta de datos se realizó a temperatura de nitrógeno líquido (entre 103 y 113 K), mientras que el crioprotector empleado, en todos los casos, contenía las mismas sales, a las mismas concentraciones que la solución "madre" (en que creció el cristal), pero disueltos en sacarosa o trehalosa al 35% (peso-volumen). Los datos fueron colectados usando un detector MAR "image plate" (MAR reseach, Hamburgo), para los datos obtenidos en el SSRL y el LNLS, y un R-Axis II "image plate" (Rigaku Inc.), para los datos colectados en el LAUE. Se utilizaron los límites de resolución máximos para cada caso en particular (entre 1.67 Å y 2.70 Å). Los datos fueron integrados utilizando los programas Xdisplay y Denzo (HKL Reseach Inc.) (26 y 27) y escalados con los programas rotaprep, sortmtz, scala, *agrovata* (versiones anteriores), truncate y mtz2various de la suite CCP4 (28). Las estructuras fueron determinadas utilizando como modelos iniciales las estructuras previamente reportadas de la GicN6P

desaminasa de *E. coli* en sus formas T y R (11 y 12), sin hacer búsquedas de rotación, ni de translación, debido a las similitudes de las celda unitarias. El afinamiento inició, en todos los casos, con una minimización rígida con los programas X-Plor, CNS 0.5 o CNS 1.0 (21 y 29). Para consultar los detalles del afinamiento ver la tabla 5.

¿Afectan los contactos cristalinos la conformación o la flexibilidad molecular? Para todas las estructuras determinadas en la forma R de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, incluso las proteínas mutantes K160E y Y254F, los cristales mostraron las simetrías propias del grupo espacial R32 (ver estructuras 1,2,3,4, 9, 11 y 12) con un dímero en la unidad asimétrica. En contraste, en las formas T, los cristales pertenecen al grupo espacial P6₃22 con sólo un monómero en la unidad asimétrica. En el caso de las formas R, la RMSD de la superposición entre los C α de cada monómero de la unidad asimétrica, resulta en 0.305 Å (con 266 átomos C α en el cálculo), para la estructura con los sitios activos y alostéricos ocupados con una resolución de 2.15 Å (ver estructura 3), y 0.494 Å (con 266 átomos C α en el cálculo), para la estructura con sólo el sitio alostérico ocupado a 2.20 Å de resolución (ver estructura 1). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la ocupación del sitio activo o con el empaque cristalino. Existen algunos trabajos que sugieren la posibilidad de discriminar los cambios conformacionales debidos a la unión de moléculas de aquellos asociados con el empaque cristalino de cada monómero de la unidad asimétrica (22). Con el fin de encontrar el posible origen de las diferencias entre monómeros, analizamos los contactos de cada monómero en el empaque cristalino. Algunos contactos son responsables de deformaciones en el primer monómero de la unidad asimétrica (de hasta 0.70 Å). En contraste, en el segundo monómero, se observan muy pocos contactos cristalinos que no producen deformaciones en la cadena principal de más de 0.10 Å. Concluimos que el primer monómero de la unidad asimétrica presenta contactos cristalográficos que producen pequeñas distorsiones en la cadena principal. Algunos de los contactos con las partículas vecinas incluyen los residuos de la tapa del sitio activo (residuos 158 al 187), los cuales están comunicados con sus vecinos por medio de moléculas de agua. Por otro lado, el segundo monómero no presenta contactos cristalinos mediados por moléculas de agua en la tapa del sitio activo. Por lo tanto en la sección de resultados, discusión y conclusiones, siempre compararemos las estructuras en estado T con el segundo monómero de la unidad asimétrica en la forma R, ya que, al no presentar contactos cristalinos importantes, se comportaría de una manera similar a la que presenta en solución.

Intentos de obtener una estructura T con moléculas ligables. Si se utiliza el modelo MWC para explicar el comportamiento alostérico de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, se obtiene un valor para el parámetro c de 0.02. Ya que el valor es distinto de cero, suponer la existencia de moléculas en forma T con moléculas ligables en el sitio activo ayuda a que los datos cinéticos se ajusten mejor con el modelo MWC (7). Desde un punto de vista cristalográfico intentamos obtener esta estructura T con ligantes en el sitio activo. Los intentos de cristalización que incluían en el líquido "madre" cualquier ligable del sitio activo, como Fru6P o GlcNol6P, siempre resultaron en cristales de forma R, incluso a bajas concentraciones de estas moléculas. A muy bajas concentraciones, sólo obtuvimos cristales forma T sin ligables en el sitio activo (ni alostérico). Dados estos resultados cambiamos la estrategia, tomamos cristales forma T, crecidos sin ligables en el líquido madre, y los colocamos en soluciones iguales a las de su líquido "madre", pero con Fru6P 10 mM o GlcNol6P 100 μ M (proceso conocido como remojado, sumergido o "soaking"). En ambos casos los cristales no perdieron sus propiedades de difractar a los rayos X. Para los cristales forma T remojados con GlcNol6P, los datos de difracción fueron colectados y el afinamiento resultó en un modelo de la proteína en su forma T a una resolución de 2.8 Å (ver estructura número 6). Esta estructura no presentó ninguna molécula de GlcNol6P, ni en el sitio activo ni en el alostérico, incluso a pesar de que a 2.8 Å de resolución podría ser difícil visualizar partes de la molécula unida, ni siquiera los grupos fosfato se observan (por su densidad electrónica deberían de poder verse a esta resolución). En el caso del cristal remojado en Fru6P 10 mM, el modelo final a una resolución de 2.20 Å resultó también en una estructura T sin moléculas unidas (ver estructura número 5).

Construcción de conformaciones alternas para la tapa del sitio activo de la forma R heterotrópica. La estructura tridimensional de la forma R con el sitio activo libre y una molécula de GlcNAc6P unida al sitio alostérico a una resolución de 1.73 Å (ver estructura número 2) fue determinada y afinada utilizando el programa CNS (21). Se encontró una molécula de ácido tartárico unida al sitio activo de la primera molécula en la unidad asimétrica, mientras que el segundo monómero presenta un sitio activo libre de moléculas ligables. Cuando el segundo monómero de la estructura determinada a 1.73 Å de resolución (ver estructura 2) se empalma sobre la misma estructura resuelta con 2.20 Å de resolución, el RMSD resultante es de 0.222 Å (con 240 átomos C α en el cálculo)

excluyendo del cálculo las zonas con diferencia de posición mayores a 0.50 \AA . Los fragmentos excluidos se localizan en la tapa del sitio activo y asas ("loops") vecinas a ésta, todos con PAD mayores de 60 \AA^2 . En este punto, y usando los datos a 1.73 \AA de resolución, un mapa de *fo-fc* presentó picos negativos sobre la conformación de la tapa del sitio activo afinada originalmente para estos datos, y densidad positiva cerca de la conformación correspondiente a la estructura determinada a 2.20 \AA de resolución. Esto significa que la tapa del sitio activo, en la forma R con sólo el sitio alostérico ocupado, tiene al menos dos conformaciones alternas. Incluyendo estas dos conformaciones en el afinamiento a 1.73 \AA , una tercera conformación alterna claramente aparece en un mapa de *fo-fc* (Figura 11). Este tipo de búsqueda también se aplicó a la forma R con los dos sitios ocupados y determinada a una resolución de 1.65 \AA (ver estructura 4), pero sólo encontramos una conformación en la tapa del sitio activo.

Figura 11



Figura 11: en la estructura determinada a 1.73 \AA de resolución de la forma R con sólo el sitio alostérico ocupado, fue posible afinar tres conformaciones alternas para la tapa del sitio activo. En la figura se ven tres puntos de vista del mapa de diferencia (*fo-fc*, picos a 3σ en verde y -3σ en rojo), los cuales muestran la clara existencia de tres conformaciones alternas para la tapa del sitio activo.

Afinamiento anisotrópico de la forma T a 1.9 \AA de resolución. El modelo final de la estructura cristalina de la forma T resuelta con 1.90 \AA de resolución (ver estructura 7), fue utilizado para realizar un nuevo afinamiento, con los mismos datos y las mismas reflexiones en el grupo prueba del R_{free} que en el afinamiento original con CNS (21), pero usando el programa Shelxl-97 (30). Primero se realizó una minimización energética con ajuste isotrópico, seguida de un grupo de ciclos de afinamiento anisotrópico sólo de los átomos de azufre, ciclos de minimización energética isotrópica con CNS para

reducir el sobre-afinamiento. Finalmente, utilizando el mismo grupo de moléculas de agua generados en CNS, todos los átomos (excepto hidrógenos) fueron afinados anisotrópicamente. Este último afinamiento se realizó usando ciclos cortos para reducir los problemas que podría causar la relación parámetros/datos. Debido a las condiciones extremas en que el afinamiento anisotrópico fue realizado, se corrieron dos pruebas independientes en las que sólo se afinaron anisotrópicamente la tapa del sitio activo o el carboxilo terminal (residuos 245 a 266), mostrando la misma dirección y valores que el modelo anisotrópico que incluye a todos los átomos.

Afinamiento de las conformaciones alternas para la tapa del sitio activo y el carboxilo terminal de la forma T con una resolución de 1.9 Å. Partiendo del modelo afinado con 1.9 Å de resolución, incluyendo sus PAD isotrópicos (ver estructura 7), construimos tres conformaciones alternas para los residuos 159 a 186, usando dos metodologías: 1) el conformero original más dos conformaciones alternas desplazadas 0.8 Å en la dirección del eje anisotrópico máximo, a ambos lados de la estructura original, 2) como en 1, pero esta vez desplazadas en una dirección perpendicular al eje mayor. El primer caso produjo una reducción en los valores de R y de R_{free} , mientras que el segundo caso produjo un aumento en ambos ^{nota 6}. Adicionamos tantas conformaciones alternas hasta generar un mapa de *fo- f_c* sin picos interpretables a 3 σ . Cada vez que se adiciona una conformación alterna al modelo, un ciclo (en CNS) que incluye minimización (minimise), ajuste de PAD (b-individual), ajuste de ocupaciones (q-refinement), recocido a 500 K (annealing), ajuste de PAD (b-individual), ajuste de ocupaciones (q-refinement) y finalmente un ajuste de PAD (b-individual), hasta que generamos un total de 7 conformaciones alternas. Si consideramos 5 conformaciones alternas, la tapa del sitio activo presenta una ocupación total del 86%, pero si se consideran a las 7, el porcentaje de ocupación llega a 96%. El mismo proceso se aplicó al carboxilo terminal, obteniendo 3 conformaciones alternas para los residuos 254 a 266. En cada uno de los pasos mencionados los valores de R y R_{free} disminuyeron ligeramente. Resalta que los valores de ocupación (q) para cada conformación alterna son independientes de la cantidad de conformeros incluidos en el modelo.

NOTA 6: Los valores de R (R_{free}) para la estructura afinada sin conformaciones alternas en la tapa fueron de 0.2212 (0.2397). En el caso de tres tapas alternas en dirección del eje anisotrópico mayor, los valores fueron de 0.2159 (0.2362). En el caso de tres tapas alternas en dirección perpendicular al eje anisotrópico mayor, los valores fueron 0.2389 (0.2501).

Tabla 2

RMSD en Å		ESTRUCTURA 3 Forma R nativa Sitio activo ocupado Sitio alostérico ocupado Resolución 2.15Å	ESTRUCTURA 2 Forma R nativa Sitio activo libre Sitio alostérico ocupado Resolución 1.73Å (afinado con una conformación en la tapa del sitio activo)	ESTRUCTURA 2 Forma R nativa Sitio activo libre Sitio alostérico ocupado Resolución 1.73Å (afinado con tres conformación en la tapa del sitio activo)	ESTRUCTURA1 Forma R nativa Sitio activo libre Sitio alostérico ocupado Resolución 2.20Å	ESTRUCTURA 9 Forma R Mut.K160E Sitio activo ocupado Sitio alostérico libre Resolución 2.30Å	RMSD entre conformeros R en Å
ESTRUCTURA 7 Forma T nativa Resolución 1.90Å	0	0	0.234 (240 Cα) 74-83, 109-117, 144-146, 185 y 263-266.	0.240 (239 Cα) 74-83, 108-117, 144- 146, 185 y 264-266.	0.078 (266 Cα)	0.231 (260 Cα) 261-266.	ESTRUCTURA 3 Forma R nativa Sitio activo ocupado Sitio alostérico ocupado Resolución 2.15Å
ESTRUCTURA 5 Forma T nativa Resolución 2.20Å	0.124 (266 Cα)	0	0	0.110 (257 Cα) 77-83, 145 y 177.	0.212 (240 Cα) 74-83, 109-117, 144-146, 185 y 263-266.	0.224 (227 Cα) 71-83, 107-117, 143-146, 161, 178, 184-186 y 260-266.	ESTRUCTURA 2 Forma R nativa Sitio activo libre Sitio alostérico ocupado Resolución 1.73Å (afinado con una conformación en la tapa del sitio activo)
Código PDB1CD5 Forma T nativa Resolución 2.30Å	0.193 (237 Cα) 80, 112, 164-180 y 257-266	0.216 (238 Cα) 80, 112, 165-180 y 257-266	0	0	0.222 (240 Cα) 74-83, 108-117, 144-146 y 264-266.	0.227 (225 Cα) 73-83, 108-117, 140-149, 176, 185- 186 y 260-266.	ESTRUCTURA 2 Forma R nativa Sitio activo libre Sitio alostérico ocupado Resolución 1.73Å (afinado con tres conformación en la tapa del sitio activo)
ESTRUCTURA 10 Forma T Mut.K160E Resolución 2.10Å	0.168 (235 Cα) 80-83, 161-184 y 264-266	0.173 (239 Cα) 80, 161-183 y 264- 266	0.218 (229 Cα) 77, 112, 161-184 y 256-266	0	0	0.231 (259 Cα) 260-266.	ESTRUCTURA1 Forma R nativa Sitio activo libre Sitio alostérico ocupado Resolución 2.20Å
RMSD entre conformeros T en Å	ESTRUCTURA 7 Forma T nativa Resolución 1.90Å	ESTRUCTURA 5 Forma T nativa Resolución 2.20Å	Código PDB1CD5 Forma T nativa Resolución 2.30Å	ESTRUCTURA10 Forma T Mut.K160E Resolución 2.10Å		0	ESTRUCTURA 9 Forma R Mut.K160E Sitio activo ocupado Sitio alostérico libre Resolución 2.30Å

Tabla 2: Las sobrexposiciones de Cα fueron realizadas con el programa O (34) utilizando primero un empalme preliminar (LSQ-EXP), optimizándolo después (LSQ-IMP) e incluyendo en los ciclos de cálculos de RMSD solo aquellos átomos con distancias a su átomo correspondiente en la estructura con la que se compara menores a 0.5 Å. Con esta metodología generamos una lista de Cα que se encuentran fuera del intervalo de 0.5 Å y que no son considerados en los cálculos de RMSD en el último ciclo. Este método fue usado en el caso de comparaciones entre formas R (arriba a la derecha) y formas T (abajo a la izquierda). En la tabla las intersecciones entre la columna de una y la fila de otra estructura muestra su valor de RMSD, el número de átomos usados en el último ciclo de cálculo del RMSD y la lista de residuos excluidos del cálculo. En el caso de las comparaciones entre los conformeros R, se utiliza solo al segundo monómero de la unidad asimétrica, ya que este no presenta contactos cristalinos con los vecinos en el cristal.

Simetrías no cristalográficas. En el caso particular de la estructura de la proteína mutante Y254F con GlcNol6P afinada a 2.60Å de resolución (ver estructura 12) el número de reflexiones colectadas es de 15901. Si consideramos que una forma R de GlcN6P desaminasa de *E. Coli* tiene un dímero en la unidad asimétrica (grupo espacial R32), entonces existen 4184 átomos en ella (cada monómero tiene 266 residuos y 2092 átomos, sin considerar átomos de hidrógeno). Si al afinar el modelo, a cada átomo se le determina su posición (x,y,z) y su PAD, entonces en la unidad asimétrica, se determinarían 16736 parámetros. Si sólo se cuenta con 15901 reflexiones es imposible intentar afinar al modelo. Si embargo, dentro de la unidad asimétrica, existe una relación de simetrías no cristalográfica (SNC) entre ambos monómeros, así que se calculó la matriz de roto-translación entre ambas con el programa O (34), y se trabajó sólo con un monómero y su matriz de SNC. De esta manera se determinan solo 8368 parámetros por celda unitaria, a los que se les aplica la matriz de SNC para generar la unidad asimétrica. Con este método se pierde información sobre el comportamiento vibratorio real, ya que el monómero afinado no es en realidad el promedio entre los dos monómeros que existen en el cristal, además se pierde la información que dan las pequeñas diferencias entre los dos monómeros de la unidad asimétrica.

Proteínas mutantes Y254F, F174A y K160E. Las tres proteínas mutantes se obtuvieron por mutagénesis oligonucleótido-dirigida usando el método de Kunkel con las modificaciones de Sambrook (38). El gene *nagB* (que codifica para la GlcN6P desaminasa de *E. coli*) se inserta en el vector pTZ18-R (vector de cadena sencilla). Se verificó la secuencia de los fágémidos que portan a la mutación y del gene completo. Los plásmidos que llevan a la mutación fueron empleados para transformar una cepa Δ *nag* de *E. coli* IBPC590, la cual es también Δ *lacI* y expresa a la desaminasa de una manera constitutiva. En el caso de las proteínas mutantes Y254F y F174A, la enzima se purificó por medio de cromatografía de afinidad, usando GlcNAc6P (el activador alostérico) como intercambiador en una columna de ECH-Sefarosa ligada a GlcNAc6P. Para la enzima mutante K160E, dado que la mutación modifica las características electrostáticas del sitio alostérico, no es posible usar la columna de afinidad, en su lugar, la enzima se purificó por medio de cromatografía de intercambio iónico usando un HPLC, variando el pH y el tipo de gradiente de despegue. En todos los casos la pureza de las preparaciones se verificó con geles de "SDS-PAGE" y FPLC con una columna Superdex-200 (Pharmacia) equilibrada con acetato de potasio 100 mM, Tris-HCl 75 mM pH 7.5. En todos los casos las enzimas mutantes

resultaron hexaméricas y estables. En el caso de todas las enzimas mutantes, el grupo del Dr. Mario Calcagno (Facultad de Medicina, UNAM), gentilmente nos proporcionó las enzimas puras y precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En particular agradecemos a Samuel Lara González, Ismael Bustos Jaimes, Miriam Altamirano y Laura I. Alvarez Añorve, por las proteínas mutantes y la purificación de las mismas.

Cristalización de la proteína mutante F174A. Al inicio de esta tesis se tenían pruebas para formular la hipótesis de que la tapa del sitio activo y su comportamiento vibratorio tienen un papel importante en la catálisis y en el comportamiento alostérico de la GlcN6Pdesaminasa. Con esto en mente y analizando las estructuras tridimensionales existentes se propuso que la fenilalanina 174 era fundamental para estabilizar a la tapa del sitio activo. Para probar esto se mutó la fenilalanina en alanina. Se realizaron las pruebas de cristalización con ligantes del sitio activo y el alostérico, por separado y juntos, y en todos los casos, excepto con fosfatos, la morfología cristalina y las estructuras determinadas resultaron ser formas T. En el caso del uso de fosfatos, aparecen cristales bidimensionales en forma de placas hexagonales, los cuales no han difractado.

Tabla 3

<i>Condiciones de cristalización</i>	<i>Morfología</i>
Acetato de sodio (2.1 M, 2.3 M, 2.5 M, 2.8 M y 2.9 M), HEPES 100 mM, pH 7 y GlcNAc6P (5 mM, 20 mM y 100 mM)	Cristales T
Acetato de sodio (2.1 M, 2.3 M, 2.5 M, 2.8 M y 2.9 M), HEPES 100 mM, pH 7 y GlcNol6P (5 μM , 20 μM , 50 μM y 100 μM)	Cristales T
Acetato de sodio (2.1 M, 2.3 M, 2.5 M, 2.8 M y 2.9 M), HEPES 100 mM, pH 7, GlcNol6P 5 μM y GlcNAc6P 5 mM.	Cristales T
Acetato de sodio (2.1 M, 2.3 M, 2.5 M, 2.8 M y 2.9 M), HEPES 100 mM, pH 7, GlcNol6P 50 μM y GlcNAc6P 50 mM.	Cristales T
Acetato de sodio (2.3 M, 2.5 M, 2.8 M y 2.9 M), HEPES 100 mM, pH 7 y Fru6P (5 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM).	Cristales T
Regulador de fosfatos 2 M pH (7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0)	Cristales T
Regulador de fosfatos 4 M pH (7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0)	Cristales T
Acetato de sodio (2.0 M, 2.3 M, 2.5 M, 2.7 M y 2.9 M), HEPES 100 mM, pH 7	Cristales T

Tabla 3: en el caso de la enzima silvestre, para obtener una forma R se usan concentraciones de 5 mM en el caso del activador alostérico (GlcNAc6P), 5 μM del inhibidor competitivo (GlcNol6P, ligable al sitio activo),

la mezcla de ambos, 5 mM de Fru6P (a 20 mM la Fru6P se une en los dos sitios, activo y alostérico), o bien fosfatos 300 mM (el ion fosfato por si solo produce la transformación alostérica), uniéndose en ambos sitios. En la enzima mutante F174A nunca se pudo lograr morfologías cristalinas distintas a la de la forma T.

Figura 12



Figura 12: la morfología característica de los cristales de las formas R nativas, las proteínas mutantes Y254F y K160E de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (arriba, izquierda); morfología obtenida con fosfatos en la enzima mutante F174A (abajo, derecha); morfología característica de los cristales de las formas T nativas, proteínas mutantes Y254F, F174A y K160E de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (arriba, derecha).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación entre el grupo amino terminal y las propiedades alostéricas. Los cristales de la GlcN6P desaminasa en su forma R, en presencia de GlcNAc6P (ver estructura 1) se crecieron en condiciones poco ortodoxas. Para la cristalización se requirió dializar la enzima exhaustivamente, con el fin de retirar las sales y el activador alostérico. La diálisis emplea por lo menos 72 horas y 5 cambios de regulador de pH. Este proceso fue diseñado para evitar la presencia de los iones sulfato durante la cristalización ya que estos se unen a los sitios activo y alostérico como lo hace el ion fosfato. En la estructura que hablamos, el proceso de diálisis sólo tomó 8 horas con dos cambios de regulador de pH (1:1000). Esta proteína se cristalizó usando acetato de sodio como precipitante y sin adicionar el activador alostérico. La morfología de los cristales obtenidos corresponden a la forma R (ver figura 12). Se determinó la estructura usando el programa CNS (21), la cual mostró un grupo espacial R32 con un dímero en la unidad asimétrica, como ocurre comúnmente en la forma R. En el sitio alostérico encontramos un pico de densidad electrónica, en el lugar en el que el ion fosfato se une, pero la densidad formaba un anillo de seis miembros. Cuando se añadió un modelo de GlcNAc6P a los sitios alostéricos del dímero de la unidad asimétrica, los parámetros de afinamiento cristalográfico bajaron de $R=26.6$ ($R_{\text{free}}=28.8$) a $R=24.6$ ($R_{\text{free}}=26.7$). Por el contrario, el sitio activo no presentó ningún pico de densidad que se pueda relacionar con la presencia de algún ligable en el cristal. La RMSD de la superposición de $C\alpha$ entre esta estructura y la de la forma R con el sitio activo y el alostérico ocupados con Fru6P (ver estructura 3) fue de 0.078 \AA (ver tabla 2). Ambos cristales crecieron con el mismo precipitante, y los patrones de difracción se colectaron en la línea 7-1 del SSRL. Sin embargo, la distribución de los factores de temperatura es diferente, en particular en la tapa del sitio activo (figura 13). La presencia de las moléculas de GlcNAc6P en el cristal, incluso después de haber diluido a la enzima 10^6 veces y tras dos cambios de la solución de regulador de pH, uno cada 4 horas, el ligable adicionado en el proceso de purificación aún se encuentra en el cristal. Por lo tanto, la unión entre la enzima y su activador alostérico resulta ser bastante fuerte. al menos en las condiciones en las que creció el cristal. Si consideramos una K_i en un orden milimolar, los resultados obtenidos pueden sustentar la existencia de modificaciones en los residuos involucrados en la unión de la enzima y el activador. Se ha demostrado que el ion fosfato puede, por sí solo, producir la transformación alostérica (12). Por lo tanto, los residuos involucrados en esta unión (que son la Arg158, Lys160 y la Ser151 de

una subunidad y el N-terminal de la otra subunidad), pueden ser los responsables de las propiedades descritas. Como se ha demostrado, el grupo amino del N-terminal une al ion fosfato con un puente de hidrógeno neutro a pH 7.0 (41). De hecho, se ha propuesto que la protonación del grupo amino del N-terminal es responsable de la pérdida de cooperatividad homotrópica que presenta la enzima a pH bajos (41). A pH 6, la enzima se comporta como si existiera principalmente en el estado R, o en un estado cercano a este. La enzima despliega su cooperatividad homotrópica máxima en el intervalo de pH de 7.7 a 8.0 a 30°C (41). Con nuestros resultados, proponemos que el colapso de la cooperatividad homotrópica a un pH menor a 7.7, está relacionado con la protonación del grupo amino y con la acción de la molécula de GlcNac6P como un "ligable pegajoso" (24 y 25).

Figura 13

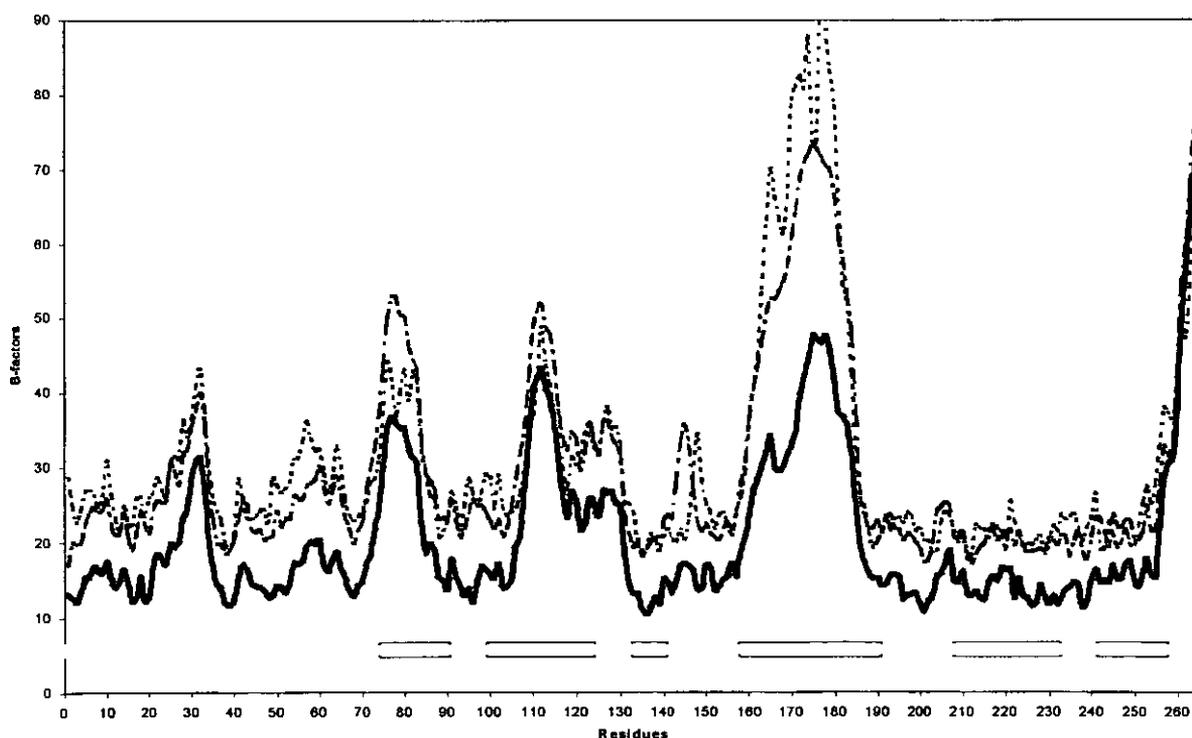
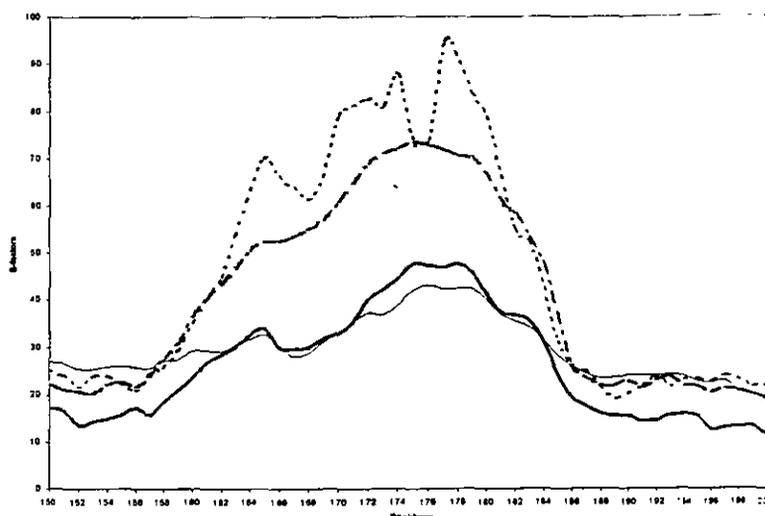


Figura 13: La gráfica muestra la distribución de los factores de temperatura a lo largo de la secuencia de la GlcN6P desaminasa de E. coli. Las estructuras graficadas son: la forma R con los dos sitios ocupados (línea gruesa), la forma R con el sitio alostérico ocupado (línea punto línea) y la forma T (línea punteada). Las tres estructuras fueron determinadas a partir de cristales con tamaños similares a resoluciones casi idénticas y difractados con el mismo crioprotector en la línea 7-1 del SSRL a la temperatura del nitrógeno líquido. La gráfica de la derecha muestra un acercamiento a la tapa del sitio activo de las mismas estructuras de la figura

de la derecha con la adición de la proteína mutante Y160E en su forma R. El código de colores es: amarillo, para la zona externa; azul, para la zona interna y magenta, para la tapa del sitio activo y asas vecinas.



Contactos cristalinos y vibración atómica. Un análisis de la flexibilidad molecular entre formas R con distintas ocupaciones de su sitio activo y alostérico (con tamaños de cristal similares, colectados en las mismas condiciones, con el mismo crioprotector en la línea 7-1 del SSRL y considerando al segundo monómero de la unidad asimétrica) nos permite observar un comportamiento anómalo. Como se ve en la tabla 4, en el caso de la estructura con ambos sitios ocupados, la diferencia entre la vibración atómica de las tres zonas no tiene diferencia significativa. Pero en el caso de la estructura con el sitio activo libre, es claro que la tapa del segundo monómero vibra mucho más que la del primer monómero. Más aún existe una correlación entre aumento de vibración en la tapa del sitio activo y disminución de la vibración en la zona externa. Dicho en otras palabras, si la tapa del sitio activo es "sujetada", ya sea por contactos cristalinos o por la ligadura de moléculas en el sitio activo, su vibración atómica se reduce, sin embargo hay una relación directa entre la vibración de la tapa y la de la zona externa de la enzima. Esto nos hace pensar que la unión del sustrato reduce la vibración de la tapa, por lo que la vibración atómica parece tener un papel central en la función biológica de la enzima. Como se verá más adelante, tenemos más pruebas que sustentan esta afirmación.

Tabla 4

Factores de Temperatura promedio	Zona interna (residuos 137 a 143, 207 a 233 y 244 a 253)	Tapa del sitio activo (residuos 162 a 185)	Zona externa (residuos 1 a 136, 144 a 161, 186 a 206, 234 a 243 y 254 a 266)
2 sitios ocupados, monómero 1 (estructura 3)	14.49Å ²	31.76Å ²	20.91Å ²

2 sitios ocupados, monómero 2 (estructura 3)	14.30Å ²	38.37Å ²	16.67Å ²
Sitio activo libre, monómero 1 (estructura 1)	21.40Å ²	46.77Å ²	31.30Å ²
Sitio activo libre, monómero 2 (estructura 1)	20.97Å ²	62.23Å ²	24.93 Å ²

Tabla 4: comparación de los promedios de los factores de temperatura de la zona interna, zona externa y tapa del sitio activo entre los monómeros 1 y 2 de la unidad asimétrica en los cristales R (con ambos sitios ocupados y sólo el alostérico ocupados).

Figura 14

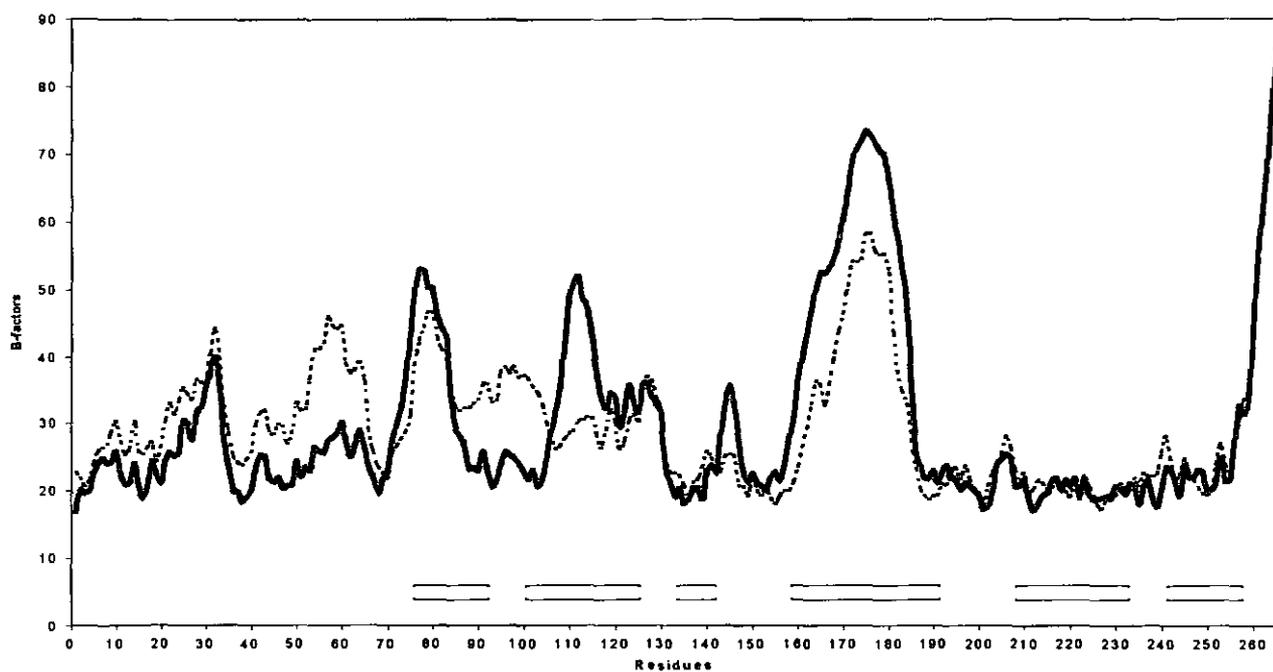


Figura 14: gráfica de los factores de temperatura de ambos monómeros de la unidad asimétrica de la GlcN6P desaminasa en su forma R con solo el sitio alostérico ocupado (estructura 1) contra el número de residuo. La línea punteada muestra al monómero 1, mientras que la línea llena representa al monómero 2. Nótese que al reducirse la vibración en la tapa del sitio activo, aumenta en otras secciones de la estructura.

Fru6P: ruta catabólica y un probable activador alostérico alternativo. Los cristales de la forma R de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, con ambos sitios ocupados con Fru6P, fueron resueltos con una resolución de 2.15 Å (estructura 3). La concentración de Fru6P empleada (27 mM), ampliamente excede a la Km determinada para el sustrato en la reacción reversa de la enzima (~2 mM)(42). La ausencia de amonio, "congela" al sustrato en el sitio activo, evitando la conversión de

Fru6P a GlcN6P. En el modelo final, la estructura general de la molécula es similar a otras previamente resueltas con ambos sitios ocupados por iones fosfato, o por el GlcNol6P y la GlcNAc6P (12). Un análisis general de su comportamiento vibratorio muestra a la estructura menos móvil de esta tesis. De hecho, la tapa del sitio activo tiene un factor de temperatura promedio de 38.37 \AA^2 para todos los átomos. El análisis del sitio activo muestra una molécula de Fru6P en su forma abierta, el grupo fosfato presenta contactos directos entre sus átomos de oxígeno y N Gly43, N Thr44, Ogl Thr44 y Nz Lys 208, y mediados por moléculas de agua con N Asn140, N Gly 142, O Thr 41 y Oδ1 Asn 170. El átomo O5 de la Fru6P tiene contacto directo con Nε2 His 143 y por medio de moléculas de agua con Od1 Asn 170. El átomo O4 de la Fru6P, interactúa por medio de moléculas de agua con O Thr 41, el O3 con N y O Ala 145, y finalmente, el O1 y O2 forman puentes de hidrógeno con Oδ1 y Oδ2 Arg 72. La posición de la Fru6P en el sitio activo es la misma que presenta el inhibidor competitivo (GlcNol6P), apoyando la función propuesta para el asa 41 a 44 (unión del ion fosfato), el residuo H143 (abrir y cerrar el anillo del azúcar) y el residuo D72 (intercambiar protones durante la catálisis). La GlcN6P desaminasa une a la GlcN6P en su forma cerrada, sin embargo en la reacción reversa no es claro si la enzima une a la molécula de Fru6P en su forma abierta o cerrada. La estructura resuelta muestra que la Fru6P se une a la enzima en su forma abierta. Esto se sustenta con otros experimentos que mostraron que la enzima es incapaz de ligar moléculas con anillos de cinco miembros (42), y la construcción de un modelo de la Fru6P en su forma cíclica, sobre el modelo cristalográfico, que muestra que el volumen del sitio activo no puede contener a la forma cerrada de la Fru6P (figura 16). Entonces, la reacción reversa de la enzima debe estar limitada por la tasa de apertura espontánea en solución de la Fru6P (aproximadamente 20 s^{-1}), misma conclusión a la que llegó el grupo del Dr. Calcagno en una aproximación cinética (42). El análisis del mapa de densidad electrónica, desde las primeras etapas del afinamiento, mostró la existencia de otra molécula de Fru6P unida esta vez al sitio alostérico. La molécula de Fru6P en el sitio alostérico también se une en una forma abierta, además, cuando la Fru6P se sobrepone con el activador alostérico (GlcNAc6P), cada átomo de oxígeno de la Fru6p tiene casi la misma posición que los átomos del activador, incluso en el grupo fosfato (Figura 15). Por lo tanto, al menos a 27 mM, la Fru6P puede actuar como activador alostérico de la enzima. Incluso, y dado la complementariedad encontrada, es posible que en condiciones fisiológicas, la Fru6P funcione en algunos casos como activador alostérico. Esta afirmación se sustentaría en otro hecho experimental, la cooperatividad disminuye cuando se estudia el comportamiento de la GlcN6Pdesaminasa en la dirección Fru6P a GlcN6P (42).

Figura 15

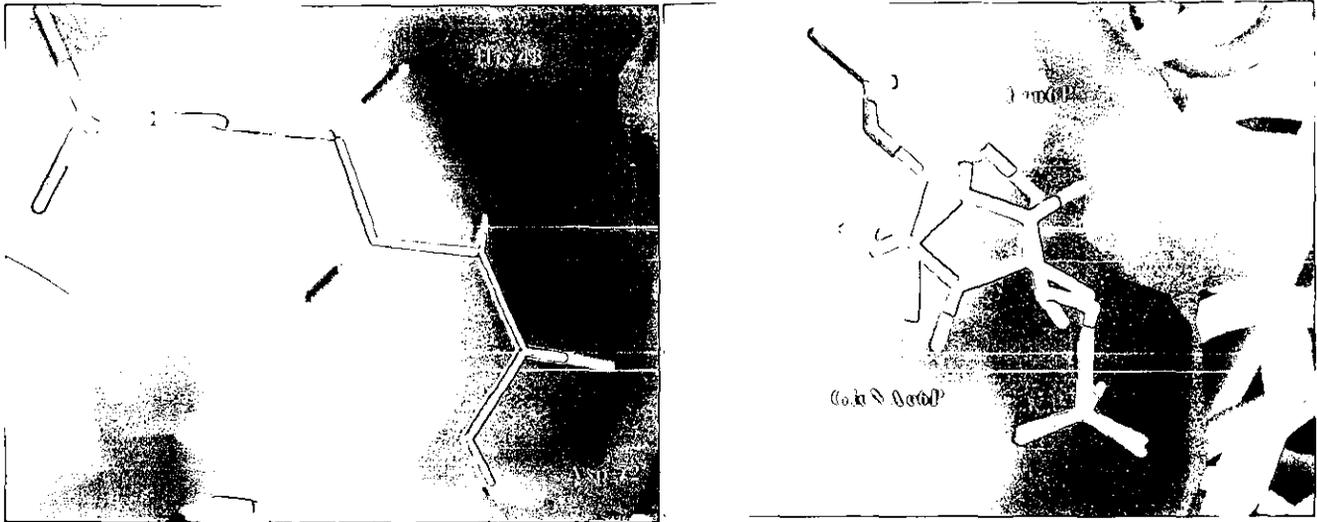


Figura 15: la molécula de Fru6P se une en una forma abierta al sitio activo de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (izquierda). A la derecha se ve el sitio alostérico y la superposición del activador alostérico (GlcNAc6P, cíclico) y la molécula de Fru6P (abierta) encontrada en la estructura 3. Resalta el hecho de que en el caso del sitio alostérico la Fru6P "mimetiza" todas las posiciones polares del activador.

Figura 16

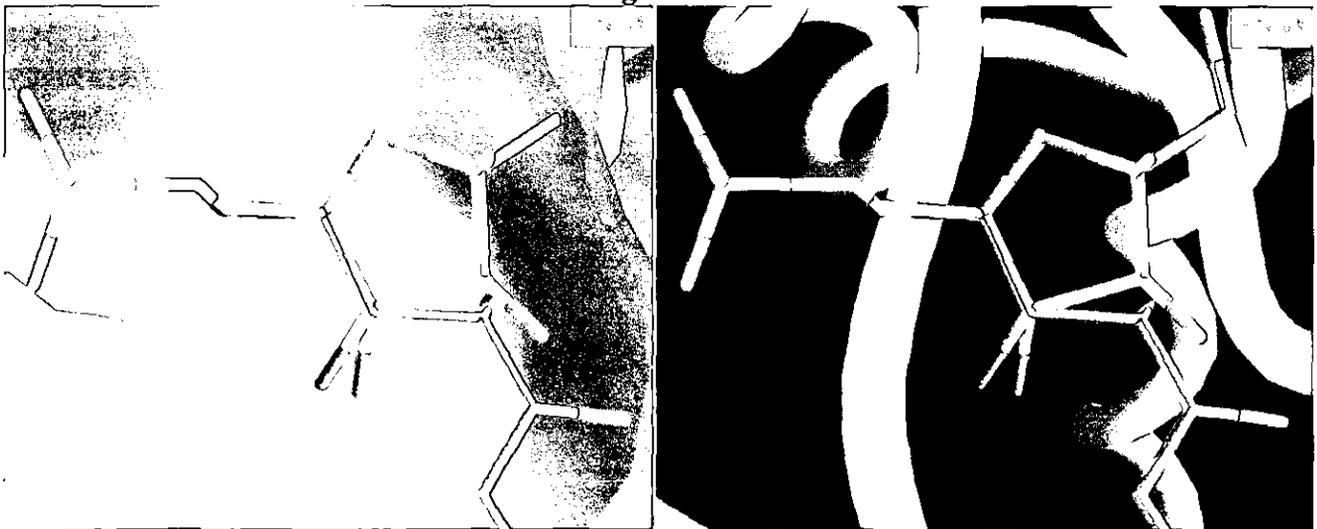


Figura 16: se construyó un modelo de la Fru6P en su forma cerrada y se superpuso al modelo cristalográfico determinado. Como se ve no hay espacio en el sitio activo de la enzima para permitir la entrada de la molécula de Fru6P en su forma cerrada, esto implicaría que el residuo catalítico H143 se desplazara 5 Å de su posición.

Comportamiento de los valores B isotrópicos: cambios vibratorios asociados a la unión del sustrato. Con el fin de realizar una comparación conformacional y vibratoria entre los conformeros T y R, utilizamos estructuras (estructuras 1, 3, y 5) que fueron determinadas bajo las mismas condiciones de colecta, exposición, uso de criopreservador y límites de resolución similares (a partir de cristales de tamaño similar). Una superposición de $C\alpha$ muestra que las mayores diferencias entre las posiciones de la cadena principal corresponden a zonas con factores de temperatura mayores de 35 \AA^2 (ver tabla 2 y figura 13). En particular, los factores de temperatura de la tapa del sitio activo disminuyen cuando la enzima forma complejo con el sustrato. La vibración en la tapa del sitio activo del conformero T (libre de moléculas ligables) es la más alta de todas. Cuando la magnitud de estas vibraciones es comparada con la de la forma R con sólo el sitio alostérico ocupado, la vibración en la tapa disminuye ligeramente. Pero en el caso de una forma R con ambos sitios ocupados, la vibración se reduce de $\sim 75 \text{ \AA}^2$, en la forma R con sólo el sitio alostérico ocupado, a $\sim 45 \text{ \AA}^2$. Es importante observar que también la estructura R con ambos sitios ocupados claramente produce una reducción general de los factores de temperatura a lo largo de toda la estructura (ver figura 13). En relación a este último punto, la línea base de los factores B está a $\sim 10 \text{ \AA}^2$, mientras en las restantes estructuras esta línea base está a $\sim 18 \text{ \AA}^2$. Este mismo efecto se observa también en las tres estructuras previamente resueltas de la forma R, que fueron colectadas a 4°C (tabla 1).

Intentamos crecer cristales de una forma R con sólo el sitio activo ocupado, ya que esta estructura nos permitiría encontrar la dependencia entre el cambio vibratorio en la tapa del sitio activo y la unión del activador alostérico. A pesar de concienzudos intentos no tuvimos éxito en obtener dicho cristal. En este punto, la proteína mutante K160E era una opción. La enzima mutante K160E produce un cambio en la superficie electrostática afectando a un residuo central en la unión del activador alostérico a su sitio (Figura 23). Su modelo final en la forma R, colectado, determinado y afinado en las mismas condiciones que las otras estructuras de esta sección (estructura 9), presenta un comportamiento vibratorio casi idéntico al de la enzima silvestre en su forma R con ambos sitios ocupados (Figura 13), pero con una línea base a $\sim 18 \text{ \AA}^2$. Esto significa que la flexibilidad de la tapa del sitio activo puede ser reducida sólo por la unión de moléculas al sitio activo. Un fenómeno similar se observa en la fructosa 1,6-bisfosfatasa: una sección estructural de la enzima (en este caso un asa) es altamente móvil en la forma T y casi fija en la forma R. Este cambio también está directamente relacionado con la unión del sustrato a la enzima (43).

Transformación alostérica y desplazamiento isotrópico. En un trabajo anterior (11) se presentó a la transformación alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* como una rotación con eje perpendicular al eje cristalográfico c^* . Como ya describimos antes, la estructura de la forma T presenta la movilidad más alta, tanto en la zona externa como en la tapa del sitio activo, las cuales podrían estar relacionadas con algunas propiedades de la transición alostérica. Con esto en mente, intentamos encontrar un probable centro de rotación de la transición alostérica con los datos cristalográficos generados en esta tesis. Utilizamos al átomo con menor valor en su factor de temperatura ($C\alpha$ del residuo 226, que está en la zona interna de la enzima) como centro para colocar un eje de rotación (paralelo al eje cristalográfico c). Calculamos las distancias entre este eje de rotación y el resto de los $C\alpha$, graficando esta distancia contra su valor correspondiente de vibración isotrópica (usamos sólo a los átomos de la cadena principal para evitar las vibraciones locales de las cadenas laterales). La gráfica resultante describe una distribución lineal en la que los factores de temperatura aumentan con la distancia al eje determinado. Esto puede interpretarse como una rotación que tiene el mismo centro y eje que el reportado previamente para la transición alostérica (figura17).

* recordemos que una celda cristalina está definida por seis parámetros, tres longitudes (a, b, c) y tres ángulos (α, β, γ).

Figura 17

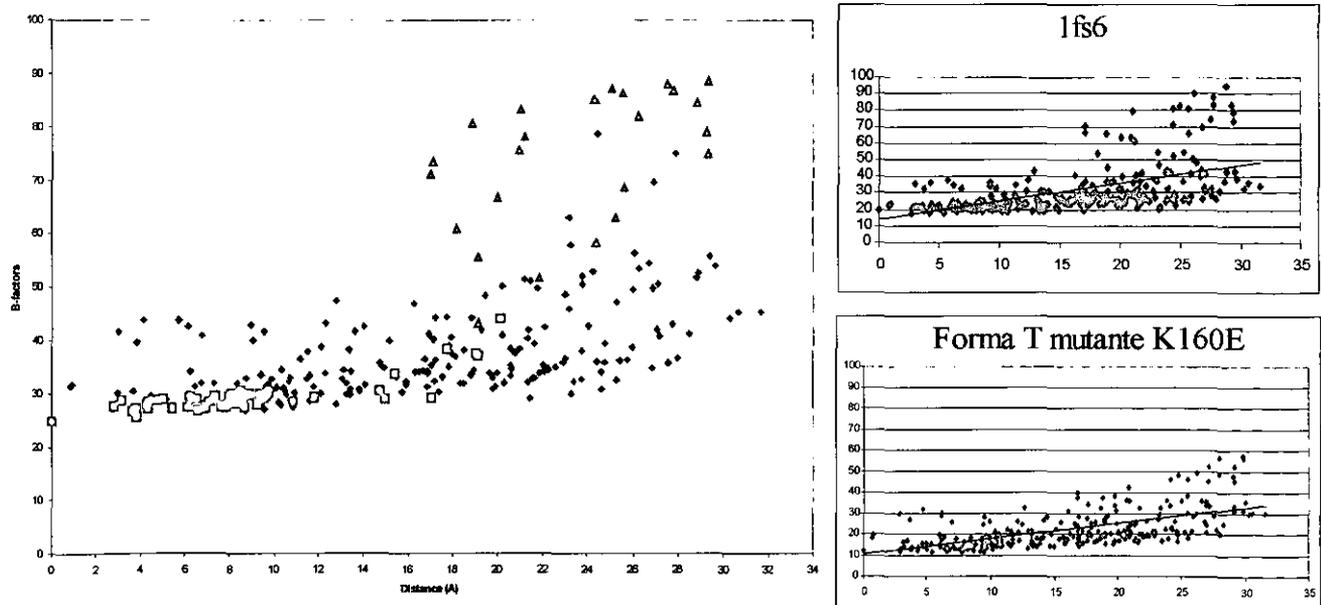
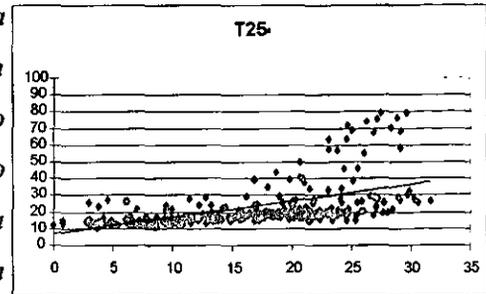


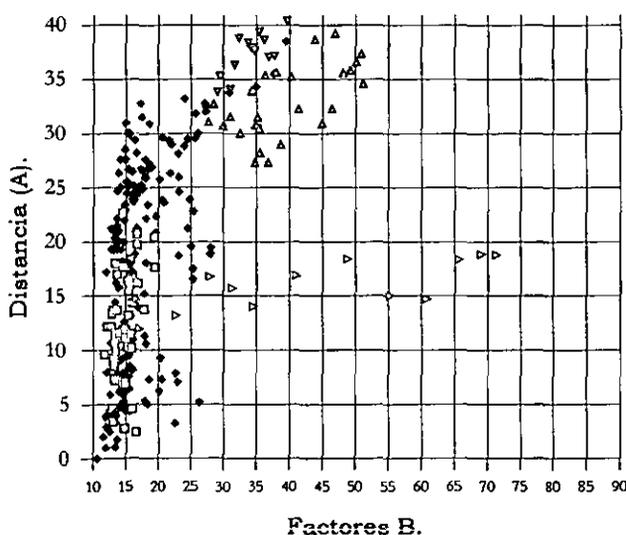
Figura 17: la gráfica representa a los valores B como una función de la distancia de cada átomo $C\alpha$ a un eje paralelo al eje cristalográfico c colocado en la posición del átomo con menor movilidad. La zona interna

(cuadros rojos) y la zona externa (rombos negros) de la enzima forma T (estructura 7) describen un aumento de la vibración en relación con la distancia al residuo menos móvil. La tapa del sitio activo (triángulos verdes) presenta también un fuerte movimiento vibratorio en el mismo plano. A la derecha se muestra el mismo tipo de gráfica de las estructuras forma T 5, 10 y 13 (respectivamente de arriba a abajo). Si este mismo tipo de gráfica se aplica a la forma R con



ambos sitios ocupados (estructura 4 a 1.67 Å de resolución) (abajo, izquierda) y se le compara con la gráfica obtenida a partir de la estructura en la forma T (estructura 7 a 1.90 Å de resolución) (abajo, derecha), resaltan varios hechos: en la forma R, la zona externa (rombos negros) no presenta el mismo aumento de la vibración en relación a la distancia con el residuo menos móvil; en la forma T, el movimiento de la tapa del sitio activo (triángulos verdes) está asociado con el movimiento del C-terminal (triángulos amarillos), mientras que en la forma R los movimientos de ambas están claramente separados; en la forma R, el movimiento de la tapa del sitio activo (triángulos verdes) está relacionado con el movimiento de las asas vecinas (residuos 75 a 83 y 109 a 112) (triángulos azules), mientras que en la forma T, estas asas, parecen estar más relacionadas con el movimiento de la zona externa. Este tipo de análisis sustenta varias hipótesis de esta tesis: (1) que la vibración de la zona externa de la enzima, en la forma T, está relacionada con la transformación a R; (2) en la forma T, el movimiento de la tapa del sitio activo esta conectada al del carboxilo terminal, lo cual implica contactos inter-monómeros y vibraciones coordinadas; y (3) en la forma R, existe un movimiento de la tapa asociado a la catálisis.

Forma R (estructura 4 a 1.67 Å de resolución).



Forma T (estructura 7 a 1.90 Å de resolución).

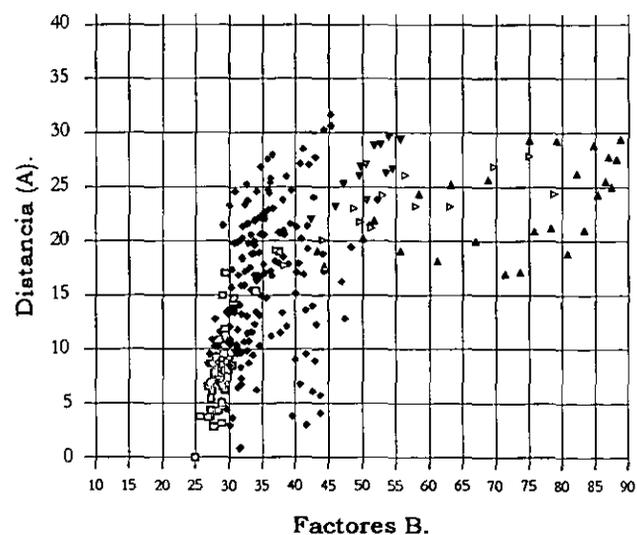


Tabla 5 (continuación)

	6.Silvestre	7.Silvestre	8.Silvestre	9.Mutante K160E
Confórmero	T	T	T	R
Monómeros en la Unidad Asimétrica (U.A.).	1	1	1	2
Ligables del Sitio Activo	Libre	Libre	Libre	GlcNol6P
Ligables del Sitio Alostérico	Libre	Libre	Libre	Libre
Otros ligables en la U. A.	nada	nada	¿1 metil amonio?	nada
Crio-colecta /Fuente de rayos X/longitud de onda	Si/ LUPEP/ 1.5418Å	Si/ SSRL 9-1/ 0.782Å	Si/ LNLS/ 1.3760Å	Si/ SSRL 7-1/ 1.08Å
Crio-protector	Sacarosa 35%	Trehalosa 35%	Trehalosa 35%	Sacarosa 35%
Grupo Espacial	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22	R32
Parámetros de Celda a=b, c (Å) α=β, γ	130.1,138.75 90°, 120°	126.68,139.33 90°, 120°	126.96,139.49 90°, 120°	124.78,221.83 90°, 120°
Resolución	50-2.70Å	50-1.9Å	50-2.5Å	50-2.10Å
R _{sym}	.094	.072	.098	.083
R _{sym} al intervalo de resolución máxima	.368 (2.70-2.80Å)	.326 (1.90-1.95Å)	.331 (2.50-2.56Å)	.220 (2.10-2.21Å)
% datos colectados "completeness" [F/s(F)>1]/ Multiplicidad	93.3% / 2.0	93.1% / 3.4	96.8% / 4.4	76.5% / 2.5
1/s(I) (Resolución máxima)	5.2 (1.9)	6.9 (2.3)	7.2 (2.3)	7.4 (2.0)
Número de reflexiones	17950	48412	22628	27889
Minimización de cuerpo rígido	R=0.330	R=0.322	R=0.287	R=0.316
Recocido (Ti=2000K)	R=0.246 R _{free} =0.266	R=0.263 R _{free} =0.275	R=0.276 R _{free} =0.295	R=0.276 R _{free} =0.306
Búsqueda de ligantes o modificaciones manuales	R=0.240 R _{free} =0.211	R=0.251 R _{free} =0.262	R=0.237 R _{free} =0.257	R=0.238 R _{free} =0.256
Búsqueda de moléculas de agua	- -	R=0.209 R _{free} =0.225	R=0.205 R _{free} =0.226	R=0.197 R _{free} =0.237
Número de moléculas de agua (en la U.A.)	-	236	112	211
Relación número de parámetros / número de datos	2.14	5.02	2.56	1.72

Tabla 5 (continuación)

	10.Mutante K160E	11.Mutante Y254F	12.Mutante Y254F	13.Mutante Y254F	14.Mutante F174A
Confórmero	T	R	R	T	T
Monómeros en la Unidad Asimétrica (UA)	1	2	2	1	1
Ligables del Sitio Activo	Libre	Libre	GlcNol6P	Libre	Libre
Ligables del Sitio Alostérico	Libre	GlcNAc6P	GlcNAc6P	Libre	Libre
Otros ligables en la U. A.	nada	2 sacarosas	nada	1 sacarosa	nada
Crio-colecta /Fuente de rayos X /longitud de onda	Si/ SSRL 7-1/ 1.08Å	Si/ SSRL 7-1/ 1.08Å	Si/ LUEP/ 1.5418Å	Si/ SSRL 7-1/ 1.08Å	Si/ SSRL 7-1/ 1.08Å
Crio-protector	Sacarosa 35%	Sacarosa 35%	Sacarosa 35%	Sacarosa 35%	Aceite *
Grupo Espacial	P6,22	R32	R32	P6,22	P6,22
Parámetros de Celda a=b, c (Å) $\alpha=\beta, \gamma$	127.11,140.03 90°, 120°	123.31,223.14 90°, 120°	124.76,222.05 90°, 120°	127.11,140.03 90°, 120°	127.61,139.82 90°, 120°
Resolución	50-2.10Å	50-2.10Å	50-2.60Å	50-1.95Å	50-2.02Å
R _{sym}	.085	.092	.084	.070	.055
R _{sym} al intervalo de resolución máxima	.267 (2.10-2.19Å)	.299 (2.15-2.20Å)	.336 (2.60-2.66Å)	.317 (1.95-1.99Å)	.334 (2.06-2.12Å)
% datos colectados "completeness" [F/s(F)>1]/ Multiplicidad	93.4% / 3.2	92.3% / 3.2	77.8% / 1.9	96.3% / 3.0	99.0% / 3.4
I/s(I) (Res. máxima)	8.0 (3.2)	6.07 (1.9)	6.60 (2.2)	8.4 (2.4)	11.1(2.3)
Número de reflexiones	36911	32862	15901	45675	41650
Minimización de cuerpo rígido	R=0.314	R=0.328	Con SNC R=0.355	R=0.367	R=0.352
Recocido (Ti=2000K)	R=0.268 R _{free} =0.287	R=0.313 R _{free} =0.332	Con SNC R=0.287 R _{free} =0.323	R=0.271 R _{free} =0.288	R=0.279 R _{free} =0.289
Búsqueda de ligantes o modificaciones manuales	R=0.239 R _{free} =0.263	R=0.223 R _{free} =0.265	Con SNC R=0.236 R _{free} =0.277	R=0.250 R _{free} =0.266	R=0.252 R _{free} =0.265
Búsqueda de moléculas de agua	R=0.196 R _{free} =0.212	R=0.198 R _{free} =0.246	Con SNC R=0.229 R _{free} =0.257	R=0.187 R _{free} =0.208	R=0.204 R _{free} =0.223
Número de moléculas de agua (en la U.A.)	333	579	Con SNC 98	533	317
Relación número de parámetros / número de datos	3.36	1.70	Con SNC 1.77 Sin SNC 0.88	4.15	4.72

Tabla 5: aquí se muestran los detalles en el proceso de colecta y afinamiento, así como la estadística que nos

permite evaluar la calidad del modelo final de las catorce estructuras resueltas en la presente tesis. Se uso aceite de inmersión de microscopio como crioprotector.*

Forma R con el sitio activo libre: conformaciones alternas en la tapa del sitio activo.

En la forma R con ambos sitios ocupados, el residuo E148 es un elemento estructural esencial en la estabilización de la tapa del sitio activo. Apunta al sitio activo, formando puentes de hidrógeno entre los átomos Od1 y N de los residuos T166 y T163, la tapa, y el átomo Nd1 del residuo H143, contribuyendo a la estabilización de toda la tapa. El residuo E148 forma parte de un sistema intercambiador de protones poco común ^{nota 7}, que está directamente relacionado con la catálisis enzimática (12). En la forma T, el residuo E148 apunta hacia el sitio alostérico, equilibrando las cargas en el mismo (11), rompiendo el puente entre el residuo H143 y la base de la tapa del sitio activo. Este cambio conformacional del residuo E148 contribuye a la flexibilidad de la tapa en la forma T. En la forma R con sólo el sitio alostérico ocupado, la posición del residuo E148 es la misma que la que tiene en la forma R con ambos sitios ocupados, pero solo una de las conformaciones alternas de la tapa del sitio activo forma la red de puentes de hidrógeno con T166 y T163. Esto significa que la ausencia de un ligable del sitio activo impide la estabilización completa de la tapa. Entonces, en la transición entre las forma T y R la tapa del sitio activo se transforma de un estado altamente móvil (forma T), a un estado menos móvil, parcialmente estabilizado por el puente mediado por el residuo E148 (forma R con sólo el sitio alostérico ocupado), y finalmente, a una tapa totalmente estabilizada con ambas moléculas ligables y la red de puentes de hidrógeno mediados por el residuo E148.

NOTA 7: un intercambiador, o "relay", de protones es un mecanismo capaz de absorber y liberar protones momentáneamente.

Figura 18



Figura 18: las tapas alternas del sitio activo encontradas en la enzima forma R con sólo el sitio alostérico ocupado a 1.73 Å de resolución (estructura 2). La figura representa la superficie accesible al solvente,

mostrando a los tres conformeros alternos como describen un movimiento de cerrado y apertura de la tapa del sitio activo. El código de colores es amarillo para la zona externa, azul para la zona externa y magenta para la tapa del sitio activo.

Afinamiento posterior de la forma T: afinamiento anisotrópico y conformaciones alternas: Realizamos un afinamiento anisotrópico de los átomos (excepto hidrógenos) con el fin de generar datos adicionales que nos permitan clarificar si la vibración atómica de la tapa del sitio activo puede ser correlacionada con la transformación alostérica. Para esto usamos los datos de la estructura de la forma T determinada a una resolución de 1.9Å (estructura 7). Este cristal está formado en un 78% por agua, lo que significa que los 2411 átomos de la unidad asimétrica generan la estructura completa en una celda grande (para esta cantidad de átomos). Por lo tanto, a 1.9Å de resolución colectamos 48412 reflexiones, un promedio de 20 reflexiones por cada átomo. Más aún, a esta resolución los átomos de hidrógeno no son detectables, por lo que no necesitamos incrementar la cantidad de parámetros en el modelo (incluyendo a átomos de hidrógeno en el afinamiento). Previamente en el ajuste isotrópico, habíamos detectado que tanto la tapa del sitio activo, como el carboxilo terminal, presentaban factores B isotrópicos cercanos a 80 Å². Los átomos que presentan este tipo de movilidad isotrópica suelen producir diferentes patrones que aquellos con movilidades altamente anisotrópicas. El alto contenido de solvente en el cristal favorece la posibilidad matemática de refinar los factores B con un enfoque anisotrópico: por cada átomo necesitamos calcular 9 parámetros (x, y, z, y los seis términos anisotrópicos), entonces tenemos que calcular 21699 parámetros, lo que significa 2.23 reflexiones por cada parámetro. Aún con esta relación entre parámetros por calcular y número de reflexiones a 1.9 Å de resolución (y en este caso en particular), podemos encontrar solo una solución para el proceso de afinamiento. Para valores de u en el orden de 2 Å, incluso a esta resolución, una descripción anisotrópica generará una mejor representación del modelo protéico que sus correspondientes valores isotrópicos. El modelo final afinado con factores de temperatura anisotrópicos muestra altos valores, compatibles con un movimiento colectivo de rotación con eje paralelo al eje cristalográfico c, que incluye a la tapa del sitio activo, toda la zona externa y el carboxilo terminal de la enzima (figura 14). Estas regiones del monómero contienen al sitio alostérico que se forma en la interfase con el monómero vecino. En particular los residuos Y254 y T152 están involucrados en las interacciones intermonoméricas. Por lo tanto, este movimiento colectivo puede propagarse a toda la partícula homohexamérica. Este movimiento anisotrópico coincide en dirección con el que presenta la molécula durante la transición alostérica. El centro de este movimiento coincide con el determinado en esta tesis

por medio de factores B isotrópicos (figura 17) y también con el ya determinado para la transición alostérica (11). Más aún, las enzimas mutantes (estructuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14) presentan menor movilidad en la tapa del sitio activo y en la zona externa, lo que sugiere que la alta movilidad de la tapa del sitio activo en la forma T es parte de un movimiento colectivo que incluye a la zona externa, tal como sucede durante la transición alostérica. Aún en el cristal, la vibración anisotrópica de la forma T libre de moléculas ligables describe un movimiento con la misma dirección de la transformación alostérica. Además, y de manera paralela, afinamos siete conformaciones alternas para la tapa del sitio activo y tres conformaciones alternas para el C-terminal en un modelo isotrópico (figura 19). En particular, las conformaciones alternas encontradas en la tapa del sitio activo presentan distancias entre 1.60 Å en la base de la tapa y 4.00 Å en el residuo 172, todas en el mismo plano del eje máximo anisotrópico. A pesar de la pequeña distancia entre los conformeros vecinos (menos de 1 Å), los factores de temperatura isotrópicos no resultan menores de 55 Å². Esto puede ser interpretado como una densidad continua más que un grupo de conformeros individuales. Este hecho sustenta los resultados encontrados en el afinamiento anisotrópico, al menos para estas dos regiones (tabla 6 y figuras 19 y 20).

Figura 19

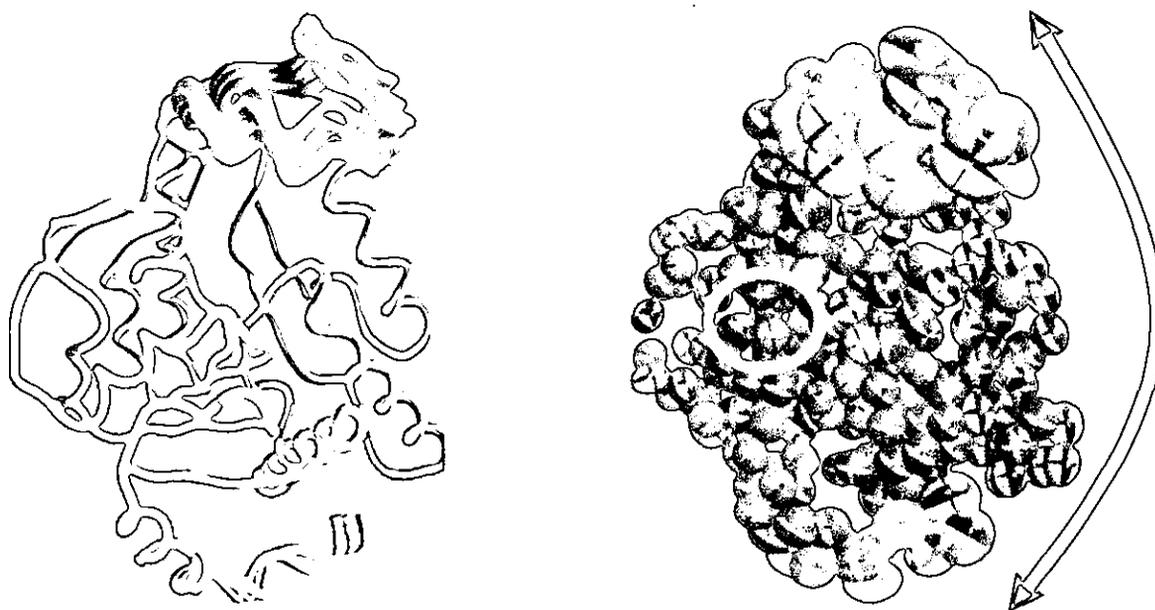


Figura 19: Tras un afinamiento anisotrópico (derecha), los Ca de la forma T libre de ligables claramente muestran un movimiento de rotación con centro (circulo azul) y dirección (línea azul) idénticas a la propuesta

para la transición alostérica. La traza está coloreada con base en los factores de temperatura isotrópicos (derecha). El color rojo para los valores altos y el azul para los valores bajos. El intervalo de valores B está entre 24 \AA^2 y 148 \AA^2 . La vista de la traza (izquierda), afinada con conformaciones alternas tanto en la tapa del sitio activo, como en el carboxilo terminal. El código de colores es: amarillo, para la zona externa, azul, para la zona interna y magenta, para la tapa del sitio activo.

Figura 20

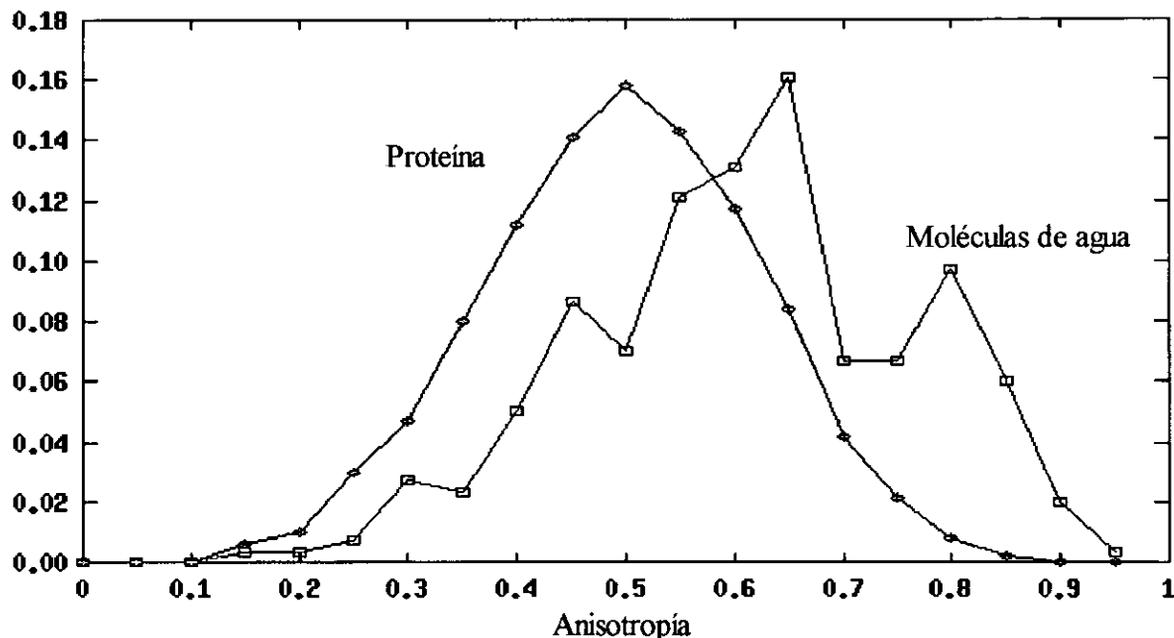
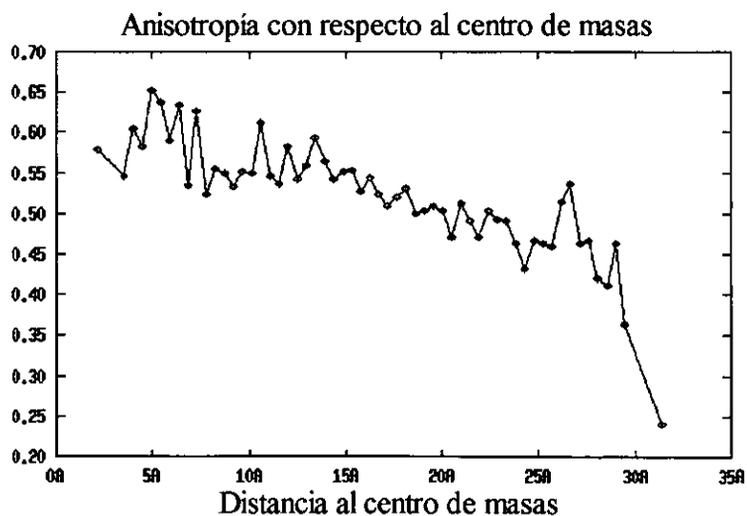


Figura 20: PARVATI (44) es un programa que permite validar y analizar afinamientos de estructuras macro moleculares que incluyen parámetros de desplazamiento anisotrópicos. Cuando el modelo afinado en esta tesis fue analizado, la distribución de la anisotropía en el caso de los átomos de la proteína dio un perfil característico de estructuras bien afinadas (arriba, ver figuras 4 y 5). Por otro lado, la gráfica entre la distancia al centro de masas (muy cercano al



centro del eje de rotación determinado en esta tesis) y la anisotropía describe el mismo movimiento concertado en la dirección T a R (www.bmsc.washington.edu/parvati/parvati.html).

Tabla 6

	Forma T silvestre a 1.90 Å de resolución (estructura 7).	Forma T silvestre a 1.90 Å de resolución (estructura 7).
Afinamiento isotrópico con CNS / # de moléculas de agua.	R=0.212 (R _{free} =0.232) /205	R=0.212 (R _{free} =0.232) /205
Relación # de reflexiones / parámetros (ajuste isotrópico).	5.02	5.02
Afinamiento anisotrópico con Shelxl-97 / # de moléculas de agua.	R=0.188 (R _{free} =0.223) /297	—
Relación # de reflexiones / parámetros (ajuste anisotrópico).	2.23	—
Afinamiento isotrópico con CNS incluyendo 7 conformaciones alternas de la tapa y 3 del C-terminal / # de moléculas de agua	—	R=0.209 (R _{free} =0.225) / 236
Relación # de reflexiones / parámetros (ajuste isotópico con conformaciones alternas).	—	2.57

Tabla 6: aquí se detallan algunos de los parámetros que permiten evaluar los ajustes anisotrópicos y de múltiples conformeros aplicados al modelo de la forma T nativa resuelta a una resolución de 1.90 Å.

Reacción inversa y unión del ion amonio. La GlcN6P desaminasa de *E. coli* cataliza la reacción entre GlcN6P y una molécula de agua para obtener ion amonio y Fru6P. Con el fin de localizar el sitio en que la molécula de amonio se une a la estructura, se decidió co-cristalizar a la enzima en presencia del ion amonio, sin embargo en una nube electrónica el ion amonio no puede diferenciarse de una molécula de agua (ambas moléculas tienen 18 electrones). Por esta razón se usó metil amonio. La primera estructura determinada en presencia de metil amonio fue una forma T a 2.5 Å de resolución (estructura 8), sin embargo a esta resolución no fue posible determinar con certeza la posición de la molécula de metil amonio. Posteriormente se determinó la estructura de una forma R con iones fosfato (los cuales se unen en los sitios activo y alostérico, y producen la transición alostérica de T a R), esta estructura fue determinada a 1.67 Å de resolución (estructura 4). En general esta estructura no difiere en conformación ni en comportamiento vibratorio con las estructuras resueltas con ambos sitios ocupados (estructura 3 de esta tesis y PDB 1dea, 1hor y 1hot, de trabajos previos) al analizar en detalle el sitio activo, encontramos una molécula de metil amonio unida con el residuo D72 por medio de un puente de hidrógeno. De hecho esta molécula de metil amonio sirve de puente para unir por medio de dos puentes

de hidrógeno los átomos Od1 del residuo D72 con N del residuo T41.

Figura 21

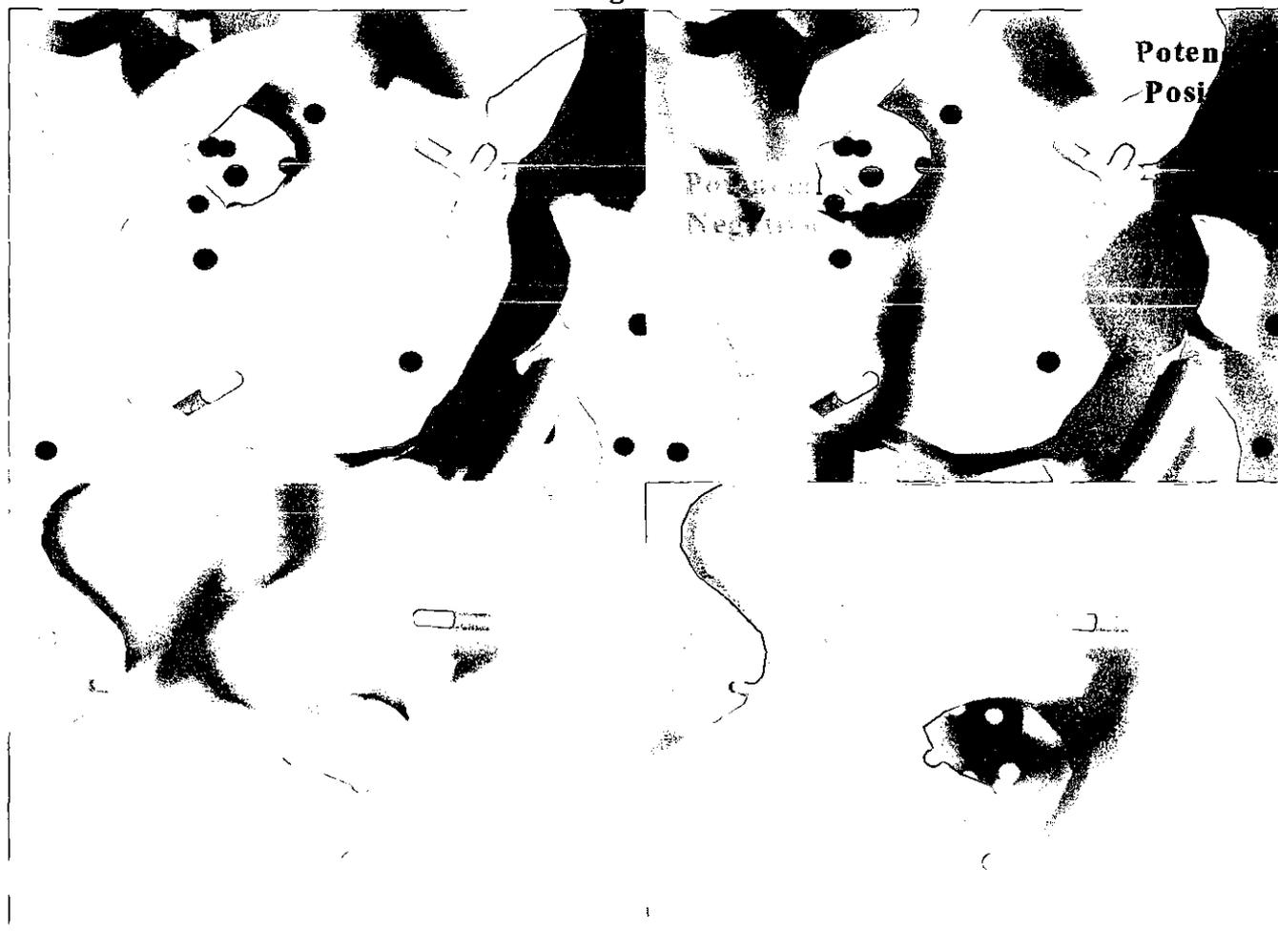


Figura 21: en las figuras de superficie accesible al solvente se muestra (arriba) una vista del sitio activo desde el punto de vista del residuo H143, a la derecha se ve el potencial electrostático de superficie. Existen dos canales de acceso una para el ion amonio y otro para la molécula fosfatada (por complementariedad de cargas). Abajo se ve el canal de acceso al ion amonio desde el solvente, existen dos moléculas de metil amonio ("cápsulas" azul y blanco) por cada monómero de la enzima, lo cual corrobora experimentos realizados hace una década por el grupo del Dr. Calcagno (comunicación personal). El código de colores es : amarillo, para la zona externa, azul, para la zona interna y magenta, para la tapa del sitio activo (figuras de la izquierda) y azul: potencial positivo y rojo: potencial negativo (figuras de la derecha).

Figura 22



Figura 22: el canal de entrada y salida del ion amonio muestra características importantes, si se le observa haciendo un corte longitudinal varias moléculas de agua (puntos azul claro) se encuentran entre las moléculas de metil amonio. Es probable que estas aguas nos permitan armar una "película" sobre el camino que puede seguir la molécula de amonio para entrar y salir del sitio activo.

Esta posición era en la que se esperaba encontrar a la molécula de metil amonio ya que el residuo 72 es el responsable de la enolización del amino azúcar removiendo el hidrógeno del carbono 2 del sustrato a través de un intermediario cis-enol amonio, pasos necesarios para liberar al ion amonio. Al continuar con el análisis de la estructura determinada (tabla 5) y a 15.51 Å en línea recta de la posición de la primera molécula de metil amonio encontramos una segunda molécula. Esta molécula de metil amonio se encuentra estabilizada por medio de dos puentes de hidrógeno, uno con el átomo O del residuo F173 y otro con el átomo Oe2 del residuo E83. Ambas moléculas de metil amonio se encuentran en los extremos de un canal de acceso al sitio activo, el cual presenta un potencial electrostático negativo (propio para complementarse con la carga positiva del ion amonio) y una red de nueve moléculas de agua. Estas moléculas de agua están unidas entre si por una red de puentes de hidrógeno. Sería posible pensar que estas moléculas de agua puedan ser sitios intercambiables que permitan la entrada y salida de iones amonio a la estructura, sin embargo no tenemos datos suficientes más que para especular. Un dato interesante es el hecho de que la relación dos moléculas de amonio: un monómero de proteína, también fue determinado por medio de estudios cinéticos(42).

Proteína mutante K160E. El modelo de la forma T de la proteína mutante K160E de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* muestra ambos sitios (activo y alostérico) libres de ligables. La estructura general del modelo cristalográfico es similar a la de la enzima silvestre en la forma T (estructura 5), con un RMSD entre sus C α de 0.138 Å. De hecho, con excepción de la mutación puntual, la proteína mutante es estructuralmente una forma T típica (figura 19). En el caso de la mutante K160 E en la forma R, el sitio alostérico aparece libre de moléculas ligables, a pesar de que la estructura conformacional se mantiene igual a la de la enzima silvestre, eso sí, con un cambio dramático en cuanto a sus propiedades electrostáticas (ver Figura 23). En cuanto al sitio activo, éste está ocupado por una molécula de GlcNol6P, de la misma forma que en la enzima silvestre.

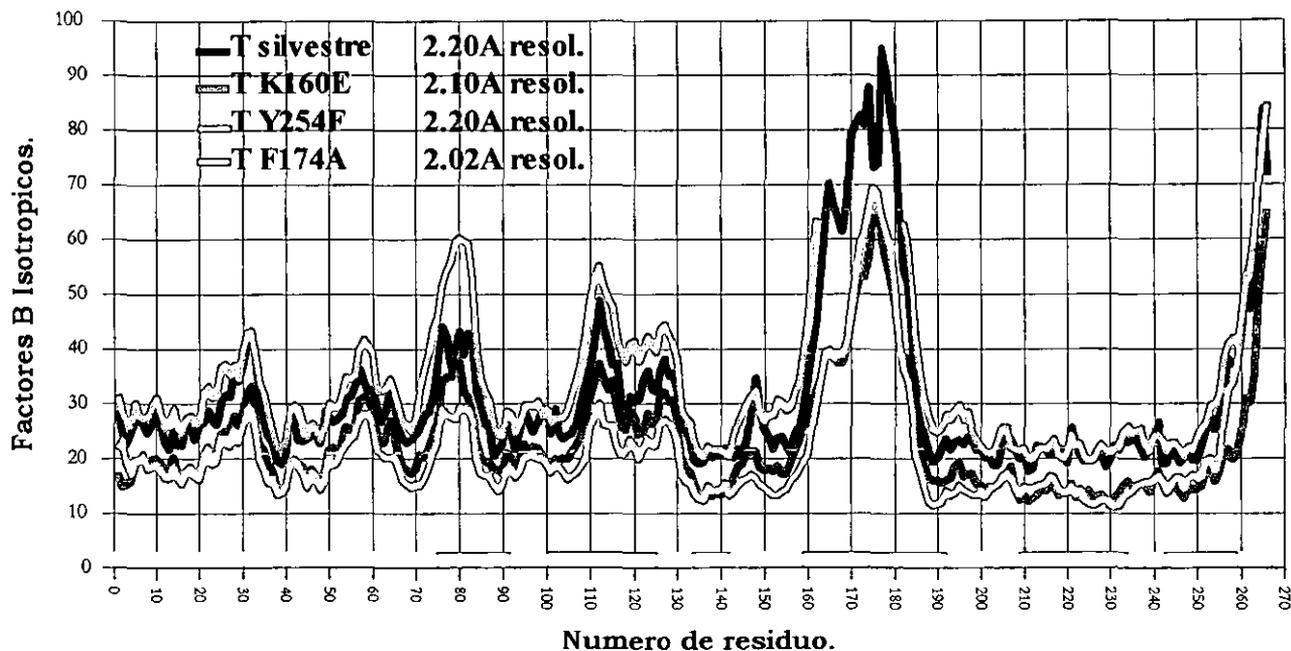
Figura 23



Figura 23: derecha, potencial electrostático de superficie del sitio alostérico silvestre con la molécula del activador representada en "enlaces"; izquierda, sitio alostérico de la proteína mutante K160E. La figura fue generada con GRASP.

Figura 24

Factores B Isotrópicos: Forma T, silvestre vs mutantes.



Factores B Isotrópicos: forma R, silvestre vs mutantes.

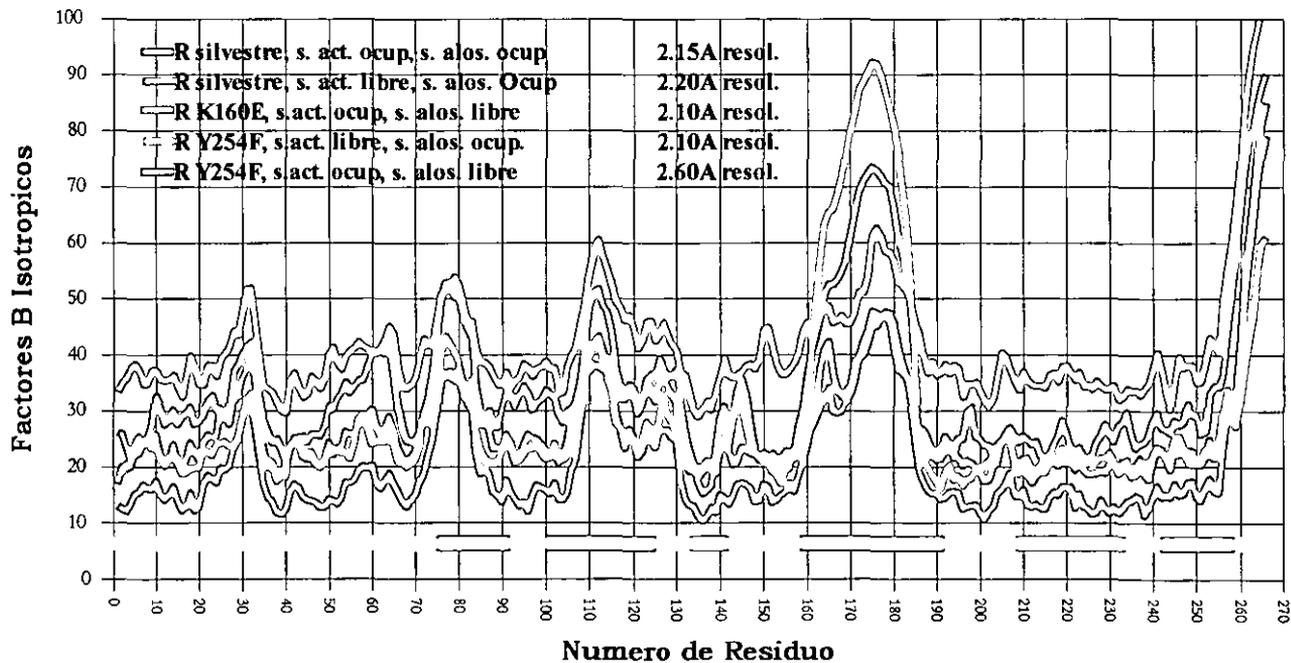


Figura 24: gráficas sobre el comportamiento del factor B isotrópico versus el número de residuo. Arriba se ve la comparación del comportamiento B isotrópico de la enzima silvestre T (estructura 5, 2.20 Å de resolución,

línea negra) contra las enzimas mutantes T K160E (estructura 10, 2.20 Å de resolución, línea azul), Y254F (estructura 13, 2.20 Å de resolución, línea verde) y F174A (estructura 14, 2.02 Å de resolución, línea chedron). Abajo se ve la comparación del comportamiento B isotrópico de las enzima silvestres (forma R) con ambos sitios ocupados (estructura 3, 2.15 Å de resolución, línea gris) y la enzima silvestre con sólo el sitio alostérico ocupado (estructura 1, 2.20 Å de resolución, línea café) contra las enzimas mutantes R K160E con sólo el sitio activo ocupado (estructura 9, 2.10 Å de resolución, línea verde claro), Y254F con sólo el sitio alostérico ocupado (estructura 11, 2.10 Å de resolución, línea salmón) y Y254F con sólo el sitio activo ocupado (estructura 12, resuelta con SNC, 2.60Å de resolución, línea verde).

Figura 25

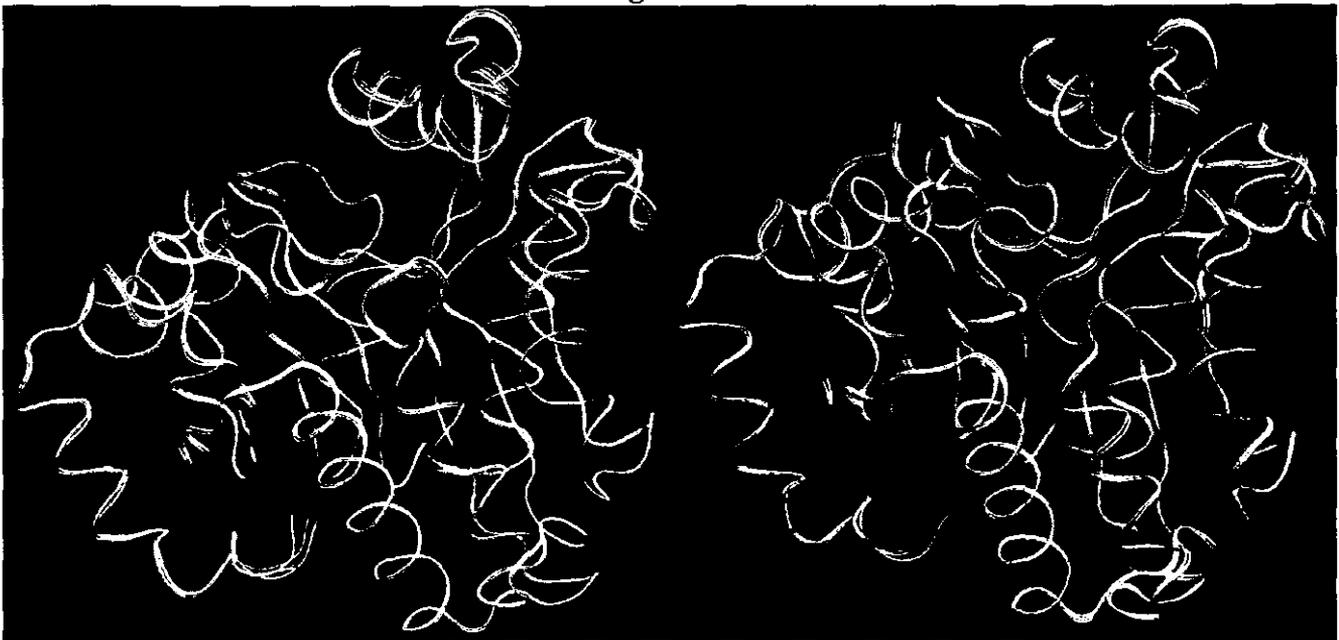


Figura 25: sobreposición de la traza de los monómeros en forma R y T, nativos y mutantes. A la izquierda se ve en rojo a la enzima silvestre T (estructura 5, 2.20 Å de resolución), en amarillo la enzima mutante T K160E (estructura 10, 2.20 Å), en azul claro la enzima mutante T Y254F (estructura 13, 2.20 Å de resolución) y en verde la enzima mutante T F174A (estructura 14, 2.02 Å de resolución). A la derecha se ve en cobre a la enzima silvestre (forma R) con ambos sitios ocupados (estructura 3, 2.15 Å de resolución), en violeta a la enzima silvestre (forma R) con sólo el sitio alostérico ocupado (estructura 1, 2.20Å de resolución), en azul claro a la enzima mutante R K160E con sólo el sitio activo ocupado (estructura 9, 2.35 Å de resolución), en azul marino a la proteína mutante R Y254F con sólo el sitio alostérico ocupado (estructura 11, 2.10 Å de resolución) y en verde a la enzima mutante R Y254F con sólo el sitio activo ocupado (estructura 12, resuelta con SNC, 2.60 Å de resolución). Tanto en la forma R como en la T las estructuras tridimensionales sólo

difieren entre sí en la tapa del sitio activo y el carboxilo terminal, zonas de alta vibración atómica.

Al analizar el comportamiento vibratorio de la enzima mutante K160E resaltan algunos hechos (Figura 24). La enzima mutante en la forma T posee la estructura más "fija", en términos de vibración atómica, en relación a cualquier desaminasa de *E. coli* (silvestre o mutada). En particular la tapa del sitio activo tiene vibraciones similares a la de la forma R silvestre con ambos sitios ocupados. Si estructuralmente la enzima es idéntica a la enzima silvestre (Figura 25) entonces las diferencias cinéticas que presenta la enzima mutante K160E con relación a la enzima silvestre se deben primordialmente a cambios en la flexibilidad molecular.

La proteína mutante K160E produce una fuerte modificación en las interacciones electrostáticas del sitio alostérico. Ya se había propuesto que el exceso de cargas positivas en esta región es esencial para la estabilización del conformero T en la enzima silvestre (11). Por otro lado, los estudios cinéticos de esta mutante muestran que sigue una cinética hiperbólica, es decir que se comporta como si fuera Michaeliana. Estos experimentos contradicen a los datos cristalográficos (que muestran formas R y T). Para clarificar este punto, el grupo del Dr. M.L. Calcagno (Facultad de Medicina, UNAM) realizó un grupo de simulaciones experimentales utilizando el modelo MWC (14, ecuación 1). En estas simulaciones diferentes valores de la constante de equilibrio T-R (L) fueron probados (el valor de la enzima silvestre es $L=10000$). Sólo cuando el valor de $L=10$ (diez veces más forma T que R) la enzima posee ecuaciones cinéticas que no se diferencian de las correspondientes a la forma R (Michaeliana). Por lo tanto la enzima puede cristalizar en la forma T predominante.

Proteína mutante Y254F. La enzima mutante Y254F de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* no presenta, ninguna modificación a nivel de la estructura con respecto a la enzima silvestre (Figura 25). De hecho la superposición de la traza con la enzima silvestre da un valor de $RMSD=0.095\text{Å}$. La posición del activador alostérico es la misma que en la enzima silvestre. La principal diferencia entre la enzima silvestre y la mutada, además de sus diferencias cinéticas (tabla 7), radica a nivel de los factores B, en particular la en la tapa del sitio activo (Figura 24).

Tabla 7

	K_{cat} (s^{-1}) en ausencia de activador alostérico.	K_R (mM) en ausencia de activador alostérico.	K_T (mM) en ausencia de activador alostérico.	K_m (mM) en presencia de activador alostérico.	K_{cat} (s^{-1}) en presencia de activador alostérico.
Enzima silvestre	292 +/- 17	2	100	2,1 +/- 0.1	302 +/- 20
Mutante Y254F	11,4 +/- 1.5	4.5	32	1,0 +/- 0.1	75 +/- 3

Tabla 7: tomado de Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. & Altamirano, M.M. (1998). 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* 37, 7844-7849.

En la proteína silvestre forma R, los factores de temperatura de la tapa del sitio activo están en el intervalo de 20 a 50 Å², mientras que en la enzima mutante Y254F el intervalo va de 40 a 80 Å². Por otro lado la forma T muestra una tapa "fija", muy distinta a la tapa altamente móvil de la enzima silvestre. La mutación puntual en el residuo 254 rompe un puente de hidrógeno con el monómero vecino (P149 en la forma T y T161 en la forma R), el cual ha sido propuesto como un "switch" de la transición alostérica (14). El comportamiento vibratorio inverso de la enzima mutante (tapa R móvil y T fija) dan sentido a la teoría de que la flexibilidad es fundamental en la transición alostérica. Si tanto la tapa como el resto de la estructura mutante T poseen factores B bajos, la conversión espontánea entre ésta y la forma R se ven reducidas (L baja de 10⁴ a 10³). Dicho en otra forma, la ruptura del enlace formado por Y254 estabiliza la tapa en T y desestabiliza la tapa en R. Esta desestabilización puede explicar que la caída en la K_{cat} afecte más al sitio activo que al alostérico (tabla 7).

Proteína mutante F174A. La enzima mutante F174A modifica una de las ataduras que tiene la tapa del sitio activo. La ruptura de esta interacción hidrofóbica produce una deslocalización importante de la tapa, a tal grado que en la estructura determinada en la forma T no fue posible encontrar densidad electrónica para los residuos 163 a 181. Además no fue posible cristalizar un forma R mutante a pesar de los repetidos experimentos realizados (tabla 3). La falta de densidad nos hace suponer que la tapa tiene altísimos factores B isotrópicos. Esto es coherente con el hecho de que los residuos 75 a 90 y 100 a 125 presentan sus valores más altos de flexibilidad en esta enzima mutante (Figura 24). Estos residuos corresponden a tres "asas" vecinas a la tapa del sitio activo y que vibran en

la misma dirección que ésta. El hecho de que en esta mutante sea donde presentan mayor movilidad apoyan el hecho de que la tapa sea altamente vibrante y nos hacen prever un L menor que en la enzima silvestre, ya que una tapa altamente móvil acerca más a la forma T a la R.

Modelo alostérico concertado y la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Las modificaciones estructurales que produce la transición entre el conformero T libre de ligables y el conformero R con ambos sitios ocupados ya ha sido descrita (11), pero el carácter concertado de la transición alostérica aún no. Durante la rotación rígida asociada con los cambios conformacionales de T a R, los contactos de la zona interna no cambian, pero en la zona externa se producen cambios severos en los contactos intermonómeros, los cuales están directamente relacionados con la formación del sitio alostérico. Como hemos mostrado, el residuo E148 está involucrado en la estabilización de la tapa del sitio activo en la forma R, y en la conexión entre la tapa y el residuo catalítico H143 (conexión esencial para la catálisis). En la forma T, el residuo E148, que forma parte del "asa" 144-154, forma un puente salino con el residuo K160, el cual es esencial en la estabilización de este conformero (11). El "asa" 144 a 154 está formada por cuatro vueltas que conservan su posición relativa durante la transición alostérica. Mientras la vuelta 139 a 142 se mantiene como parte de la sección interna, la vuelta 144 a 147 se mueve como un rígido junto con la sección externa y la tapa del sitio activo, debido principalmente a las interacciones hidrofóbicas cercanas al residuo F146. Cuando se realiza una superposición de $C\alpha$ entre las forma R determinadas (tabla 2), se observa una correlación entre el movimiento de los residuos 144 a 146 y la tapa del sitio activo. Si el conformero R tiene el sitio activo ocupado por el sustrato, la vuelta 144 a 146 se mueve en dirección de la zona interna, "cerrando" a la tapa del sitio activo. En correspondencia, la forma R sin ligantes en el sitio activo mueve su vuelta 144 a 146 en dirección de la tapa del sitio activo, "abriendo" la tapa. La misma correlación de movimientos también ocurre en la forma T, pero con un mayor desplazamiento de la posición de los $C\alpha$. Más aún, este movimiento de apertura de la tapa del sitio activo está directamente relacionado con un aumento en la movilidad atómica (Figura 13). Los residuos involucrados en estas interacciones están 95% conservados en las 32 secuencias de GlcN6P desaminasas conocidas, de bacterias a mamíferos (Arreola-Alemón, R., comunicación personal).

En la transformación homotrópica, el sustrato se une al sitio activo cerrando y reduciendo la vibración atómica de la tapa del sitio activo, generando un cambio en la conformación del "asa" 144-154. Estos cambios conformacionales rompen el puente de hidrógeno entre el átomo O del residuo P149

y el grupo OH del residuo Y254, que es característico de la forma T. El cerrado de la tapa cambia y estabiliza la posición de los residuos K160 y T161. Favoreciendo la formación de una red de puentes de hidrógeno con el residuo Y254 (mediados en algunos casos hasta por cuatro moléculas de agua), el cual forma un "switch" de la transición alostérica (14), y parece estar presente sólo en las GlcN6P desaminasas alostéricas de cualquier fuente (Arreola-Alemón, R., comunicación personal). En la forma T el mismo residuo Y254 forma un puente de hidrógeno con el residuo E148, el cual también se destruye durante el cambio conformacional del asa 144-154, obteniendo una nueva conformación estructural que forma un red de puentes de hidrógeno característica del estado R. Los "switches" moleculares se han encontrado en otras enzimas alostéricas como la aspartato transcarbamoilasa de *E. coli*. Aquí, un contacto inter-subunidad mediado por el residuo E239 se relaciona con la transmisión de la cooperatividad en la transformación homotrópica (45 y 46).

En la transición heterotrópica el activador alostérico (GlcNAc6P) se une a su sitio, desplazando al residuo E148 hacia el sitio activo, rompiendo su interacción con el residuo Y254 e iniciando la transición alostérica en la misma forma que ocurre en la transición homotrópica. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el "asa" 144-154 no presenta cambios en la posición de su cadena principal como producto de la fuerte repulsión electrostática, como pasa entre el residuo E148 y el ion fosfato del activador alostérico. Proponemos que tanto en la transición homotrópica como en la heterotrópica, la ruta de transmisión implica un "induced fit" local del asa 144-154 que está directamente relacionado con el comportamiento de la tapa del sitio activo y la propagación de su movimiento a toda la partícula homo-hexamérica mediada por los contactos inter-subunidad de la sección externa de la enzima.

Tabla 8

Monómero A	Interacciones de la forma T (distancia en Å)	Interacciones de la forma R (distancia en Å)	Monómero B
Átomo O ϵ 1, E148	3.03	ninguna	Átomo OH, Y 254
Átomo O, P149	3.23	ninguna	Átomo OH, Y 254
Átomo O, P149	Dos moléculas de agua (2,59 - 2,30)	ninguna	Átomo OH, Y 254
Átomo O, P149	ninguna	Cuatro moléculas de agua (2,94 - 2,84 - 2,61 - 2,54 - 2,72)	Átomo O, K250

Monómero A	Interacciones de la forma T (distancia en Å)	Interacciones de la forma R (distancia en Å)	Monómero B
Átomo O, P149	ninguna	Tres moléculas de agua (2,94 - 2,84 - 2,69 - 2,94)	Átomo Oy1, T251
Átomo C β , A150	4.06	3.72	Átomo C ξ , F255
Átomo O, A150	3.31	3.5	Átomo O, M1
Átomo O, A150	2.76	3.02	Átomo N, M1
Átomo Oy, S152	ninguno	2.66	Átomo O, H 232
Átomo Oy, S152	2.65	ninguno	Átomo O, P233
Átomo N, L153	Una molécula de agua (2,82 - 2,76)	3.02	Átomo O, Q230
Átomo N, L153	Una molécula de agua (2,82 - 2,76)	ninguno	Átomo O, H232
Átomo O, T161	ninguno	3.14	Átomo OH, Y 254
Átomo N, T161	ninguno	Una molécula de agua (3,08 - 3,11)	Átomo OH, Y 254
Átomo N ξ , K160	ninguno	Una molécula de agua (2,69 - 3,11)	Átomo OH, Y 254
Átomo Oy1, T161	ninguno	Tres moléculas de agua (2,96 - 2,60 - 2,81 - 3,11)	Átomo OH, Y 254
Átomo O, K160	ninguno	Cuatro moléculas de agua (2,96 - 2,55 - 2,60 - 2,81 - 3,11)	Átomo OH, Y 254
Átomo N, K160	ninguno	Cuatro moléculas de agua (3,19 - 2,55 - 2,60 - 2,81 - 3,11)	Átomo OH, Y 254

Tabla 8: la tabla muestra las distancias de los puentes de hidrógeno formados en la superficie intermonomérica cercana al sitio alostérico, tanto de la forma R, como de la T, así como una interacción hidrofóbica entre los residuos A150 y F255. Cuando los contactos están mediados por moléculas de agua, el número de aguas involucradas y las distancias correspondientes a cada puente se presentan.

Discusión general. En este trabajo describimos a las estructuras determinadas, así como su cinética e implicaciones alostéricas, desde un punto de vista que resalta el papel que juegan las vibraciones atómicas.

Cuando la enzima se encuentra en su forma R sin moléculas ligables (estructura no determinada, pero que ajusta con su existencia las ecuaciones del modelo MWC con el comportamiento cinético), el equilibrio con la forma T libre de ligables puede desplazarse en dos formas: homotrópicamente con la adición de cualquier sustrato (GlcN6P o Fru6P), o heterotrópicamente con la adición de el GlcNAc6P. En la segunda opción, como demostramos, el conformero R presenta una tapa del sitio activo con tres conformeros preferenciales, los cuales en condiciones normales abren y cierran al sitio activo. Una vez que alguna molécula ligable se une al sitio activo, la tapa se estabiliza en una de las tres conformaciones generando una reducción general de la vibración atómica en toda la proteína. Entonces, la flexibilidad de la tapa del sitio activo no solo tiene un papel central durante la transición alostérica, si no también en el proceso de unión del sustrato. Por lo tanto, la alta movilidad de la tapa, y la existencia de tres conformeros en la forma R con el sitio activo libre, resultan en un término entrópico que está asociado a la ligadura del sustrato y contribuye en el valor de la K_m . Esto resulta en que concentraciones relativamente altas del sustrato coexistan con la enzima activada. Por lo tanto, las concentraciones relativamente altas del activador alostérico necesarias, se mantienen con ayuda de la GlcNAc6P desacetilasa. De esta manera, el catabolismo de la GlcNAc continúa mientras se mantiene la concentración de la GlcNAc6P (un intermediario de la ruta) a niveles relativamente altos. Esta concentración debe ser lo suficientemente alta para mantener a la GlcN6Pdesaminasa en su estado R.

El modelo MWC predice que, en solución, la GlcN6P desaminasa de *E. coli* en su forma T libre de ligables coexiste en equilibrio con cantidades limitadas de conformeros en la forma R sin ligables. Este modelo cinético asume que, en presencia de moléculas que se unen al sitio activo (como GlcN6P o Fru6P, transición homotrópica), la forma T libre de ligables se convierte en una forma T con el sitio activo ocupado, y entonces la transición alostérica homotrópica produce a la forma R con al sitio activo ocupado. Los datos cristalográficos mostrados en esta tesis sugieren que la dificultad de encontrar cristales forma T con ligables, genera dos posibles alternativas: que la forma T con ligables sea un intermediario inestable de la transición que no se logró "congelar" aún incubando cristales T sin ligables en las correspondientes soluciones con estas moléculas, o bien, que la enzima sin ligables en solución esté formada por un grupo de partículas hexaméricas en conformación T en equilibrio con algunas en estado R. Por lo tanto, la transición alostérica homotrópica sigue la secuencia: forma T libre de ligables -

forma R libre de ligables - forma R ocupada. Ésta es también la ruta heterotrópica obligada, ya que el activador alostérico se une exclusivamente al estado R (12). Entonces, la presencia de moléculas unidas al sitio activo en la transición alostérica homotrópica desplaza el equilibrio T a R, directamente uniéndose en el sitio activo del conformero R sin ligables. Si relacionamos este modelo con el comportamiento vibratorio observado podemos proponer que la forma "tensa" de la enzima es más bien un estado "oscilante", en que una parte de las conformaciones involucradas en la oscilación alcanzan a la forma R sin ligables, el cual puede unir moléculas en cualquiera de sus dos sitios (activo y alostérico) (figura 26).

Figura 26

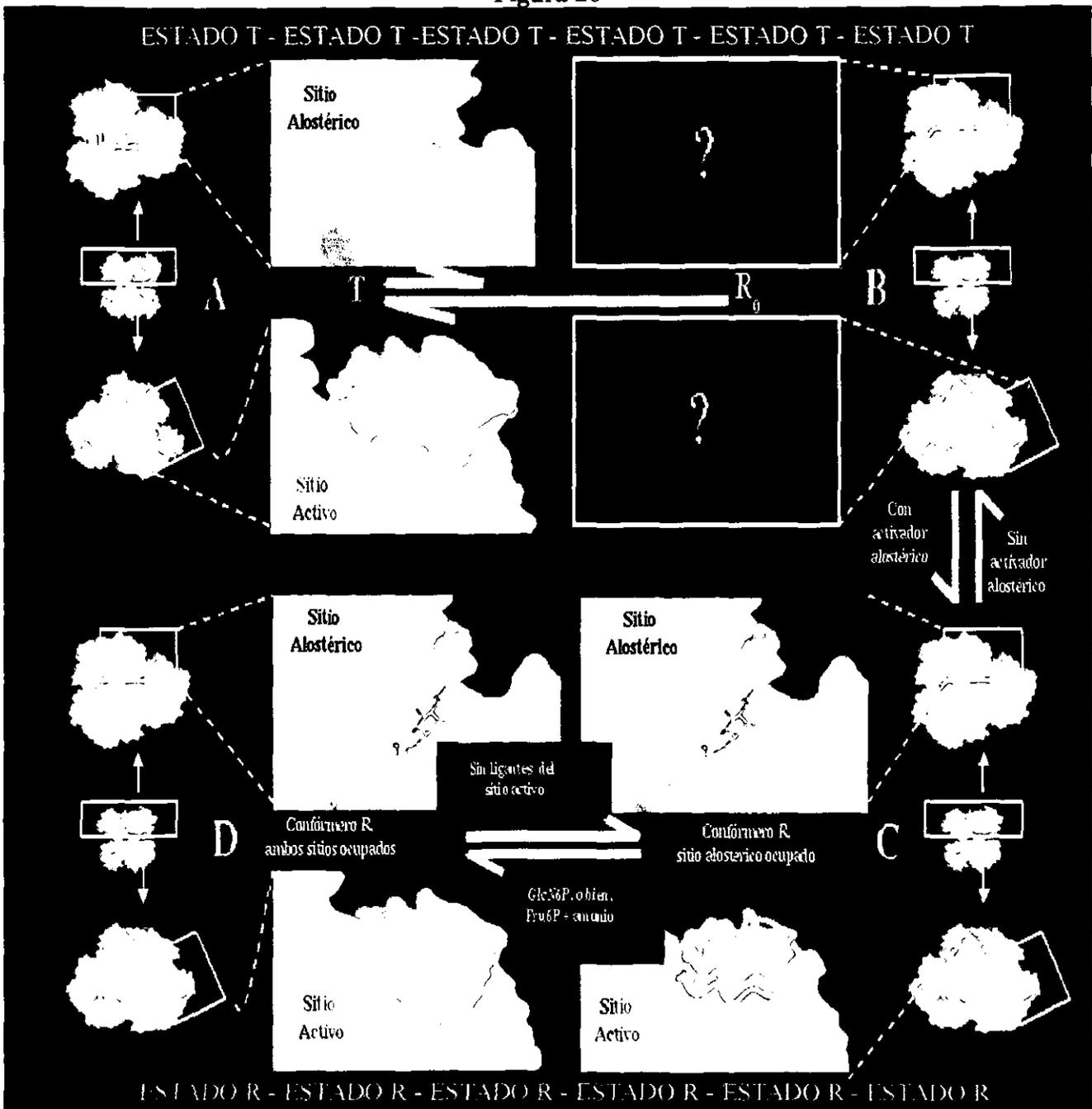


Figura 26: asumiendo el modelo MWC aplicado para explicar los datos cinéticos de esta enzima, la forma T es incapaz de unir al activador alostérico, pero capaz de unir al sustrato. En nuestros resultados no obtuvimos ninguna forma T con ligandos. Proponemos que, tanto en la transición homotrópica como la heterotrópica, el proceso de unión ocurre directamente en la forma R sin ligandos, que está en equilibrio con la forma T sin ligandos, a través de vibraciones atómicas que presentan la misma dirección que la transformación alostérica (A a B). En la activación heterotrópica el activador alostérico produce la transición de T a R uniéndose

directamente a la forma R, una vez en la forma R. La tapa del sitio activo genera tres conformaciones alternas que "abren" y "cierran" al sitio activo. Cuando el sustrato (o cualquier otra molécula ligable) se une al sitio activo, la tapa se congela en una conformación, "cerrando" el sitio (C a D). Cuando la concentración del sustrato decrece se generan las tres conformaciones alternas de la tapa del sitio activo (D a C). Finalmente cuando la concentración de el activador alostérico decrece, la forma T sin ligables se reconstruye (C a A, o C a B a A). El código de colores es: amarillo, para la zona externa, azul, para la zona interna, y magenta, para la tapa del sitio activo.

CONCLUSIONES

1. En la unidad asimétrica de los cristales forma R, sólo el monómero 2 puede usarse como modelo del comportamiento en solución, debido a que el monómero 1 presenta contactos cristalinos (mediados por moléculas de agua) entre la tapa de su sitio activo y la tapa del sitio activo de un hexámero vecino.
2. Existe una relación de flexibilidad molecular inversamente proporcional entre la tapa del sitio activo y la zona externa de la enzima. Es decir, si por alguna razón estructural la flexibilidad molecular de la tapa del sitio activo disminuye, la flexibilidad de la zona externa aumenta y viceversa.
3. No fue posible obtener un cristal forma T con ligantes, ni adicionando los ligantes al momento de armar el experimento de cristalización (caso que siempre generó cristales R), ni remojando cristales T ya formados en soluciones con alguno de los ligantes de los sitios alostérico o activo.
4. La estructura del conformero R con sólo el sitio alostérico ocupado presenta tres conformaciones alternas de la tapa del sitio activo, las cuales "abren" y "cierran" el acceso al sitio activo.
5. Dado las condiciones especiales que presenta la proteína y su cristal, fue posible afinar los factores de temperatura de la forma T a 1.9 Å de resolución con un modelo anisotrópico, sentando precedente sobre las condiciones de elección de un modelo isotrópico o uno anisotrópico.
6. Se demostró que un movimiento anisotrópico direccionado puede ser reconstruido, dentro del modelo isotrópico, utilizando conformaciones alternas.
7. El activador alostérico (GlcNAc6P) se une con una fuerza inusual al sitio alostérico. Aún a una dilución de 10^6 , se encuentra en la estructura cristalina determinada.
8. El sustrato de la reacción inversa (Fru6P) se liga al sitio activo en una forma abierta, por lo que la velocidad de la reacción reversa debe estar limitada por la tasa de apertura espontánea en solución de la Fru6P.
9. En condiciones fisiológicas es posible que la Fru6P funcione como activador alostérico,

- ligándose al sitio alostérico.
10. La flexibilidad molecular de la tapa del sitio activo en la forma R está directamente relacionada con la ligadura del sustrato.
 11. La flexibilidad molecular encontrada en la forma T permite suponer que la forma T "oscila" hacia la forma R, modificando la concepción de la transformación alostérica y formulando una nueva hipótesis que puede ser aplicada a otros sistemas alostéricos.
 12. La mutación K160E "desarma" al sitio alostérico, pero no congela a la enzima en alguno de los dos estados (R o T), ya que cristalográficamente fue posible determinar ambos conformeros.
 13. Las estructuras cristalinas de los conformeros R y T de la mutante Y254F, permiten sustentar la existencia real de un "switch" alostérico. Así como, clarifican su función, en la forma R, el puente Y254 - T161 "estabiliza" a la tapa del sitio activo favoreciendo la catálisis. En la forma T, el puente Y254 - P149 comunica la flexibilidad molecular del C-terminal al resto de la zona externa favoreciendo la estructura "oscilante" T a R.
 14. La estructura cristalina del conformero T de la mutante F174A, resalta la función que las interacciones hidrofóbicas mediadas por F174 juegan para estabilizar a la tapa del sitio activo y favorecer la catálisis enzimática.
 15. Durante las transformaciones homo y heterotrópicas, el asa formada por los residuos 144 a 154 sufre un "induced fit".
 16. La flexibilidad molecular de distintos motivos estructurales de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (tapa del sitio activo y asas vecinas, C-terminal, etc.) está directamente relacionado con la catálisis y la transformación alostérica, donde juega un papel central.
 17. En la forma R el sitio activo presenta dos "canales" de acceso, los cuales son complementarios en potencial al ion amonio y al ligante fosfatado.
 18. Por cada monómero protéico se pueden ligar dos moléculas de ion amonio.
 19. El "canal" de acceso al sitio activo del ion amonio presenta una cadena de moléculas de agua que pueden formar parte de un sistema intercambiador de iones del interior al exterior de la cavidad catalítica.

PERSPECTIVAS

1. Corroborar la hipótesis del estado T "oscilante" en la GlcN6Pdesaminasa de *E. coli*, utilizando afinamiento con matrices TLS.
2. Corroborar la hipótesis del estado T "oscilante" en la GlcN6Pdesaminasa de *E. coli*, haciendo dinámicas moleculares.
3. Corroborar la hipótesis del estado T "oscilante" en la GlcN6Pdesaminasa de *E. coli*, haciendo análisis de modos normales.
4. Afinar y estandarizar el método de purificación para obtener la GlcN6P desaminasa de *Candida albicans*. Sobre el que se trabajó durante esta tesis.
5. Cristalizar y determinar la estructura tridimensional de la GlcN6P desaminasa de *C. albicans*..
6. Realizar la caracterización cinética de la GlcN6P desaminasa de *C. albicans*..
7. Intentar encontrar otros ejemplos de sistemas alostéricos en los que la movilidad molecular también juegue un papel importante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perutz, M.F. (1990). *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
1. Cooper, A. and Dryden, D.T.F. (1984). *Allostery without conformational change: a plausible model*. *E. Biophys. J.* **11**:103-109.
2. Goodsell, D.S. and Olson, A.J. (2000) *Structural symmetry and protein function*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**: 105-153.
3. Jencks, W.P. (1997). *From chemistry to biochemistry to catalysis to movement*. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 1-18.
4. Ji, X., Braxenthaler, M., Moulton, J., Fonticelli, C., Bucci, E. & Gilliland, G.L. (1998). *Conformation of the sebacyl b¹Lys82-b²Lys82 crosslink in T-state human hemoglobin*. *Proteins:Structure, Function and Genetics* **30**: 309-320.
5. Blow, D. (2000). *So do we understand how enzymes work?* *Structure*, **8**, R77-R81.
6. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J-P. (1965). *On the nature of the allosteric transition: A plausible model*. *J. Mol. Biol.* **12**: 88-118.
7. Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G. And Filmer, D. (1966). *Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. *Biochemistry* **5**: 365-385.
8. Rubinson, K.A. (1998). *The polymer basis of kinetics and equilibria of enzymes: the accessible-volume origin of entropy changes in a class ab-lactamase*. *J. Prot. Chem.* **17**: 771-787.
9. Kidera, A. and Go, N. (1992). *Normal mode refinement: crystallographic refinement of protein dynamic structure*. *J. Mol. Biol.* **225**: 457-475.
10. Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L., Garratt, R.C. & Oliva, G. (1999). *The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution*. *Structure* **7**: 527-536.
11. Oliva, G., Fontes, M.R.M., Garratt, R.C., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L. & Horjales E. (1995). *Structure and catalytic mechanism of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli at 2.1 Å resolution*. *Structure* **3**: 1323-1332.
12. Altamirano, M.M., Hernández-Arana, A., Tello-Solís, S. & Calcagno, M.L. (1994). *Spectrochemical evidences for the presence of a tyrosyl residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **220**: 409-413.

13. Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. & Altamirano, M.M. (1998). *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* **37**: 7844-7849.
14. Midelfort, C. & Rose, I.A. (1977). *Studies on the mechanism of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate isomerase*. *Biochemistry* **16**: 1590-1599.
15. Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984). *Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**: 165-173.
16. Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Horjales, E. & Calcagno, M.L. (1995). *Asymmetric allosteric activation of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121*. *Biochemistry* **34**: 6074-6082.
17. Teplyakov, A., Obmolova, G., Badet-Denisot, M.A. & Badet, B. (1999). *The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase*. *Protein Sci.* **8**: 596-602.
18. Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. & Suastegui, J. (1984). *Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine 6-phosphate isomerase (deaminase) from Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**: 165-173.
19. Plumbridge, J.A. (1990). *Induction of the nag regulon of Escherichia coli by N-acetylglucosamine and glucosamine: role of the cAMP-catabolite activator protein complex in expression of the regulon*. *J. Bacteriol.* **172**: 2728-2735.
20. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, j., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998). *Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination*. *Acta Cryst.* **D54**: 905-921.
21. Eigenbrot, C., Randal, M. & Kossiakoff, A.A. (1992). *Structural effects induced by mutagenesis affected by crystal packing factors: the structure of a 30-51 disulfide mutant of basic trypsin inhibitor*. *Proteins* **14**: 75-87.
22. Lara-González, S., Dixon, H.B.F., Mendoza-Henández, G., Altamirano, M.M. & Calcagno, M.L. (2000). *On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**: 219-227.
23. Zhang, M. & Yuan, T. (1998). *Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility*. *Biochem. Cell Biol.* **76**: 313-323.
24. Williams, E.A. & Morrison, J.F. (1992) *Human dihydrofolate reductase: reduction of alternative substrates, pH effects, and inhibition by deazafolates*. *Biochemistry*, **29**: 6801-6811.

25. Otwinowski, Z. (1993). *Oscillation data reduction program*. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*. (Sawyer L. Isaacs, N. & Bailey S., Eds), pp. 56-62, SERC Daresbury Laboratory, Warrington.
26. Otwinowski, Z. & Minor W. (1996). *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. (Carter, C. & Sweet, R.M., eds), pp 307-325, Academic Press, Boston MA.
27. Collaborative Computational Project, Number 4, (1994). *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. *Acta Crystallogr. D* **50**: 760-763.
28. Brunger, A.T. (1992). X-PLOR Version 3.1. *A system for X-ray Crystallography and NMR.*, Yale University Press, New Haven, CT.
29. Sheldrick, G.M. & Schneider, T.R. (1997). *SHELXL: high resolution refinement*. *Methods Enzymol.* **277**: 319-343.
30. Brunger, A.T. (1992). *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. *Nature* **355**: 472-475.
31. Merrit, E.A. & Murphy, M.E.P. (1994). *RASTER-3D Version 2.0, a program for photorealistic molecular graphics*. *Acta Crystallogr. D* **50**: 869-873.
32. Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993). *GRASP - graphical representation and analysis of surface properties*. *Biophys. J.* **64**: A166.
33. Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). *Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in electron density maps and the location of errors in these models*. *Acta Cryst. A* **47**: 110-119.
34. Kraulis, P.J. (1991). *MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures*. *J. Appl. Crystallogr.* **24**: 946-95.
35. Freire, E. (1999). *The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: analysis of the binding of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 10118-10122.
36. Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Hernández-Arana A. & Calcagno, M. (1991). *Secondary structure of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy*. *Biochem Biophys. Acta* **1076**: 266-272.
37. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
38. Das, M. & Datta, A. (1982) *Purification and some properties of inducible glucosamine-6-phosphate deaminase from Candida albicans*. *Biochem. Internl.* **6**: 735-741.
39. Natarajan, K. & Datta, A. (1993) *Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **12**: 9206-9214.

40. Lara-González, S., Dixon, H.B.F., Mendoza-Hernández, G. Altamirano, M.M. & Calcagno, M.L. (2000) *On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli. J. Mol. Biol*, **301**: 219-227.
41. Montero-Morán, G.M., Lara-González, S., Alvarez-Añorve, L.I., Plumbridge, J.A. & Calcagno, M.L. (2001) *On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of Escherichia coli glucosamine 6-phosphate deaminase. Biochemistry* **40**(34):10187-96.
42. Choe, J.Y., Fromm, H.J. and Honzatko, R.B. (2000). *Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric revealed in product complexes. Biochemistry* **29**: 8565-8564.
43. Merrit, E.A. (1999). *Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement. Acta Cryst. D***55**: 1109-1117.
44. Endrizzi, J.A., Beernink, P.T., Alber, T. & Schachman, H.K. (2000). *Binding of bisubstrate analog promotes large structural changes in the unregulated catalytic trimer of aspartate transcarbamoylase: implications for allosteric regulation induced cell migration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 5077-5082.
45. Sakash, J.B. & Kantrowitz, E.R. (2000). *The contribution of individual interchain interactions to the stabilization of the T and R states of Escherichia coli aspartate transcarbamoylase. J. Mol. Chem.* **37**: 28701-28707.
46. Kleywegt, G.J. & Read, R.J. (1997). *Not your average density. Structure* **12**:1557-69.
47. Rice, L.M. & Brunger, A. (1994). *Torsion angle dynamics: reduced variable conformational sampling enhances crystallographic structure refinement. Proteins.* ;**19**(4):277-90.
48. Konnert, J.H. (1974). *Structural information in diffuse diffraction patterns. Environ Health Perspect.* **9**:137-8.
49. Adams MJ, Liljas A, Rossmann MG. (1973). *Functional anion binding sites in dogfish M4 lactate dehydrogenase. J Mol Biol* **76**(4):519-28.

APÉNDICE -A

A continuación se encuentra un pequeño glosario con algunos de los términos más empleados en la jerga cristalográfica:

Afinamiento: es el proceso para mejorar el ajuste entre el modelo molecular y los datos cristalográficos. Durante el proceso, se ajustan las posiciones atómicas en el modelo, la ocupaciones y los factores de temperatura, con el objetivo de mejorar el ajuste entre los datos (intensidad de las reflexiones) y los parámetros estructurales (como las distancias y ángulos de enlace). Se pueden imponer ciertos "*constraints*" y "*restraints*" en el modelo durante el afinamiento, relajando estas restricciones cuando el afinamiento avanza. Las minimizaciones energéticas también son incluidas en el afinamiento. Algunos de los signos de progreso en el afinamiento incluyen: la reducción del valor del factor R y Rfree; ajuste de residuos a regiones permitidas en la gráfica de Ramachandran; reducción en la desviación promedio de los parámetros estructurales ideales y mejor ajuste del modelo en el mapa de densidad.

Anisotropía: anisotropía neta de un átomo (*A*) se define como el cociente entre el autovalor ("eigenvalue") mínimo y el máximo de una matriz 3 X 3 de parámetros anisotrópicos de desplazamiento. Si el cociente es 1.0 el átomo se comporta con un desplazamiento isotrópico (esférico), mientras el valor tienda a cero, se incrementan las características anisotrópicas (con una dirección preferida).

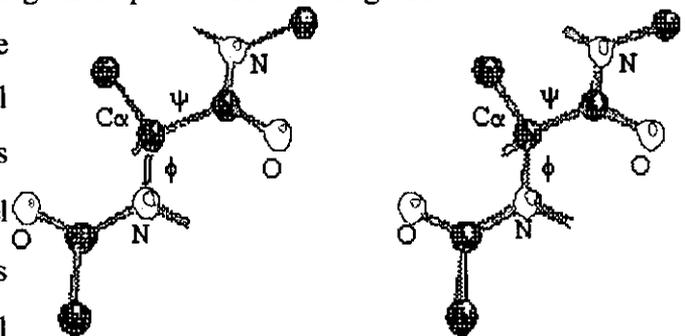
Celda unitaria: el volumen menor de un cristal con el que se puede generar todo el cristal sólo aplicándole translaciones. Está definido por tres longitudes (*a*, *b* y *c*) y tres ángulos (α , β y γ).

Constreñir o fijar parámetros ("*Constraint*"): es cuando un valor fijo es colocado en un parámetro durante el afinamiento cristalográfico. Por ejemplo en la etapas iniciales del afinamiento, todas las ocupaciones son fijadas o constreñidas a un valor de 1.0. En la etapas finales (y si se cuenta con suficientes datos) estos valores son liberados, y se permite que las ocupaciones afinen a valores fraccionales. Esto puede reflejar la existencia de conformaciones alternas, tanto en cadenas laterales como en secciones completas de la macromolécula o ligantes de la misma.

Cristal: según la IUCr (International Union of Crystallography) un cristal es "aquel sólido que presenta un patrón de difracción discreto y reproducible al bombardearlo con radiaciones de longitud de onda cercana o menor a 1.5 Å". Según la Enciclopedia Británica un cristal es "cualquier sólido en que los átomos constituyentes están arreglados según un patrón definido y que tienen una superficie regular que refleja simetría interna"

Datos: en cristalografía de rayos X, los datos son las posiciones y las intensidades medidas de las reflexiones en el grupo de patrones de difracción producidos por un cristal.

Diagrama de Ramachandran: es una gráfica que muestra los ángulos conformaciones de la cadena principal de un polipéptido. Este diagrama se usa para encontrar problemas en el modelo durante al afinamiento de la estructura. Los ángulos conformaciones graficados son phi (ϕ), el ángulo torsional del enlace N-C α , definido por los átomos C-N-C α -C; y psi (ψ), el ángulo torsional del enlace C α -C, definido por los átomos N-C α -C-N.



Los ángulos phi y psi de un residuo individual están restringidos por repulsión estérica. Los pares permitidos se representan en el diagrama de Ramachandran como polígonos irregulares que incluyen los ángulos conformaciones de la cadena principal que no dan lugar a repulsión estérica, o bien, repulsión modesta. Cada residuo en la proteína es representado como un punto en la gráfica.

Dispersión anómala con múltiples longitudes de onda (MAD): es un método que deriva las fases iniciales midiendo los datos de difracción a varias longitudes de onda, cercanas al máximo de absorción de un átomo en particular. La señal anómala que resulta permite (por comparación) obtener la fase. Usualmente esta técnica se emplea reemplazando a los residuos de metionina con selenio-metioninas.

Fase: se refiere a la posición del máximo de una onda con relación a un origen.

Factor de temperatura (Factores B, factor de Debye-Waller o parámetro de desplazamiento): este factor se puede expresar como la medida de oscilación de un átomo alrededor de una posición específica en el modelo. También se puede definir como un factor que se aplica al factor dispersante ("scattering term") de cada átomo que describe el grado en que la densidad electrónica está dispersa alrededor de un punto. Normalmente, se espera que los átomos de las cadenas laterales muestren más libertad de movimiento que los átomos de la cadena principal. La difracción es afectada por la vibración atómica, por lo que es real el asignar factores de temperatura a cada átomo e incluir el valor en los parámetros por afinar. A partir de los factores de temperatura generados durante el afinamiento, se genera información sobre las zonas con mayor libertad de movimiento.

Si el factor de temperatura B_j es solamente la medida del movimiento térmico de un átomo j , entonces en el caso más simple de un movimiento térmico armónico de igual magnitud en todas direcciones (llamada vibración isotrópica), B_j está dado por:

$$B_j = 8 \pi^2 \langle u_j^2 \rangle = 79 \langle u_j^2 \rangle$$

donde u es el desplazamiento de un átomo desde su posición de reposo. Pero en la mayoría de las proteínas los valores B obtenidos son muy grandes como para ser simplemente el resultado de movimientos térmicos, sino más bien efectos de desorden molecular general.

Los factores de temperatura son propiedades de la estructura cristalina de macromoléculas. Factores de temperatura bajos indican poco movimiento en esa parte de la molécula en el cristal. Un valor alto significa una distribución mayor en las posiciones de esa sección particular, esto es que esta zona es más móvil en el cristal. Los factores de temperatura altos también pueden representar un error o inexactitudes en el afinamiento del modelo.

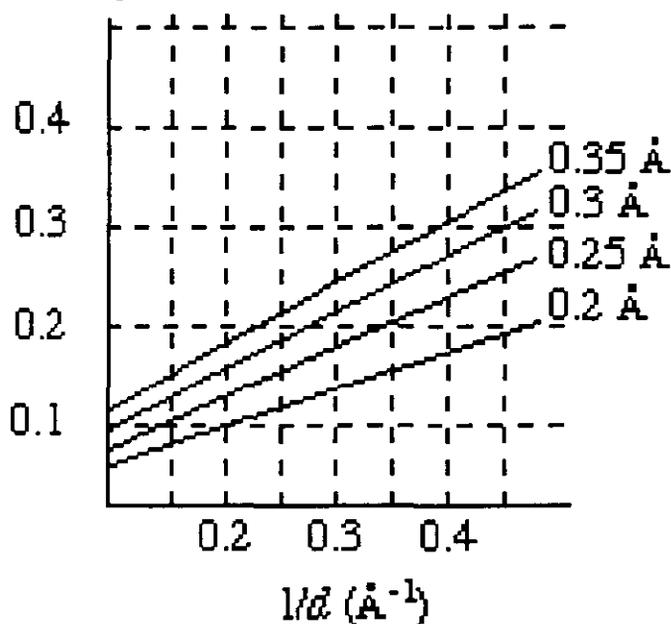
Factor R: es una medida de la coincidencia entre el modelo experimental cristalográfico y los datos de difracción. Primero se calculan, a partir del modelo, las amplitudes esperadas de las ondas para cada reflexión en el patrón de difracción, y luego, se comparan con los datos experimentales:

$$R = \frac{\sum \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

Gráfica de Luzzati: es una forma de estimar la precisión de la localización de los átomos en

un modelo cristalográfico afinado. En el mejor de los casos la gráfica de Luzzati permite estimar el límite superior del error en las coordenadas atómicas. La figura siguiente muestra cuatro curvas teóricas en una Gráfica de Luzzatti.

Los números a la derecha de cada curva son los estimados teóricos del promedio de la incertidumbre en la posición de los átomos en el modelo afinado (los errores rms en la posición de los átomos). Los errores de posición son dependientes del factor R a distintos intervalos de resolución. Para preparar los datos para una gráfica de Luzzati, los datos de intensidad son separados en grupos de reflexiones con base a intervalos estrechos de $1/d$ (donde d es el espacio entre planos de la red reales). Entonces se gráfica cada factor R (eje vertical) contra el punto medio de $1/d$ para el grupo de reflexiones (eje horizontal). Normalmente, el factor R aumenta con bajas resoluciones (valores altos de $1/d$). La curva generada con los datos experimentales ajusta con alguna de las curvas teóricas, obteniéndose el error de posición atómica. La distribución de Luzzati, corresponde a un caso especial de la distribución general. Luzzati asume que todos los átomos son sujetos del mismo error de la misma distribución gaussiana de error en las coordenadas, asumiendo que el modelo está completo. La única diferencia con la distribución general es que la expresión para el término de varianza puede simplificarse a:



$$\sigma_{\Delta}^2 = (1 - D^2) \Sigma_N$$

Luzzati asume un error uniforme, pero átomos diferentes siempre son sujetos de errores diferentes. De hecho, la distribución de Luzzati (a pesar de la práctica), no fue diseñada para estimar el error en las coordenadas.

Grupo espacial: es un conjunto de arreglos de operaciones de simetría coherentes con un

patrón regular extendido al infinito. Es la simetría de una estructura tridimensional. Existen 230 grupos espaciales posibles, de los cuales solo 65 pueden emplearse en macromoléculas biológicas. La simetría de cualquier agregado o cristal de una molécula biológica está descrito sólo por operaciones de rotación y/o translación. Esto se debe a que las moléculas proteicas consisten sólo de L-aminoácidos, por lo que, las simetrías de reflexión o inversión no están permitidas.

Mapas de densidad electrónica: es, en cierto sentido, el producto final de la determinación estructural cristalográfica. Representa, en forma topográfica, las zonas espaciales con mayor densidad de electrones, con base en valores de error estadístico llamados sigma (σ), donde las zonas de alta concentración electrónica (como metales, grupos hemo, algunos iones, etc.) presentan densidad electrónica a valores de sigma altos (mayores de 3.0). Normalmente los mapas de densidad se representan a valores de sigma iguales a 1.0, sin embargo el conocer el valor de sigma en un mapa dado es necesario para evaluar la calidad del modelo.

Modelo experimental: Es el producto de la determinación estructural por métodos de difracción (principalmente cristalografía de rayos X) y espectroscopia de RMN; en contraste los modelos teóricos que incluyen modelos por homología, por simulación de plegado o por dinámica molecular.

Modelo versus estructura: Algunos científicos tienden a utilizar el término estructura para referirse al resultado de los métodos experimentales, como cristalografía de rayos X y espectroscopia de RMN. Y el término modelo para referirse a los modelos teóricos, incluyendo los modelos por homología y aquellos obtenidos por simulaciones de plegado y dinámicas moleculares. La estructura molecular es difícil de ver directamente, por lo que es correcto usar el termino modelo para todos los resultados que intenten explicar la estructura molecular. En este contexto se podría diferenciar a los modelos en experimentales y teóricos, y llamar al proceso de construir y afinar un modelo como una determinación estructural.

Mosaicidad ("mosaicity"): es la medida angular del grado de dispersión de las celda unitarias en el cristal. Un valor de mosaicidad bajo indica cristales mejor ordenados y por lo tanto una

mejor difracción.

Ocupación (valor q , "occupancy"): Es uno de los parámetros incluidos en el afinamiento. La ocupación n_j de un átomo j es una medida de la fracción de moléculas en el cristal en que el átomo j ocupa la posición especificada en el modelo. Si se incluye la ocupación en los parámetros afinados (dependiendo de la relación parámetros datos), se obtienen estimados de la frecuencia de conformaciones alternativas, generando información sobre la dinámica de la molécula proteica.

Parámetros estructurales: son los ángulos y distancias de enlace, así como los ángulos conformacionales en el modelo. En modelos afinados, estos parámetros no deben mostrar desviaciones estándares mayores de 0.02 Å para distancias de enlace y 4 grados para ángulos de enlace.

Precisión de las posiciones atómicas: en cristalografía el termino resolución se refiere simplemente al limite máximo que permite diferenciar entre dos puntos a una distancia dada. En contraste, la precisión de la posición atómica depende en parte de los limites de resolución de los datos empleados, pero también depende de la calidad de los mismos, de su integridad ("*completeness*"), de la intensidad en la última franja de resolución, de la certeza del grupo espacial seleccionado, etc. Los datos buenos pueden generar las posiciones que son precisas a 1/5 o 1/10 de la resolución indicada (ver Gráfica de Luzzati).

Problema de fase: En difracción de rayos X sólo se miden las amplitudes. Las fases se deben derivar de otra manera (usando reemplazo isomórfico múltiple, reemplazo molecular o dispersión anómala). Las fases usadas inicialmente en un afinamiento son siempre aproximadas.

Reemplazo isomórfico múltiple (MIR): es el método primario de determinación inicial de las fases en una estructura nueva. Estas fases se derivan a partir de al menos 3 grupos de datos colectados con cristales que se han embebido en soluciones de metales pesados y que luego se comparan con los de un cristal nativo.

Reemplazo molecular (MR): es un método que deriva las fases iniciales al comparar una

estructura homóloga conocida con los datos de difracción de una estructura desconocida.

Regiones desordenadas: son aquellas regiones que tienen densidad electrónica baja, o bien, que tienen factores de temperatura altos.

R_{free}: se calcula de la misma manera que el valor R, pero utilizando solamente un pequeño grupo de intensidades seleccionadas al azar (el "grupo de prueba"), que se separan al principio del afinamiento y no son incluidas en el mismo. Las intensidades dentro del R_{free} se usan solamente en las validaciones cruzadas ("*cross-validation*") para seguir el proceso de coincidencia entre los datos calculados (del modelo) y los datos observados. En cualquier etapa del afinamiento, el R_{free} mide que tanto el modelo atómico usado predice un sub-grupo de intensidades medidas que no fueron incluidas en el afinamiento, mientras que el valor R mide que tanto el modelo actual predice los datos completos.

Restringir o limitar parámetros ("*Restraint*"): es una condición impuesta durante el afinamiento cristalográfico, para que todas las distancias y ángulos de enlace estén dentro de un intervalo específico.

Resolución: en un modelo generado a partir de los datos de difracción de rayos X, la resolución es la distancia más corta (en Å) que se toma de los patrones de difracción, y que representa la distancia de planos atómicos dentro de la celda unitaria. Dicho de otra forma, la resolución es la distancia más corta en que dentro del modelo dos puntos pueden ser diferenciales entre sí.

Simetrías no cristalográficas: son simetrías que no están contempladas en las simetrías reticulares permitidas, es decir, son simetrías adicionales que presentan algunas moléculas biológicas. Cuando se está afinando una estructura, es muy importante la relación de parámetros por calcular versus los datos colectados. En el caso de algunas bio-moléculas, dentro de la unidad asimétrica existen simetrías (simetrías no cristalográficas) que cuando se consideran disminuyen el número de parámetros por determinar, simplificado el problema al añadir en los cálculos de la matriz de roto-translación que define a la simetría no cristalográfica. Un caso extremo son las moléculas virales, que sin el uso de simetrías no cristalográficas serían casi imposibles de resolver debido a la gran cantidad de parámetros

espaciales por determinar.

Unidad asimétrica: es el agregado más pequeño de moléculas que puede generar la celda unitaria completa utilizando operaciones simétricas. Por razones técnicas, que tienen que ver con las estrategias de colecta de los datos, las propiedades del cristal y el afinamiento del modelo, la unidad asimétrica se menciona en los artículos que tratan de modelos cristalográficos, ya que trabajar con una fracción de la celda unitaria facilita los cálculos. Es fácil tener la impresión de que la unidad asimétrica es la unidad biológica funcional, pero frecuentemente esto no es cierto. De hecho en el PDB normalmente se encuentra depositada la unidad asimétrica, así como los operadores simétricos que permiten generar la unidad biológica funcional y, por supuesto, la celda unitaria completa.

APÉNDICE -B

Aquí se muestra una lista de los acrónimos y abreviaturas empleados en el texto:

CCP4	Programa Colaborativo Computacional 4, (<i>Collaborative Computational Program Number 4</i>).
CNS	Crystallographic & NMR system.
EDTA	Acido etilen diamino tetraacetico
Fru6P	D-Fructosa 6-fosfato.
GlcN	Glucosamina.
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina.
GlcNol6P	2-desoxi-2-amino D-glucitol-6-fosfato (D-Glucitol amina 6-fosfato)
GlcN6P	D-glucosamina-6-fosfato.
GlcN6P desaminasa	D-glucosamina-6-fosfato desaminasa.
GlcNAc6P	<i>N</i> -acetil-glucosamina 6-fosfato.
HEPES	Acido <i>N</i> -(2-hidroxietyl) piperazina- <i>N'</i> -2-etanosulfonico.
IUCr	International Union of Crystallography.
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis.
KNF	Modelo Alostérico de Koshland-Nemethy-Filmer.
LNLS	Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón, (Brasil).
LAUE	Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas.
MetAmonio	Metil amonio.
MES	Acido 2-morfolino etanelsulfonico
MWC	Modelo Alostérico de Monod-Wyman-Changeux.
PDB	Banco de Datos de Proteínas, (<i>Protein Data Bank</i>).
PAD	Parámetros Atómicos de Desplazamiento.
RCP (PCR)	Reacción en cadena de la polimerasa.
RMSD (RMS)	Desviación Cuadrática Promedio (<i>Root Mean Square Deviation</i>).
SNC (NCS)	Simetrías no Cristalográficas (<i>Non Crystallographic Symmetries</i>)
SSRL	Laboratorio de Radiación Sincrotrón Stanford, (<i>Stanford Synchrotron Radiation Laboratory</i>).
<i>V_{max}</i>	Velocidad Máxima.

APÉNDICE -C

Aquí se muestra una lista de algunas direcciones en la red que son de gran utilidad en cristalografía de macromoléculas, y que espero le ahorren tiempo a cualquier persona interesada en el tema:

SOCIEDADES

<http://www.faseb.org/protein/>

The Protein Society



<http://nexus.hwi.buffalo.edu/ACA/>

American Crystallographic Association



<http://www.iucr.ac.uk/>

International Union of Crystallography
(ver SINCRIS para obtener varios Softwares)



<http://area.ba.cnr.it/eca/>

European Crystallographic Association



<http://ifcsun1.ifisiol.unam.mx/smb/>

Sociedad Mexicana de Bioquímica



<http://www.unam.mx/smcrl/>

Sociedad Mexicana de Cristalografía



<http://www.lnls.br/sbcr/>

Sociedade Brasileira de Cristalografia

BANCOS DE DATOS

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

Protein Data Bank



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

The Genome Database



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

GenBank



<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>

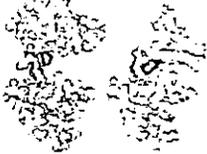
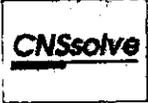
Swiss Prot



<http://www.bmcd.nist.gov:8080/bmcd/bmcd.html>

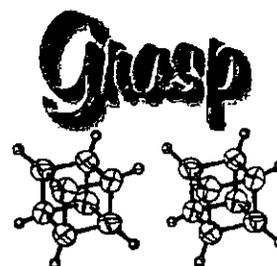
Biological Macromolecule
Crystallization Database



- <http://alpha2.bmc.uu.se/hicup/> Hetero-compound Information Centre 
- <http://www.ccdc.cam.ac.uk/> Cambridge Crystallographic Data Center 
- <http://ndbserver.rutgers.edu:80/> Nucleic Acid Database 
- <http://www.bmrb.wisc.edu/> BioMagResBank 
- <http://bioinfo.mbb.yale.edu/MolMovDB/> Database of Macromolecular Movements 
- <http://www.ibt.unam.mx/vir/> Grupo de Anticuerpos 
- <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/> Enzyme Nomenclature
- PROGRAMAS**
- <http://imsb.au.dk/~mok/o/> O Protein Crystallographic Package 
- <http://www.dl.ac.uk/CCP/CCP4/main.html> Collaborative Computational Program 4 
- <http://cns.csb.yale.edu/v1.0/> Crystallography and NMR System 
- <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> Visual Molecular Dynamics 
- <http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/raster3d.html> Raster 3D 
- <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/> The SHELXL Home Page
- <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/p1lys/p1lys.html> Refinement of Triclinic Lysozyme at 1.1 Å using Shelx (*un ejemplo CLARO de cómo usar Shelx*)

<http://trantor.bioc.columbia.edu/grasp/>

Graphical Representation and
Analisy of Structural Properties



<http://www.ornl.gov/ortep/ortep.html>

Oak Ridge Thermal Ellipsoid
Plot Program

<http://www.scripps.edu/pub/dem-web/toc.html0>

XtalView (MIR y MAD)
(visualiza PAD anisotropicos.)



http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/biochemie/ds/dsbrag_e.htm

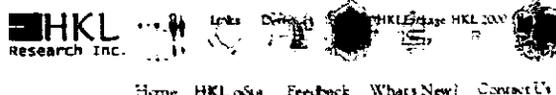
Bragi (Protein Modeling Program)

(similar a InsightII pero gratis.)



<http://www.hkl-xray.com/>

HKL (Xdiplay
and Denzo)



<http://www.msi.com/>

Quanta

Molecular Simulations Inc.

http://afmb.cnrs-mrs.fr/TURBO_FRODO/main.html

Turbo Frodo



<http://www.bmsc.washington.edu/parvati/parvati.html>

Parvati

(Análisis de PAD anisotropicos)



<http://www.ks.uiuc.edu/Development/biosoftdb/biosoft.cgi> Structural Software
Database



<http://zeus.polsl.gliwice.pl/~nikodem/linux4chemistry.html>

Linux for Chemistry
(Softwares para Linux)



<http://tuxfinder.com/>

Tuxfinder

(Buscador de Softwares para Linux)



FUENTES SINCROTRON

- | | | |
|---|--|---|
| http://biosync.sdsc.edu/ | Structural Biology
Sincrotron User Organization |  |
| http://ssrl.slac.stanford.edu/welcome.html | Stanford Synchrotron
Radiation Laboratory |  |
| http://www.lnls.br/ | Laboratório Nacional de Luz Sícron
(Campinas - Brasil) |  |
| http://srs.dl.ac.uk/index.htm | Synchrotron Radiation Source
(Daresbury Laboratory) |  |
| http://www.esrf.fr/ | European Synchrotron Radiation Facility
(Grenoble Laboratory) |  |

INSTITUTOS, INSTITUCIONES Y UNIVERSIDADES

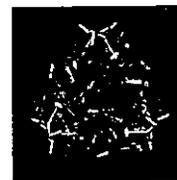
- | | | |
|---|---|---|
| http://www.iqimica.unam.mx/ | Instituto de Química - UNAM
(sede del Laboratorio Universitario de Estructura) |  |
| http://www.ifisiol.unam.mx/ | Instituto de Fisiología Celular - UNAM |  |
| http://WWW.biomedicas.unam.mx/ | Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM |  |
| http://www.ibt.unam.mx/ | Instituto de Biotecnología - UNAM |  |
| http://www.unam.mx/indexs.html | UNAM |  |
| http://www.main.conacyt.mx/sni/index.html | Conacyt - SNI |  |
| http://itzamna.cifn.unam.mx/ | Centro de Investigaciones sobre
Fijación de Nitrógeno -UNAM |  |

EDUCATIVOS Y FUNCIONALES

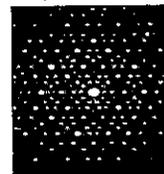
<http://www.ibt.unam.mx/paginas/arreola/links.html> Laboratorio de Cristalografía

de Proteínas IBT-UNAM

(*en construcción*)



<http://www.lassp.cornell.edu/lifshitz/quasicrystals.html> Quasicrystals



<http://asterix.jci.tju.edu/brenner/pr613.html>

Difference Patterson Tutorial

<http://www.uni-wuerzburg.de/mineralogie/crystal/teaching/teaching.html> Interactive Tutorial

Diffraction

<http://www.cmc.uab.edu/> UAB Center for Macromolecular Crystallography



<http://neon.mems.cmu.edu/degracf/pg/index.html> Point Groups and Bravais Lattices

(*Representaciones 3D de grupos puntuales*)



<http://www-structure.llnl.gov/Xray/101index.html>

Crystallography 101

<http://www.geom.umn.edu:80/~lori/kali/>

Tour of Symmetry Groups

<http://www-bioc.rice.edu/~berry/papers/crystallization/crystallization.htm>

ProteinCrystallization:

Theory and Practice

<http://www.za.iucr.org/cww-top/crystal.index.html> Crystallography Online



http://www.chess.cornell.edu/MacCHESS/cryo_video.html

Cryocrystallography video

(*Explica como obtener un video sobre crio-cristalografia*)

<http://brie.bmsc.washington.edu/scatter/>

X-ray Anomalous Scattering

(*MAD básico*)

<http://speedy.st-and.ac.uk/~naismith/workshop/dw2.htm>

Least Squares Refinement

of Structural Parameters

<http://www.hamptonresearch.com/>

Hampton Research



Solutions for crystal growth...

(proveedor y buenas fichas técnicas)

<http://www-swiss.ai.mit.edu/~astark/crystal.html>

Interactive Crystallography

<http://www.px.nsls.bnl.gov/>



http://www.netaccess.on.ca/~dbc/cic_hamilton/pcrys.html

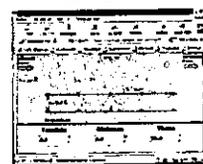
Protein Crystallography Sources

<http://www.ems.psu.edu/Metals/classes/metal434/index.html>

Geometrical Crystallography

<http://www.journey.sunysb.edu/ProjectJava/Bragg/home.html>

Bragg's Law
and Diffraction



<http://www.bioc.rice.edu/XRayView/>

XRayView: a virtual X-Ray
Crystallography Laboratory



<http://pearch.cimr.cam.ac.uk/course.html>

Protein Crystallography Course



<http://www.journey.sunysb.edu/ProjectJava/home.html>

Java Project: Free Scientific Applets
(varias aplicaciones gratis en Java)



<http://crystal.nasa.gov/>

Biological Crystal Growth in Space



<http://www.fos.su.se/struc/linux/linuxtal.html>

Linux Applications in Crystallography

<http://www.lerner.ccf.org/labs/yee/ddq>

DDQ (Difference Density Quality)
A new validation tool to assess the
local and global correctness of
macromolecular crystal structures
(el programa corre con CNS)



<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/~tickle/iucr99/> Modelling Rigid Body Thermal Motion (TLS)
(*artículo sobre movimientos termicos, anisotropia y TLS*)

<http://xray.bmc.uu.se/~terese/> The Protein Crystallization Page

<http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/~johan.zeelen/xtal.html> X-tal protocols

<http://bmbgsi13.leeds.ac.uk/wwwprg/stura/cryst.html> Crystallization Techniques

http://www.ccp14.ac.uk/ccp/web-mirrors/llnrupp/crystal_lab/cystalmake.html
How to grow protein crystals

<http://www-bioc.rice.edu/~berry/papers/crystallization/crystallization.html>
Protein Crystallization:
Theory and Practice

<http://em-outreach.sdsc.edu/web-course/Sec-III.C.1-C.5/Sec-III.C.1-C.5.html>
Crystals, Symmetry, and Diffraction.

APÉNDICE -D

Códigos en una y tres letras de los aminoácidos, así como sus características químicas:

A	Ala	Alanina	Ala	A	Alanina
B	Aminoácido inusual		Arg	R	Arginina
C	Cys	Cisteína	Asn	N	Asparagina
D	Asp	Ácido Aspártico	Asp	D	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutámico	Cys	C	Cisteína
F	Phe	Fenilalanina	Gln	Q	Glutamina
G	Gly	Glicina	Glu	E	Ácido Glutámico
H	His	Histidina	Gly	G	Glicina
I	Ile	Isoleucina	His	H	Histidina
J	Aminoácido inusual		Ile	I	Isoleucina
K	Lys	Lisina	Leu	L	Leucina
L	Leu	Leucina	Lys	K	Lisina
M	Met	Metionina	Met	M	Metionina
N	Asn	Asparagina	Orn	O	Ornitina
O	Orn	Ornitina	Phe	F	Fenilalanina
P	Pro	Prolina	Pro	P	Prolina
Q	Gln	Glutamina	Ser	S	Serina
R	Arg	Arginina	Thr	T	Treonina
S	Ser	Serina	Trp	W	Triptófano
T	Thr	Treonina	Tyr	Y	Tirosina
U	Aminoácido inusual		Val	V	Valina
V	Val	Valina			
W	Trp	Triptófano			
X	Aminoácido inusual				
Y	Tyr	Tirosina			
Z	Aminoácido inusual				

Verde: Aminoácidos hidrofóbicos **Rojo:** Aminoácidos cargados **Azul:** Aminoácidos polares

APÉNDICE -E

Las coordenadas determinadas en esta tesis y depositadas en el Protein Data Bank son:

1. **Código pdb:1fqo** Glucosamine-6-phosphate deaminase complexed with the substrate of the reverse reaction fructose 6-phosphate (forma abierta). Autores: Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P., Horjales, E.
2. **Código pdb:1frz** Glucosamine-6-phosphate deaminase from *E. coli*, R conformer. Complexed with the allosteric activator *N*-acetyl-glucosamine-6-phosphate at 2.2 Å resolution. Autores: Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P., Horjales, E.
3. **Código pdb:1fs6** Glucosamine-6-phosphate deaminase from *E. coli*, T conformer at 2.2 Å resolution. Autores: Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P., Horjales, E.
4. **Código pdb:1fsf** Glucosamine-6-phosphate deaminase from *E. coli*, T conformer at 1.9 Å resolution. Autores: Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P., Horjales, E.
5. **Código pdb:1fs5** A discovery of three alternate conformations in the active site of glucosamine-6-phosphate deaminase. Autores: Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S.P., Horjales, E.
6. **Código pdb:1jt9** Structure of the mutant F174A T form of the glucosamine-6-phosphate deaminase from *E. coli*. Bustos-Jaimes, I., Sosa-Peinado, A., Rudiño-Piñera, E., Horjales, E., Calcagno, M.L.

A continuación se anexan los dos artículos que han sido producto de ésta tesis: el primero, "Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase", aceptado para su publicación en "Acta Crystallographica Section C"; y el segundo, "On the role of the conformational mobility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase", sometido a revisión para su publicación.



Acta Crystallographica Section D

From Dr. G. Oliva Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural, Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo CP 369, 13560-970 São Carlos SP, Brazil.
Phone: 55 16 273 9844 Fax: 55 16 273 9881 E-mail: oliva@if.sc.usp.br

In reply please quote: Ms. #OL23

July 6, 2001

Dr. Enrique Rudino Pinera and Dr. Eduardo Horjales
Instituto de Biotecnologia – UNAM
Av. Universidad, 2001
Cuernavaca,
MEXICO 62271

FAX: +52-73-172388

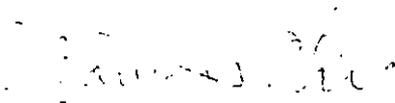
Dear Drs. Pinera and Horjales

Please find enclosed the comments from the referees of your manuscript #OL23, entitled "Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase."

The reports enclosed recommend publication of the manuscript with revisions. Therefore, I would ask you to carefully go over these reviews and modify your manuscript accordingly, informing me in a covering letter how you have dealt with each comment. Please, submit your revised version in three copies and with an electronic version, preferably in Word 7.0. Also, as a publication policy of the journal, all authors have to sign the enclosed form, thus confirming that they have seen the final version of the manuscript

I look forward to hearing from you.

Sincerely,


Glaucius Oliva
Co-Editor

Section Editor: Dr J. P. Glusker, Department of Molecular Structure, The Institute for Cancer Research, 7701 Burholme Avenue,
Philadelphia, PA 19111, USA. Phone: 1 215 728 2863 Fax: 1 215 728 2863 E-mail: jp_glusker@fccc.edu

Editorial Office: International Union of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, England.
Phone: 44 (1244) 342878 Fax: 44 (1244) 314888 E-mail: med@iucr.ac.uk



Acta Crystallographica Section D

From Dr G. Oliva Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural, Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo CP 369, 13560-970 São Carlos SP, Brazil.
Phone: 55 16 273 9344 Fax: 55 16 273 9691 E-mail: oliva@ifsc.usp.br

In reply please quote: Ms. #OL23

October 4, 2001.

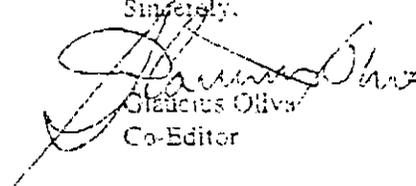
Dr. Enrique Rudino Pinera and Dr. Eduardo Horjales
Instituto de Biotecnología - UNAM
Av. Universidad, 2001
Cuernavaca,
MEXICO 62271

FAX: +52-73-172388

Dear Drs Pinera and Horjales

This is to inform you that after final review by the referees, your manuscript #OL23, entitled "Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase", has now been accepted for publication. The manuscript was sent on to the Managing Editor to be prepared for the printer. Should the Managing Editor find that he needs more information from you in order to proceed, he will get in touch with you directly.

Sincerely,



Glaucius Oliva
Co-Editor

Section Editor: Dr J. P. Glusker, Department of Molecular Structure, The Institute for Cancer Research, 7401 Burholme Avenue,
Phila. Pa, PA 19111, USA Phone: 1 215 726 2863 Fax: 1 215 726 2863 E-mail: jp_glusker@icr.edu

Editors: Office International of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, England
Phone: +4 (1244) 3-2378 Fax: +4 (1244) 314883 E-mail: med@iucr.ac.uk

1. Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase

E. Rudiño-Piñera^{§,*}, S. Morales-Arrieta^{§,||}, S. P. Rojas-Trejo[§] and E. Horjales^{§,*}

[§] Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 510-3, Cuernavaca, MOR 62271, México.

^{||} Present Address: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo 195, La Paz, BCS 23090, México.

* Correspondence e-mail: rudino@ibt.unam.mx and horjales@ibt.unam.mx

PDB References: Refined atomic co-ordinates have been deposited in the Protein Data Bank with entries codes 1fqo, 1frz, 1fs5, 1fs6 and 1fsf.

The new crystallographic structure of the free active-site R conformer of the allosteric enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*, coupled to previously reported structures of the T and R conformers, generates a detailed description of the heterotropic allosteric transition in which structural flexibility plays a central role. The T conformer's external zone [Horjales (1999). *Structure*. 7, 527-536] presents higher B-values than in the R conformers. The ligand-free enzyme (T conformer) undergoes an allosteric transition to the free active-site R conformer upon binding of the allosteric activator. This structure shows three alternate conformations of the mobile section of the active-site lid (residues 163-182), in comparison to the high B-values at the unique conformation of the T conformer. One of these alternate R conformations corresponds to the active-site lid found when the substrate is bound. The disorder associated with the three alternate conformations can be related to the biological regulation of the *K_m* of the enzyme for the reaction, which is metabolically needed to maintain adequate concentrations of the activator, which holds the enzyme in its R state. Seven alternate conformations for the active-site lid and three for the C-terminus, were refined on the T structure using isotropic B-factors. Some of these conformers approach in geometry that of the R conformer. Furthermore, the direction of the atomic vibrations obtained with anisotropic B refinement supports the hypothesis of an oscillating rather than a tense T state. The concerted character of the allosteric transition is also analysed in view of the apparent dynamics of the conformers.

1. Introduction

Allosteric regulation involves communication between distant ligand-binding sites on biological macromolecules, which are central to many cellular regulatory mechanisms (Perutz, 1990). It encompasses two kinds of transitions: (a) *homotropic*, in which binding of a molecule to one subunit modulates the binding of the same type of molecule to the other subunits, and (b) *heterotropic*, in which binding of a ligand in its specific site triggers a conformational change that modulates the binding properties of a second type of molecule in the binding site (Goodsell & Olson, 2000). In allosteric enzymes, this control process involves two structurally different states which differ in quaternary structure: the T-form ("tense form") in which the affinity for the substrate is zero or low, and the R-form ("relaxed form") with an optimal affinity for substrate and/or allosteric activator. The metabolic regulation achieved by allosteric enzymes results from their ability to shift the system equilibrium between these two states, through the homotropic route (active-site ligand bound) or through the heterotropic route (allosteric site ligand bound). The traditional concept of allosteric transition could explain quantitatively many of the observed co-operative and linkage phenomena in allosteric enzymes, but even in its original paper Monod emphasises that "the concept of conformational transition should be understood in its widest connotation" (Monod *et al.*, 1965). Actually, we know that individual macromolecules are dynamical objects, that undergo various forms of intramolecular motion (Jencks, 1997). In some cases, the effect of these motions can be directly correlated with enzyme activity and protein function (Ji *et al.*, 1998; Blow, 2000).

The allosteric transition concept and the concerted allosteric model of Monod, Wyman and Changeux (Monod *et al.*, 1965), were introduced 35 years ago to explain available kinetic data, in a time of very limited macromolecular structural information. This model describes the thermodynamic equilibrium between the T and R states, and its application to enzymatic kinetic processes is possible under the assumption that the enzyme follows rapid equilibrium, rather than steady-state kinetics (Noat *et al.*, 1968). Steady-state kinetic equations for allosteric enzymes are of great complexity and present very limited practical use, with some exceptions which use the steady-state kinetic equations in a classical approach, introducing the co-operativity components in the model in an empirical way (Willemoes *et al.*, 2000; Tovar-Mendez *et al.*, 1998). The Monod-Wyman-Changeux model, together with its contemporary sequential model of Koshland-Nemethy-Filmer (Koshland *et al.*, 1966), are still used, with or without modifications, to explain the allosteric behaviour of most of the allosteric enzymes (Yifrach & Horovitz, 1965; Perella & Di Cera, 1998). We want to emphasise that both T and R states are characterised by a specific quaternary structure, but this can be achieved in different ways. For example: the R state can be obtained when the allosteric activator is bound, when active-site ligands

(substrate or competitive inhibitor) bind or when both active and allosteric sites are occupied. These three complexes share the same quaternary structure, but they can present local tertiary structural differences, and different mobilities of those structural components. These local differences have not been analysed in detail for many allosteric enzymes. They involve general differences in binding properties which kinetically are expressed in a ΔG (Gibbs free energy) which contains differences between the two states of the T - R transition (Bustos-Jaimes *et al.*, 2001), regarding to both enthalpic and entropic terms. When the protein reaches the R conformer either through the heterotropic or the homotropic route, the binding of a new substrate is independent of the way in which the R conformer was obtained, resulting in the same V_{max} through homotropic or heterotropic activation. If the enzyme follows the MWC model (Monod *et al.*, 1965) this results in a K system. Conversely, if local differences in conformation or atomic mobility are found in different R complexes, the kinetic process can present differences in relation to the way in which the R conformer was obtained. This can result in V-type activation or mixed K-V systems.

The experimentally obtained B-values (or thermal components) generated for each atom during the X-ray crystallographic refinement of a protein model, even with its limitations, are directly related to the thermal vibration of each atom in the crystal, and can be associated to the entropy change of a particular process related to the molecule (Rubinson, 1998). Anisotropic calculations can provide information on the direction of molecular flexibility. A sufficient redundancy of reflection data compared to model parameters is necessary to obtain reliable values for B factors (Kidera & Go, 1992). Thus, a comparison between the stable conformations in which the protein crystallises, and the kinetically defined states (R and T) can provide information on conformational and vibrational changes associated with the allosteric transition.

Conformational changes associated with allosteric enzyme regulation have been studied in several cases such as phosphoribosyl diphosphate synthase (Willemoes *et al.*, 2000), glycogen phosphorylase (Rath *et al.*, 2000), fructose 1,6-bisphosphatase (Choe *et al.*, 2000), phosphofructokinase (Kimmel & Reinhart, 2000), pyruvate kinase (Valentini *et al.*, 2000) and aspartate transcarbamoylase (Sakash & Kantrowitz, 2000; Endrizzi *et al.*, 2000). Unfortunately in most of the cases the complexity of the structures and the irreversible character of the reactions catalysed disable the inclusion of atomic vibrations in the description of the allosteric transition. In this context, 2-amino-2-deoxy-D-glucose-6-phosphate amino-hydrolase (ketol isomerizing) or glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6P deaminase, EC 3.5.99.6, formerly EC 5.3.1.10) from *Escherichia coli*, is a well studied model from genetic, kinetic and structural points of view (Horjales *et al.*, 1999; Oliva *et al.*, 1995; Altamirano *et*

et al., 1994; Montero-Moran *et al.*, 1998; Midelfort & Rose, 1977; Calcagno *et al.*, 1984; Altamirano *et al.*, 1995; Plumbridge, 1990). This enzyme catalyses the reversible isomerisation-deamination of glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) to form fructose 6-phosphate (Fru6P) and ammonium ion. The functional particle is an homohexamer (266 residues per monomer) and its allosteric activator is *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) (Altamirano *et al.*, 1995). This molecule binds exclusively to the R-form and the enzyme behaves as a typical *K*-system enzyme (Calcagno *et al.*, 1984). The GlcN6P deaminase homotropic cooperativity and GlcNAc6P activation can be explained in terms of the MWC model (Calcagno *et al.*, 1984). Its activity has a central role in the co-ordinated regulation of amino-sugar synthesis and utilisation in bacteria, as the only allosteric enzyme in the catabolic route.

We previously reported the structure of the R state of GlcN6P deaminase, in three different complexes, with both active and allosteric sites occupied by ligands, in a range between 2.10Å and 2.40Å resolution (Oliva *et al.*, 1995), and the ligand-free T conformer, at 2.30Å resolution (Horjales *et al.*, 1999). Here we report the crystallographic structures of another five complexes of wild type GlcN6P deaminase from *E. coli*, in both T and R states. We present the structure of the free active-site R-form (GlcNAc6P bound to the allosteric site) at 1.73 Å resolution and the ligand-free T-form at higher resolution (1.90 Å). We also refined three other structures that are used in this work to validate B-factor comparisons. On the basis of these structures, we describe an entropic component associated with active-site ligand binding, generated by the flexible behaviour of the residues in the active-site lid (residues 158 to 187). The relationship between the allosteric transition and the molecular flexibility changes and its biological function is also described (in order to get a structural background and the definition of the sections for the title enzyme see figure 1).

2. Material and methods

2.1 Preparation of the enzyme before crystallisation trials.

The two final steps in the process of purification of GlcN6P deaminase include its elution from an affinity column using its allosteric activator (GlcNAc6P) as exchanger. Finally, the enzyme is precipitated with ammonium sulphate and stored at 4°C (Calcagno *et al.*, 1984). The pure *E. coli* GlcN6P deaminase precipitated with ammonium sulphate is exhaustively dialysed at 4°C, with six changes (1:1000 volume) HEPES 100mM, pH 7.0. The intervals between each change are four, twelve, four, four, four and twelve hours. In some cases where this protocol was not followed, we obtained crystals with sulphate ions or GlcNAc6P bound. The final enzyme solution is then used for the crystallisation trials.

2.2 Crystallisation and structure determination.

E. coli GlcN6P deaminase crystallises in its T or R conformers as follows: Wild type R-form crystals with GlcNAc6P (2.20Å resolution) were grown at 18°C in 2.8M sodium acetate, 100mM HEPES pH 7.5, with unit cell parameters $a=b=125.700\text{Å}$, $c=224.000\text{Å}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ and $\gamma=120^\circ$. Wild type R-form crystals with GlcNAc6P (1.73Å resolution) were grown at 18°C in 0.75M sodium tartrate, 200mM HEPES pH 7.0 and 50 μM GlcNAc6P, with unit cell parameters $a=b=124.228\text{Å}$, $c=222.724\text{Å}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ and $\gamma=120^\circ$. Wild type T-form crystals (2.20Å resolution) were grown at 18°C in 2.45M sodium acetate, 100mM HEPES pH 6.8, with unit cell parameters $a=b=126.8\text{Å}$, $c=139.44\text{Å}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ and $\gamma=120^\circ$, the crystals were soaked in 10mM Fru6P and then exposed to X-rays. Wild type R-form crystals with Fru6P were grown at 18°C in 2.8M sodium acetate, 100mM HEPES pH 7.5 and 27mM Fru6P, with unit cell parameters $a=b=126.04\text{Å}$, $c=223.508\text{Å}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ and $\gamma=120^\circ$. Wild type T-form crystals (1.90Å resolution) were grown at 18°C in 2.45M sodium acetate, 100mM HEPES pH 6.8, with unit cell parameters $a=b=126.676\text{Å}$, $c=139.326\text{Å}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ and $\gamma=120^\circ$. All the native R-form crystals belong to space group R32 with one dimer in the asymmetric unit, while the native T-form crystals belong to space group P6₃22 with one monomer in the asymmetric unit, generating in both cases the biologically active homohexamer by crystal symmetries. In all cases the crystals grew using the vapour-diffusion technique with 5 to 10 μl drops containing 15 mg/ml protein. In all cases the crystal morphology, size and time of growing were identical as previously reported GlcN6P deaminase R (Oliva *et al.*, 1995) and T-form (Horjales *et al.*, 1999) crystals.

Diffraction data were obtained at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory Station 7-1 (except data from wild type T-form crystals at 1.90Å resolution and wild type R-form crystals with GlcNAc6P at 1.73Å resolution, which were collected at Station 9-1) at liquid nitrogen temperatures (103 to 113K). In all cases the cryoprotectant solutions contained the same salts at the same concentrations as the reservoir solution but dissolved in 35% sucrose (wild type T-form crystals at 2.20Å resolution and wild type R-form crystals with GlcNAc6P at 2.20Å resolution) or 35% trehalose (wild type T-form crystals at 1.90Å resolution and wild type R-form crystals with GlcNAc6P at 1.73Å resolution). Diffraction data were collected using an image plate detector (MAR research, Hamburg) and the highest resolution limit for each particular data set ranged between 1.73 and 2.20Å resolution. Table 1 shows the measurement statistics. Data were integrated using the program DENZO (Otwinowski, 1993; Otwinowski & Minor, 1996) and scaled with programs Scala and Truncate from the CCP4 suite (CCP4, 1994). The structures were solved using the previous reported structures of the GlcN6P deaminase T

and R conformers (Horjales *et al.*, 1999; Oliva *et al.*, 1995) as initial models, without rotation and translation searches (due to the unit cell value similarities) by a rigid minimisation procedure as shown in table 1.

2.3 Construction of alternate conformations in the active-site lid of the heterotropic R-form.

The R-form structure with an empty active-site and a GlcNAc6P molecule bound to its allosteric site was determined at 1.73Å resolution and refined using the CNS program (Brunger *et al.*, 1998). A molecule of tartaric acid was found in the active-site of the first monomer in the asymmetric unit, while the second monomer has an empty active-site (see table 1). The active site lid of the first monomer in the asymmetric unit, presents a flexibility which is lower than the second monomer, in all R structures determined. This is produced by crystallographic contacts stabilised through hydrogen bonds with a neighbouring active site lid. This reduced flexibility favours the differential binding of the tartaric acid molecule in this monomer.

Two independent determinations of this structure (pdb codes 1fs5 -1.73Å resolution - and 1frz - 2.20Å resolution) presented different conformations in the following regions: the mobile section of the active-site lid (residues 163 to 182) and neighbouring loops (residues 75 to 83 and 109 to 112), all with large B-factors. An *fo-fc* map (of the structure at 1.73Å resolution) at this stage presented negative density on the refined active-site lid conformation and positive density close to the conformation corresponding to the structure determined at 2.20Å resolution. Thus, the mobile section of the active-site lid has at least two alternate conformations. Including these two conformations in the refinement of the structure at 1.73Å resolution, a third alternate conformation clearly appears in the *fo-fc* map (see figure 5). This search was also performed with the R-form with both sites occupied by phosphate ions at 1.65Å resolution (Rudiño-Piñera & Horjales, unpublished) but only one active-site lid conformation was found without remarkable density around the lid in the *fo-fc* map.

2.4 Anisotropic refinement.

The final model from the wild type T-form crystals at 1.90Å resolution obtained with CNS ($R=0.218$, $R_{\text{free}10\%}=0.238$ with data higher than 2σ) was used to carry out a new refinement (with the same reflection file and R_{free} test group from CNS) using the program SHELXL-97 (Sheldrick & Schneider, 1997). An initial isotropic minimisation was performed, followed by a set of cycles refining anisotropically only the sulphur atoms, with CNS minimising cycles to avoid over refinement. Finally, using the same water molecules set (297 water molecules) generated by CNS, all nonhydrogen atoms

were refined anisotropically. This last refinement was performed in short cycles to reduce the problems that could be caused by the parameters / reflections relation. The final R and $R_{\text{free}10\%}$ values were 0.188 and 0.233 respectively with data higher than 2σ . Starting from the structure with 297 water molecules, we applied a two different anisotropic refinements, one including only the mobile section of the active-site lid (residues 163-182) and the other only the C-terminus (residues 245-266). The results of these refinements show the same direction and B-values as in the anisotropic refinement of the whole monomer (data not shown).

2.5 Refinement of alternate conformations for the active-site lid and the C-terminus.

Starting from the refined T-form structure at 1.90Å resolution including temperature factors (see table 1), we constructed three alternate conformations for residues 159 to 186 in two different ways: 1) the refined conformer plus two alternate conformations displaced 0.80 Å in the direction of the larger anisotropic ellipsoid axis, at both sides of the original one, 2) as 1, but displaced in a perpendicular direction. Trial 1 reduced both R and R_{free} values, while trial 2 increased both. We added as many alternate conformations as necessary to obtain no interpretable density peaks in a *fo-fc* map contoured at 3σ . For each new alternate conformation a minimise, b-individual, q-group, annealing (500K), b-individual, q-group and finally, a b-individual refinement steps were performed, resulting in seven alternate conformations. The five alternate conformations model showed a total occupation in the lid of 0.86 and for the seven alternate conformations model this value was 0.96. The same procedure was followed for the C-terminus, obtaining three alternate conformations for residues 254 to 266. In each of the mentioned steps both R and R_{free} values slightly decreased (see table 1). It is remarkable that q-values for each alternate conformations were rather independent of the number of conformers included in the model.

3.RESULTS

2.3.1 Determination and analysis of the structures.

All the R-state crystals of the GlcN6P deaminase from *E. coli* belong to the R32 space group with a dimer in the asymmetric unit. In contrast, T-form crystals belong to the P6₃22 space group with only one monomer in the asymmetric unit (Horjales *et al.*, 1999). In the case of the R-forms, the root-mean-square deviation (RMSD) of the C α atom superposition between both monomers of the asymmetric unit, results in a value of 0.305Å (266 C α atoms in the calculation), for the structure with both active

and allosteric sites occupied (present work at 2.15Å resolution), and 0.494Å (266 C α atoms in the calculation), for the structure with only the allosteric site occupied (present work at 2.20Å resolution). These structural differences are probably related to the occupation of the active-site or to the crystal packing. Some reports suggest criteria that allow the discrimination of conformational changes due to ligand binding from those associated with the crystal packing in each monomer (Eigenbrot *et al.*, 1992). In order to analyse the origin of these differences we compared both monomers in the R-form asymmetric unit of one structure with its correspondent in the second structure (pdb codes 1fqo and 1frz). Some main chain differences larger than 0.70Å, in the first monomer of the R asymmetric unit, can be assigned to crystal contacts. In contrast, in the second monomer, we observed just a few crystallographic contacts that did not present main chain conformation modifications over 0.10Å. In the first monomer, some of these contacts with other hexameric particles include residues from the mobile section of the active-site lid (residues 163 - 182) and are mediated by ordered water molecules. Otherwise, the second monomer presents neither distortion nor crystal contacts mediated by the active-site lid. Additionally, the behaviour of the B-factor values for both GlcN6P deaminase R-forms, clearly presents differences between the two independent monomers of the asymmetric unit (figure 2-A). When the active-site lid is free of crystal contacts, as in the second monomer of the R-form, its B-values rise. Thus, in the subsequent sections, we will compare the conformations and the atomic vibrations of the monomer in the T state, with the second monomer in the asymmetric unit of R conformers.

3.2 Attempts to obtain T state crystals with occupied active site.

As the parameter c in the adjustment of the MWC model is different of zero ($c=0.02$), the existence of molecules in the T state, with ligand bound to the active-site, adjusts in a better way the kinetic data (Montero-Moran *et al.*, 1998). From a crystallographic point of view, we attempted to detect this occupied active-site T state. The search for crystallisation conditions which contain in the mother liquid ligands of the active-site, such as Fru6P or 2-deoxy-2-amino D-glucitol-6-phosphate (GlcNol6P), always resulted in R-state crystals, even at low concentrations. At very low concentrations only ligand-free T crystals were obtained (data not shown). Thus, we changed the strategy: we soaked a T crystal in solutions with 10 mM Fru6P and 100 μ M GlcNol6P. In both cases the crystals did not lose their diffraction properties. In the case of the T-state crystals soaked with GlcNol6P, the diffraction data were collected and the refinement resulted in a T protein model at 2.80Å resolution (data measured using a rotating anode) with a final $R=0.211$ ($R_{\text{free}}=0.240$). This structure did not have any GlcNol6P

molecule in the active or allosteric sites (even at this low resolution the phosphate groups should be detected). For the T-form soaked in 10 mM Fru6P, the final protein model at 2.20Å resolution, also resulted in a ligand-free T structure.

3.3 Behaviour of isotropic B-values: vibrational changes associated to substrate binding

In order to perform a conformational and vibrational comparison between T and R conformers, we used structures (pdb codes 1fqo, 1frz and 1fs6), which were determined under the same conditions of X-ray data collection, crystal cryo-protectant and similar resolution limits. A C α superimposition shows that the differences detected between the main chain positions in the models correspond to residues where the B-factors are higher than 35Å² (figure 2-B and figure 3). In particular, the B-factor values at the active-site lid decrease upon active-site ligand binding. The B-factor distribution in the ligand-free T structure presents a highly vibrating active-site lid (residues 158-187). When this vibration is compared to a purely heterotropic R-form structure (free active-site), the B factors at the active-site lid are still high. In the case of an R-form with both sites occupied, the B-factor values decrease from close to 75 Å², in the purely heterotropic R-form, to close to 45 Å². It is also important to emphasise that the binding at both sites clearly produces a reduction of the general isotropic B-factors throughout the structure (see figure 2-B). In this particular case a baseline of the B-factors is at 10Å², while in the other structures with the active or the allosteric site empty, this base line is close to 18Å². This effect is also found in the three structures which originally describe the R-form of the GlcN6P deaminase from *E. coli*, which were collected at 4°C (Oliva *et al.*, 1995). Thus, the ligand-free T conformer is the structure with highest molecular flexibility.

We tried to grow crystals of the homotropic R-form (free allosteric site), as this structure would provide information on the dependence of the vibrational change at the active-site lid with allosteric activator binding. Extensive trials to obtain wild type protein crystals in this condition, have not been successful. The mutant K160E (Lara-González *et al.*, unpublished) changes the electrostatic surface affecting a residue with a central role in binding the activator (GlcNAc6P) to the allosteric site. Its final structure in the R-form with only the active-site occupied, collected and solved at identical conditions as the other structures in this section, presents a B-factor behaviour almost identical to that of the wild type R-form with both sites (active and allosteric sites) occupied (see figure 2-B and figure 3), but with a base line almost at 18Å². This means that the flexibility of the active-site lid can be highly reduced just through binding of a ligand in the active-site. A similar feature is observed in fructose 1,6-bisphosphatase: a structural section (in this case a loop) which is highly mobile in the T-form, and fixed in the R-form. This change is also related with substrate binding (Choe *et al.*, 2000).

In a previous work we presented the allosteric transition as a rotation of the external region of each monomer, around an axis perpendicular to the crystallographic *c* axis (Horjales *et al.*, 1999). As described above in this section, the T-form structure presents a higher mobility just in the external section and the active-site lid, which may be related to some properties of the allosteric transition. With this in mind, we tried to find a probable centre of rotation of the observed T-form flexibility. We used the atom with the lowest B value (C α residue 226, which is in the internal section of the enzyme) as placed at the rotation axis (parallel to the crystallographic *c* axis). We calculated the distances between this rotation axis and the rest of the C α atoms. Figure 4 shows a plot of the corresponding isotropic B values of the main chain as a function of these distances (we used main chain atoms to avoid noise generated by side chain local vibrations). The final plot describes a linear distribution in which B isotropic values increase with distance to an axis parallel to the crystallographic *c* axis. It can be interpreted as a rotation, which has the same centre and axis as the one previously reported for the allosteric transition (Horjales *et al.*, 1999).

3.4 Heterotropic free active-site R-form: multiple alternate conformations at the active-site lid.

In the R-form with both sites occupied, residue E148 is an essential structural element in the stabilisation of the active-site lid. It points to the active-site pocket, forming hydrogen bonds between the O δ 1 and N atoms from residues T166 and T163, at the lid, and the N δ 1 atom from active-site residue H143, contributing to the stabilisation of the full lid. In this position residue E148 has been proposed to form an uncommon proton relay which is directly related to enzymatic catalysis (Oliva *et al.*, 1995). In the T-form residue E148 points to the allosteric site, equilibrating the charges in the pocket (Horjales *et al.*, 1999), disrupting the bridge between residue H143 and the base of the active-site lid. This conformational change of residue E148 main chain contributes to the high flexibility found in the active-site lid T conformation. In the R-form with only the allosteric site occupied, the position of the residue E148 is the same as in the R-form with both sites occupied, but only one of the active-site lid alternate conformations form the hydrogen bonds with T166 and T163. This means that the absence of an active-site binding molecule prevents complete stabilisation of the active-site lid. Then, in the T to R allosteric transition the active-site lid moves from a highly mobile state (T-form), to a less mobile state, partially stabilised by the bridge mediated by residue E148 (purely heterotropic R-form), and finally, to an active-site lid fully stabilised by both ligands and bridge at residue E148.

3.5 Further refinement of the T-form: anisotropic B refinement and multiple alternate conformations.

We performed an anisotropic refinement of the non-hydrogen atoms in order to generate additional data to clarify if the atomic vibration of the active-site lid can be correlated to the allosteric transition, using the data of the T-form at 1.90Å resolution. This crystal has 78% water content which means that the 2411 atoms generate the whole structure in a large unit cell (for this amount of atoms). Thus, at 1.90Å resolution we collected 48412 reflections, an average of 20 reflections for each atom. At this resolution, hydrogen atoms are not detectable. Moreover, we do have isotropic B factors over 80 Å² in large regions of the structure (active-site lid and C-terminus). Atoms with such high isotropic mobility should produce different diffraction patterns at such resolution, than those with high anisotropic mobilities. The high solvent content in the crystal favours the mathematical possibility to refine anisotropic B-factor: for each atom we need to calculate 9 parameters (x, y, z, and the six anisotropic terms), then we have to calculate 21699 parameters, which means 2.23 reflections for each parameter. Even with this relation parameters to be calculated to reflection number at 1.90Å resolution, we can find a unique solution for the refinement procedure. For those u values in the order of 2Å, even at 1.90Å resolution, the anisotropic description will generate a better representation of the protein model than the corresponding isotropic B-values.

The final model refined with anisotropic B factors shows large values compatible with a collective rotation movement parallel to the crystallographic c axis, which includes the active-site lid, the whole external section (Oliva *et al.*, 1995) and the C-terminus of the enzyme (see figure 6). These regions of the monomer contain the whole allosteric site which is placed in the inter-subunit interface. In particular Y254 and T152 are involved in specific inter-monomeric interactions. Thus, this collective movement can be propagated through the whole hexamer. It is remarkable that this anisotropic movement is coincident in direction with that exerted by the same section of the monomer during the allosteric transition. The centre of this movement is coincident with that determined above using isotropic B-factors (see section 3.3) and also with the already determined for the rotation generating the allosteric transition (Horjales *et al.*, 1999). Moreover, mutants which present lower isotropic B-values at the active-site lid also show lower isotropic B-values at the external section, which suggests that the highly mobile active-site lid in the T-form is part of a collective motion which also comprises the external section (data not shown), as in the allosteric transition. It is remarkable that even in the crystal, the anisotropic atomic vibration of the ligand-free T-form describes a motion in the direction of the allosteric transition.

We also refined seven alternate conformations for the active-site lid and three alternate conformations for the C-terminus in an isotropic model (see Experimental Procedures and figure 6). In particular, those alternate conformations found in the active-site lid present distances between 1.60Å in the base of the lid and 4.00Å in the residue 172, all in the same plane of the maximal anisotropic axis. In spite of the short distance between neighbouring conformers (less than 1Å), isotropic B-factors do not diminish below 55Å². This can be interpreted as a continuous density rather than a set of individual conformers. This fact supports the results found in the anisotropic refinement, at least for these two regions.

3.6 MWC concerted allosteric model and GlcN6P deaminase from *E. coli*

The structural modifications which produce the transition between the ligand-free T conformer and the R conformer with both sites occupied have been described (Horjales *et al.*, 1999; Oliva *et al.*, 1995), but the concerted character of the allosteric transition lacks a structural explanation. During the rigid body rotation associated to the T-R conformational changes, the internal section contacts do not change, but large changes are produced in the inter-monomeric contacts of the external section of the enzyme, which are directly related to the formation of the allosteric cleft (see table 3) (Horjales *et al.*, 1999). As shown above (see section 3.4), residue E148 is involved in the stabilisation of the active-site lid in the R conformer, and in the connection between the lid and the catalytic residue H143. In the T-form, residue E148, which is part of the loop 144-154, is part of a salt bridge with K160 which is essential in the stabilisation of this conformer (Oliva *et al.*, 1995). Loop 144-154 is formed by four turns which are conserved during the transition but changing their relative positions. While turn 139-142 remains as part of the internal section, turn 144-147 moves rigidly with the external section and the active-site lid, mainly because of hydrophobic interactions around residue F146. When a C α superimposition between R-forms with both sites and only the allosteric site occupied is performed, we found a correlation between the movement of residues 144-146 and the active-site lid. If the R-form active-site is occupied by the substrate, turn 144-146 moves in the direction of the internal section, "closing" the active-site lid. Correspondingly, the R-form without ligands in the active-site moves its turn 144-146 in direction to the active-site lid, "opening" the lid. The same correlation of movements also occurs in the T-form, but with larger displacements of the C α position. Furthermore, this "opening" movement of the active-site lid is directly related to an increase in its atomic mobility (see figure 3). It is noteworthy that the residues involved in such interactions are 100% conserved in at least 14 GlcN6P deaminases sequences known to date that range from bacteria to mammals (Arreola *et al.*, unpublished).

In the homotropic transformation, the substrate binds to the active-site, closing and reducing the atomic vibration of the active-site lid, generating a change in the conformation of the loop 144-154. This conformational change breaks the hydrogen bond between O atom from residue P149 and OH group of residue Y254, which is characteristic of the T-form. Moreover, the closure of the lid changes and stabilises the position of the residues K160 and T161, favouring the formation of the highly stable hydrogen bond net with residue Y254 (mediated in some sections by four water molecules, see table 3), which has been proposed to form a switch in the allosteric transition (Montero-Moran *et al.*, 1998). Furthermore, in the T-form the same residue Y254 forms a hydrogen bond (see table 3) with residue E148, which also is destroyed during the conformational change of the loop 144-154, further stabilising the formation of a new hydrogen bond net characteristic of the R state. Molecular switches have been found in other allosteric enzymes such as the *E. coli* aspartate transcarbamoylase.

In the heterotropic transition the GlcNAc6P (allosteric activator) molecule binds to its site, displacing residue E148 to the active-site cleft, breaking its interaction with Y254 and starting the allosteric transition in the same fashion as in the homotropic transition. This assumption is supported by the fact that loop 144-154 has to change its main chain position with the action of a strong electrostatic repulsion, as happens between residue E148 and the phosphate ion of the allosteric activator. We proposed that in both homotropic and heterotropic allosteric transitions, the allosteric transition transmission route implies a local induced fit of the loop 144-154, which is directly related with the behaviour of the active-site lid and the propagation of the movement to the whole hexamer particle mediated by the inter-subunit contacts of the external section as described.

4. DISCUSSION

E. coli glucosamine 6-phosphate deaminase has a remarkable role as the only allosteric enzyme in the amino-sugar catabolic route. As such it constitutes a useful tool as a kinetic and structural model for the study of enzymatic allosteric control. Here we describe the structures of five complexes of the enzyme in R and T states and analyse their kinetic and allosteric implications. We focus this work on the role of atomic vibrations, both in the R and T conformers.

When the enzyme is in a "ligand-free R-form", the equilibrium with the "ligand-free T-form" can be displaced in two ways: homotropically by the addition of any substrate (GlcN6P or Fru6P), or heterotropically by the addition of the allosteric activator (GlcNAc6P). We found that in the second mode, the R conformer has an active-site lid with three preferential conformers, which in normal conditions open and close the active-site pocket. Upon binding to the active-site, the substrate stabilises the active-site lid in one of the three conformers producing a general reduction in the atomic vibration

of the whole protein. Then, the active-site lid flexibility has, not only a central role in the allosteric transition, but also in the substrate-binding process. Thus, the high mobility of the active-site lid, and the existence of three conformers in the "free-active-site R-form", results in an entropic term which is associated to substrate binding and contributes to an increase in K_m . This results in a relatively high concentration of the substrate coexisting with the activated enzyme. Thus, relative high concentrations of GlcNAc6P (the allosteric activator) are maintained in the steady state involving deaminase and the enzyme GlcNAc6P deacetylase. In this way, catabolism of GlcNAc can take place while maintaining relatively high levels of GlcNAc6P (an intermediate in the pathway). This concentration has to be high enough to hold the GlcN6P deaminase in its R state.

The MWC model predicts that, in solution, ligand-free T conformers of *E. coli* GlcN6P deaminase coexist in equilibrium with limited amounts of ligand-free R conformers. This kinetic model assumes that, in the presence of molecules that bind to the active site, such as GlcN6P or Fru6P (homotropic transition), the "ligand-free T-form" changes to an "occupied active-site T-form", that, in turn, changes via the homotropic allosteric transition to an "occupied active-site R-form". The crystallographic data shown here suggests that the difficulties to obtain "occupied active-site T-form" crystals (see Materials and Methods) are a consequence of one of two possible effects: either the "occupied active-site T-form" is just an unstable transition intermediate, undetectable by X-ray crystallography, or the ligand free enzyme in solution is an ensemble of structures with most of the hexameric particles in the T conformation and some in the R conformation. Thus, the homotropic allosteric transition proceeds in the sequence: "ligand-free T-form" to "ligand-free R-form" to "occupied R-form". This is also the obligatory route for the heterotropic transition because the allosteric activator binds exclusively to the R-state (Oliva *et al.*, 1995). Thus, the presence of active-site ligands in the homotropic transition displaces the T-R equilibrium, directly by binding to the active-site in the "ligand-free R conformer". If we relate this model to the observed behaviour of the atomic flexibility found in the crystallographic ligand-free T-form, it appears that the "tense" form of the enzyme is in fact an "oscillating" state. In this state, a minor part of the conformations involved in the oscillation reaches the "ligand-free R-form", which is the conformer that binds ligands in any of the two sites (see figure 7).

5. ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by grants from PAPIIT-UNAM (IN230598), ERP and SMA are awarded with CONACyT fellowships and student research grants from PAEP (DGEP, UNAM). We wish to thank Dr. M.L. Calcagno, Dr. G. L. Gilliland, Dr. X. Ji, and Dr. R. Stock for helpful discussions, Laura

I. Alvarez-Añorve for supplying the purified wild type protein and for assistance in enzyme purification, Samuel Lara-González for supplying the mutant K160E enzyme, Rodrigo Arreola for discussions, Dr. M. Newcomer and the Department of Biochemistry, Vanderbilt University (Nashville, Tennessee) for the kind help at the initial stages of cryo-protection tests. This work is based upon research conducted at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), which is funded by the Department of Energy (BES, BER) and the National Institutes of Health (NCRR, NIGMS).

6. REFERENCES

- Altamirano, M.M., Hernández-Arana, A., Tello-Solís, S. & Calcagno, M.L. (1994) *Eur. J. Biochem.* **220**, 409-413.
- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Horjales, E. & Calcagno, M.L. (1995) *Biochemistry* **34**, 6074-6082.
- Blow, D. (2000) *Structure*, **8**, R77-R81.
- Brunger, A.T. (1992). X-PLOR Version 3.1. *A system for X-ray Crystallography and NMR.*, Yale University Press, New Haven, CT.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, j., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998) *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- Bustos-Jaimes, I. & Calcagno, M.L. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* (in press).
- Calcagno, M.L., Campos, P.J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.
- Collaborative Computational Project, Number 4, (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D 50**, 760-763.
- Choe, J.Y., Fromm, H.J. and Honzatko, R.B. (2000) *Biochemistry* **29**, 8565-8564.
- Eigenbrot, C., Randal, M. & Kossiakoff, A:A: (1992). *Proteins* **14**, 75-87.
- Endrizzi, J.A., Beernink, P.T., Alber, T. & Schachman, H.K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 5077-5082.
- Goodsell, D.S. & Olson, A.J. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 105-153.
- Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L., Garratt, R.C. & Oliva, G. (1999) *Structure* **7**, 527-536.
- Jencks, W.P. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 1-18.
- Ji, X., Braxenthaler, M., Moulton, J., Fonticelli, C., Bucci, E. & Gilliland, G.L. (1998)

- Proteins: Structure, Function and Genetics* **30**, 309-320.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Cryst. A* **47**, 110-119
- Kidera, A. & Go, N. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 457-475.
- Kimmel, J.L. & Reinhart, G.D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 3844-3849.
- Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G. And Filmer, D. (1966) *Biochemistry* **5**, 365-385.
- Midelfort, C. & Rose, I.A. (1977) *Biochemistry* **16**, 1590-1599.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J-P. (1965) *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
- Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. & Altamirano, M.M. (1998) *Biochemistry* **37**, 7844-7849.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993). *Biophys. J.* **64**, A166.
- Noat, G., Ricard, J., Borel, M. & Got, C. (1968) *Eur. J. Biochem.* **5**, 55-70.
- Oliva, G., Fontes, M.R.M., Garratt, R.C., Altamirano, M.M., Calcagno, M.L. & Horjales E. (1995) *Structure* **3**, 1323-1332.
- Otwinowski, Z. & Minor W. (1996). *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode.* (Carter, C. & Sweet, R.M., eds), pp 307-325, Academic Press, Boston MA.
- Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing.* (Sawyer L. Isaacs, N. & Bailey S., Eds), pp. 56-62, SERC Daresbury Laboratory, Warrington.
- Perella, M. & Di Cera, E. (1998) *The J. Biol. Chem.* **274**, 2605-2608.
- Perutz, M.F. (1990). *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Plumbridge, J.A. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 2728-2735.
- Rath, V.L., Ammirati, M., Danley, D.E., Ekstrom, J.L., Gibbs, E.M., Hynes, T.R., Mathiowetz, A.M., McPherson, R.K., Olson, T.V., Treadway, J.L. & Hoover, D.J. (2000) *Chem. Biol.* **7**, 677-682.
- Rubinson, K.A.. (1998) *J. Prot. Chem.* **17**, 771-787.
- Sakash, J.B. & Kantrowitz, E.R. (2000) *J. Mol. Chem.* **37**, 28701-28707.
- Sheldrick, G.M. & Schneider, T.R. (1997) *Methods Enzymol.* **277**, 319-343.
- Tovar-Mendez, A., Rodríguez-Stres, R., Lopez-Valentin, D.M. & Muñoz-Clares, R.A. (1998) *Biochem. J.* **332**, 633-642.
- Valentini, G., Chiarelli, L., Fortin, R., Speranza, M.L., Galizzi, A. & Mattevi, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18145-18152.
- Willemoes, M., Hove-Jensen, B. & Larsen, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35408-35412.
- Yifrach, O. & Horovitz, A. (1995) *Biochemistry.* **34**, 5303-5308.

TABLE 1

	R	R	R	T	T
Conformer	R	R	R	T	T
Monomers in asymmetric unit (A.U.)	2	2	2	1	1
Active-site ligand	Fru6P	Empty	Empty ³	Empty	Empty
Allosteric site ligand	Fru6P	GlcNAc6P	GlcNAc6P	Empty	Empty
Other ligands found in the A.U.	none	None	1 tartaric acid	None	None
Cryo-collecting /X-ray source ²	Yes/SSRL 7-1	Yes/SSRL 7-1	Yes/SSRL 9-1	Yes/SSRL 7-1	Yes/SSRL 9-1
Cryo-protectant ¹	Sucrose 35%	Sucrose 35%	Trehalose 35%	Sucrose 35%	Trehalose 35%
Space group	R32	R32	R32	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22
Cell parameters a=b, c (Å)	126.04, 223.50	125.70, 224.00	124.22, 222.72	126.8, 139.44	126.68, 139.33
Resolution	50-2.15Å	50-2.10Å	50-1.73Å	50-2.10Å	50-1.90Å
Highest resolution bin	(2.15-2.20Å)	(2.10-2.25Å)	(1.73-1.77Å)	(2.10-2.25Å)	(1.90-1.95Å)
R _{sym} all data (highest resolution bin)	0.071 (0.221)	0.087 (0.305)	0.083 (0.284)	0.067 (0.316)	0.072 (0.326)
Completeness (highest resolution bin)	94.6% (97.2%)	90.5% (72.3%)	95.6% (86.3%)	94.5% (70.8%)	93.1% (91.2%)
Multiplicity (all data)	2.9	2.6	3.5	3.7	3.4
I/σ(I) (highest res. range)	8.1 (3.6)	6.77 (2.5)	8.1 (2.9)	9.64 (2.4)	6.9 (2.3)
Number of reflections	35,080	31,426	65,814	31,742	48,346
Rigid body minimisation ⁴	R=0.279	R=0.279	R=0.310	R=0.288	R=0.322
Annealing (Ti=2000K)	R=0.226 R _{free} =0.271	R=0.266 R _{free} =0.286	R=0.298 R _{free} =0.308	R=0.226 R _{free} =0.231	R=0.275 R _{free} =0.263
Ligand search or manual corrections	R=0.208 R _{free} =0.260	R=0.246 R _{free} =0.267	R=0.238 R _{free} =0.271	R=0.220 R _{free} =0.251	R=0.224 R _{free} =0.244
Water search	R=0.187 R _{free} =0.233	R=0.199 R _{free} =0.228	R=0.212 R _{free} =0.231	R=0.214 R _{free} =0.235	R=0.218 R _{free} =0.238
					Aniso. Ref. ⁵
Water molecules (in A.U.)	304	234	682	168	297
Relation # of reflections /parameters	1.95	1.77	3.22	3.55	5.02
Multiple alternate conformation construction in the active-site lid			R=0.195 R _{free} =0.227		294 5.02
					Mult. Alt. Conf. Ref ⁵
Anisotropic refinement					R=0.188 R _{int} =0.233
Multiple alternate conformation construction in the active-site lid and C-terminus					R=0.209 R _{int} =0.225
Relation # of refle/param after multiple conformation or anisotropic refinement			2.50		2.23
PDB Code	1FQO	1FRZ	1FS5	1FS6	1FSF
					2.57

Table 1: ¹In all cases the cryo-protectant solution is the same as the mother liquor where the crystals grew, but instead of water, the salts were dissolved in aqueous solutions of sucrose or trehalose. ²All the diffraction data were collected at 103K to 113K. The test data set for R_{free} calculations was randomly selected to contain 10% of the whole data set. ³In one monomer of the asymmetric unit the active-site is occupied by one molecule of tartaric acid and the other monomer presents a ligand free active-site. ⁴The rigid body minimisations were performed directly using as starting model the R and T structures previously reported by our group (PDB codes 1HOT and 1CD5). In each step of the refinement procedure, manual adjustments were performed using both *2fo-*fc** and *fo-*fc** electron density maps. ⁵In the fifth column, after the line title "water molecules (in A.U.)", the following lines show the statistics for two different refinement procedures of the same data-set: using the anisotropic model for B factor refinement and using the isotropic model with alternate conformations of the active site lid and the C-terminus.

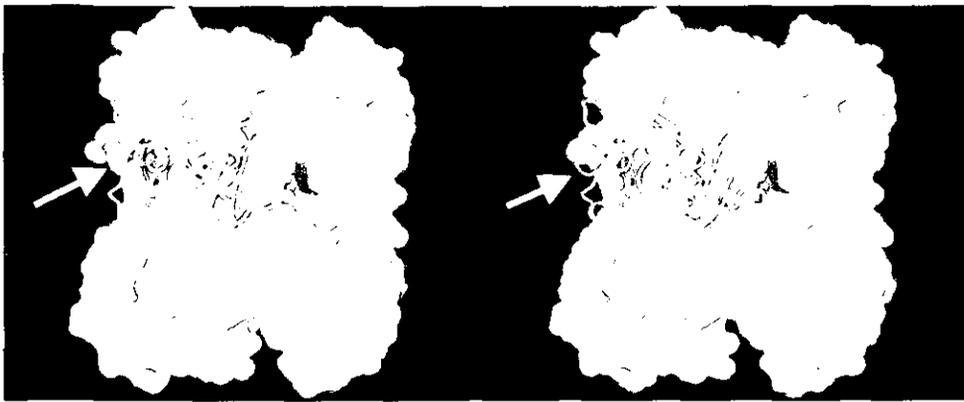
TABLE 2

Monomer A	T-form interaction (distance in Å)	R-form interaction (distance in Å)	Monomer B
Atom OE1, E148	3.03	none	Atom OH, Y 254
Atom O, P149	3.23	none	Atom OH, Y 254
Atom O, P149	two wat. molec. (2.59, 2.30)	none	Atom OH, Y 254
Atom O, P149	none	four wat. molec. (2.94, 2.84, 2.61, 2.54, 2.72)	Atom O, K250
Atom O, P149	none	three wat. molec. (2.94, 2.84, 2.69, 2.94)	Atom Oy1, T251
Atom CB, A150	4.06	3.72	Atom C ζ , F255
Atom O, A150	3.31	3.50	Atom O, M1
Atom O, A 150	2.76	3.02	Atom N, M1
Atom Oy, S152	none	2.66	Atom O, H 232
Atom Oy, S152	2.65	none	Atom O, P233
Atom N, L153	one wat. molec. (2.82, 2.76).	3.02	Atom O, Q230
Atom N, L153	one wat. molec. (2.82, 2.76).	none	Atom O, H232
Atom O, T161	none	3.14	Atom OH, Y 254
Atom N, T161	none	one wat. molec. (3.08, 3.11).	Atom OH, Y254
Atom NE, K160	none	one wat. molec. (2.69, 3.11).	Atom OH, Y254
Atom Oy1, T161	none	three wat. molec. (2.96, 2.60, 2.81, 3.11).	Atom OH, Y254
Atom O, K160	none	four wat. molec. (2.96, 2.55, 2.60, 2.81, 3.11).	Atom OH, Y254
Atom N, K160	none	four wat. molec. (3.19, 2.55, 2.60, 2.81, 3.11).	Atom OH, Y254

Table 2: Distances of the hydrogen bonds formed in the inter-monomer surface close to the allosteric site, in both R and T conformers of the GlcN6P deaminase from *E. coli*, and one hydrophobic interaction between residues A150 and F255. When the contacts between residues are mediated by ordered water molecules, the number of water molecules involved and the distances corresponding to each hydrogen bond are presented.

FIGURE 1

A



B

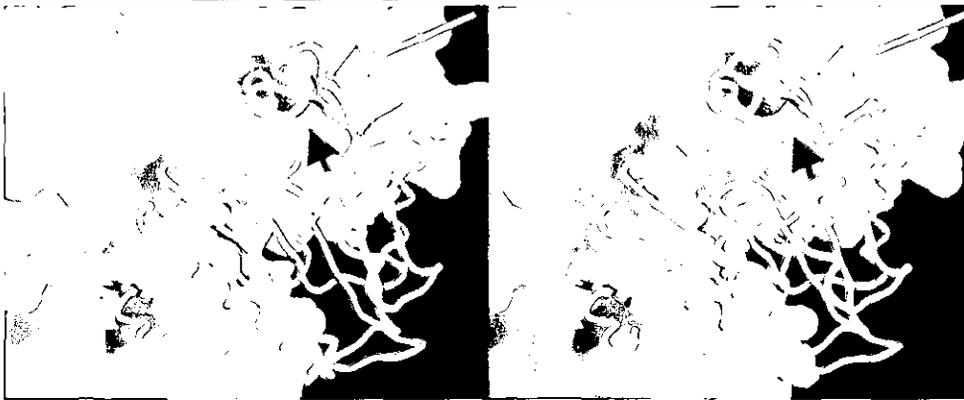


Figure 1: (A) Stereo drawing showing the biologically functional homo-hexameric particle of the GlcN6P deaminase from *E. coli* and (B) a close up view of a monomer. The colours represent: cyan, the internal module, which is responsible for most of the intermonomeric contacts of the hexamer (residues 137 to 143, 207 to 233 and 244 to 253); magenta, the active site lid, which has residues in the active and allosteric sites, and show an unusual flexibility behavior during the allosteric transition (present work)(residues 158 to 187, the active site lid is formed by the base of the active site lid, which is part of an anti-parallel β -sheet (residues 158 to 162 and 183 to 187), and the mobile section of the active site lid, residues 163 to 182); orange, two loops which present large flexibilities associated to the movements of the active site lid (present work)(residues 75 to 83 and 109 to 112); yellow, the external module, which describe a rotation of 11° during the allosteric transition (Horjales, E. *et al*, 1999) (residues 1 to 136, 144 to 206, 234 to 243 and 254 to 266); dark blue, the residues Y254 (at the beginning of the C-terminus) and T161 (at the active site lid), which, in the R form, build an inter-

monomeric hydrogen bond as part of a complex water mediated hydrogen bond net (Montero-Morán *et al.*, 1998). In the T form a different inter-subunit hydrogen bond net exists, which includes a hydrogen bond between residues Y254 and P149 (Montero-Morán *et al.*, 1998). In figure (A), the white arrow shows the view point of figure (B). In (B), the red arrow points to the allosteric site (residues 1, 158 and 160), which is functional only in the R conformer (Oliva *et al.*, 1995), while the blue arrow points to the active site (residues 40 to 44, 72, 85, 143, 172 and 208, Oliva *et al.*, 1995). The allosteric site is formed in the inter-subunit space, thus each monomer is part of two allosteric sites. The figure was generated with GRASP (Nicholls *et al.*, 1993).

FIGURE 2-A

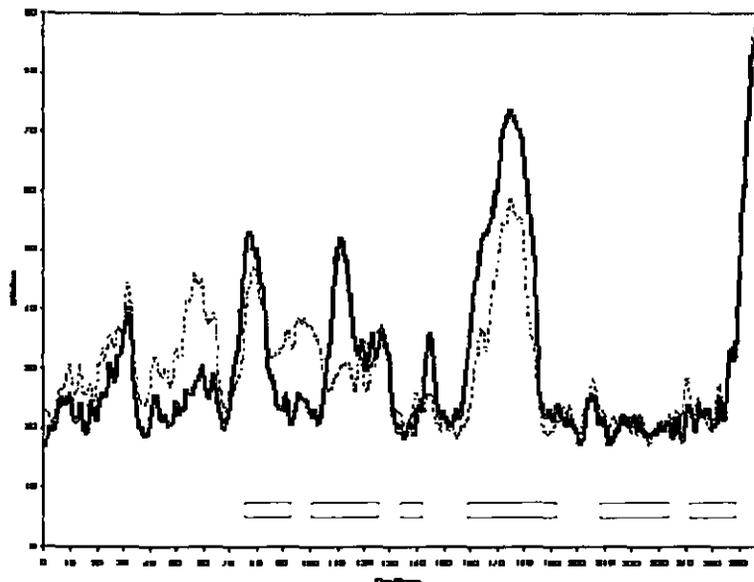


FIGURE 2-B

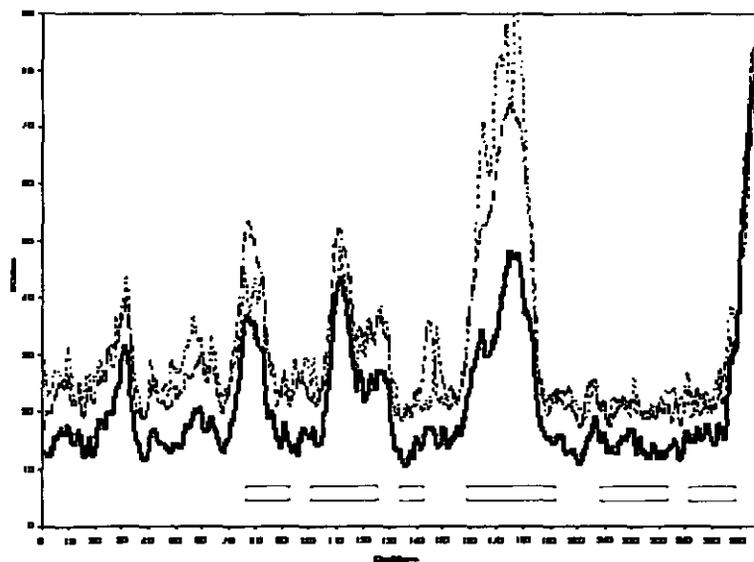


Figure 2-A: presents the B-factor distributions along the sequence of the R state of *E. coli* GlcN6P deaminase, with the allosteric site occupied. The first monomer of the asymmetric unit (dashed line) and the second (full line) are presented (pdb code 1frz). **Figure 2-B:** shows the B-factor distributions along the sequence of the R state *E. coli* GlcN6P deaminase with both sites occupied (full line, pdb code 1fqo), the R state with the allosteric site occupied (dashed-dotted line, pdb code 1frz) and the T-form (dashed line, pdb code 1fs6), we used the second monomer of the asymmetric unit for the R-forms. All the structures used have similar resolutions, and their diffraction patterns were collected at

identical conditions in the same SSRL 7-1 beam line at liquid nitrogen conditions. The colour code is: yellow, for the external section, cyan, for the internal section, and magenta, for the active-site lid and neighbouring loops, see table 2 and figure 1.

FIGURE 3

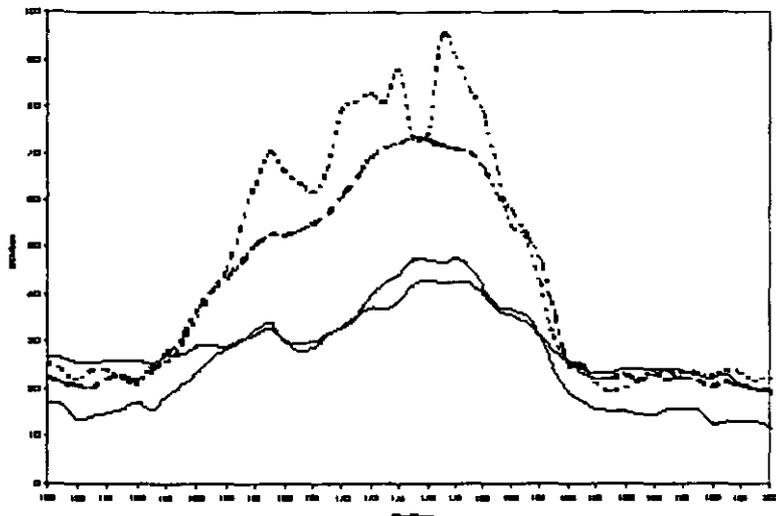


Figure 3: Average B-factor for main chain atoms are presented for wild type T-form at 2.20Å resolution (thick dashed line), wild type R-form with only the allosteric site occupied at 2.20Å resolution (thin dashed line), wild type R-form with both active and allosteric sites occupied at 2.15Å resolution (thick full line) and mutant Y160E (Lara-Gonzalez *et al.*, unpublished) with only the active-site occupied at 2.30Å resolution (thin full line). All the data sets were collected at SSRL beam line 7-1, at liquid nitrogen temperatures using 35% sucrose as cryo-protectant solution, the structures were solved with CNS. Isotropic temperature B-factor are plotted for the active-site lid (residues 158-187).

FIGURE 4

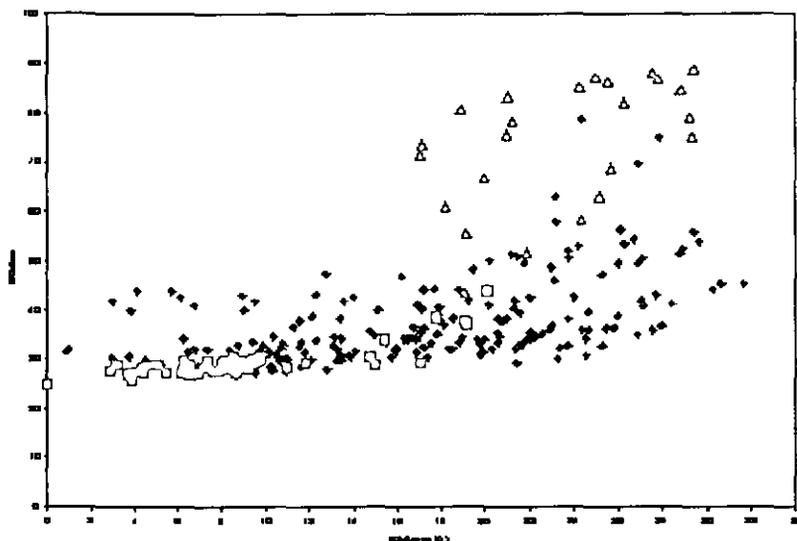


Figure 4: the plot represents the B-factor values as a function of the distance of each C α atom to an axis parallel to the crystallographic c axis going through the atom with lowest atomic mobility. The internal section (red squares) and the external section (black rhombus) of the T state of the enzyme (present work at 1.90Å resolution) describe an increase of the vibration in relation with the distance to the less mobile residue. The active-site lid (green triangles) presents a stronger vibrational motion in the same plane. When the plotted data of the external section (without C-terminus and active site lid) is adjusted to a linear distribution, the resulted slope is 0.4674 (correlation factor = 0.2596). In all the R cases (data not shown) the slope always is less than 0.0800.

FIGURE 5

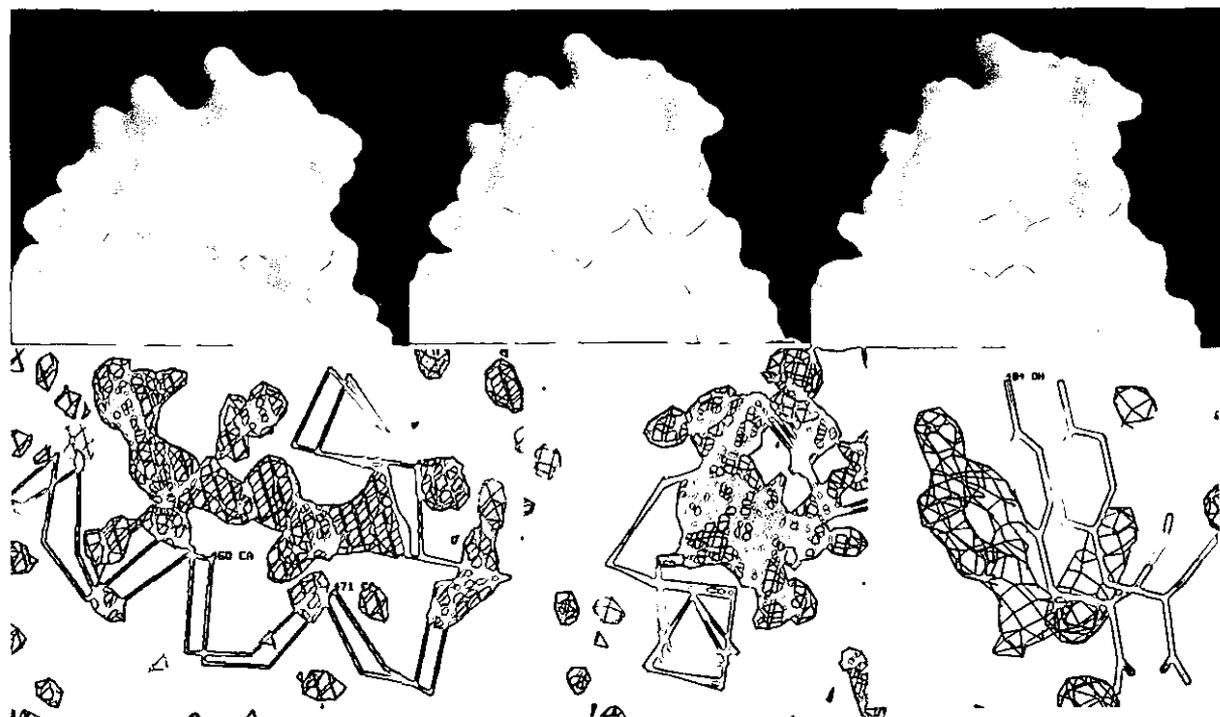


Figure 5: the alternate active site lids found in the R-form enzyme, with only the allosteric site occupied at 1.73Å resolution. The solvent access surface figure (top) presents the three conformers describing an opening-closing movement in the active-site lid. The second set of figures (bottom) presents the construction of the third alternate active-site lid. Here a *fo-fc* map shows a positive electron density enough to construct another conformation, even the lateral chains presents a clear third alternate structure. For colours code see figure 1.

FIGURE 6

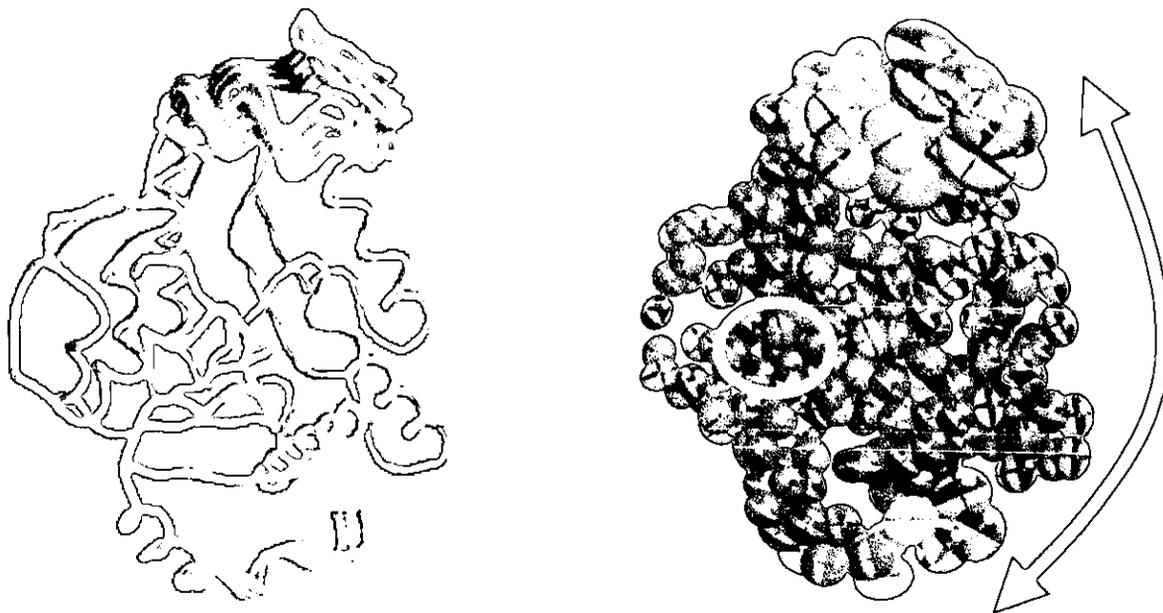


Figure 6: Left: view of the trace of the ligand-free T-form monomer of GlcN6P deaminase, refined with alternate conformations at both active-site lid and C-terminus. The colour code is: yellow, for the external section, cyan, for the internal section, and magenta, for the active-site lid and neighbouring loops, see figure 1. Right: after an anisotropic refinement, the C α atoms of the ligand-free T-form clearly shows a rotation movement with axis at the centre of the small blue circle which is similar to that proposed for the allosteric transition (Horjales *et al.*, 1999). The trace is coloured according to isotropic B factor values. Red colour for high, blue colour for low values. C α B-factor values range from 24 Å² to 148Å².

FIGURE 7

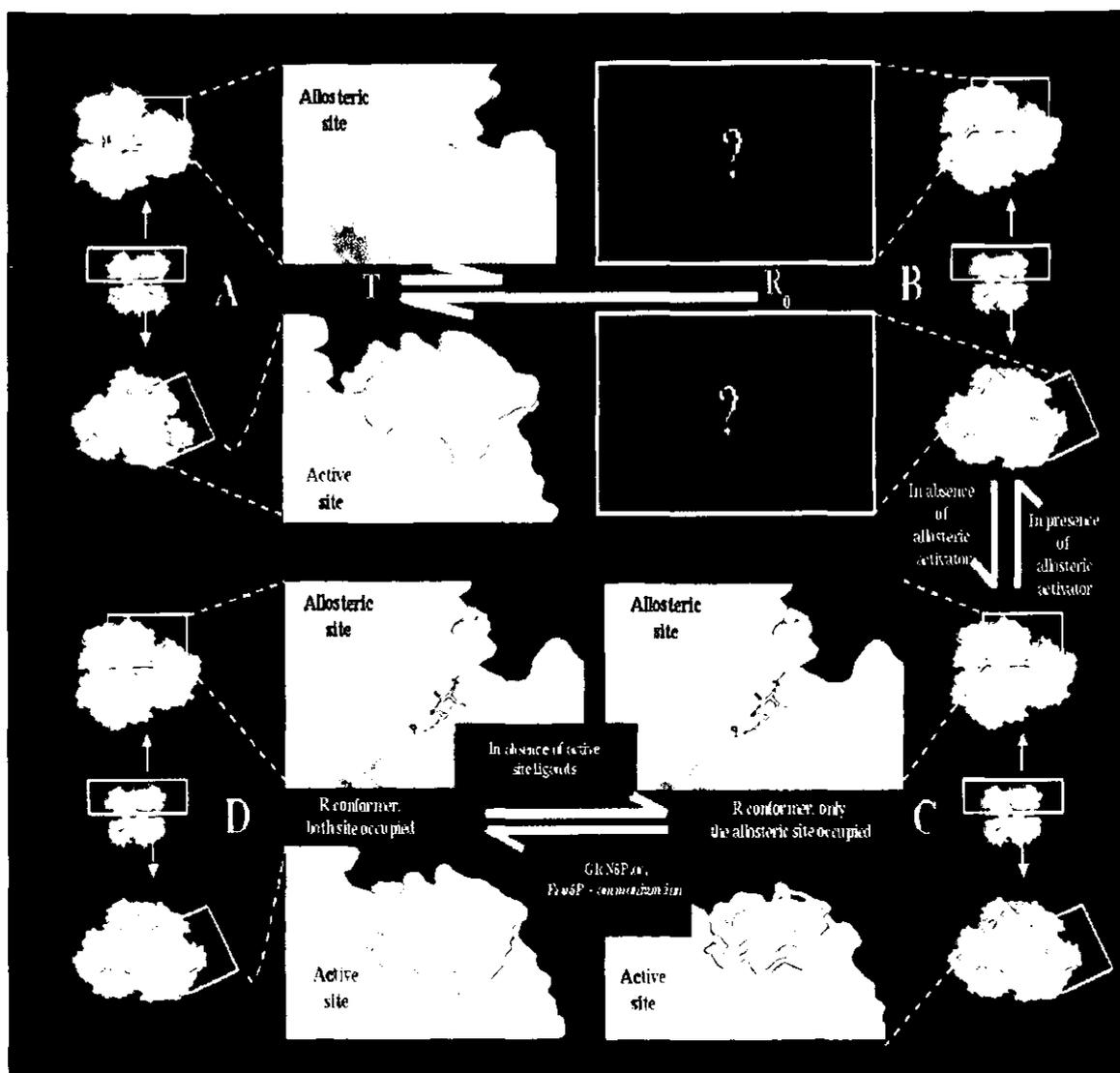


Figure 7: In the figure: A, is the ligand-free T form; B, the proposed ligand-free R form (A and B conformations in different concentrations form the kinetic T state); C, the R form with only the allosteric site occupied; and D, the R form with both, allosteric and active sites, occupied (together C and D form the R state). Assuming a MCW model, the T-form is unable to bind the allosteric activator, but able to bind the substrate. In our results we can not get any T-conformer with ligands bound. We propose that in both homotropic or heterotropic transformations the ligand binding process occurs directly in a ligand-free R-form molecule, which is in equilibrium with the ligand-free T-form through atomic vibrations which present the same direction as the allosteric transformation. In the heterotropic activation the allosteric activator produce the transition from T to R, once in R, the active-site lid generate three alternate conformations "opening" and "closing" the active-site crevice. When the

substrate (or any other ligand) bind to the active-site, the lid has only one conformation, "closing" the site (C to D). When the concentrations of substrate decrease, the empty active-site generates the three alternate conformations in the lid (D to C). Finally when the concentration of the allosteric activator further decrease, the ligand-free T-form is re-constructed (C to A, or C to B to A). The colour code is: yellow, for the external section, cyan, for the internal section, and magenta, for the active-site lid, see figure 1.

On the role of the conformational mobility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase

Running title: Active-Site Lid of Glucosamine-6-*P* Deaminase

Keywords: Active-site lid, conformational mobility, conformational flexibility, allosteric transition, glucosamine 6-*P* deaminase

Ismael Bustos-Jaimes^{†*}, Alejandro Sosa-Peinado[†], Enrique Rudiño-Piñera[§], Eduardo Horjales[§] and Mario L. Calcagno[†]

[†]Laboratorio de Físicoquímica y Diseño de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), P.O. Box 70-159, Ciudad Universitaria, Mexico City, D.F., 04510, Mexico and [§]Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), P.O. Box 510-3, Cuernavaca, MOR, 62271, Mexico.

*Corresponding author, e-mail: ismaelb@servidor.unam.mx.

(Summary)

The active site of glucosamine-6-*P* deaminase from *Escherichia coli* (GlcN6*P* deaminase, EC 3.5.99.6) has a complex lid formed by two antiparallel β -strands connected by a loop-helix-loop segment (158-187). This motif contains Arg172, which is residue involved in binding the substrate in the active-site, and three residues that are part of the allosteric site, Arg158, Lys160 and Thr161. This dual binding role of the motif forming the lid, suggests that it plays a key role in the functional coupling between active and allosteric sites. Previous crystallographic work showed that the temperature coefficients of the active-site lid are very large when the enzyme is in its T allosteric state. These coefficients decrease in the R state, thus suggesting that this motif changes its conformational mobility as a consequence of the allosteric transition. In order to explore the possible connection between the conformational

mobility of the lid and the function of the deaminase, we constructed the site-directed mutant Phe174-Ala. Phe174 is located at the C-end of the lid helix and its side chain establishes hydrophobic interactions with the remainder of the enzyme. The crystallographic structure of the T state of Phe174-Ala deaminase was determined at 2.02 Å- resolution; it shows no density for residues 162 to 181 and high temperature factors as well as weak density in the segments 160-162 and 182-184 (PDB 1JT9). This mutant form of the enzyme is essentially inactive in the absence of the allosteric activator, *N*-acetylglucosamine-6-*P* although it recovers its activity up to the wild-type level in the presence of this ligand. Spectrometric and binding studies show that inactivity is due to the inability of the active-site to bind ligands when the allosteric site is empty. These data indicate that the conformational mobility of the active-site lid critically alters the binding properties of the active site and that the occupation of the allosteric site restores the lid mobility to a functional state.

Introduction

During their catalytic cycle, enzymes undergo conformational changes, that are critical for their function. Proteins are non-rigid or even "floppy" structures, while substrates are usually less flexible. Therefore, the formation of enzyme-substrate complexes is accompanied by local structural changes that are usually restricted to the active site region, or close to it. The structural changes (called induced fit) are driven by ligand binding-energy¹. These local structural changes sequester the bound substrates and reaction intermediates from bulk solvent, stabilising intermediates or transition states for efficient catalysis. Mobile structures allow substrates to diffuse into the active site and subsequently become surrounded by the protein. In many enzymes the conformational changes associated with catalysis depend upon the presence of a hinge, that is, a specific flexible segment in the structure. Protein hinges may modulate domain displacements, or conformational changes of protein motifs smaller than domains, which have been described as active-site lids². There is a considerable variation in the mobile or flexible structures in the active site of enzymes with open α/β fold. The most studied lid in this structural family is that of lipases, which contains an α -helix whose motion is an essential part of the catalytic mechanism³.

Glucosamine-6-phosphate deaminase (GlcN6*P* deaminase, EC 3.5.99.6), an allosteric enzyme converting GlcN6*P* into Fru6*P* and ammonia, is a three-layer sandwich α/β -protein. GlcN6*P* deaminase from *Escherichia coli* has been extensively characterized both structurally^{4,5} and kinetically⁶⁻⁹; it is a homohexameric enzyme allosterically activated by *N*-acetylglucosamine-6-

phosphate (GlcNAc6P). This enzyme behaves as a classic allosteric *K*-system *i.e.* its regulation is the result of a change in its apparent affinity for the substrate produced by the allosteric transition, without change in the catalytic constant. GlcN6P deaminase molecule has a complex structure that completes and closes the active site that can be recognised as an active-site lid. This motif, made up of amino acids 158-187, is formed by two antiparallel β -strands connected by a loop-helix-loop segment (Figure 1). The helix-loop segment (164-182) is connected to the remainder of the structure by β -strands at the C- and the N-termini of the helix-loop motif. These two strands are part of a small three-stranded antiparallel β -sheet that includes the active-site residue Asp72. This residue provides the general base that catalyses the enolisation of the substrate by abstraction of a proton^{4,8}. The 10-residue long α -helix in the lid (164-174) is anchored to the rest of the enzyme by a hydrophobic interaction built by the side chain of Phe174, which is buried in an uncharged pocket (Figure 2). This helical segment also contains Arg172, which is one of the charged residues binding the $-OPO_3^{2-}$ group of the substrate, GlcN6P. The β -strand at the N-terminus of the lid motif includes the residues Arg158 and Lys160, each contributing a positive charge to the allosteric-activator binding site. This strand also contains Thr161, which is hydrogen-bonded through its side-chain to the acetamido oxygen of the allosteric activator, GlcNAc6P⁴. The allosteric transition of the GlcN6P deaminase has been described as a rigid body rotation of two regions in each enzyme subunit. This rotation occurs about an axis parallel to the three-fold axis of the hexamer⁵. The comparison of the crystallographic coordinates of the enzyme in its T and R state, also shows that the allosteric transition causes distinct changes in the tertiary structure, mainly in the loop 136-158, which contains catalytic residues⁹. In contrast, the active-site lid does not display a well-defined conformational change in the transition from the T to the R allosteric state. Moreover, the atoms in its central segment (the helix-loop 164-182) show a marked decrease in their flexibility, as indicated by the lower values of their crystallographic B factors in the R state. This is the sole structural change in the lid motif associated with the allosteric transition that is revealed by crystallographic studies^{7,10}; it can be described as a change in conformational mobility rather than a precise geometrical displacement.

In the present research we have studied the role of the mobility of the active-site lid on the kinetic behaviour of *E. coli* GlcN6P deaminase. The analysis of the structural models of the enzyme shows that the side chain of Phe174 in the mobile segment of the lid, builds up hydrophobic interactions with the remainder of the protein (Figure 2). Taking advantage of this feature, we designed the mutant Phe174-Ala with the purpose of increasing the mobility of the lid. The study of this mutant shows that

the lid flexibility plays a crucial role in catalysis and the functional connection between the allosteric and the active site in GlcN6P deaminase.

Results and discussion

The crystallographic data for Phe174-Ala mutant in its T state reveals a lack of electronic density in the active-site lid

The crystallographic structure of the mutant enzyme Phe174-Ala was determined at 2.02 Å- resolution from a ligand-free enzyme crystal (Table 1, PDB entry 1JT9). This structure corresponds to the T form of the enzyme, but it lacks any electronic density in the segment corresponding to the residues 163-182. This segment is part of the motif forming the active-site lid. Figure 3 shows the electron-density map for the mutant enzyme, where the missing segment is shown as the α -carbon trace of the corresponding segment in the wild-type deaminase in the T state.

Many unsuccessful attempts were made to crystallise the Phe174-Ala mutant enzyme in its R allosteric state by saturating it with active- or allosteric-site ligands. Many conditions were tried, with acetate or phosphate salts as precipitants at a variety of concentrations and pH values, and adding high concentrations of GlcNAc6P, Fru6P or 2-amino-2-deoxyglucitol 6-P (GlcN-ol-6P, a competitive inhibitor). It should be recalled that phosphate ion is a low-affinity ligand that binds to both allosteric- and active site⁴.

The observed absence of any electronic density for the segment 163-182 in the active-site lid of the mutant enzyme proves how this hydrophobic interaction is necessary to maintain the lid structure in the wild-type ligand-free enzyme. High temperature factors, as well as low electron-density are found in the active-site lid segments 160-162 and 182-184, residues that are contiguous to the entirely disordered helix-loop motif. The present results prove that the mutation Phe174-Ala effectively weakens the interaction between the active-site lid and the remainder of the enzyme molecule. This effect of the mutation is restricted to the active-site-lid. The comparison of the model of the mutant enzyme, constructed with the exclusion of the lost segment, with the model of the wild-type enzyme in its T state superposes with a rmsd of 0.20 Å (not shown), indicating that the remainder of the molecule is unchanged by the mutation.

As a consequence of the Phe174-Ala replacement, GlcNAc6P becomes an essential activator of GlcN6P deaminase

The mutant Phe174-Ala is essentially inactive when assayed in the absence of its allosteric activator and displays a mixed allosteric activation pattern, changing both $S_{0.5}$ and k_{cat} values with increasing allosteric activator concentrations (Figure 4). Only at very high concentrations of GlcN6P, a very low reaction rate can be measured in the absence of GlcNAc6P. In contrast, wild-type deaminase behaves as an allosteric K system in which k_{cat} is independent of the activator concentration⁶. When the mutant enzyme was assayed in the presence of a saturating GlcNAc6P concentration, its k_{cat} attains the same value as that found for the wild-type enzyme (Figure 4 and Table 2). The considerable loss of catalytic activity observed in the absence of the allosteric activator suggests that the mutation produced a disruption of the active-site lid that can be functionally reversed by the addition of GlcNAc6P. Since a low residual activity is detected at very high substrate concentrations, a minor ability of the active site of the mutant enzyme to bind GlcN6P cannot be excluded. However, it could also be due to a heterotropic activation, that is, the activation produced by the low-affinity binding of GlcN6P to the allosteric site.

The increase of V_{max} produced by the allosteric activation in the mutant enzyme, recalls the behaviour of an essential activator. The observed activation pattern (Figure 4) can be a consequence of the sequential oligomer activation by increasing GlcNAc6P concentration. Assuming that each enzyme subunit is inactive until it binds a GlcNAc6P molecule, the enzyme will behave as a functional hexamer only when it has its six allosteric sites occupied and the six active-site lids have all been restored to a functional state.

Occupation of the allosteric site by GlcNAc6P enables the active site to bind the competitive inhibitor

Direct binding experiments were used to correlate the kinetic effect of the replacement of Phe174 by alanine in GlcN6P deaminase, to its ability to bind the competitive inhibitor GlcN-ol-6P. The binding curves for the ³H-labelled inhibitor to the wild-type and mutant enzymes show that this active-site ligand is not significantly bound to the Phe174-Ala mutant enzyme in the absence of the allosteric activator (Figure 5). This is similar to the result observed in kinetic experiments; only high concentrations of GlcN-ol-6P produce some binding to the mutant enzyme (less than 0.6 moles per mole of enzyme hexamer). The addition of a saturating concentration of GlcNAc6P allows the mutant enzyme to bind the inhibitor, displaying some positive homotropic co-operativity. The affinity of the active site for GlcN-ol-6P is decreased nearly three fold as a consequence of the mutation (Table 2). These direct binding measurements prove that the low activity observed, in the absence of the

allosteric activator, is a consequence of the reduced affinity of the mutated enzyme for active-site ligands. As a direct consequence, the allosteric transition cannot be triggered from the active site.

Effect of allosteric- and active-site ligands on the structure of the mutant enzyme: evidence from CD spectral changes.

The interaction of the allosteric activator and the competitive inhibitor with Phe174-Ala GlcN6P deaminase was analysed by CD spectrometry in the aromatic absorption range. For reference, similar CD titration experiments were performed using the wild-type enzyme. GlcN-ol-6P binding to the wild type enzyme produces an increase of the CD peak at 288-290 nm and an increase in a shoulder at 280 nm (Figure 6A). This shoulder is absent in the CD spectrum of the Phe174-Ala deaminase, whose spectrum appears essentially unchanged in the range 278-300 nm when GlcN-ol-6P is added up to a concentration of 15 times the corresponding K_d . These results are consistent with the kinetic and binding behaviour of the mutant enzyme and confirm that it cannot bind active-site ligands in the absence of the allosteric activator.

The CD titration of the wild-type enzyme with the allosteric activator is shown in Figure 7A. The main spectral changes produced by GlcNAc6P binding to the wild-type enzyme are a CD decrease at 268-277 nm with negative peaks at 270 and 275 nm and a decrease of the positive peak at 265 nm. These spectral changes were already reported for the wild-type GlcN6P deaminase^{7,11}. The replacement of Phe174 by alanine increases the magnitude of these signals. This change is considerably larger than the effect found for the wild-type enzyme (Figure 7). This noticeable spectral effect produced by GlcNAc6P binding to Phe174-Ala deaminase could be related to the rebuilding of the active site following the occupation of the allosteric site, when the concerted quaternary transition occurs.

The V effect observed and the inability of the active site to bind its specific ligands in the absence of the activator, suggest that the allosteric transition started by GlcNAc6P does not activate all the active sites in an all-or-none fashion as in the wild-type enzyme. This means that its apparent k_{cat} becomes dependant on the GlcNAc6P concentration. Taking into account the linkage between the active and allosteric sites created by the residues of the lid motif, it is expected that these functionally linked sites, one allosteric and one catalytic, are those which are structurally connected through the lid motif.

Active-site lid conformational flexibility and the allosteric coupling in GlcN6P deaminase

The mutation increases the conformational flexibility of the active-site lid so much that no electron density corresponding to the central helix-loop motif (residues 164-183) is observed. The remainder of the lid structure includes two residues, which are located in the inter-subunit cleft and are part of the allosteric site, Arg158 and Lys160, which bind the $-OPO_3^{2-}$ group of GlcNAc6P and Thr161, whose side-chain hydroxy group is hydrogen-bonded to the carbonyl oxygen of the acetamido group of GlcNAc6P. These residues are part of the a short β -strand (sequence RVKT, 158-161), whose C-terminal end builds a critical hydrogen-bond between the backbone carbonyl group and Tyr254 hydroxy group in the facing subunit, when the allosteric site is occupied and the enzyme is in the R state. In the T state, this phenolic hydroxy group moves as a true molecular switch, and interacts with the backbone carbonyl at position 149, which is part of the loop 136-158 that is a component of the active site⁸. The curves of velocity against substrate concentration for the mutant Tyr254-Phe¹² in the presence of varying concentrations of the allosteric activator are similar to those shown in Figure 4. This suggests that both point mutations, Phe174-Ala and Tyr254-Phe, have a similar effect on the active site. In both cases, the kinetic data suggest that the mutants cannot trigger the allosteric transition from the active site. Although we do not have direct evidence for an effect of the Tyr254-Phe mutant on the mobility of the active-site lid, it is possible that releasing the constraints in the allosteric site at the N-terminal side of the lid motif will increase the mobility of the lid. A crystallographic study of Tyr254-Phe deaminase, in its T and R states will make clear this point.

Concluding remarks

The present results provide a new insight into the dynamics of allosteric transitions. These were classically analysed as geometrical displacements involving the quaternary structure^{13,14} accompanied by local displacements of some segments or motifs, affecting the tertiary structure of the protein. Although this kind of conformational change is an essential part of the allosteric transition in GlcN6P deaminase⁵, we wish to emphasise the different behaviour of the active site lid. This motif does not produce a well-defined open-closed transition, but it displays a noticeable change in its flexibility or mobility. In a recent crystallographic study¹⁰, the allosteric transition of this enzyme has been described as a flexibility-driven molecular motion. In agreement with the present results, a thermodynamic study of the allosteric transition of GlcN6P deaminase from *E. coli* revealed that the whole Gibbs energy change is driven by its entropic component¹⁵. This entropic dependence of the allosteric transition suggests that the variation in conformational flexibility in specific components of the molecule plays an essential role in the function of this enzyme.

Materials and Methods

Reagents

Most chemicals and biochemicals were from Sigma-Aldrich S.A. de C.V, Mexico. The affinity gel used for GlcN6P deaminase purification (*N*-aminohexanoylglucosamine-6P agarose) was prepared as described⁶ with further modifications¹². The dead-end inhibitor, GlcN-ol-6P, was synthesised according to Midelfort and Rose¹⁶; its ³H-labelled form (274 kBq μmole^{-1}) was obtained with the same procedure, using ³H-NaBH₄ as reducer.

Bacterial strains and mutagenesis

Site directed mutation Phe174 (TTT) to Ala (GCT) was obtained by oligonucleotide-directed mutagenesis, using Stratagene QuickChange[®] reagents as described by the manufacturer, to mutate the *nagB* gene inserted in the vector pTZ18R. The plasmid carrying the mutation was verified by sequencing and used to transform the Δnag strain IBPC590. This strain is ΔlacI and expresses the deaminase constitutively. Details on the strain and the procedure were already reported⁷.

Enzyme purification

E. coli wild-type GlcN6P deaminase and the site-specific mutant Phe174-Ala, were purified by allosteric-site affinity chromatography as previously reported¹². The purity of the enzyme preparations was verified by SDS-PAGE. GlcN6P deaminase was assayed in the direction of Fru6P formation, by the measurement of Fru6P concentration at fixed times, as previously reported⁶. The progress of the reaction was always kept below 5 % conversion of the initial amount of substrate. Kinetic data were analyzed by nonlinear regression analysis using the program Origin (MicroCal Software, Inc., Northampton, MA). The amino acid substitution does not affect significantly the molar absorptivity estimated according to Edelhoch¹⁷, and the corresponding value for the wild-type enzyme ($20.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was used to calculate the concentration of the mutant enzyme.

Crystallisation and crystallographic measurements

Crystallisation trials were performed in the presence and absence of the allosteric-site ligand GlcNAc6P, or an active-site ligand (GlcN-ol-6P or Fru6P) or inorganic phosphate that binds to both sites. In all cases in which crystal growth was obtained, the crystals belonged to the space group P6₃22, which is the crystal morphology corresponding to the T form of the enzyme⁵. We tested the diffraction

pattern of several crystals to confirm the space group. The crystal used for diffraction data collection was obtained with the hanging-drop vapour diffusion technique, at 18 °C in 2.9 M sodium acetate and 100 mM HEPES buffer at pH 7.0, containing 5 mM GlcNAc6P. A diffraction data set at 2.02 Å resolution at line 7-1 (wavelength 1.08 Å) was obtained in the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory. Mineral oil was used as a cryoprotector (Table 1). Attempts to obtain crystals in the allosteric R state were unsuccessful. Only with 4 M phosphate buffer as precipitant at pH values from 7.0 to 8.0, did we obtain microcrystals with a different morphology.

Measurement of the dissociation constant of the competitive inhibitor

Binding of the active-site ligand GlcN-ol-6P, a competitive inhibitor, was obtained from radioactive binding measurements of ³H-labeled GlcN-ol-6P at 30 °C, separating the enzyme by ultracentrifugation, as previously described¹².

Binding of GlcNAc6P and GlcN-ol-6P by circular dichroism spectroscopy

The dissociation constant of the allosteric activator GlcNAc6P and the dead-end inhibitor GlcN-ol-6P were determined by near-UV CD spectroscopy using a Jasco J-715 CD spectrometer. Protein samples (10 µM) were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 and data were collected at 30 °C as described in reference 7. Spectral data were corrected with suitable blanks and for dilution during titration.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Drs. M. Costas-Basin, D.A. Fernández-Velasco and J.A. Plumbridge for the critical reading of the manuscript and many interesting discussions. They also acknowledge Laura I. Álvarez-Añorve, for her technical assistance. This paper was supported by a grant from the National University of Mexico (DGAPA-UNAM Projects IN-212799 to MLC and IN220896 to EH) and CONACyT (Project No. 25258-N). IBJ and ERP received Ph.D. student fellowships also from CONACyT and student research grants from PAEP (DGEP, UNAM). Part of this work is based upon research conducted at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), which is funded by the Department of Energy (BES, BER) and the National Institutes of Health, NCRR, NIGMS.

References

1. Fersht, A. R. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H. Freeman & Co., New York.
2. Gerstein, M., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1994). Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry* **33**, 6739-6749).
3. Derewenda, Z. S. (1995). A twist in the tale of lipolytic enzymes. *Nature Str. Biol.* **2**, 347-349.
4. Oliva, G., Fontes, M. R. M., Garratt, R. C., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. & Horjales, E. (1995). Structure and Catalytic Mechanism of Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* **3**, 1323-1332.
5. Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Garratt R. C. & Oliva, G. (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T-state at 2.3 Å resolution. *Structure*, **7**, 527-537.
6. Calcagno, M. L., Campos, P. J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984). Purification, Molecular and Kinetic Properties of glucosamine 6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 165-173.
7. Altamirano M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E. & Calcagno, M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry*, **34**, 6074-6082.
8. Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Álvarez-Añorve, L. I., Plumbridge, J.A. & Calcagno, M. L. (2001). On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase, *Biochemistry*, in press.

9. Lara-González, S., Dixon, H.B.F., Mendoza-Hernández, G., Altamirano, M. M. & Calcagno, M. L. (2000). On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**, 219-227.
10. Rudiño-Piñera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S. P. and Horjales, E. (2001). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase, *Acta Crystallogr D*, in press.
11. Woody, R.W. & Dunker, K.A. (1996). Aromatic and Cystine Side-chain Circular Dichroism. In *Proteins In Circular Dichroism and the Conformation Analysis of Biomolecules*, Chapter 4. G.D. Fasman, Editor, Plenum Press, New York and London.
12. Montero-Morán, G.M., Horjales, E., Calcagno, M.L. & Altamirano, M. M. (1998). Tyr254 Hydroxyl Group Acts as a Two-Way Switch Mechanism in the Coupling of Heterotropic, Homotropic Effects in *Escherichia coli* Glucosamine-6-phosphate Deaminase. *Biochemistry* **37**, 7844-7849.
13. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
14. Perutz, M.F. (1990). *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
15. Bustos-Jaimes, I. & Calcagno, M. L. (2001). Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys*, in press.
16. Midelfort, C. and Rose, I. A. (1977). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* **16**, 1590-1596.
17. Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **7**, 1948-1954.

18. Carson, M. (1991). Ribbons 2.0. *J. Appl. Cryst.* **24**, 958-961.

19. Nicholls, A., Sharp, K.A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **4**, 281-296.

20. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110-119.

Tables

Table 1. Data collection and refinement statistics.

Monomers per asymmetric unit	1
Other non-water atoms in the A.U.	none
Space group	P6 ₃ 22
Cell parameters a = b, c (Å)	127.61, 139.82
α = β, γ (deg.)	90, 120
Resolution (Å)	50 - 2.02
R _{sym}	0.05
R _{sym} at highest resolution bin (2.06-2.12 Å)	0.334
Completeness [F/s(F)>1] (%)	99.0
multiplicity	3.4
I/s(I) at highest resolution bin (2.3)	11.1
Unique reflections measured	41650
Rigid body minimisation	R = 0.352
Annealing (T _i = 2000 K)	R = 0.279
	R _{free} = 0.289
Ligand search and manual modifications	R = 0.262
	R _{free} = 0.275
Water search	R = 0.213
	R _{free} = 0.231
DDQ directed model correction and alternate conformations building	R = 0.19
	R _{free} = 0.21
Water molecules in the asymmetric unit	268
Reflections per atom	18.88

Table 2. Kinetic and binding constants for the Phe174-Ala mutant form of GlcN6P deaminase and for wild-type enzyme.

	K_m^a (mM)	k_{cat}^a (s^{-1})	K_d GlcN-ol-6P ^{a, b} (μ M)	K_d GlcNAc6P (μ M)
Phe174-Ala	3.43 ± 0.04	163 ± 7	11.0 ± 1.7	139 ± 18^c
Wild-type	0.55 ± 0.03	160 ± 8	3.7 ± 0.5	35 ± 5^b

^a Data obtained in the presence of a saturating concentration of GlcNAc6P; ^b from direct binding experiments; ^c Calculated from the change of k_{cat} with GlcNAc6P concentration.



Figure 1. The active-site of GlcN6P deaminase in the T state. The active-site lid appears at the top of the image and the side chains of Phe174 and Arg172 are shown. The former is the residue which replacement by alanine disturbs the stability of the lid. Arg172 is involved in binding the $-OPO_3^{2-}$ group of the substrate in the R state of the enzyme. Some important residues of the active site are indicated. This figure was generated using the program RIBBONS¹⁸.

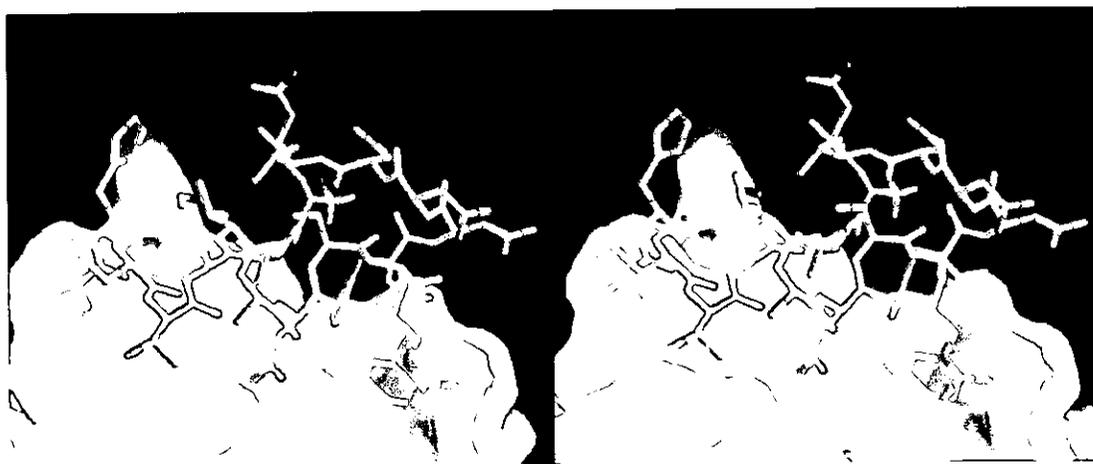


Figure 2. Stereo view of the active site lid (in rods) of the T conformer of wild-type GlcN6P deaminase (PDB entry 1FSF). The main chain atoms are shown in green. All side chain atoms appear in atom-type colour colours except those from Phe174, which are coloured in magenta. The remainder

of the structure appears as a surface representation coloured according to the net charge. This figure was prepared using the program GRASP¹⁹.

Figure 3. Stereo view of the $2f_0-f_c$ density-map contoured at 1.0σ level of the crystal structure of the Phe174-Ala GlcN6P deaminase. The active site lid corresponding to the structure of the wild-type enzyme (PDB 1FSF) and was drawn using thin red lines. There is no electronic density for this segment in Phe174-Ala deaminase. Figure created using the program O²⁰.

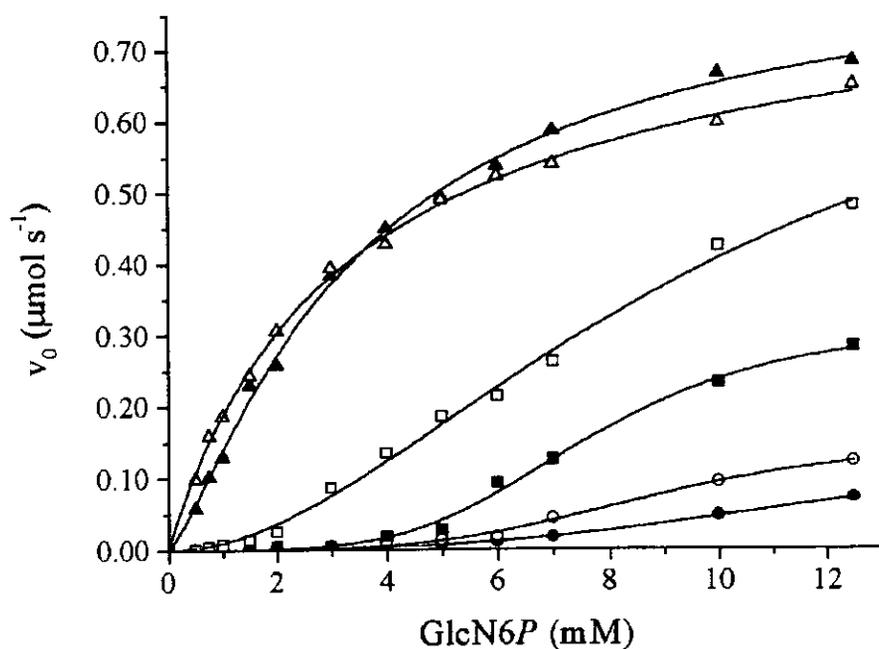


Figure 4. Curves of initial velocity against substrate concentration, obtained at different GlcNAc6P concentrations. Data were fitted to the Hill equation. GlcNAc6P concentrations were, 0 (\square), 0.05 mM (\circ), 0.10 mM (\square), 0.20 mM (\square), 0.50 mM (\square) and 0.75 mM (ρ).

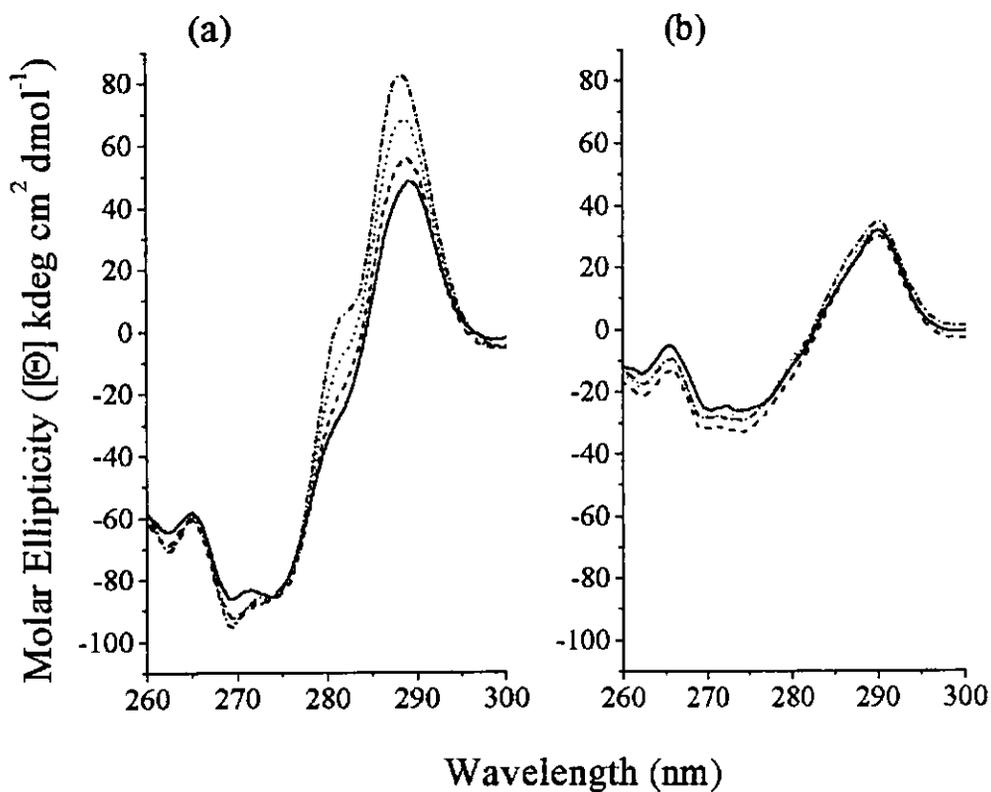


Figure 6. Near UV CD spectra of wild-type (a) and Phe174-Ala mutant GlcN6P deaminase (b) obtained at different concentrations of the active-site ligand, GlcN-ol-6P. The concentrations of this inhibitor were, 0 (\square), 33.0 μM (---), 76.0 μM (···), and 190 μM , ($\square \cdot \square$).

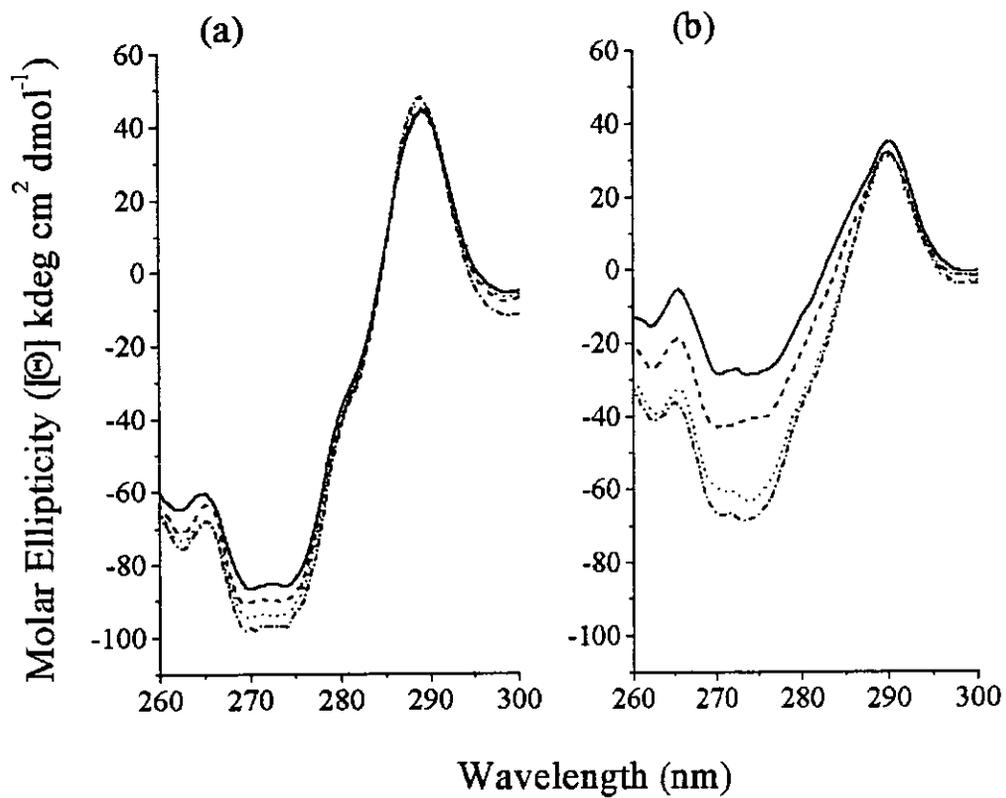


Figure 7. Near UV CD spectra of wild-type (a) and Phe174-Ala mutant GlcN6P deaminase (b) obtained at different concentrations of the allosteric activator, GlcNAc6P. 0.00 (□), 0.10 mM (- - -), 0.67 mM (· · ·), and 2.00 mM (□ · □).