



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas,
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

**El activador alostérico de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* se
une y es modificado en el sitio catalítico.**

TESIS

Que para obtener el título de:
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A

Sergio Zonszein Strauss

Director de tesis:
Dr. Mario L. Calcagno

Ciudad Universitaria,
México D.F.

2008



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.

A

Rosalinda Strauss Seidler

(1953-2006)

Agradecimientos

Dr. Lenin Domínguez quien hizo posible este trabajo gracias a su importante aportación en el uso de las herramientas bioinformáticas, así como a las fructíferas discusiones que lograron cambiar la forma en que observamos a la enzima.

Dr. Mario L. Calcagno quien me ha dado todo su apoyo, amistad, conocimiento y paciencia.

Dr. Ismael Bustos Jaimes por las importantes discusiones y agradables platicas.

Laura I. Álvarez Añorve por su apoyo en la elaboración de reactivos y la purificación de enzimas.

A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, gracias por soportar mis desastres y por los buenos momentos que he vivido.

Elias y Stephanie Zonszein.

Mi Oma por todas las bufandas y comida deliciosa.

Olga quien me ha acompañado por etapas difíciles en mi vida.

A mis compañeros y amigos de la carrera Sofía Ibararán y Bernardo Ochoa.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios Lola y Memo.

A todos mis amigos quienes siempre me apoyan y molestan cuando deben.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	9
Métodos	9
Plásmidos y mutagénesis	9
Expresión y Purificación	10
Cinética enzimática	11
Determinación de las constantes de disociación del activador	11
Cinética de la abertura del anillo piranósico de análogos del sustrato seguida por la formación de hidrazina	12
Mutación <i>in numero</i> y minimización de energía	13
<i>Docking</i>	14
Dinámica Molecular	14
Resultados y Discusión	16
Caracterización cinética de la mutante Tyr121Trp de la GlcN6P Desaminasa de <i>E. coli</i> :	16
La <i>N</i> -acetilglucosamina 6-fosfato como activador alostérico:	16
Cinética de la catálisis de la reacción en sentido desaminante	16
Unión del activador alostérico	19
La <i>N</i> -acetilglucosamina 6-fosfato como sustrato:	21
Cinética del paso de la abertura del anillo piranósico utilizando la GlcNAc6P como análogo del sustrato	21
Cálculo de propiedades estructurales, cinéticas y dinámicas de la GlcN6P Desaminasa de <i>E. coli</i> y las formas mutantes:	22
Minimización de energía y alineamiento de estructuras	22
<i>Docking</i> (Autodock y Xscore)	25
Dinámica Molecular (Grommacs)	28
El modelo de dos estados de Monod Wyman Changeux puede explicar la unión bifásica del activador alostérico:	39
Análisis de las caracterizaciones <i>in vitro</i> e <i>in numero</i>	39
Un modelo posible para explicar la unión bifásica de la GlcNAc6P a la mutante Tyr121Trp	41
El activador alostérico tiene dos sitios de unión distintos en la desaminasa	43
La mutante Tyr121Trp: Repercusión sobre las constantes cinéticas y las propiedades estructurales y dinámicas de la enzima	43
Conclusiones	47
Perspectivas	48
Referencias	49

Resumen

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* es un hexámero alostérico de 6 subunidades idénticas que participa en el catabolismo de los aminoazúcares y es activada por la *N*-acetilglucosamina 6-Fosfato. La cinética alostérica de la enzima se describe perfectamente con el modelo de Monod-Wyman-Changeux. En 1995, Altamirano y col. describieron un comportamiento anómalo en la unión del activador alostérico a la mutante Tyr121Trp, que muestra un comportamiento bifásico y que fue interpretada como la asimetría de la transición alostérica causada por la mutación. En esta tesis se presenta una explicación alternativa de este hecho, fundamentada en evidencias cinéticas y estructurales y que son la base de un modelo más plausible y realista. Mostramos una nueva visión de este hecho, basados en la teoría de la unión “promiscua” del sustrato al sitio alostérico y del activador al sitio catalítico. En este último caso, se ha descubierto que el activador es además sustrato del primer paso del mecanismo catalítico: la abertura del anillo piranósico del activador. Esto se ha demostrado con un nuevo método de ensayo específico para la fase de abertura del ciclo, el cual se ha validado con los controles necesarios. Este método ha llevado a descubrir que, en menor grado, la enzima silvestre también puede catalizar la abertura del activador. La teoría de la unión “promiscua” fue también puesta a prueba con técnicas de bioinformática estructural, que incluyen simulaciones de unión con el programa Autodock y simulaciones de dinámica molecular con el programa GROMACS. Tanto los resultados obtenidos de las simulaciones de unión como los de los experimentos *in vitro* concuerdan en demostrar la unión del ligante alostérico al sitio activo, y dan valores de constantes de disociación para el activador similares entre sí.

Introducción

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* (GlcN6P desaminasa EC 3.5.99.6 antes EC 3.5.1.10) es una enzima alostérica que participa en el catabolismo de aminoazúcares; éstos tienen un importante papel estructural ya que son componentes de la pared celular de las bacterias y también son fuente de carbono y nitrógeno. Las enzimas del catabolismo de los aminoazúcares están codificadas en *E. coli* por los genes de los operones divergentes *nagE-BACD* (Figura 1); el gen de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa es el *nagB*. La desaminasa es la única enzima de su ruta metabólica regulada alostéricamente, ya que es activada por la *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). El operón *nag* contiene a su propio represor codificado por el gen *nagC*, la proteína NagC es un represor miembro de la familia de proteínas ROK (represor, ORF, kinase)[1]. NagC es un factor transcripcional involucrado en la utilización de las azúcares del sistema de fosfotransferasas (PTS) en *E. coli*. El represor NagC es inhibido alostéricamente por la GlcNAc6P, facilitando la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis y catabolismo de aminoazúcares en *E. coli*. NagC controla a los tres grupos de genes del regulón *nag*, el operón *nagE-BACD*, el operón *glmUS* y el operón *manXYZ*, todos los genes codificados en estos operones están involucrados en el metabolismo de las aminoazúcares.

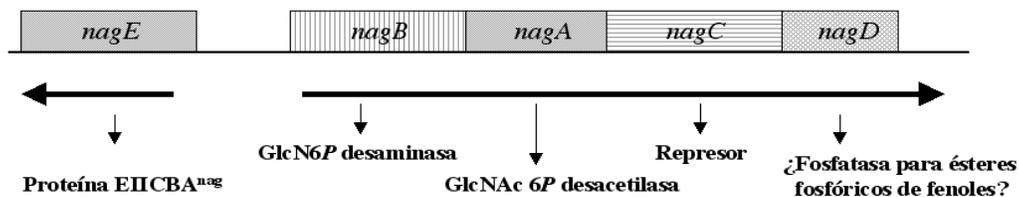


Figura 1. Organización de los genes agrupados en el operón divergente *nag* [2]

La Glucosamina-6-fosfato desaminasa cataliza la reacción reversible de desaminación e isomerización de la glucosamina-6-fosfato en glucosa-6-fosfato e ion amonio (Figura 2).

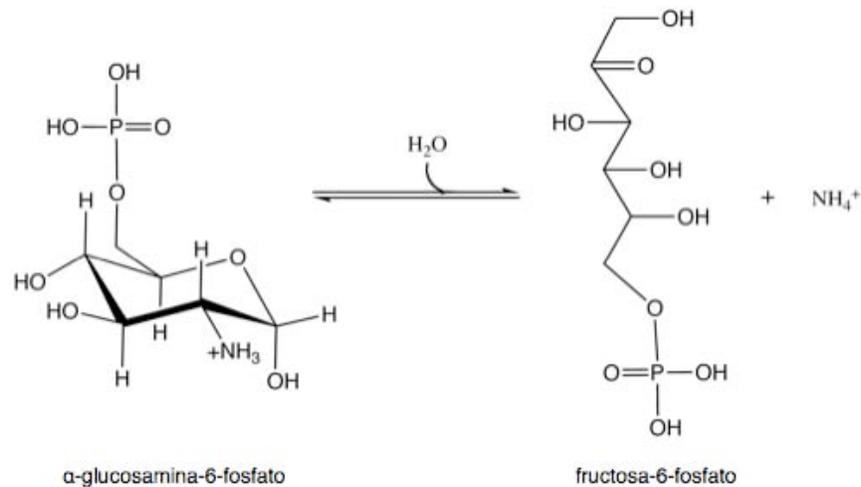


Figura 2. Reacción catalizada por la GlcN6P desaminasa.

La unidad biológica y funcional de la enzima es un hexámero compuesto por subunidades idénticas de 266 aminoácidos con un peso de 29.7 kDa cada una; el arreglo estructural de la GlcN6P desaminasa es el de un dímero de trímeros con ejes cristalográficos de orden 3 y 2, y una simetría interna de tipo 32 [3] (Figura 3). La desaminasa tiene 6 sitios alostéricos ubicados en las interfases entre los monómeros contiguos en cada trímero.

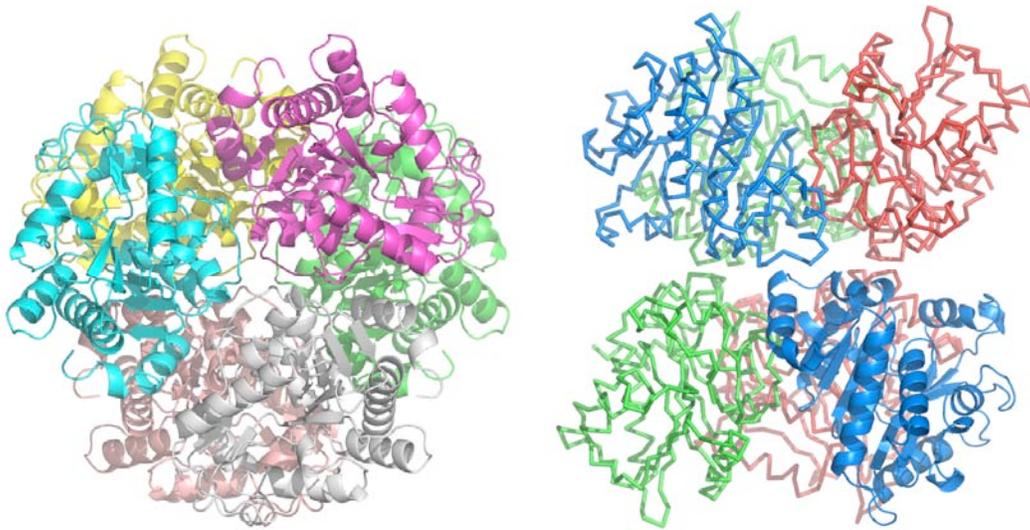


Figura 3. Modelo cristalográfico de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Hexámero a la a) visto desde su eje de orden 3, b) visto desde su eje de orden 2 con cada dímero en distinto color.

Su cinética alostérica se puede describir mediante el modelo de dos estados de Monod-Wyman-Changeux (MWC) [4]. El modelo propone dos estados conformacionales en equilibrio, uno de baja afinidad por sus ligantes llamado estado T y otro de alta afinidad llamado R. El efecto del activador alostérico es el de aumentar la afinidad por el sustrato, modificando su K_m aparente, sin cambio en la k_{cat} : Esto se describe como comportamiento de tipo K . El efecto K es recíproco, el activador modifica la afinidad de la enzima por su sustrato, y éste a la vez modifica su afinidad por el activador [4].

La desaminasa es una enzima alostérica que describe una cinética cooperativa de tipo sigmoide en ausencia del activador alostérico y presenta una activación de tipo K puro por la unión de la GlcNAc6P al sitio alostérico; en condiciones saturantes de activador, se obtiene una cinética hiperbólica del tipo de Michaelis-Menten.

En 1995 Altamirano M. y col. [5] describieron un comportamiento alostérico atípico en la mutante Tyr121Trp de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. En este artículo revelan que la

unión del activador alostérico, determinada mediante experimentos de diálisis en equilibrio, sucede en dos fases (Figura 4). Cinéticamente, muestran que la activación ocurre en dos etapas con afinidades distintas para la GlcNAc6P y concluyen que la transición se desencadena en dos pasos termodinámicamente distanciados. Aunque los datos experimentales de la unión del activador describen el mismo fenómeno y son comparables con los datos obtenidos recientemente en esta tesis, el análisis y ajuste de los datos no es consistente con el conocimiento actual sobre esta enzima. En la citada publicación de 1995 se estimó que el máximo de ocupación de sitios calculables estaba limitado a 6, basándose en la suposición que el ligante se unía exclusivamente al sitio alostérico en la forma R. Los autores de este artículo interpretaron erróneamente las curvas bifásicas de unión del activador, ya que en los resultados actuales de los experimentos de unión se revela la unión a muchos más de seis sitios.

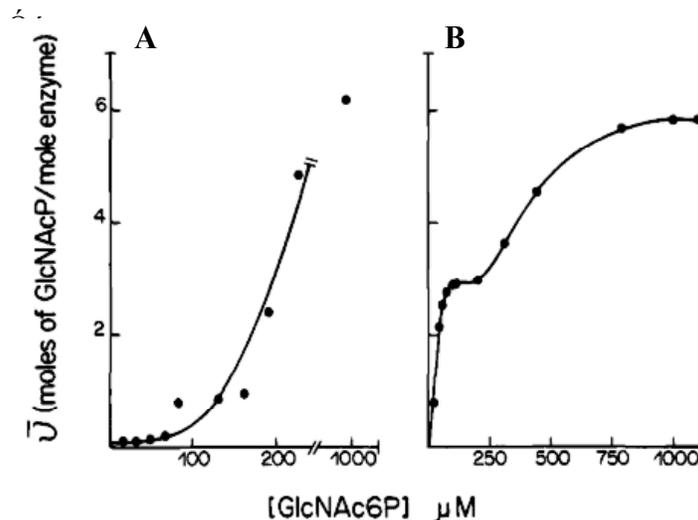


Figura 4. Unión de GlcNAc6P a la GlcN6P desaminasa determinada por diálisis en equilibrio. Datos de Altamirano y col. [5] A) Enzima silvestre. B) Enzima mutante Tyr121Trp. Los datos están expresados como fracción de ocupación (fracción de saturación × número de sitios)

Los autores discuten los resultados partiendo del planteamiento de que esta cinética no puede ser explicada con el modelo de dos estados como el de MWC. Sin embargo, esta propuesta resulta poco plausible, ya que no es razonable plantear que una mutación puntual, que no afecta directamente al sitio alostérico, pueda generar un cambio cualitativo tan grande en el mecanismo alostérico de una proteína.

En este trabajo nos hemos propuesto hacer un análisis más profundo sobre el efecto de la mutación Tyr121Trp en esta enzima, así como del comportamiento de la enzima silvestre al reevaluar el marco teórico de la unión del activador alostérico exclusivamente a sus 6 sitios. Mediante la reinterpretación de los datos con la información obtenida de experimentos de unión de ligantes marcados, estudios cinéticos y simulaciones de *docking*, proponemos una explicación más plausible del efecto bifásico de la unión de la GlcNAc6P, la cual además es compatible con el modelo de MWC.

En las formas T y R de la enzima la Tyr121 se encuentra en la hélice 4; su cadena lateral apunta hacia el interior de la molécula haciendo contacto con la cadena principal. Específicamente está formando un contacto polar con el grupo carbonilo de la cadena principal en la posición de la Asn70; ésta se encuentra en una pequeña región sin estructura secundaria que conecta dos cadenas β . Al inicio de la segunda cadena β se encuentra el Asp72, el cual participa en el segundo paso del ciclo catalítico catalizando la enolización del sustrato por la sustracción de su protón en C2(S). Además esta cadena β se encuentra muy cercana al motivo que forma la tapa del sitio activo (158-187), un segmento que trataré más adelante como la región 70-90, la cual incluye una hoja β antiparalela a las hojas β que forman el dominio de la tapa, probablemente formando parte de su estructura (Figura 5). La región 70-90 incluye un giro, el cual muestra un

cambio coordinado junto con la tapa al comparar las estructuras de T y R. Tomando en cuenta lo anterior, podemos plantear que la estabilidad y la geometría del sitio activo y la catálisis mediada por la cadena lateral del Asp72 dependen de la formación de un puente de hidrógeno entre Tyr121 y Asn70, así como predecir que la región 70-90 se mueve consistentemente con la tapa modificando la forma del sitio activo.

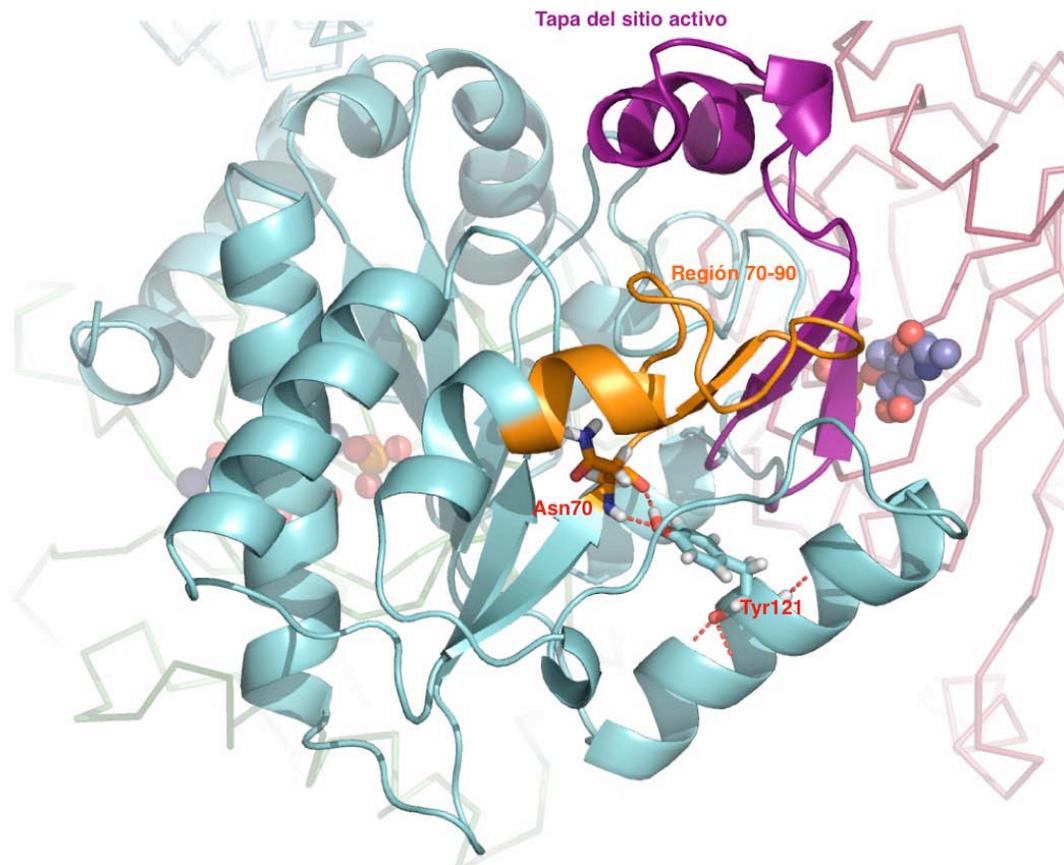


Figura 5. Representación de la enzima silvestre en el estado R. En esferas esta representado el activador alostérico GlcNAc6P, en color púrpura se puede observar el dominio de la tapa del sitio activo y en anaranjado la región 70-90, en palitos la Tyr121 con sus contactos polares con la cadena principal de la Asn70.

Anteriormente se había sugerido que pudiese existir una unión del sustrato GlcN6P no sólo al sitio activo sino también al sitio alostérico. Es así que Bustos-Jaimes y col. en el

2002 [6] con el análisis de la cinética en ausencia de activador en la mutante Phe174-Ala de la desaminasa de *E. coli*, propusieron que ocurre la activación heterotrópica a altas concentraciones de sustrato. Esto implica que el sustrato a altas concentraciones, se une con baja afinidad al sitio alostérico.

En cuanto a la unión del sustrato de la reacción inversa, la fructosa-6-fosfato (Fru6P), hay evidencias de su afinidad por el sitio alostérico. G. Mulliert (datos sin publicar) midió la unión de la Fru6P mediante el método de Hummel y Dryer, que consiste en pasar a la proteína a través de una columna de filtración molecular equilibrada con Fru6P, lo que permite medir la diferencia en la concentración de sustrato que une la enzima. Sus datos permiten calcular una estequiometría de 11.8 ± 0.3 sitios ocupados por molécula. Consistentemente con este dato, Rudiño y col. encontraron en 2000 que la Fru6P se une tanto al sitio activo como al sitio alostérico en el modelo cristalográfico de enzima co-cristalizada con Fru6P a una concentración saturante (27 mM).

Con estas evidencias podemos proponer la hipótesis de la unión de la GlcNAc6P al sitio activo, explicando de una manera parsimoniosa y apegada al modelo de Monod, la curva bifásica de unión del activador observada por Altamirano y col. [5]. Este trabajo también nos ha permitido proponer una nueva visión acerca del comportamiento de la enzima y la interacción con sus ligantes.

Objetivos

Proponer un modelo plausible del fenómeno bifásico de la unión de GlcNAc6P en la mutante Tyr121Trp observado por Altamirano y col. en 1995, así como revisar la capacidad discriminadora del sitio activo entre la GlcN6P y la GlcNAc6P.

Métodos

Plásmidos y mutagénesis

Se empleó el *kit* Quick Change (Stratagene, La Jolla, CA. E.U.A.), partiendo del vector pTZ18R con un inserto de ADN conteniendo una copia del gen *nagB*. Con este plásmido se realizó una mutagénesis sitio-específica por PCR empleando oligonucleótidos sintéticos de acuerdo al método de Kunkel descrito por Sambrook y col. [7]. Los oligonucleótidos usados para cambiar el codón de Tyr 121 por uno correspondiente a Trp (TAC-TGG) fueron:

F121W 5'-CCA GTG GGA AGA AAA AAT CCG TTC TTA CGG- 3'

T_m 62 °C, $\Delta G^\circ_{FH} = - 8.0$ (kcal mol⁻¹)

R121W 5'- CTT CCC ACT GGC GGC ACT CGG -3'

T_m 62 °C, $\Delta G^\circ_{FH} = - 8.3$ (kcal mol⁻¹)

El valor de ΔG°_{FH} corresponde a la energía libre de formación de heterodúplex [8] en el extremo 3'OH del oligonucleótido, con lo que garantizamos la generación del producto de PCR.

La reacción de PCR para la mutagénesis se llevó a cabo utilizando a la polimerasa *Pfu* y desoxinucleotidos trifosfato. El programa de termociclado usado fue el siguiente:

Paso	Temp(°C) / tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 / 2 min	1
Desnaturalización	94 / 1 min	30
Hibridación	57 / 1 min	
Polimerización	68 / 10 min	
Extensión final	68 / 15 min	1

Para la digestión del plásmido pTZ18*RnagB*, que fue usado como punto de inicio para la mutagénesis, se utilizó la enzima *DpnI*, que hidroliza a el ADN metilado. El producto de la PCR se usó para transformar células competentes de *E. coli* Epicurian XL-blue, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se sembraron las células transformadas, seleccionando aquéllas capaces de crecer en el medio de cultivo adicionado con 50 µg mL⁻¹ de ampicilina. Se purificó el plásmido de las colonias seleccionadas y se secuenció para corroborar la presencia de la mutación. A este plásmido se le denominó en lo sucesivo pTZ18*RnagB*121W.

Expresión y Purificación

La enzima mutante Y121W fue extraída de las células de *E. coli* 590, transformadas con el plásmido conteniendo la mutación. Se rompieron las células por sonicación en un amortiguador de Tris 50 mM, pH 8, EDTA 10 mM a 4 °C con 20 pulsos de 30 s con una amplitud de 40% y 1 minuto de reposo entre los pulsos. La enzima se purificó siguiendo el método de Calcagno y col. [9]. El extracto se trató con sulfato de amonio al 40% de

saturación y el sobrenadante de la precipitación se llevó a 55% de saturación, lo que produjo un precipitado que contenía a nuestra enzima. El precipitado de la fracción de 40-55% de saturación se resuspendió en Tris-HCl 100 mM pH 7.8, y se dializó toda la noche. La enzima se purificó mediante una columna con matriz de afinidad, que tiene inmovilizado un análogo del activador, la *N-ε aminohecanoil-glucosamina 6-P*, sobre una matriz de agarosa.

La concentración de la enzima pura se determinó mediante el método de BCA, utilizando como patrón a la desaminasa silvestre. Con base en este dato, calculamos la absortividad molar para esta mutante, al máximo de absorción de la enzima a 278 nm.

Cinética enzimática

La cinética de la enzima se estudió en el sentido desaminante, midiendo la concentración de fructosa 6-*P* formada a tiempo fijo, como se describió por Calcagno y col. (1984). Los experimentos se llevaron a cabo en Tris-HCl 50 mM, pH 7.7. El ajuste de los datos se hizo por regresión no lineal con ecuaciones derivadas del modelo de Monod, utilizando el programa GraphPad Prism 4.0c para Macintosh.

Determinación de las constantes de disociación del activador

La K_{dis} para la GlcNAc6P se calculó utilizando medidas de unión con ^3H -GlcNAc6P. El procedimiento fue esencialmente el descrito por Howlett y col. (1978) [10] adaptado por Montero-Morán y col. [11] La ^3H -GlcNAc6P se sintetizó utilizando anhídrido acético tritiado y GlcN6P, de acuerdo a un método ya descrito [11]. Las muestras de 200 μl con la enzima y el ligante fueron centrifugadas por 5 horas a 30 °C y 195,000 g utilizando una ultracentrifuga Beckman optima XL-100K con el rotor 42.2 Ti. Las muestras contienen dextrano 2.5 mg mL⁻¹ para reducir el mezclado de la proteína sedimentada. Todos los

experimentos se hicieron en presencia de Tris 100 mM, pH 7.7, como amortiguador. Se tomaron muestras de 50 μ l las cuales se mezclaron en 1.5 mL de líquido de centelleo y se midió su radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS6500. La concentración final de enzima utilizada fue de 3 μ M, Los datos obtenidos en saturación de inhibidor competitivo se midieron con 500 μ M de GlcN-ol-6P.

Cinética de la abertura del anillo piranósico de análogos del sustrato seguida por la formación de hidrazona.

Esta metodología está basada en la medición de la aparición de la hidrazona de la GlcNAc6P, que se forma cuando la enzima abre al anillo piranósico de la GlcNAc6P y queda el grupo carbonilo libre para reaccionar con la hidracina (Figura 6).

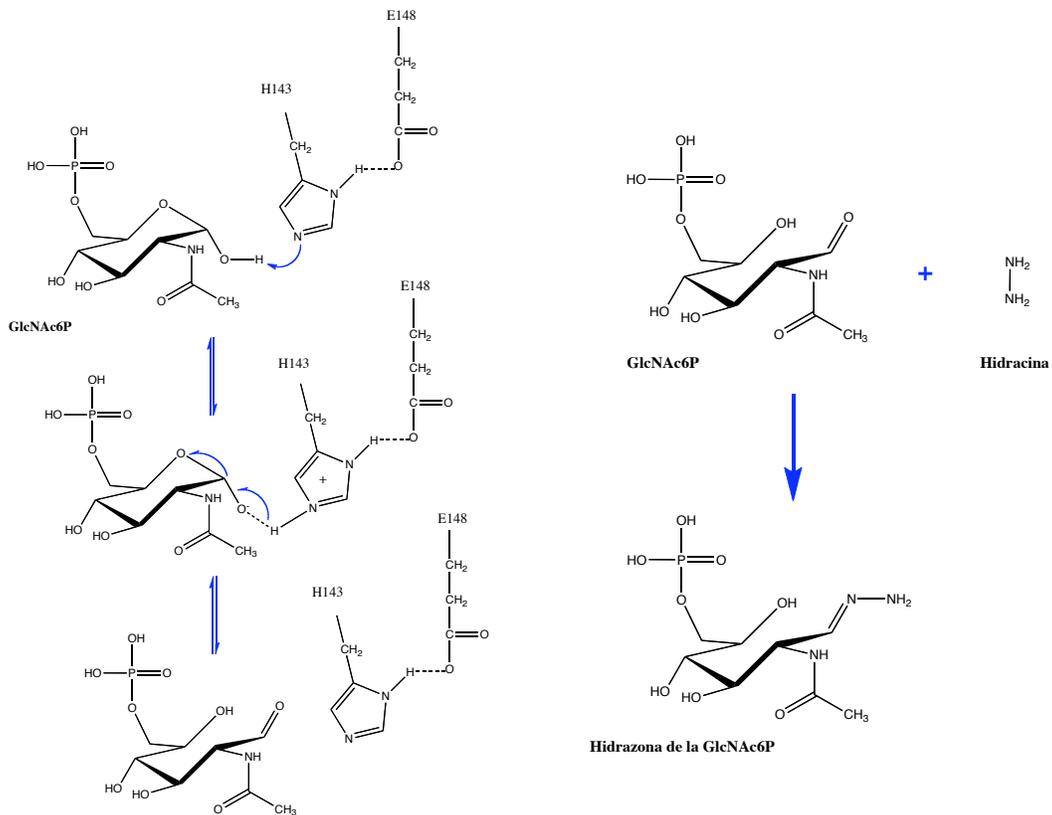


Figura 6. Reacción de abertura del anillo piranósico de la GlcNAc6P, seguida por la reacción de la GlcNAc6P con hidracina.

La reacción se lleva a cabo en presencia de un exceso de hidracina (0.3M), en Tris-HCl 100mM pH 7.8 y EDTA 15 mM. Se hicieron medidas a distintas concentraciones de activador. Es necesario emplear un instrumento de doble haz que permite usar una celda como blanco para sustraer la reacción espontánea. La reacción se puede seguir en forma continua. El máximo de absorción era determinado para cada concentración de GlcNAc6P debido a que existe un corrimiento de 178 nm a 184 nm dependiente de la concentración de GlcNAc6P.

Para medir la reacción se prepara la celda agregando el agua, Tris-HCl y la GlcNAc6P. Posteriormente se agrega la hidracina simultáneamente en las 2 celdas y se registra la línea base en el espectrofotómetro. La reacción se inicia agregando la enzima y se comienza a registrar el espectro, haciendo barridos cada tres minutos entre 200 y 300 nm en el espectrofotómetro Cary 400.

Calculamos las velocidades iniciales a distintas concentraciones de ligante y ajustamos los datos con regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el programa GraphPad Prism 4.0c para Macintosh.

Mutación in numero y minimización de energía

Para poder obtener una posible estructura de la enzima mutante, se utilizó el programa Swiss-PDBViewer [12] para generar la mutación y a continuación se hizo una minimización de energía de 100 pasos con el programa UCSF Chimera [13]. Para comprobar la calidad de las minimizaciones, las estructuras se mandaron a analizar con MolProbity[14], un recurso en línea accesible en <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

Docking

En el *docking* se evalúan tanto el espacio conformacional del ligante como la energética de la interacción proteína-ligante. La interacción entre el ligante y la enzima se simula mediante un campo de fuerza. Este campo está basado en una malla finita, que evalúa a la proteína y al ligante en términos de la interacción entre pares de átomos. Esta metodología se ha utilizado exitosamente para el desarrollo de fármacos [15-17].

Para poder hacer los experimentos de unión de la GlcNAc6P y GlcN6P *in numero*, se utilizó el programa Autodock 3 [18], en el cual las estructuras ya minimizadas de la enzima silvestre y de la mutante en sus formas T y R se sometieron a un *docking* de 500 pruebas. Se utilizó el modelo llamado lamarckiano, aumentando el número de poblaciones a 1500 y las evaluaciones de energía a 2 500 000, limitando el espacio de la malla a una subunidad y sus contactos interfaciales en la subunidad contigua que forman al sitio alostérico.

Posteriormente los resultados del *docking* se procesaron con el programa XSCORE [19] para estimar las correspondientes constantes de disociación.

Dinámica Molecular

La dinámica molecular nos permite simular el movimiento de una estructura cristalográfica en solución.

Los experimentos de dinámica molecular se llevaron a cabo con el programa GROMACS [20] corriendo en el *cluster* de super cómputo Kan Balam de la DGSCA, UNAM. Las estructuras minimizadas y sin ligantes fueron puestas en libertad a 25 °C y durante un periodo de tiempo prefijado en 10 ns.

Para poder utilizar los datos de RMSD y RMSF que arroja la paquetería GROMACS, hicimos un promedio de las subunidades, debido a que éstas presentan variaciones sutiles.

Un análisis fundamental es el análisis del área y del volumen de los sitios activos para cada una de las estructuras, esto se realizo utilizando al programa *Pockets* [21], el cual es capaz de encontrar y medir las cavidades en la estructura tridimensional.

Otro análisis llevado a cabo sobre las estructuras obtenidas en las dinámicas moleculares, fue un postprocesamiento que calcula el ángulo diedro formado entre cuatro carbonos alfa y compara esos ángulos entre dos estructuras. El programa utilizado es una aplicación que corre en línea de comandos [22].

Resultados y Discusión

Caracterización cinética de la mutante Tyr121Trp de la GlcN6P Desaminasa de *E. coli*.

La *N*-acetilglucosamina 6-fosfato como activador alostérico

Cinética de la catálisis de la reacción en sentido desaminante

La caracterización cinética en el sentido desaminante de la reacción es primordial para conocer cómo afecta la mutación a la enzima. La comparación entre este y otros métodos experimentales nos permite conocer mejor el funcionamiento normal de la enzima silvestre. La mutante Y121W muestra un comportamiento alostérico de tipo mixto; esencialmente es una activación predominantemente de tipo *K* con un componente de activación *V* (Tabla 1, Figura 7).

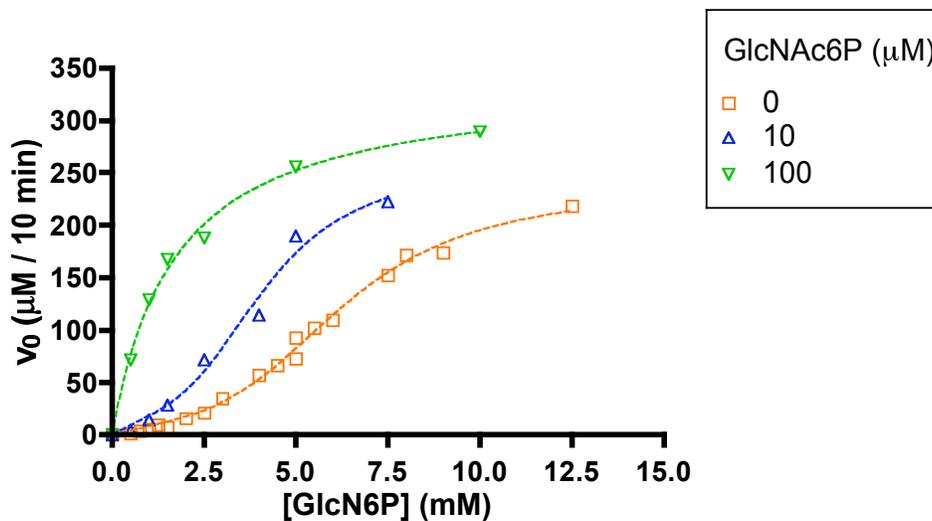


Figura 7. Cinética de la desaminasa mutante Tyr121Trp a tiempo fijo. Datos ajustados a la ecuación del modelo de Monod.

Tabla 1.**Constantes cinéticas de la desaminasa silvestre y de la mutante Tyr121Trp**

Enzima	K_m^R (mM)	k_{cat} (s)	h	K_m^T (mM)	L ($\times 10^{-3}$)	C	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
Silvestre	0.55 ± 0.05	158 ± 8	2.9 ± 0.1	22 ± 2	1000 ± 19	0.025 ± 0.0002	287.2 ± 29.8
Tyr121Trp	1.26 ± 0.08	86 ± 2	2.1 ± 0.1	28 ± 2	14 ± 1	0.045 ± 0.006	68.2 ± 4.6

Ecuación 1. Ecuación del modelo de MWC para fijación no exclusiva

$$\bar{y} = \frac{L'c\alpha(1+c\alpha)^{n-1} + \alpha(1+\alpha)^{n-1}}{L'(1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n}$$

Comparando las constantes cinéticas de la enzima silvestre con las de la mutante, calculadas mediante el ajuste de los datos por regresión no lineal a ecuaciones derivadas del modelo de Monod (ecuación 1), podemos observar que la k_{cat} para la forma R está poco afectada con una constante de la mitad del valor de la enzima silvestre, mientras que la K_m de la mutante es el doble; esto nos indica que la eficiencia catalítica de la forma R está disminuida 4 veces. Las constantes L y c obtenidas del ajuste a la ecuación de Monod nos permiten observar que el conformero R de la enzima mutante es más abundante que la forma T, ya que L cambia de 10^6 a 1.4×10^4 y la afinidad diferencial por el sustrato medida con el parámetro c es del doble; los datos indican que el sustrato pierde afinidad por la enzima en su forma R.

Una propiedad interesante que esperábamos observar en la cinética, es que la enzima presenta inhibición competitiva por el activador a altas concentraciones. Sin embargo, observamos un comportamiento complejo: en el sentido desaminante tenemos a la GlcNAc6P como un activador que se une al sitio alostérico pero que también actúa como inhibidor, tal vez interactuando en el sitio activo. La inhibición que observamos es muy modesta y aparentemente de tipo incompetitivo, lo cual parece contradecir la propuesta de la unión promiscua del activador al sitio activo (Figura 8, Tabla 2)

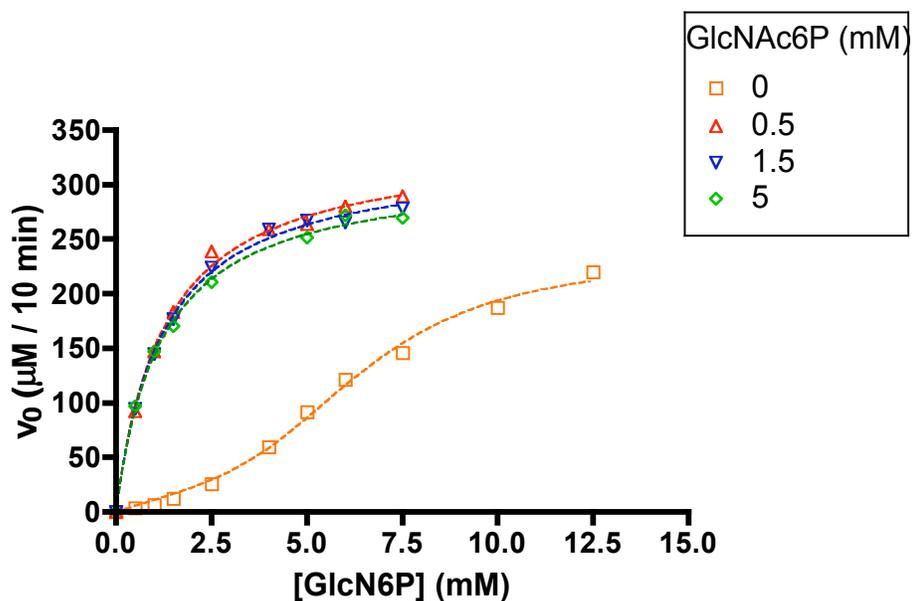


Figura 8. Cinética de la desaminasa mutante Tyr121Trp a altas concentraciones de activador. Datos ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten y de MWC.

Tabla 2. Constantes cinéticas de la desaminasa mutante Tyr121Trp a altas concentraciones de activador, obtenidas del ajuste por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten y a la ecuación de Hill.

[GlcNAc6P] (mM)	K_m (mM) ¹	V ($\mu\text{M} / 10 \text{ min}$)	V/K_m	h
0.5	1.26 ± 0.08	339.1 ± 6.7	269.1 ± 17.8	1.16 ± 0.10
1.5	1.23 ± 0.07	328.1 ± 5.6	266.7 ± 15.8	1.10 ± 0.09
5	1.19 ± 0.07	315.5 ± 5.7	265.1 ± 16.3	0.87 ± 0.10

Con los datos hasta ahora obtenidos es imposible observar el efecto de inhibición predicho; además la inhibición es inesperadamente baja, posiblemente debido al incremento de la fuerza iónica en los experimentos con altas concentraciones de activador. También hay que considerar la superposición del efecto activador K con una inhibición competitiva clásica, lo que tendrá como consecuencia el ocultamiento de esta

última a la experimentación cinética. Es posible que las concentraciones de GlcNAc6P no hayan sido suficientemente elevadas como para poder caracterizar cinéticamente la inhibición, la que al ser muy baja resulta oscurecida por el error experimental.

Para lograr una caracterización adecuada del efecto de inhibición es necesario hacer un estudio cinético a concentración saturante de sustrato, explorando un rango amplio de concentraciones de activador.

Unión del activador alostérico

Uno de los objetivos principales de esta investigación es encontrar una interpretación del efecto bifásico de la unión directa del activador alostérico a la mutante Tyr121Trp que sea plausible y ajustada a nuestro conocimiento actual sobre esta enzima. Esta unión en la enzima mutante muestra un comportamiento en dos fases, a diferencia de las curvas sigmoides monofásicas que presenta la enzima silvestre. Otra de las grandes diferencias que se pueden observar es la saturación de la mutante con 18 moléculas de GlcNAc6P. Al saturar con el inhibidor competitivo GlcN-ol-6P, la mutante pierde el comportamiento bifásico y se obtiene una curva de unión que se satura alrededor de 12 sitios (Figura 9).

La gran similitud estructural entre el sustrato y el activador alostérico permite plantear la hipótesis de la unión del ligante alostérico al sitio activo. Esto nos lleva a plantear la existencia de una unión promiscua de la GlcNAc6P al sitio activo. Sin embargo, parecería lógico que la saturación máxima fuera en 12 sitios, por lo que faltaría explicar la unión inespecífica a los 6 sitios restantes. La saturación a más de 12 sitios en la enzima mutante Tyr121Trp, es un resultado relativamente difícil de explicar.

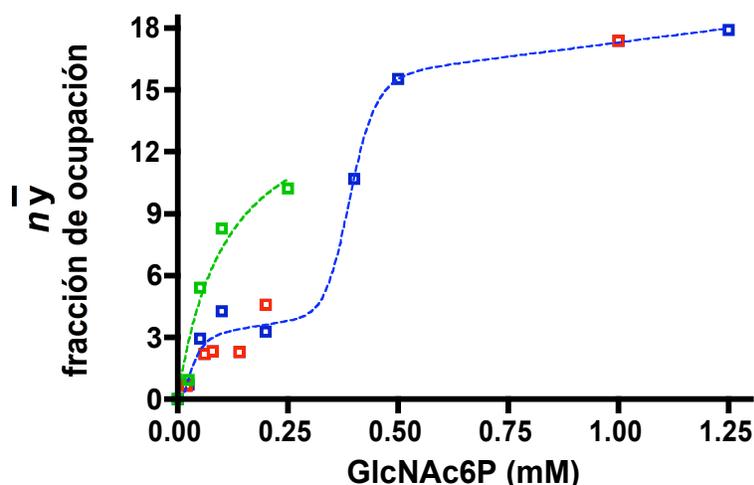


Figura 9. Unión de $^3\text{H-GlcNAc6P}$ a la desaminasa mutante Tyr121Trp, datos expresados como fracción de ocupación (fracción de saturación \times número de sitios). Azul datos obtenidos de experimentos de unión con $^3\text{H-GlcNAc6P}$. Rojo, datos obtenidos de experimentos de unión con $^{14}\text{C-GlcNAc6P}$. Verde, datos obtenidos de experimentos de unión con $^3\text{H-GlcNAc6P}$ en presencia de concentración saturante de GlcN-ol-6P.

Para analizarlo, podemos especular que ocurre una unión doble del activador a su sitio, mediante un apareamiento en forma de *stacking* (apilamiento) de los fosfo-aminoazúcares con los grupos fosfato orientados hacia lados opuestos. Una posible evidencia de este apareamiento de la GlcNAc6P en solución es el efecto dependiente de la concentración que conlleva un corrimiento espectral en el UV hacia el rojo [23]. Esta podría ser una posible explicación a la unión de la GlcNAc6P a 6 sitios adicionales, ya que la enzima tiene 6 sitios activos y 6 alostéricos, y con la unión doble de la GlcNAc6P por apilamiento en el sitio alostérico podemos explicar la saturación en 18 sitios. Esta hipótesis del apilamiento de la GlcNAc6P en el sitio alostérico tiene que estudiarse a fondo en el futuro, tanto con métodos de experimentación directa como por bioinformática estructural.

La *N*-acetilglucosamina 6-fosfato como sustrato

Cinética del paso de la abertura del anillo piranósico utilizando la GlcNAc6P como análogo del sustrato.

Hemos desarrollado un método novedoso, que además nos permite estudiar el primer paso catalítico de la enzima en la reacción de desaminación, la abertura del anillo piranósico del aminoazúcar, mediante la reacción con hidracina previamente descrita. Utilizamos esta técnica con la finalidad de medir la primera fase de la reacción con análogos del sustrato, los cuales reaccionan con hidracina formando la hidrazona del aminoazúcar abierto. En este caso utilizamos el activador GlcNAc6P como sustrato alternativo, con el objeto de verificar la hipótesis planteada: su unión al sitio activo y la posible catálisis sobre el ligante alostérico en el sitio catalítico (figura 10). Los parámetros cinéticos se calcularon por regresión no lineal utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (tabla 3).

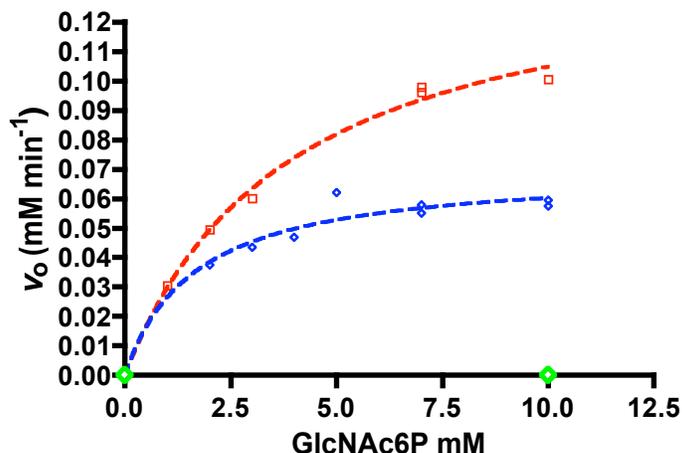


Figura 10. Cinética de la abertura del anillo piranósico de la GlcNAc6P seguido por la formación de la hidrazona. Rojo enzima silvestre, azul mutante Tyr121Trp y verde mutante His143Gln (incapaz de abrir el anillo piranósico).

Tabla 3. Constantes cinéticas obtenidas para el primer paso de la catálisis utilizando el activador como análogo del sustrato.

	Silvestre	Tyr121Trp
k_{cat} (s^{-1})	0.345 ± 0.019	0.164 ± 0.009
K_m (mM)	3.89 ± 0.53	1.63 ± 0.48
V ($mM \text{ min}^{-1}$)	0.145 ± 0.008	0.069 ± 0.004
k_{cat} / K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)	0.088 ± 0.013	0.100 ± 0.03
$\Delta\Delta G^\circ$ ($kJ \text{ mol}^{-1}$)	13.98 ± 0.69	16.17 ± 1.52

Podemos observar que la eficiencia catalítica de este paso no se encuentra afectada por la mutación; no obstante, la K_m calculada para la mutante es la mitad del valor obtenido en la enzima silvestre. Esto nos lleva a plantear que la curva bifásica obtenida en los experimentos de medida directa de la unión del GlcNAc6P, se da por una disminución en la constante de disociación del activador alostérico unido al sitio activo. Como un experimento comprobatorio de la actividad y unión en el sitio activo, utilizamos la mutante de la enzima His143Gln que es incapaz de abrir el anillo piranósico [24]. Esta mutante de la enzima muestra nula actividad de abertura de la GlcNAc6P, lo que confirma que el sitio alternativo de unión de la GlcNAc6P, es el sitio catalítico.

Cálculo de propiedades estructurales, cinéticas y dinámicas de la GlcN6P Desaminasa de E. coli y las formas mutantes

Minimización de energía y alineamiento de estructuras

La minimización de energía nos permite estandarizar las estructuras cristalográficas silvestres y mutantes llevándolas a su mínimo de energía, quitando los efectos del empacamiento y la variación de las conformaciones cristalográficas, lo que es un requisito para luego hacer experimentos de *docking* y de dinámica molecular. Una vez

realizada la minimización de energía con el programa UCSF Chimera, se comprobó la calidad de la minimización con el programa en línea MolProbity. Con la finalidad de verificar si la minimización de estructuras fue satisfactoria, se examinan y validan las estructuras buscando choques entre átomos (tabla 4).

Tabla 4. Resultados de MolProbity antes y después de la minimización de energía.

		1FRZ (estado R cristalográfico)		1FRZ minimizado	
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	17.51	40th percentile	5.82	91st percentile
	Rotamer outliers	7.71%	Goal: <1%	6.75%	Goal: <1%
Protein Geometry	Ramachandran outliers	0.00%	Goal: <0.2%	0.00%	Goal: <0.2%
	Ramachandran favores	96.28%	Goal: >98%	96.28%	Goal: >98%
	C β deviations >0.25Å	0	Goal: 0	0	Goal: 0
	MolProbity store	2.67	38th percentile	2.2	65th percentile
		1FRZ-Y121W		1FRZ-Y121W minimizado	
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	13.79	55th percentile	1.6	99th percentile
	Rotamer outliers	7.71%	Goal: <1%	6.68%	Goal: <1%
Protein Geometry	Ramachandran outliers	0.00%	Goal: <0.2%	0.00%	Goal: <0.2%
	Ramachandran favores	96.28%	Goal: >98%	96.21%	Goal: >98%
	C β deviations >0.25Å	0	Goal: 0	0	Goal: 0
	MolProbity store	2.57	43rd percentile	1.79	86th percentile
		1FSF (estado T cristalográfico)		1FSF minimizado	
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	16.26	44th percentile	0.16	99th percentile
	Rotamer outliers	11.89%	Goal: <1%	10.79%	Goal: <1%
Protein Geometry	Ramachandran outliers	0.38%	Goal: <0.2%	0.38%	Goal: <0.2%
	Ramachandran favores	96.59%	Goal: >98%	97.35%	Goal: >98%
	C β deviations >0.25Å	0	Goal: 0	12	Goal: 0
	MolProbity store	2.75	34th percentile	1.47	96th percentile
		1FSF-Y121W		1FSF-Y121W minimizado	
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	16.26	44th percentile	0.2	99th percentile
	Rotamer outliers	11.89%	Goal: <1%	10.43%	Goal: <1%
Protein Geometry	Ramachandran outliers	0.38%	Goal: <0.2%	0.38%	Goal: <0.2%
	Ramachandran favores	96.59%	Goal: >98%	97.35%	Goal: >98%
	C β deviations >0.25Å	0	Goal: 0	12	Goal: 0
	MolProbity store	2.75	34th percentile	1.48	96th percentile

De los experimentos de minimización de energía y alineando las estructuras minimizadas pudimos observar cambios en la orientación de las cadenas laterales de algunos aminoácidos, así como de la cadena principal, cuando comparamos *in numero* las estructuras de las proteínas silvestres y mutantes.

Un parámetro que podemos utilizar para comparar los alineamientos de las estructuras es el RMSD (*Root Mean Square Deviation*: desviación del valor cuadrático medio), que es una medida estadística de la magnitud de la diferencia de posición entre los carbonos alfa de los residuos de dos estructuras. El RMSD que calcula Pymol al hacer un alineamiento de los hexámeros minimizados en la forma T de las enzimas silvestre y la mutante Tyr121Trp es de 0.002 Å, mientras que para los alineamientos de la forma R el valor obtenido es de 0.392 Å, lo que podría indicar que la estructura de la forma R mutante diverge más de la estructura silvestre que la de la forma T. En la forma T de la enzima mutante no se observan cambios de orientación de las cadenas laterales, lo que nos lleva a pensar que la mutación afecta significativamente a la forma R mientras que no genera cambios a la forma T. En esta primera fase del análisis estructural pudimos observar que las cadenas principales tanto en la forma R como en la forma T no muestran diferencias entre sí, sin embargo la estructura de la forma R presenta cambios en la orientación de algunas cadenas laterales, entre las cuales se encuentran residuos del sitio catalítico como Asp72 y His143. Se pierde un puente de hidrógeno entre la Tyr121 y la cadena principal de la Asn70; este puente de hidrógeno posiblemente estabiliza en su posición al Asp72, que es un residuo catalítico esencial que cataliza el paso de la enolización de la GlcN6P mediante la sustracción del protón en C-2. [3]

Docking (Autodock y Xscore).

El *docking* permite predecir las posibles interacciones de un ligante con capacidad de torsión con la estructura rígida de una proteína; de esta forma, es posible encontrar sitios de unión para un ligante. Con los experimentos de *docking* se obtuvieron resultados que apoyan la hipótesis de la unión del activador alostérico a ambos sitios. Se realizaron experimentos para cada una de las formas de las estructuras silvestre y mutante previamente minimizadas, simulando la unión tanto del activador como del sustrato (Figura 11). Cualitativamente los experimentos del programa Autodock nos permitieron observar el pegado de la GlcNAc6P al sitio alostérico y al sitio activo, tanto para la enzima silvestre como para la mutante. Un postprocesamiento de los datos de *docking* con el programa XSCORE permitió calcular los valores de constantes de disociación (Tabla 5).

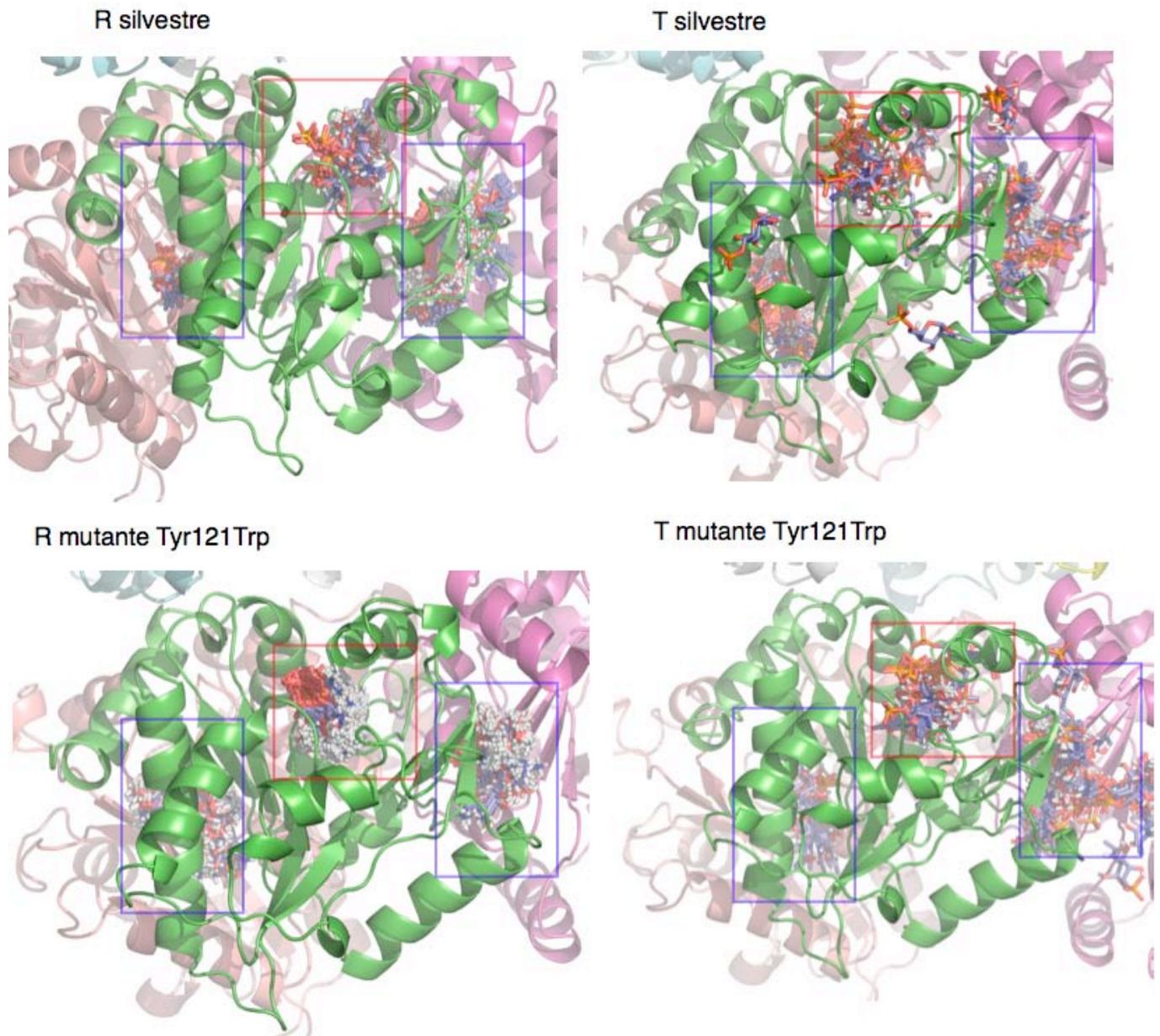


Figura 11. Resultados de la simulación con Autodock de la unión del activador alostérico a las formas R y T de la enzima silvestre y la mutante Tyr121Trp. Se puede observar en todas las formas de la enzima dentro del recuadro rojo las moléculas que se unieron al sitio activo; dentro de los recuadros azules se encuentran las moléculas que se unen a los dos sitios alostéricos que forma la subunidad en las interfases de las dos subunidades contiguas.

Tabla 5. Datos de las simulaciones de la unión del activador alostérico y del sustrato a la enzima silvestre y mutante en las conformaciones T y R, se muestran las K_d calculadas con XSCORE.

Silvestre	Activador GlcNAc6P		Sustrato GlcN6P	
	Sitio alostérico	Sitio Activo	Sitio alostérico	Sitio Activo
T IFSF	1-300	301-331	1-178	179-244
XSCORE	4.31-3.39	3.39-3.25	5.09-4.50	3.99-3.29
K_d (μM)	48.9-407.3	407.3-562.3	8.1-31.6	102.3-512.8
Promedio 10 mejores	4.124	3.358	5.066	3.894
Resultados	7.51623E-05	0.000438531	8.59014E-06	0.000127644
K_d (μM)	75.16	438	8.59	127
R IFRZ	1-451	452-500	461-500	1-460
XSCORE	5.34-4.57	3.75-3.24	3.35-3.29	5.42-4.91
K_d (μM)	4.5-26.9	177.8-575.4	446.6-512.86	3.8-12.3
Promedio 10 mejores	5.179	3.607	3.332	5.376
Resultados	6.62217E-06	0.000247172	0.000465586	4.20727E-06
K_d (μM)	6.622	247	465	4.207
Mutante Y121W	Activador GlcNAc6P		Sustrato GlcN6P	
	Sitio alostérico	Sitio Activo	Sitio alostérico	Sitio Activo
T IFSF	1-378	415-490	1-280	431-490
XSCORE	5.31-4.60	3.51-3.25	5.16-4.81	3.91-3.29
K_d (μM)	4.89-25.11	309-562	6.91-15.48	123-512
Promedio 10 mejores	5.208	3.462	5.099	3.854
Resultados	6.19441E-06	0.000345144	7.96159E-06	0.000139959
K_d (μM)	6.19	345	7.96	139
R IFRZ	1-372	373-381	1-091	92-444
XSCORE	5.30-4.65	3.38-3.24	5.03-4.58	3.51-3.36
K_d (μM)	5.01-22.38	416-575	9.33-26.30	309-436
Promedio 10 mejores	5.276	3.333333333	4.965	3.502
Resultados	5.29663E-06	0.000464159	1.08393E-05	0.000314775
K_d (μM)	5.29	464	10.83	314

Dinámica Molecular (Grommacs).

La dinámica molecular nos brinda un panorama en donde la estructura puede moverse libremente en un ambiente de agua en un lapso de tiempo determinado. Este procedimiento simula el movimiento de la proteína en solución, tomando en cuenta la estructura, las cargas, las fuerzas de *Van der Waals* y las fuerzas electrostáticas. En nuestros experimentos dejamos libre a la enzima por 10 ns. Los resultados presentados provienen de la comparación del último paso del proceso de la dinámica para cada estructura y de una serie de post-procesamientos, análisis globales y particulares que se presentan a continuación.

En el análisis global de la dinámica molecular, que se refiere a la comparación de los cambios generales en la estructura, podemos observar resultados de RMSD mediante el alineamiento de las estructuras mutante y silvestre en cada uno de los estados alostéricos. El alineamiento de las estructuras hexaméricas obtenidas tras el último paso de la dinámica molecular para las enzimas mutante y silvestre en la conformación T, calcula un RMSD de 4.148 Å, lo que nos permite observar que hay una diferencia estructural considerable entre éstas, a diferencia del alineamiento de los conformeros R el cual calcula un RMSD de 2.126 Å. Los RMSD de los alineamientos de una sola subunidad son de 1.521 Å para la forma T y de 1.432 Å para la forma R (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Valores de RMSD obtenidos del alineamiento entre monómeros de las estructuras finales obtenidas de la dinámica en Pymol , unidades expresadas en Å.

	T silvestre	R silvestre	T121
R silvestre	1.509	X	X
T121	1.521	1.629	X
R121	1.383	1.432	1.517

Tabla 7. Valores de RMSD obtenidos del alineamiento entre hexámeros de las estructuras finales obtenidas de la dinámica en Pymol , unidades expresadas en Å.

	T silvestre	R silvestre	T121
R silvestre	32.877	X	X
T121	4.148	31.847	X
R121	33.135	2.126	32.002

También obtuvimos el comportamiento del RMSD durante el proceso de dinámica molecular; en el lapso de 10 ns la estructura cambia y este cambio puede ser apreciado mediante el RMSD, ya que el programa compara la estructura inicial con cada una de las estructuras generadas en el tiempo por medio de la distancia entre los carbonos alfa de cada residuo. Con este análisis se observan pocas diferencias del cambio de RMSD en el tiempo, cuando comparamos la enzima mutante en el estado R y la silvestre en estado R y T. Sin embargo, hay que notar un resultado de este primer análisis, las variaciones de todas las estructuras comparadas contra su estado inicial de la dinámica tienden asintóticamente a un valor constante en el periodo de tiempo considerado, exceptuando la forma T de la mutante (Figura 12).

Los RMSD de las estructuras obtenidas de la dinámica de las formas T y R silvestres y mutantes son pequeños, entre 2.5 y 6 Å. Este cambio en RMSD representa un cambio estructural poco significativo [25] debido a que la máxima variación estructural obtenida mediante la comparación contra su estructura como imagen en el espejo es de 36 Å. Con los resultados anteriores en mente, podemos proponer que la mutación Tyr121Trp afecta globalmente a la estructura del conformero T ya que en los mismos tiempos de simulación obtenemos mayores cambios entre la estructura final y la inicial, además de que no llegamos a ver una estabilización del cambio.

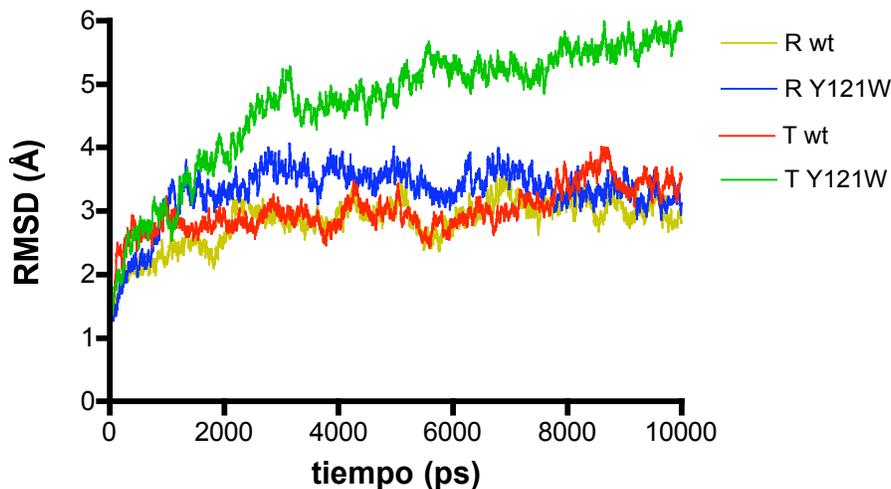


Figura 12. Cambio de RMSD a lo largo del tiempo comparado contra la estructura inicial de la simulación.

En el análisis particular se encuentran mayores diferencias en regiones específicas. En este análisis se incluyen la comparación detallada entre los RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) por aminoácido, el análisis de los ángulos de torsión entre los carbonos alfa de los aminoácidos, la comparación de los alineamientos de las estructuras y el cálculo de área y volumen del sitio activo.

El RMSF es la raíz cuadrada de la fluctuación de la posición de cada residuo durante la simulación, al igual que el RMSD su unidad es el Å. Este parámetro indica la magnitud del cambio en la posición de cada aminoácido y pueden encontrarse similitudes con los factores B cristalográficos (Figura 13, 14). Del análisis de los RMSF podemos observar como la tapa del sitio activo de la forma mutante se encuentra en una posición intermedia entre T y R silvestre y que la región correspondiente a los residuos 70 a 90 de la mutante tiende a una fluctuación similar a la de la forma R silvestre (Figura 15, 16).

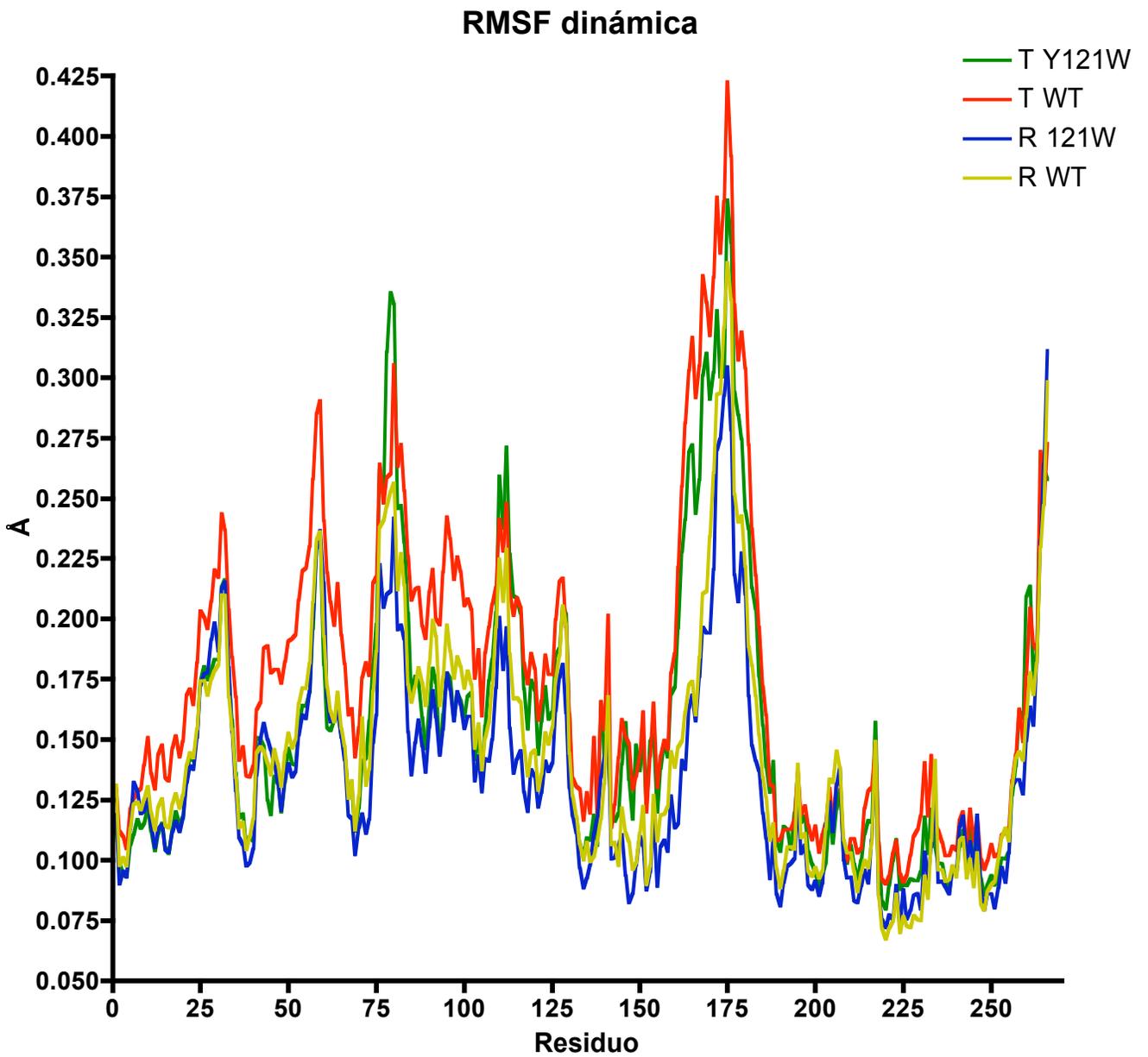


Figura 13. Promedio de valores de RMSF para cada residuo en las 6 subunidades obtenidos de la dinámica molecular.

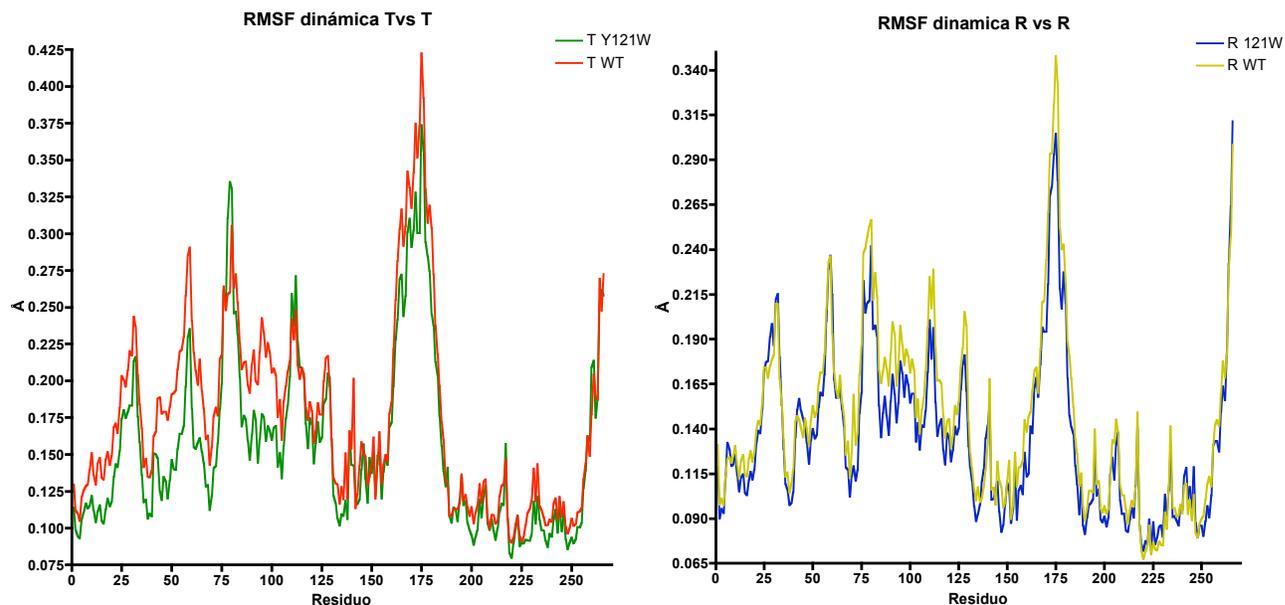


Figura 14. Promedio de valores de RMSF para cada residuo en las 6 subunidades obtenidos de la dinámica molecular.

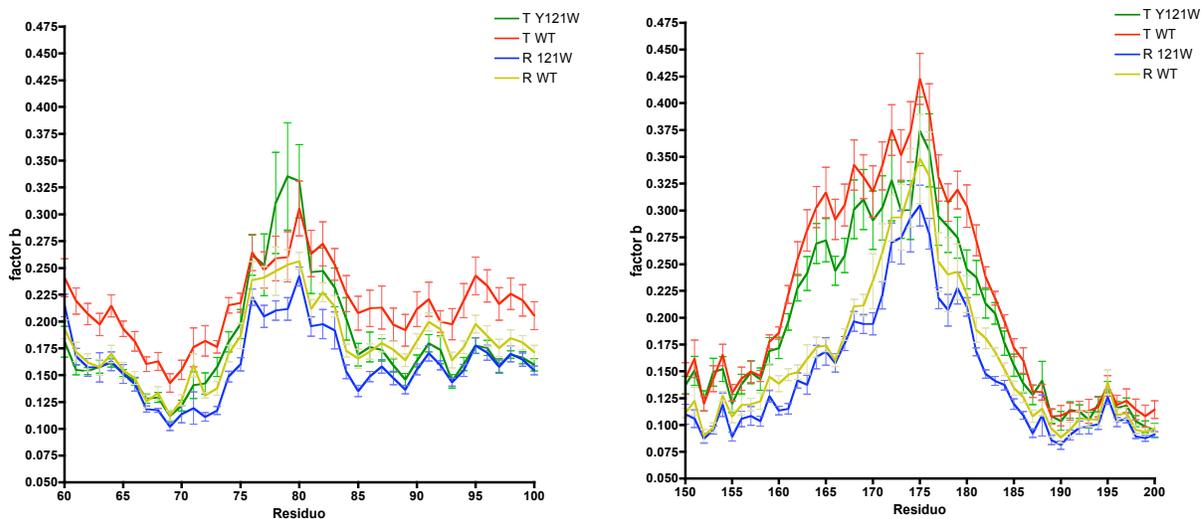


Figura 15. Izquierda, región 70-90. Nótese que en la región 70-90 la estructura de las formas mutantes tiende a la forma R silvestre. Derecha, los RMSF de los residuos de la tapa del sitio activo muestran que las formas T presentan un comportamiento similar entre ellos, así mismo se nota una tendencia similar para las formas R.

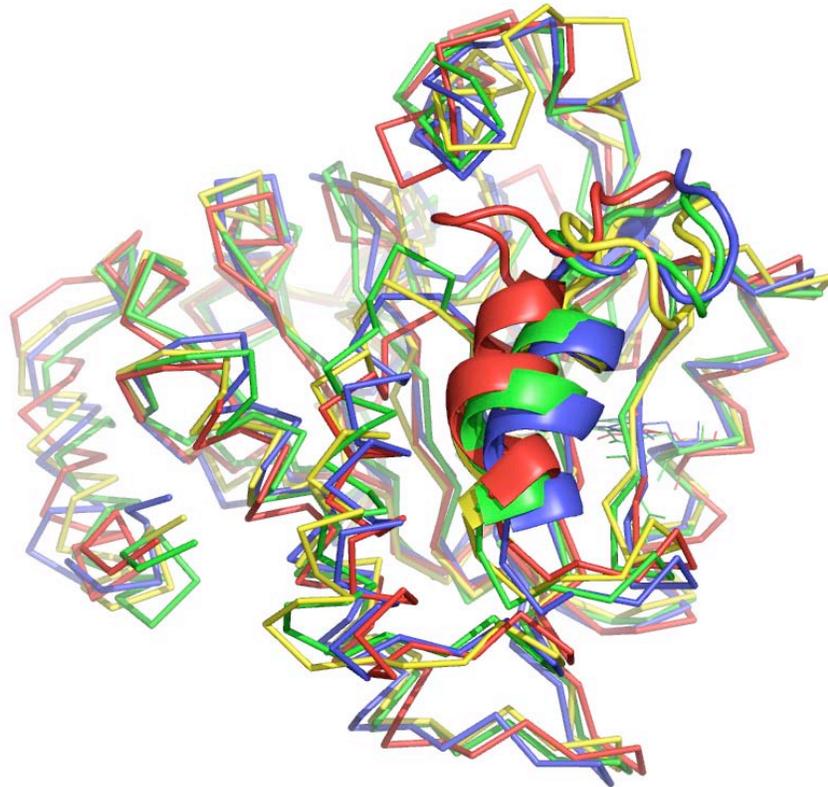


Figura 16. Una de las regiones interesantes que podemos observar en el alineamiento de las cuatro estructuras, es el asa que se forma en la región de los aminoácidos 70 a 90, modelada en caricatura (*cartoon*), la cual está en una posición semejante entre las mutantes en R y en T así como en la estructura silvestre en R, para la forma T silvestre esta asa se encuentra mucho más compacta. También, justo al principio de esta región hay un pequeño cambio de estructura secundaria de vuelta (*Turn*) a doblez (*Bend*) entre T y R silvestre; la forma mutante no presenta este cambio de estructura. Rojo, T silvestre; Amarillo, R silvestre; verde, T mutante y azul, R mutante.

En la comparación de los ángulos diedros de los carbonos alfa en la forma T se encuentran variaciones en regiones de la estructura poco exploradas con excepción de los residuos Ala150 y Ser151, los cuales tienen un rol de estabilización de la forma T formando un contacto polar con el amino terminal de la subunidad adyacente (Figura 17) [11].

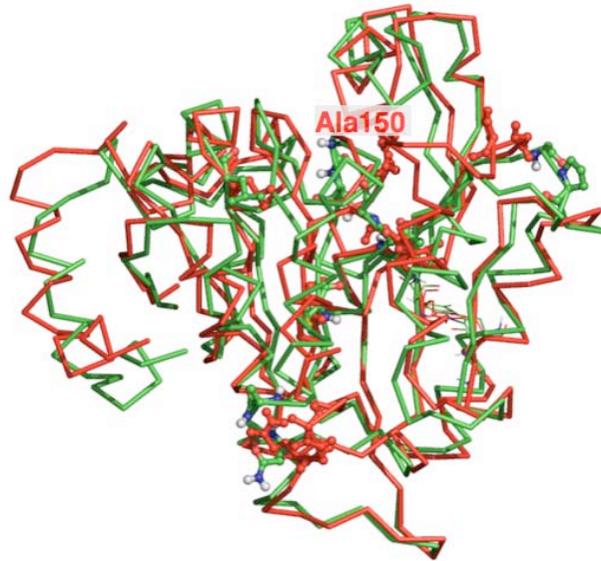


Figura 17. Comparación de los ángulos diedros entre los carbonos alfa de las enzimas silvestre contra mutante Tyr121Trp en el conformero T, se pueden observar residuos involucrados en la estabilización de la forma T como Ala150 y Ser151 así como residuos del asa de 70-90 dibujados en palos (*sticks*).

Del alineamiento de las estructuras en R obtenidas de la dinámica, se pueden observar cambios en varias de las cadenas laterales de residuos del sitio activo, en especial un cambio de orientación de Asp72, Asp141, His143 y Glu148 (Figura 18). Además se observa la pérdida de algunas interacciones polares, en especial el puente de hidrógeno que forma la Tyr121 con la cadena principal en la Asn70.

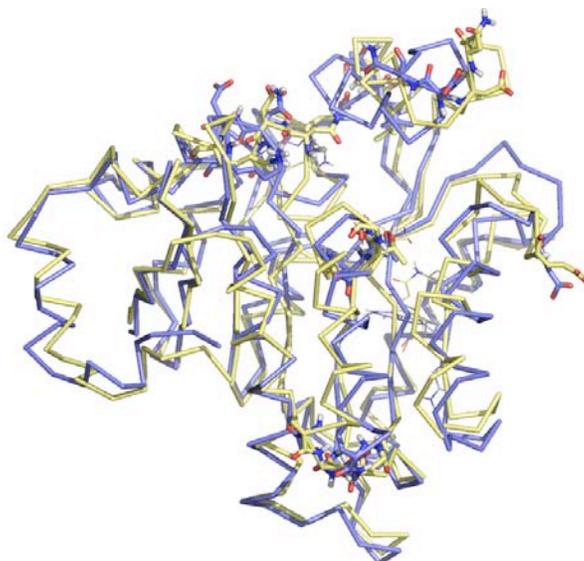


Figura 18. Comparación de los ángulos diedros entre los carbonos alfa de las enzimas silvestre contra mutante Tyr121Trp en el conformero R, se pueden observar varios residuos catalíticos como Asp141 y Glu148 así como residuos de la tapa y el asa de 70-90 dibujados en palos.

También observamos cambios importantes en el comportamiento de la tapa para la forma R; en la forma mutante este motivo se encuentra más cerrado o más compacto que la tapa en la enzima silvestre (Figura19, 20d). También se puede observar que la tapa en la forma T en la enzima mutante se encuentra más abierta que en la forma T de la enzima silvestre, a su vez la comparación de las tapas mutantes en la forma R y T muestran una posición muy similar entre ellas (Figura 20b).

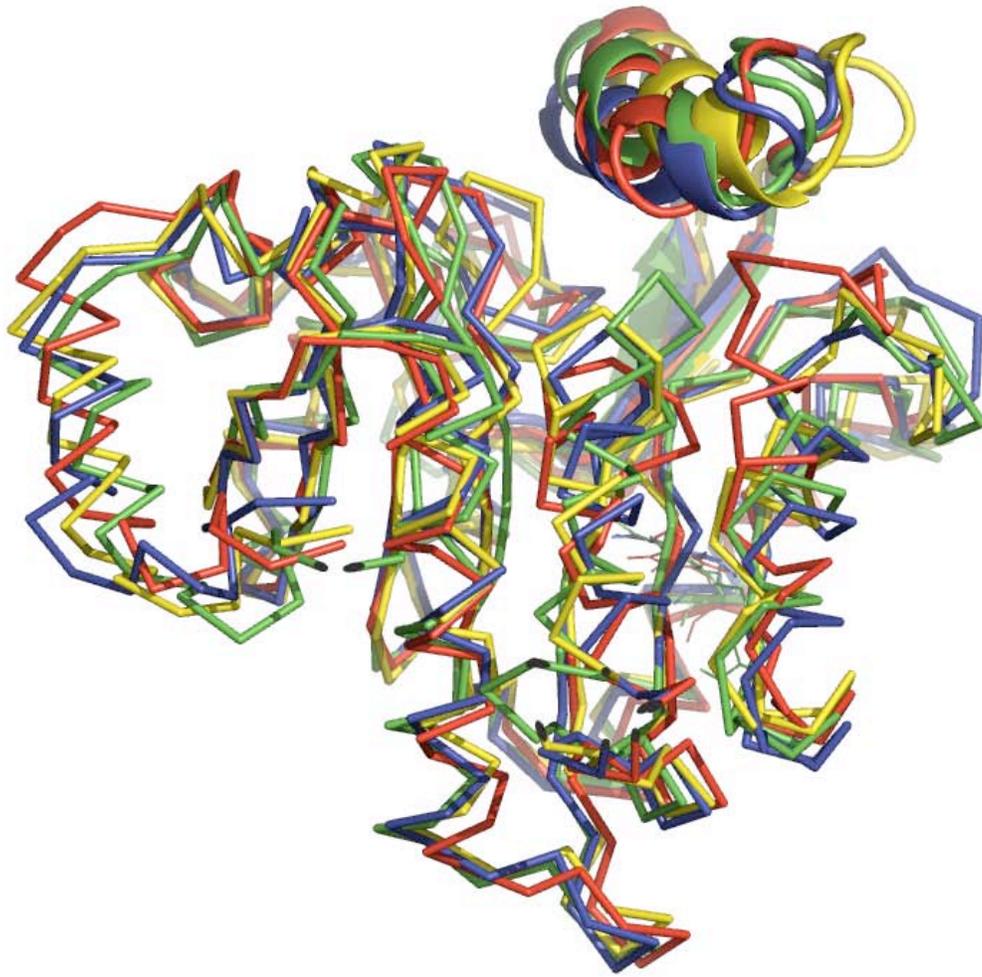
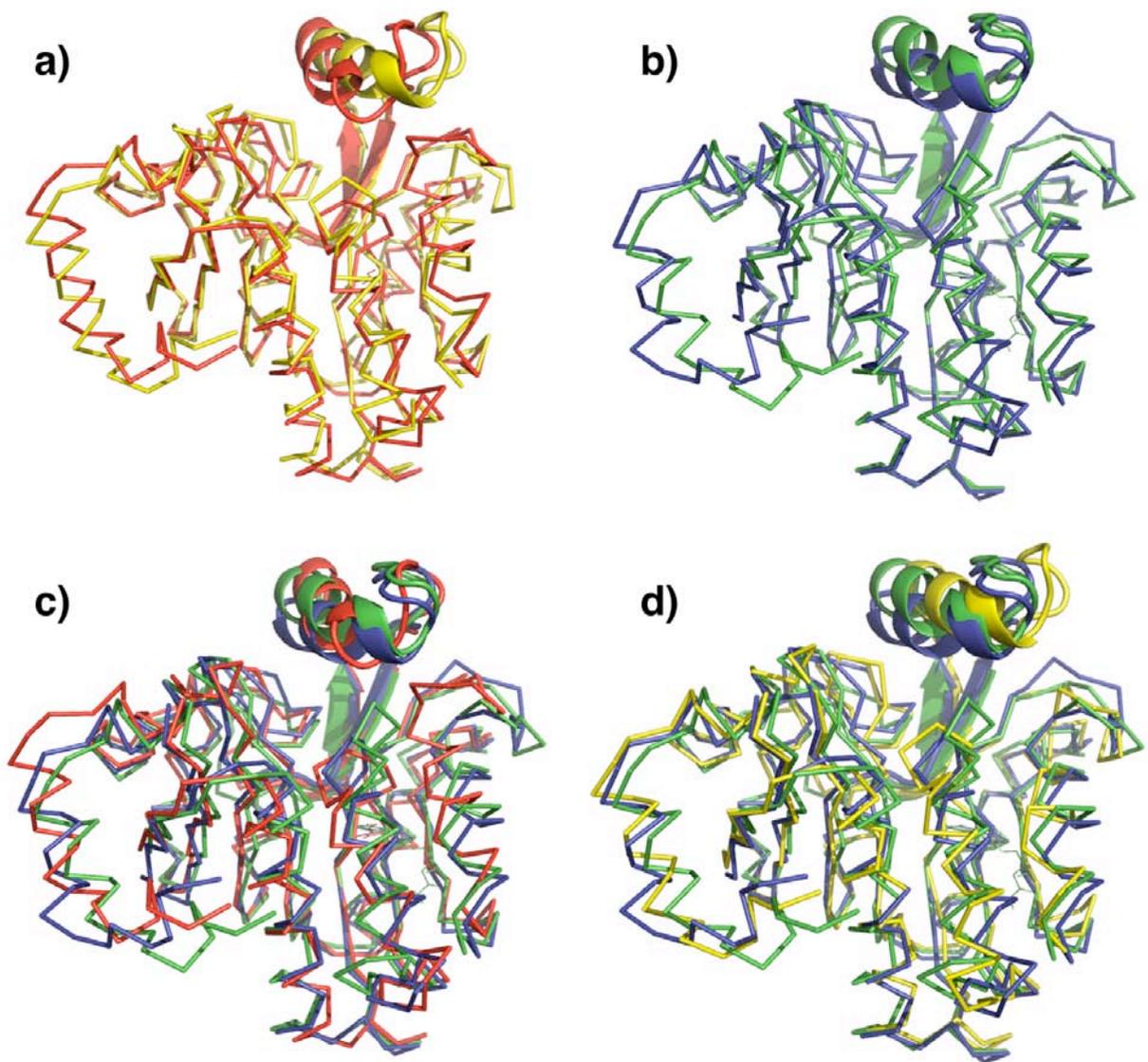


Figura 19. Alineamiento de las estructuras de las enzimas silvestre y mutante Tyr121Trp en los conformeros T y R obtenidas del último paso de la dinámica. Rojo, T silvestre; Amarillo, R silvestre; verde, T mutante y azul, R mutante.



**Figura 20. a) Alineamiento de las estructuras silvestres formas R y T.
 b) Alineamiento de las estructuras mutantes Tyr121Trp formas R y T.
 c) Alineamiento de las estructuras mutantes contra la forma T silvestre.
 d) Alineamiento de las estructuras mutantes contra la forma R silvestre.
 Se puede apreciar que la posición de la tapa en la forma mutante cambia mucho menos de posición y se encuentra en una posición intermedia entre R y T silvestres.**

Un último análisis al que sometimos nuestras simulaciones fueron los cálculos de área y volumen de los sitios activos en las formas R y T silvestres y mutantes (Tabla 8).

Dicho análisis fue realizado utilizando el programa *Pockets* [21] que corre en línea de comandos. Los resultados indican que la enzima mutante en la forma T tiene un sitio activo mucho más expandido o relajado que la enzima silvestre en el conformero T; lo que podría confirmar el aumento de afinidad por el activador alostérico en el sitio activo de la enzima Tyr121Trp.

Tabla 8. Resultados del cálculo de área y volumen del sitio activo en las formas R y T de las enzimas silvestre y mutante.

	Área (Å ²)	Volumen (Å ³)
R silvestre	334.59	150.74
T silvestre	501.53	267.24
R Tyr121Trp	349.86	266.86
T Tyr121Trp	580.78	406.86

El modelo de dos estados de Monod Wyman Changeux puede explicar la unión bifásica del activador alostérico:

Para demostrar que una sola mutación es incapaz de cambiar el funcionamiento de la enzima a tal grado que no podamos analizarla desde el punto de vista del modelo alostérico de Monod, es necesario utilizar todos los resultados obtenidos en este estudio y hacer un análisis racional de los efectos de la mutación sobre la enzima.

Análisis de las caracterizaciones *in vitro* e *in numero*.

La comparación de los resultados de los análisis *in vitro* e *in numero* (tabla 9) es importante para poder plantear un esquema general del comportamiento de la mutante, así como de las repercusiones que ésta tiene en el funcionamiento normal de la enzima.

Tabla 9. Constantes de disociación del activador alostérico marcado (³H-GlcNAc6P), datos ajustados a una suma de dos expresiones de Hill, a una ecuación bifásica derivada del modelo de MWC (ecuación 3) y el promedio de los 10 mejores resultados de los experimentos de *docking* calculados con el programa XSCORE.

	K_d Experimental ⁽¹⁾	K_d Experimental ⁽²⁾	K_d Calculada <i>docking</i>
Sitio alostérico	35 ± 9 μM	102 ± 31 μM	5.29 μM
Sitio activo	392 ± 9 μM	161 ± 35 μM	464 μM

1) Datos experimentales ajustados a la siguiente ecuación.

Ecuación 2.

$$\bar{y} = \left[n_1 S^{h_1} / K_1^{h_1} + S^{h_1} \right] + \left[n_2 S^{h_2} / K_2^{h_2} + S^{h_2} \right]$$

2) Datos experimentales ajustados a la ecuación 3.

Con estos datos observamos que las K_d obtenidas mediante la expresión de Hill no son tan distintas de las calculadas *in numero*, aunque no sucede lo mismo con los ajustes a la ecuación 3. Si consideramos los datos de *docking* en forma solo cualitativa, podemos concluir únicamente que la unión del activador alostérico al sitio activo se confirma *in numero*, dando apoyo a la hipótesis propuesta que plantea que la segunda fase de unión activador a la mutante se debe a su unión promiscua al sitio activo.

Comparando los datos cinéticos con los datos estructurales del análisis de la dinámica, observamos una desestabilización aparente de la forma T de la enzima mutante. El RMSD de la comparación de los hexámeros obtenidos de las dinámicas de T silvestre contra T mutante es de 4.148 Å, que comparado con el RMSD de las formas R de 2.126 Å indica una mayor variación entre las estructuras de T a diferencia de las de R. Esta desestabilización es congruente con los datos cinéticos ya que la constante L de la mutante es menor en comparación a la silvestre, indicando una mayor proporción de enzima en estado R que en estado T. Por otra parte, el parámetro c , que indica la afinidad diferencial dada por el cociente $c = K_m^R / K_m^T$, se hace mayor en la enzima mutante, lo

anterior muestra que la afinidad de la forma R por el sustrato disminuye en comparación a la de la enzima silvestre. Esto revela que la mutación hace a la enzima más próxima a la conformación R, pero una forma R menos afín por la GlcN6P que la forma R silvestre (Tabla 1).

Un modelo posible para explicar la unión bifásica de la GlcNAc6P a la mutante Tyr121Trp

Proponemos en este trabajo un modelo que reproduzca el efecto observado en los experimentos de unión de la ^3H -GlcNAc6P a la mutante Tyr121Trp (Ecuación 3). Esta ecuación es una expresión derivada del modelo de MWC, la cual consiste en la suma de dos términos que corresponden a las ecuaciones para la unión de un ligante de fijación exclusiva y para el caso general (fijación no exclusiva), donde el ligante se une a ambos conformeros alostéricos. En el caso de los experimentos de unión a la mutante Tyr121Trp, el único ligante en juego es la GlcNAc6P. La unión del activador es de fijación exclusiva al sitio alostérico y de fijación no exclusiva al sitio activo, de modo que $\alpha_1 = [\text{GlcNAc6P}] / K_{\text{alost}}$ y $\alpha_2 = [\text{GlcNAc6P}] / K_{\text{act}}$. En la ecuación 3, se incluyen los efectos heterotrópicos del activador unido al sitio alostérico sobre el activador unido al sitio activo y viceversa. Esta ecuación explica la estequiometría de 12 sitios ocupados por la GlcNAc6P por molécula. Sin embargo, se han observado estequiometrías de alrededor de 18. No tenemos un modelo para explicar la ocupación de 18 sitios por la GlcNAc6P. Tal vez sea un artefacto producido por unión inespecífica, la presencia de una impureza radiactiva, o bien podría tratarse como se ha especulado anteriormente de un apilamiento del activador en el sitio alostérico. No hemos considerado útil incluir esta posible

interacción de muy baja afinidad y que aún no comprendemos. Hemos utilizado, por lo tanto, la siguiente ecuación (Ecuación 3) para ajustar los datos de unión de la $^3\text{H-GlcNAc6P}$ a la desaminasa mutante Tyr121Trp (Figura 21).

Ecuación 3.

$$\bar{y} = \frac{\alpha_1(1 + \alpha_1)^{n-1}}{\frac{L}{(1 + \alpha_2)^n} + (1 + \alpha_1)^n} + \frac{\frac{L}{(1 + \alpha_1)^n} c\alpha_2(1 + c\alpha_2)^{n-1} + \alpha_2(1 + \alpha_2)^{n-1}}{\frac{L}{(1 + \alpha_1)^n} (1 + c\alpha_2)^n + (1 + \alpha_2)^n}$$

donde:

$$\alpha_1 \equiv \left(\frac{A}{Ka} \right) \quad \alpha_2 \equiv \left(\frac{A}{Kx} \right)$$

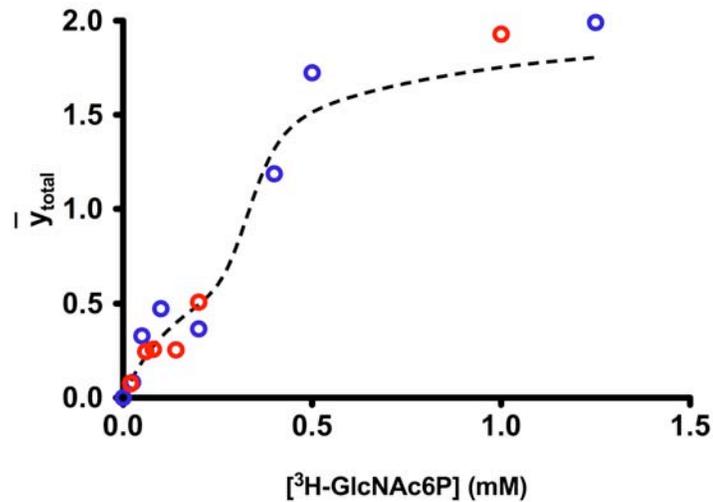


Figura 21. Datos experimentales de la unión de $^3\text{H-GlcNAc6P}$ a la enzima mutante Tyr121Trp, ajustados por regresión no lineal a la ecuación 3.

El activador alostérico tiene dos sitios de unión distintos en la desaminasa

En general los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten plantear que el activador alostérico GlcNAc6P se une tanto al sitio alostérico, su sitio natural de unión a la enzima, como al sitio activo. Los datos obtenidos de las simulaciones de unión muestran claramente que el activador puede unirse a cualquiera de los dos sitios. A su vez los experimentos de cinética de abertura del azúcar demuestran que el activador está siendo modificado en el sitio activo, y que no sólo se une a éste, sino que además se lleva a cabo la catálisis de la abertura del anillo piranósico de la GlcNAc6P con la participación de la His143.

El aumento de la afinidad en la mutante Tyr121Trp por el activador alostérico en el sitio activo puede ser explicado por el cambio en la estructura, cuyos sitios catalíticos muestran volúmenes y áreas mayores que la enzima silvestre.

La mutante Tyr121Trp: Repercusión sobre las constantes cinéticas y las propiedades estructurales y dinámicas de la enzima

La enzima mutante Tyr121Trp nos revela propiedades que no se habían observado en la enzima silvestre, ya que permite observar en los experimentos de unión con ligante radiactivo una curva bifásica, a diferencia de la enzima silvestre que muestra una curva de unión sigmoide. Podemos sugerir dos posibles hipótesis para explicar que la unión del ligante alostérico a la mutante Tyr121Trp ocurra en dos fases, primero se puede intentar describir la unión bifásica como efecto de una transición heterotrópica desacoplada en donde la mitad de los sitios tienen mayor afinidad y la otra mitad de los sitios menor afinidad. La unión de ligante alostérico sobre la primera mitad de los sitios alostéricos no

produciría ningún efecto sobre la afinidad de la otra mitad, haciendo que las K_d en distintos sitios estén distanciadas. Esto a su vez puede ser la consecuencia de una asimetría estructural preexistente a la unión de ligante, o bien a la existencia de un fenómeno de cooperatividad negativa. La segunda hipótesis consiste en considerar como posible la unión del activador alostérico tanto a los sitios alostéricos como a los sitios activos, lo que podría determinar que la segunda fase de unión sea causada por la unión del activador alostérico al sitio activo. Tomando en consideración los cálculos de fracción de saturación en donde se observa una saturación cercana a 12 ó 18 sitios, esta hipótesis sería la correcta. Si esto fuese así, las diferencias observadas en la enzima mutante también deben ser validas, aunque en menor grado, para la enzima silvestre. Para poder saber si el fenómeno ocurría en un solo sitio por subunidad o dos, en donde el primer sitio es el alostérico y el segundo es el activo, escogimos dos caminos para probar la existencia de la unión del activador al sitio activo, ya que esta unión no ha sido observada mediante estudios cristalográficos. El primero de estos caminos es la simulación de las regiones de la proteína y la conformación del ligante en donde es probable que exista una unión ligante-proteína, mediante cálculos de fuerzas electrostáticas y algoritmos basados en modelos probabilísticos de selección Lamarckiana. El segundo enfoque, consiste en investigar una posible catálisis del ligante alostérico en el sitio activo, lo cual nos permitiría estudiar en forma aislada la primera fase del ciclo catalítico de la desaminasa, es decir, la abertura del anillo piranósico de la GlcNAc6P. Esto no debería de estar impedido por la estructura química del activador. Comenzamos haciendo cálculos en computadora antes de planear experimentos cinéticos en el espectrofotómetro. En un ambiente en que la simulación permite explorar una amplia gama de posibilidades que

incluyen al sitio alostérico como al activo, simulamos la unión del ligante con el programa *Autodock*. Desde los primeros intentos, donde ni siquiera teníamos una estrategia bien planeada en cuanto a la ubicación de la rejilla tridimensional que limita el espacio del *docking*, comenzamos a ver que algunas moléculas del activador alostérico se unían al sitio activo. Las simulaciones de unión hechas con las enzimas silvestre y mutante en sus formas R y T y los cálculos de las K_d con XSCORE, permitieron obtener valores de K_d comparables con algunos ajustes de nuestros experimentos de unión de ligante radioactivo. Entonces teníamos evidencia para intentar probar con métodos *in vitro* la existencia de catálisis del ligante alostérico en el sitio activo, con lo cual no sólo probaríamos la existencia de un sitio de unión promiscuo del ligante alostérico, sino también de una actividad que puede ser medida y analizada por su cinética. El método cinético que proponemos para comprobar la catálisis del activador alostérico en el sitio activo requiere la medición del primer paso cinético del ciclo catalítico en presencia de hidracina. Anteriormente se habían hecho intentos de medir la cinética de la enzima utilizando hidracina para reaccionar con los productos de la catálisis en sus dos sentidos (Montero-Morán G, datos no publicados). Sin embargo, nunca se había utilizado el ligante alostérico como sustrato, ya que nadie había sospechado que éste pudiera unirse al sitio activo. Después de montar el método y tratar de demostrar esta catálisis, observamos que la reacción de formación de hidrazona ocurría tanto en la enzima mutante Tyr121Trp como en la enzima silvestre. Finalmente necesitábamos comprobar que esta actividad fuera llevada a cabo efectivamente en el sitio activo, por lo que utilizamos como evidencia de tipo estructural la mutante del sitio activo His143Gln. La participación de la His143 en la catálisis de abertura del anillo piranósico, prevista por Oliva y col. y

comprobada por Montero-Morán y col.[3, 24], fue un factor determinante para concluir que la actividad esta siendo catalizada en el sitio activo. Al medir la cinética de abertura del anillo piranósico de la GlcNAc6P con la mutante His143Gln se observó una pérdida completa de la actividad. Esto confirma la hipótesis de la unión del activador en ambos sitios, probando la capacidad de unión y catálisis del activador alostérico en el sitio activo. Esto también explica los datos complejos (no publicados) que Montero-Morán obtenía al medir la cinética de la enzima utilizando hidracina, ya que cuantificaba las hidrazonas de la GlcN6P, de la Fru6P, y de la GlcNAc6P. Todavía faltan más experimentos para validar nuestro método de medida de la primera fase de la catálisis empleando ligantes análogos, como la manosamina-6-fosfato, que deben ser sustratos de la apertura pero no de la enolización. Sin embargo, demostramos en forma contundente la existencia de una propiedad de la enzima silvestre que había pasado inadvertida hasta ahora.

Queda aún sin explicar el efecto de la mutante Tyr121Trp sobre la cinética alostérica de la desaminasa, aunque sirvió para revelar una nueva propiedad de la enzima. Por lo tanto, se llevaron a cabo más simulaciones en computadora, utilizando ahora la dinámica molecular con el objetivo de dar una explicación estructural a la cinética de nuestra mutante. Utilizando la paquetería GROMACS hicimos nuevamente las dinámicas moleculares de las estructuras del hexámero de la enzima silvestre y mutante en sus formas T y R. Mediante este enfoque podemos proponer una serie de posibles factores estructurales y dinámicos de la enzima involucrados en el cambio de comportamiento de la mutante. Llevamos a cabo una serie de comparaciones y postprocesamientos de las estructuras finales obtenidas de las dinámicas moleculares. Éstas incluyeron cambios

dinámicos, donde comparamos los promedios de los cálculos de los RMSF, además de los cambios estructurales generales, observando el cambio de los RMSD en el tiempo y los cambios estructurales particulares, como el cambio de una interacción polar entre una u otra cadena de la región de la mutación. Este último aspecto posiblemente repercute en el cambio de orientación del asa de la región 70-90 y de la tapa del sitio activo, cambiando parte de la estructura de éste en el estado T, llevándolo posiblemente a un estado cercano a R, mientras que otra parte de la estructura no se ve tan afectada por la mutación manteniendo su estado T. Esto se refiere a cambios terciarios no propagados del tipo de los descritos por A. Mozarelli para la hemoglobina [26]. Se hizo además el cálculo del área y el volumen del sitio activo, que es un cálculo únicamente geométrico que busca espacios en la molécula que se rellenan con esferas del radio del agua. Estos cálculos muestran una relajación del sitio activo en la forma mutante. Los resultados anteriores aportan una posible explicación del aumento de la afinidad por el activador alostérico y la disminución en la catálisis de la mutante Tyr121Trp.

Conclusiones

La GlcN6P desaminasa de *E. coli* es capaz de unir y modificar a la GlcNAc6P en su sitio activo. Lo que demuestra que el activador alostérico tiene más de un sitio de unión por subunidad. La mutante Tyr121Trp de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* provoca un cambio estructural, en donde se observa que parte del sitio activo se encuentra en una conformación intermedia entre T y R, inclusive en la conformación T, esto último alterando el sitio activo aumentando su espacio y volviéndolo más afín por el activador, provocando el fenómeno bifásico de la unión del activador alostérico.

Perspectivas

- Llevar a cabo un estudio cinético cuidadoso con distintas concentraciones de activador, que permitan obtener ajustes por regresión no lineal múltiple de mejor calidad que el presentado aquí.
- Estudiar la cinética para caracterizar la inhibición por GlcNAc6P.
- Hacer los experimentos de la cinética de abertura del anillo piranósico con manosamina-6-fosfato y N-Acetilmanosamina-6-fosfato, como control.
- Caracterizar las especies producidas por la reacción con hidracina, por ejemplo utilizando HPLC-Masas.
- Hacer los *dockings* utilizando las estructuras provenientes de la dinámica molecular.
- Hacer la cristalografía en colaboración con el Dr. Enrique Rudiño de las mutantes Tyr121Trp y His143Gln para observar la GlcNAc6P unida al sitio activo, así como la posible formación de *Stacking* de GlcNAc6P en el sitio alostérico.
- Hacer la dinámica de T mutante con tiempos más largos para obtener la estructura en donde se estabilice el RMS.
- Hacer la dinámica molecular con ligantes en el sitio alostérico y en el sitio activo.

Referencias

1. Pennetier, C., L. Domínguez-Ramírez, and J. Plumbridge, *Different regions of Mlc and NagC, homologous transcriptional repressors controlling expression of the glucose and N-acetylglucosamine phosphotransferase systems in Escherichia coli, are required for inducer signal recognition*. *Molecular Microbiology*, 2008. **67**(2): p. 364–377.
2. Plumbridge, J.A., *A dominant mutation in the gene for the Nag repressor of Escherichia coli that renders the nag regulon uninducible*. *Journal of General Microbiology*, 1992. **138**(Pt 5): p. 1011-7.
3. Oliva, G., et al., *Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from Escherichia coli at 2.1 Å resolution*. *Structure*, 1995. **3**(12): p. 1323-32.
4. Monod, J., Wyman, J. y Changeux J.P., *On the nature of allosteric transitions*. *J. Mol. Biol.*, 1965(12): p. 88-118.
5. Altamirano, M.M., et al., *Asymmetric allosteric activation of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121*. *Biochemistry*, 1995. **34**(18): p. 6074-82.
6. Bustos-Jaimes, I., et al., *On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase*. *J Mol Biol*, 2002. **319**(1): p. 183-9.
7. Sambrook, J. and M.J. Gething, *Protein structure. Chaperones, paperones*. *Nature*, 1989. **342**(6247): p. 224-5.
8. Rychlik, I., F. Sisak, and P. Lany, *Differentiation of Salmonella enteritidis and S. typhimurium by plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA*. *Vet Med (Praha)*, 1993. **38**(7): p. 433-9.
9. Calcagno, M., et al., *Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. **787**(2): p. 165-73.
10. Howlett, G.J., E. Yeh, and H.K. Schachman, *Protein-ligand binding studies with a table-top, air-driven high-speed centrifuge*. *Arch Biochem Biophys*, 1978. **190**(2): p. 808-19.
11. Montero-Moran, G.M., et al., *Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase*. *Biochemistry*, 1998. **37**(21): p. 7844-9.
12. Guex, N., A. Diemand, and M.C. Peitsch, *Protein modelling for all*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(9): p. 364-7.
13. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. *J Comput Chem*, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
14. Lovell, S.C., et al., *Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation*. *Proteins*, 2003. **50**(3): p. 437-50.
15. Lunney, E.A., et al., *A novel nonpeptide HIV-1 protease inhibitor: elucidation of the binding mode and its application in the design of related analogs*. *J Med Chem*, 1994. **37**(17): p. 2664-77.

16. Mahmoudian, M., *The cannabinoid receptor: computer-aided molecular modeling and docking of ligand*. J Mol Graph Model, 1997. **15**(3): p. 149-53, 179.
17. Lorber, D.M., *Computational drug design*. Chemistry & Biology, 1999. **6**(8): p. R227-R228.
18. Morris, G.M., et al., *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. Journal of Computational Chemistry, 1998. **19**(14): p. 1639-1662.
19. Wang, R., Y. Lu, and S. Wang, *Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking*. J Med Chem, 2003. **46**(12): p. 2287-303.
20. Lindahl, E., B. Hess, and D. van der Spoel, *GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis*. Journal of Molecular Modeling, 2001. **7**(8): p. 306-317.
21. Liang, J., H. Edelsbrunner, and C. Woodward, *Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design*. Protein Sci, 1998. **7**(9): p. 1884-97.
22. Flocco, M.M. and S.L. Mowbray, *C alpha-based torsion angles: a simple tool to analyze protein conformational changes*. Protein Sci, 1995. **4**(10): p. 2118-22.
23. Ferreira, F.M., et al., *Structural analysis of N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase apoenzyme from Escherichia coli*. J Mol Biol, 2006. **359**(2): p. 308-21.
24. Montero-Moran, G.M., et al., *On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of Escherichia coli glucosamine 6-phosphate deaminase*. Biochemistry, 2001. **40**(34): p. 10187-96.
25. Maiorov, V.N. and G.M. Crippen, *Size-independent comparison of protein three-dimensional structures*. Proteins, 1995. **22**(3): p. 273-83.
26. Viappiani, C., et al., *New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels*. Proc Natl Acad Sci, 2004 **101**(40): p. 14414-14419.