



Universidad Nacional Autónoma de México
Licenciatura en Investigación Biomédica Básica
Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas
Facultad de Medicina

**La Manosamina 6-P como inhibidor de la Glucosamina 6-P desaminasa:
efectos alostéricos y competitivos acoplados**

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

Diego Arturo Alonzo Muñiz

Director de Tesis:
Dr. Mario L. Calcagno

Miembros del Jurado:
Dra. Marietta Tuena Sangri
Dr. Antonio Peña Díaz
Dr. Rafael Camacho Carranza
Dr. Ismael Bustos Jaimes

**Ciudad Universitaria, México D.F.
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A Rosalba, Arturo y Rodrigo: uno para todos y todos para uno.

A la UNAM, por una multitud de razones:

- Por darme el honor de trabajar junto a Mario Calcagno, gran maestro de cinética enzimática, bioquímica, filosofía, filosofía de la ciencia, medicina, historia (universal, latinoamericana, del arte y de las religiones), derecho, matemáticas, informática, fisicoquímica, pipeteo, literatura, astronomía, química (y alquimia), biología, sociología, geografía... pero sobre todo eso, gracias Mario, por ser un formidable amigo.
- Por encontrarme con mis queridísimos amigos Fátima, Carlos, Uriel y Diego: cambiaron mi vida, los quiero mucho.
- Por dejarme aprender de los grandes maestros Alejandro Fernández, Alejandro Zentella, Enrique García Hernández, Rosario Muñoz y Adela Rodríguez.
- Por ser la casa del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, una muestra de que la comunidad no es una utopía. Geo, Alejandro, Alejandro, Ismael, Sergio, Haven, Héctor, Renán, Lau, Isabel, Margarita, Mariana, Jorge y muchos más miembros y ex-miembros: son un increíble grupo de personas siempre dispuesto a poner el nombre de nuestra Universidad en lo más alto, los estimo muchísimo.
- Por mis amigos, que por ser sus estudiantes de la LIBB, me hizo conocer y apreciar.
- Por poseer una persona excepcional como Cynthia Lima.
- Por permitirme trabajar junto a las excelentes investigadoras Regina Montero y María Ibarra.
- Por presentarme a los *senseis* Víctor Dávila, Javier Belmont y Luis Serrano.

A Abú, Mima, Mamolga, Ernesto, Pau, Olgui, Frida y Valentina: 23 años de cariño.

A Ale y Xime.

A Juan Carlos, Beto, Cuauhtli e Israel.

A México, por todo.

Agradecimientos

A la M. C. Laura I. Álvarez Añorve por su apoyo en la expresión y purificación de las enzimas utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Ignacio Regla por la realización de los espectros de masas de los compuestos utilizados en este trabajo.

Al LIBB Sergio Zonszein Strauss por la discusión, revisión y crítica de este trabajo.

A los Doctores Marietta Tuena, Ismael Bustos, Antonio Peña y Rafael Camacho por la revisión de este trabajo.

'El discurso auténtico funda a su vez la ciencia, y pone en manos de los hombres los inmensos poderes que, hoy, le enriquecen y amenazan, le liberan, pero podrían también esclavizarle. Las sociedades modernas, tejidas por la ciencia, viviendo de sus productos, se han vuelto dependientes como un toxicómano de su droga. Deben su poderío material a esta ética fundadora del conocimiento y su debilidad moral a los sistemas de valores, arruinados por el mismo conocimiento, a los que aún intentan atenerse. Esta contradicción es mortal. Es la que excava el abismo que vemos abrirse a nuestro paso. La ética del conocimiento creadora del mundo moderno, es la única compatible con él, la única capaz, una vez comprendida y aceptada, de guiar su evolución.'

Jacques Monod , *El azar y la necesidad*

Resumen

En esta tesis, se presentan los efectos de un análogo del sustrato, la Manosamina 6-fosfato (ManN6P), en la enzima Glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPD).

La cinética cooperativa de desaminación del sustrato GlcN6P se puede describir por el modelo alostérico de Monod Wyman y Changeux (MWC). Los efectos que tiene la ManN6P sobre esta cinética son distintos a los ya reportados para inhibidores competitivos de enzimas alostéricas, en los que generalmente se observa una activación a concentraciones bajas de inhibidor y una inhibición competitiva con pérdida de cooperatividad a concentraciones altas.

En el caso de la ManN6P no se observa la activación a concentraciones bajas, hay un aumento en el valor del parámetro $K_{0.5}$ del ajuste a la ecuación de Hill y la cooperatividad se mantiene constante. Se propone un modelo basado en el de MWC, en el cual además de los efectos competitivos, las afinidades diferenciales de la ManN6P tanto por el sitio activo como el alostérico de la enzima tienen un papel predominante sobre el desplazamiento del equilibrio entre las conformaciones T y R, y por lo tanto en la cinética de desaminación de la GlcN6P.

Este trabajo es una evidencia más de los múltiples modos de regulación que una proteína con sitios múltiples de unión puede tener, y el modelo propuesto podría aplicarse para inhibidores de otras proteínas globulares con transiciones conformacionales concertadas.

Abstract

This thesis presents the effects that a substrate analogue, Mannosamine 6-P, exerts on the isomerization-deamination reaction of Glucosamine 6-P (GlcN6P) catalyzed by the enzyme Glucosamine 6-P deaminase of *Escherichia coli* (EcGNPD).

The cooperative kinetics of the aforementioned reaction can be described by the allosteric model proposed by Monod Wyman and Changeux (MWC). The effects that ManN6P has on these kinetics are different from those reported previously for competitive inhibitors on allosteric enzymes. In those reports, at low concentrations of both inhibitor and substrate, an activation is generally observed. At high concentrations of inhibitor there is a competitive inhibition along a decrease on cooperativity.

On the other hand, at low concentrations of ManN6P there is no activation of the deamination reaction of GlcN6P; there is an increase on the parameter $K_{0.5}$ of the Hill equation and the cooperativity is held constant at all the concentration values tested, as measured by the Hill quotient. I propose a model based on that of MWC, where besides the competitive effects, the differential affinities of ManN6P for both the catalytic and the allosteric sites of the enzyme have predominant effects on the equilibrium between the T and R conformers, and in consequence on the kinetics of the deamination reaction of the substrate GlcN6P.

This work is another evidence of the multiple regulation possibilities that multisite proteins have, and suggests that the proposed model could be applied to inhibitors of other globular proteins that undergo concerted allosteric transitions.

Abreviaturas

EcGNPD: Glucosamina 6-P desaminasa de *Escherichia coli*.

GlcNAc6P: *N*-acetil glucosamina 6-P, activador alostérico de la EcGNPD.

GlcN6P: Glucosamina 6-P, sustrato de la EcGNPD.

Fru6P: Fructosa 6-P, producto de la reacción catalizada por la EcGNPD.

MWC: Hace referencia al modelo alostérico propuesto por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean Pierre Changeux.

GlcN-oi-6P: Glucitolamina 6-P, análogo del estado de transición de la reacción catalizada por la EcGNPD.

ManN6P: Manosamina 6-P, epímero en el C-2 del sustrato de la EcGNPD.

ManNAc6P: *N*-acetil manosamina 6-P, epímero en el C-2 del activador alostérico de la EcGNPD.

ManN: Manosamina, reactivo utilizado en la síntesis de ManN6P

v: velocidad inicial

$V=V_{max}$: velocidad máxima

ÍNDICE

Introducción	1
La Glucosamina 6-P desaminasa de <i>Escherichia coli</i> (EcGNPD) en el contexto celular	1
La reacción catalizada por la EcGNPD	2
La EcGNPD es un dímero de trímeros con seis sitios catalíticos y seis alostéricos	2
Alostería	4
Efectos homotrópicos	4
Efectos heterotrópicos	11
Inhibición competitiva en enzimas alostéricas	16
La estructura de la EcGNPD en distintas conformaciones y con distintos ligantes	18
La Manosamina 6-P (ManN6P)	19
Materiales y métodos	20
Síntesis de Manosamina 6-Fosfato (ManN6P)	20
Síntesis de la <i>N</i> -Acetil Manosamina 6-P (ManNAc6P)	22
Expresión y purificación de la EcGNPD <i>silvestre</i>	22
Expresión y purificación de la mutante Lys160Ala de la EcGNPD	22
Ensayos cinéticos	22
Análisis de datos y ajustes por regresión no lineal	23

Resultados y discusión 24

La ManN6P no es sustrato de la reacción desaminante de la EcGNPD 24

La inhibición causada por la ManN6P es distinta a la inhibición competitiva clásica en enzimas alostéricas 24

El fenómeno se puede describir por un modelo basado en el modelo original de Monod, Wyman y Changeux 25

La ManN6P como un inhibidor puramente alostérico 25

Modelo de MWC-Smith: inhibición competitiva 26

Modelo de MWC con inhibición competitiva y con unión del inhibidor al sitio alostérico 29

Contraste de las funciones de estado conformacional de un inhibidor que produce activación paradójica y de las funciones de estado de la ManN6P 34

La cinética de la EcGNPD a concentración saturante del activador alostérico GlcNAc6P, y con la ManN6P como un ligante fijo variable 36

La cinética de la mutante Lys160Ala de la EcGNPD con la ManN6P como un ligante fijo variable 38

La cinética de la EcGNPD silvestre con la ManNAc6P como un ligante fijo variable 39

Discusiones generales y perspectivas 41

Los parámetros cinéticos pueden confirmarse mediante experimentos de unión directa 41

La unión preferente de la ManN6P al sitio catalítico del conformero T desde un punto de vista estructural 41

El acoplamiento termodinámico de la inhibición alostérica y competitiva desde el punto de vista de diseño de inhibidores 45

Apéndice	46
Antecedentes: Constantes efectivas y constantes microscópicas	46
La construcción de un modelo basado en el de MWC: Modelo que explica la inhibición causada por la ManN6P	48
Bibliografía	58

Introducción

La Glucosamina 6-P desaminasa de *Escherichia coli* en el contexto celular

La Glucosamina 6-P desaminasa de *Escherichia coli* (**EcGNPD**) es una enzima involucrada en el catabolismo de aminoazúcares. Estos compuestos tienen una función estructural: son utilizados como unidades básicas en la síntesis del peptidoglicano y como precursores de los lipopolisacáridos de la pared celular de la bacteria. También son fuente de carbono y nitrógeno a través de la vía de utilización de los aminoazúcares, a la que pertenece la EcGNPD (1).

La enzima EcGNPD se encuentra codificada en el gen *nagB*, que forma parte del operón divergente *nagE-nagBACD* (2). La estructura y la función de los productos de los genes del operón están ilustradas en la Figura 1. El producto del gen *nagE* es un transportador fosfotransferasa que produce la *N*-acetil glucosamina 6-P (**GlcNAc6P**) a partir de la *N*-acetil glucosamina (GlcNAc). El producto del gen *nagA* es la GlcNAc6P desacetilasa, que produce la Glucosamina 6-P (**GlcN6P**) a partir de la GlcNAc6P (3). El producto del gen *nagD* es una fosfotransferasa de la familia HADSF.

La GlcN6P es el sustrato de la EcGNPD. La reacción catalizada por esta enzima produce el ion amonio y la Fructosa 6-P (**Fru6P**); la Fru6P entra en la vía glucolítica. La expresión de los genes *nagABE* se reprime por el producto del gen *nagC*, cuyo inductor es la GlcNAc6P (4).

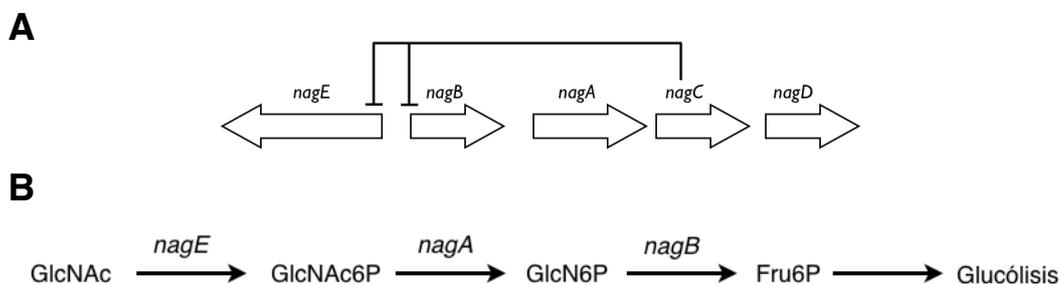


Figura 1. (A) Estructura del operón *nagE-nagBACD* (B) Función de los productos de los genes del operón *nagE-nagBACD*.

La reacción catalizada por la EcGNPD

La reacción reversible catalizada por la EcGNPD es la desaminación e isomerización del sustrato GlcN6P, dando como productos la Fru6P y el ión amonio (Figura 2). El mecanismo de reacción ha sido descrito previamente en detalle (5). El primer paso es la apertura del anillo piranósico de la GlcN6P; este paso es catalizado por el residuo His143 cuyo tautómero catalítico se estabiliza mediante interacciones con grupos carboxilo de aminoácidos cercanos, como el Glu148. El siguiente paso es la enolización catalizada por el residuo Asp72 que procede a través de una *cis*-enolamina (2-amino-2-deoxi-D-*arabino*-hex-2-enitol 6-fosfato) y su imina tautomérica (2-deoxi-2-imino-D-*arabino*-hexitol 6-fosfato). El grupo imino reacciona con una molécula de agua dando una carbinolamina inestable que finalmente se descompone en la forma carbonílica de la Fru6P y NH₃.

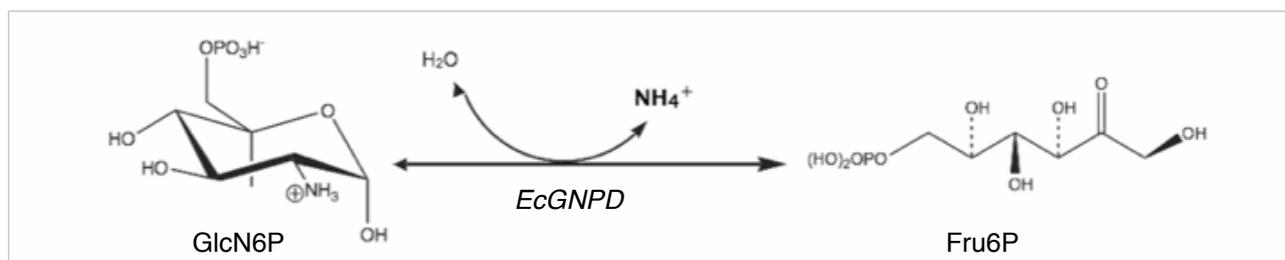


Figura 2. Reacción catalizada por la EcGNPD

La EcGNPD es un dímero de trímeros con seis sitios catalíticos y seis alostéricos

La unidad biológica de la enzima es un hexámero (6). Posee un eje cristalográfico de orden tres, y tres ejes de orden dos perpendiculares al de orden tres, que resulta en una simetría interna del tipo 32. El hexámero puede describirse como un trímero de dímeros o un dímero de trímeros dependiendo de la orientación del eje de simetría de orden tres con respecto al plano de observación (Figura 3).

El hexámero tiene seis sitios catalíticos localizados en cada subunidad, y seis sitios alostéricos formados en las interfases de las subunidades (6). El plegamiento de cada monómero de la enzima se asemeja al presente en un dominio de unión a NAD. El ligante fisiológico de los sitios catalíticos es la GlcN6P, y el ligante fisiológico de los sitios alostéricos es la GlcNAc6P.

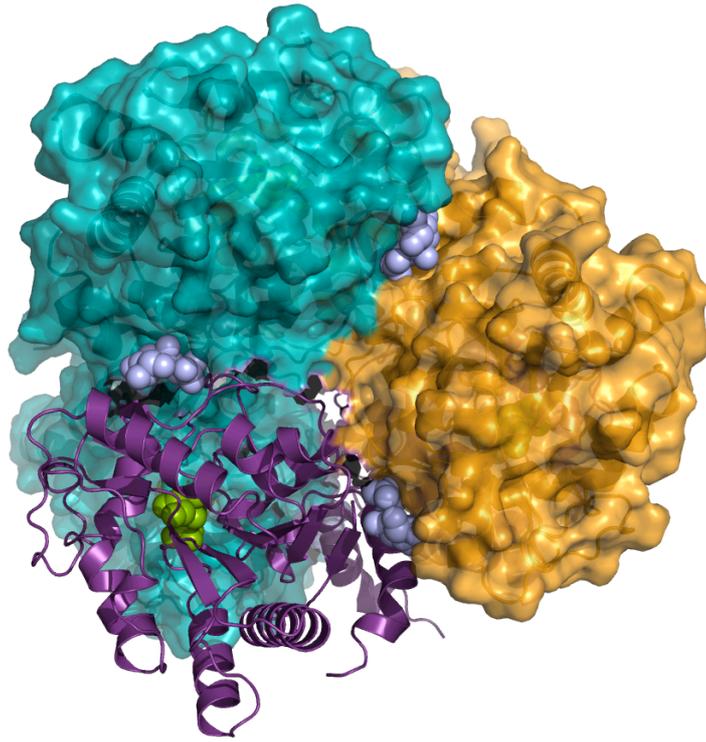
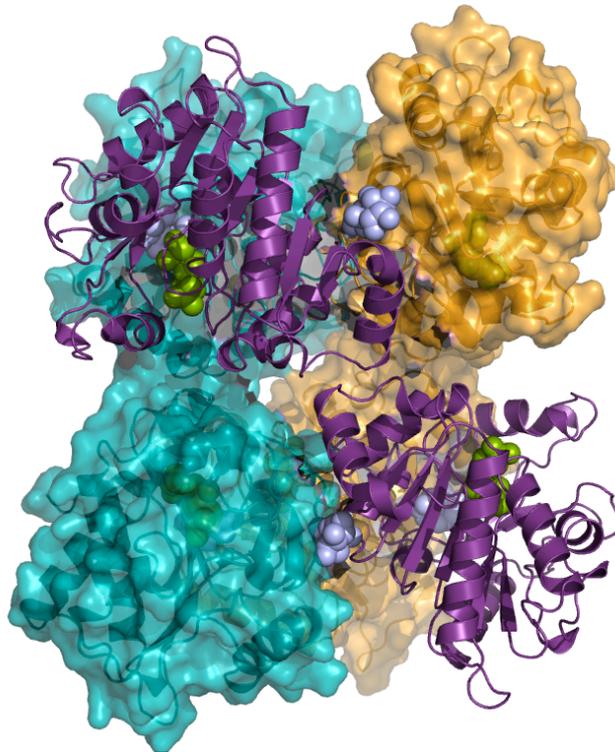
A**B**

Figura 3. Estructura de la EcGNPD en conformación R (PDB ID: 1HOR, 1HOT). Los ligantes del sitio catalítico están representados en esferas verdes, y los del sitio alostérico en esferas azules. Un dímero está representado en morado, otro en amarillo y el otro en azul. (A) Vista de la estructura con el eje de simetría de orden 3 perpendicular al papel, o vista del dímero de trímeros. (B) Vista de la estructura con el eje de simetría de orden 2 paralelo al papel, o vista de trímero de dímeros.

Alostería

En macromoléculas la alostería es una propiedad fisicoquímica que se manifiesta cuando la unión de un ligante en un sitio provoca cambios estructurales o electrónicos que perturban la afinidad en otros sitios. Los sitios alterados pueden ser **equivalentes o no equivalentes**; la afinidad perturbada en esos sitios puede ser por ligantes idénticos (**efectos homotrópicos**) o por ligantes que no tengan semejanza química (**efectos heterotrópicos**) (7).

La enzima EcGNPD es un sistema alostérico: la cinética sigmoide de desaminación de la GlcN6P tiene su origen en efectos homotrópicos (Figura 4), y la activación causada por la GlcNAc6P es un efecto heterotrópico. En las siguientes secciones se describen ambos fenómenos mediante el modelo propuesto en 1965 por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux (**MWC**) (8).

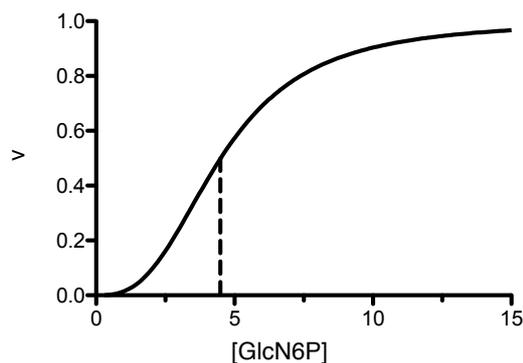


Figura 4. Simulación de la cinética de desaminación de la concentración de GlcN6P, un efecto homotrópico. La simulación se realizó con la *Ecuación 1* (pág. 7) con los parámetros $K_{SR}=0.55$, $c=0.041$, $L=2 \times 10^5$

Efectos homotrópicos

Las curvas de velocidad inicial en función de la concentración de GlcN6P de la enzima EcGNPD son sigmoideas. Se han propuesto varios modelos para describir curvas de ese tipo. El de MWC, a diferencia de modelos alostéricos anteriores, supuso una serie de consideraciones termodinámicas y estructurales que hicieron posible la descripción de la mayoría de las cinéticas sigmoideas conocidas al momento de su proposición.

La cinética de la EcGNPD también se puede describir mediante este modelo (Figura 5), y se basa en los siguientes supuestos:

Supuestos del Modelo de MWC para la EcGNPD

- Un confórmero es un complejo formado por seis subunidades idénticas.
- Existe un sitio catalítico en cada subunidad
- Hay dos confórmeros accesibles de manera reversible para la enzima: el T y el R.
- La estabilidad del confórmero T es mayor que la del R
- Los sitios catalíticos de los confórmeros T y R difieren en su afinidad por la GlcN6P. Los del confórmero R son más afines.
- La constante catalítica de los confórmeros es la misma.
- En solución y en ausencia de ligantes los dos confórmeros están en equilibrio.
- Los confórmeros T y R difieren en su estructura cuaternaria, pero se mantiene la simetría de la molécula. Es decir, si una subunidad del oligómero está en una conformación (R ó T), todas las demás subunidades están en la misma conformación. En la Figura 5 se ilustra la suposición de simetría constante mediante la representación de subunidades de confórmeros T con rombos azules, y las subunidades de confórmeros R con círculos verdes. Los confórmeros mixtos con rombos y círculos no existen, aún en la presencia de ligantes.

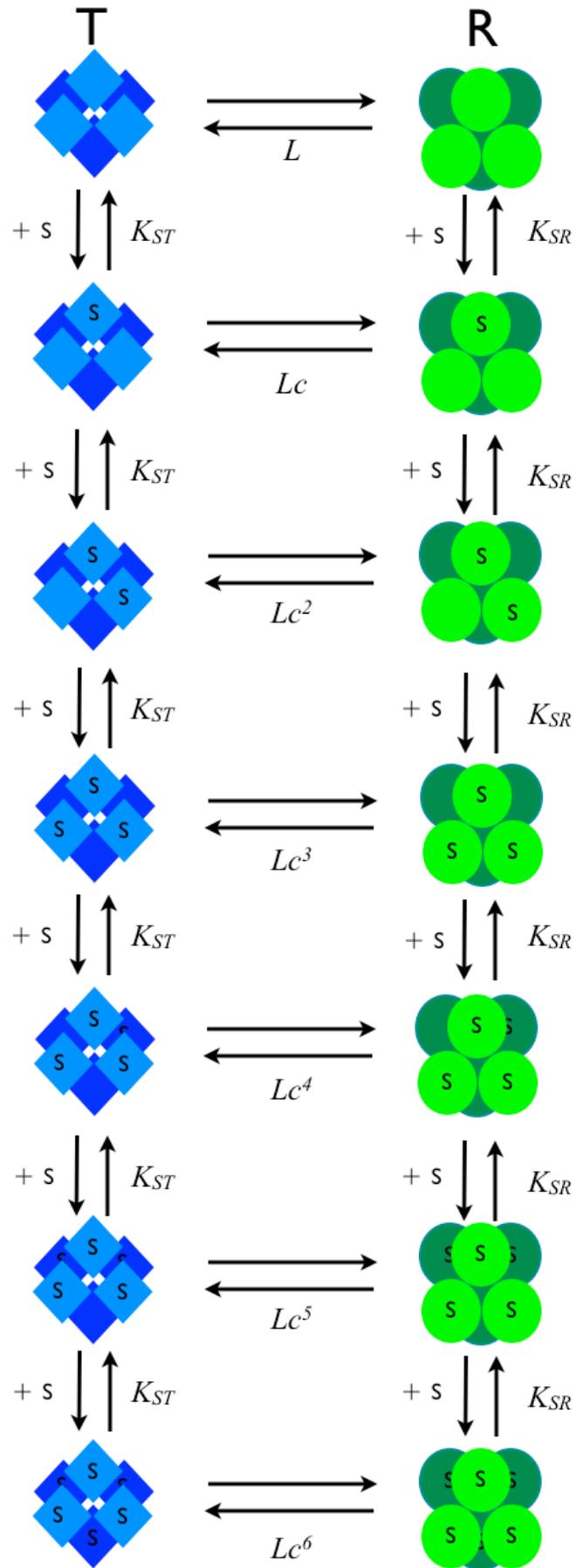


Figura 5. Ilustración del modelo de MWC para un hexámero.

La ecuación cinética que describe a un sistema con estas características es la *Ecuación 1*; representa el cociente de la concentración molar de los sitios catalíticos productivos sobre la concentración molar de todos los sitios catalíticos existentes en el sistema.

Los confómeros R y los T tienen sitios con la misma capacidad catalítica; el numerador de la ecuación es la sumatoria de la concentración molar de los sitios catalíticos productivos de R y de los sitios catalíticos productivos de T. En el denominador se expresa la sumatoria de la concentración molar de todos los sitios catalíticos presentes en el sistema, ligados o no ligados. Este cociente es igual al cociente de la velocidad inicial sobre la velocidad máxima. Siguiendo el código de colores de la Figura 5, en verde están sombreados los términos correspondientes a complejos en conformación R, y en azul están sombreados los términos correspondientes a complejos en conformación T.

Ecuación 1:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha+1)^{n-1} + Lc\alpha(c\alpha+1)^{n-1}}{(\alpha+1)^n + L(c\alpha+1)^n}$$

Donde:

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}} \quad c = \frac{K_{SR}}{K_{ST}} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

K_{SR} constante de disociación del sustrato y el sitio catalítico de R

K_{ST} constante de disociación del sustrato y el sitio catalítico de T

n es el número de subunidades, $n=6$ en la EcGNPD

En la Figura 6 se representa un experimento de velocidad inicial en función de la concentración de GlcN6P ajustado a la *Ecuación 1*. Los valores de los parámetros de ajuste están plasmados en la Tabla 1, junto con su interpretación.

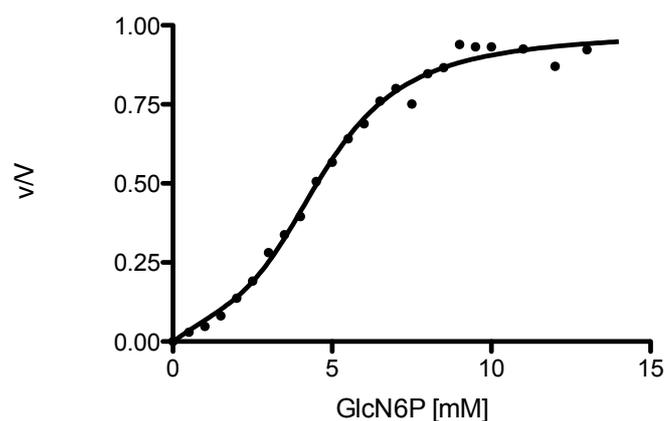


Figura 6. Velocidad inicial en función de la concentración de GlcN6P en ausencia de efectores alostéricos o inhibidores. Los datos están ajustados a la *Ecuación 1* utilizando los parámetros de la Tabla 1.

Parámetro	Valor \pm SD	Interpretación
K_{SR}	0.54 \pm 0.01mM	Afinidad de la GlcN6P por el sitio catalítico del conformero R
$L=[T_0]/[R_0]$	=200000	El conformero T predomina en ausencia de ligantes
$c=K_{SR}/K_{ST}$	0.0381 \pm 0.004	Los sitios catalíticos de los conformeros R son más afines por la GlcN6P que los del conformero T.
$K_{ST}=K_{SR}/c$	14.1 \pm 1.5 mM	Afinidad de la GlcN6P por el sitio catalítico del conformero T
n	=6	Es el número de subunidades en la EcGNPD
V	=1	Es la velocidad máxima, $V=k_{cat}E_t$

Tabla 1. Parámetros de ajuste de la Figura 6 a la *Ecuación 1* ($R^2=0.99$).

La forma de una curva descrita por el modelo de MWC tiene su origen en dos componentes relacionados con los valores de los parámetros de la Tabla 1: sensibilidad de la velocidad inicial al sustrato y la amplificación de la sensibilidad.

La sensibilidad al sustrato se puede observar cualitativamente en la parte inferior de la curva sigmoide (8); está determinada cuantitativamente por los valores de los parámetros

L y c . Entre más grande sea L , o en otras palabras entre mayor sea la diferencia en estabilidad entre los confórmers R_0 y T_0 , mayor será la cooperatividad. Entre menor sea c , o en otras palabras entre más extrema sea la diferencia de afinidades por el sustrato entre los sitios de los confórmers R y T, mayor será la cooperatividad.

El número de subunidades presentes en el oligómero es el factor que determina la amplificación de la sensibilidad al sustrato en un sistema donde predominan confórmers de baja afinidad (8). En el mecanismo de la Figura 5 se tienen que satisfacer los equilibrios entre cada uno de los complejos del sistema y el sustrato. Estos equilibrios están expresados por constantes de disociación/unión efectivas (Apéndice p. 46), que a su vez se relacionan con las constantes microscópicas K_{SR} , K_{ST} y L mediante una función termodinámica vinculada. El origen de la amplificación de la sensibilidad al sustrato es la naturaleza sinérgica de estas relaciones: no son funciones aditivas, sino que están expresadas como productos de potencias. Esto se puede mostrar utilizando como ejemplo la función termodinámica vinculada para los complejos RS_6 :

$$\frac{[RS_6]}{[R_0][S]^6} = \frac{1}{K_{SR}^6} = 36.12$$

Asumiendo que la concentración de sustrato libre y sustrato total es la misma, el equilibrio establecido por el inverso de la potencia 6 de K_{SR} es una función de potencia 6 de la concentración de sustrato, de la concentración de los complejos RS_6 y de los confórmers no ligados R_0 . Hay una expresión de este tipo para cada uno de los complejos del sistema, obviamente las potencias de cada una de esas expresiones son función de la estequiometría del sustrato en dicho complejo. La ecuación de MWC es una función que agrupa las expresiones termodinámicas vinculadas tanto de los complejos T como de los R, dos sistemas inherentemente sinérgicos; como mencionamos anteriormente, la vinculación entre los dos sistemas se realiza mediante la declaración de una constante alostérica que expresa el equilibrio entre los confórmers no ligados R_0 y T_0 : el parámetro L .

Ahondando sobre la proposición de que la oligomerización es esencial para la existencia de la cooperatividad, consideremos el siguiente sistema: en un monómero podría existir un equilibrio entre confórmers de baja afinidad (t) y de alta afinidad (r), donde el de baja afinidad predominase en ausencia de ligantes ($L > 1$). El ligante sí desplazaría el equilibrio hacia formas R, sin embargo no lo haría de manera cooperativa porque la unión de sustrato a un confórmero R nunca sería sinérgica.

El comportamiento dinámico del sistema que da lugar al establecimiento del estado de equilibrio es desconocida. Partiendo de un sistema en equilibrio en presencia de una concentración nanomolar de sustrato; donde $v_{[TS]}$ es la velocidad de formación del complejo TS a partir del complejo T_0 , $v_{[R]}$ es la velocidad de formación del complejo R_0 a partir del complejo T_0 , sea $v_{[RS]}$ la velocidad de formación del complejo RS a partir de R_0 y S , sea $v_{[Rdis]}$ la velocidad de disociación del complejo RS dando como productos R_0 y S , sea $v_{[Tdis]}$ la velocidad de disociación del complejo TS dando como productos T_0 y S . Las ecuaciones cinéticas que describen las primeras uniones del mecanismo son:

$$\begin{aligned}
 v_{[TS]} &= 6 \cdot k_{1T} [T_0] [S] & v_{[Tdis]} &= k_{-1T} [TS] & K_{SR} &= \frac{k_{-1R}}{k_{1R}} = 0.55 \text{ mM} \\
 v_{[RS]} &= 6 \cdot k_{1R} [R_0] [S] & v_{[Rdis]} &= k_{-1R} [RS] & K_{ST} &= \frac{k_{-1T}}{k_{1T}} = 14.5 \text{ mM} \\
 v_{[R]} &= k_{1L} [T_0] & v_{[T]} &= k_{-1L} [R_0] & L &= \frac{k_{-1L}}{k_{1L}} = 2 \times 10^5
 \end{aligned}$$

Observando la formación de cada complejo en función del tiempo, la secuencia de eventos que pueden ocurrir al pasar el sistema a altas concentraciones de sustrato estaría descrito por la solución de un sistema de ecuaciones diferenciales para cada uno de los complejos RS_i y TS_i donde $i \in (0, n) \in \mathbb{N}$. Las variables del sistema serían las constantes cinéticas de pegue (k_{1T} y k_{1R}) y de disociación (k_{-1T} y k_{-1R}) que pueden tomar valores limitados por la difusión ($10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), y las constantes cinéticas alostéricas k_{1T} y k_{1R} . No conocemos los valores absolutos de dichas constantes, solamente conocemos su valor relativo a partir de la suposición de equilibrio rápido de experimentos cinéticos y de experimentos de unión en equilibrio. Tampoco se ha modelado el sistema de ecuaciones,

por lo que el comportamiento dinámico del sistema alostérico en la EcGNPD es un tema aún por explorar.

En la EcGNPD, además de la cinética de desaminación del sustrato GlcN6P, la unión de la GlcNAc6P y del análogo del estado de transición GlcN-ol-6P se ajustan al modelo de MWC; los valores de los parámetros que varían entre ligantes son aquellos que describen la afinidad por cada conformero: sin embargo, el parámetro L es constante para todos, ya que el sistema en ausencia de ligantes es el mismo.

Finalmente, en un esquema libre de modelo, cuando se habla de efectos homotrópicos o cooperativos, se requieren dos entidades fisicoquímicas para construir una definición: un solo tipo de ligante y un solo conjunto de sitios equivalentes. Un efecto homotrópico se manifiesta cuando la unión de un ligante en un sitio altera las *constantes de disociación microscópicas* por ese mismo tipo de ligante en otros sitios equivalentes.

Efectos heterotrópicos

Cuando la unión de un ligante en un sitio altera las *constantes de disociación microscópicas* por un ligante sin semejanza química en sitios equivalentes o no equivalentes, se manifiesta un efecto heterotrópico. La regulación ejercida por efectores alostéricos es un efecto heterotrópico; la regulación alostérica se clasifica en inhibición alostérica y activación alostérica. En la EcGNPD hay activación alostérica provocada por la unión del efector GlcNAc6P; al igual que los efectos homotrópicos, se ha descrito mediante el modelo de MWC.

La activación alostérica tiene lugar sobre la cinética homotrópica, por lo que se mantienen constantes las definiciones y los parámetros de la Tabla 1: el sustrato GlcN6P se une preferentemente a los sitios catalíticos de conformeros R, y la enzima está en equilibrio entre los conformeros R y T; este último es más estable en ausencia de ligantes. El supuesto que se añade al modelo heterotrópico es la existencia de un conjunto de sitios alostéricos equivalentes entre sí, y la unión de GlcNAc6P a dichos sitios.

Si analizamos la velocidad inicial en función de GlcN6P en presencia de concentraciones fijas de GlcNAc6P (Figura 7A), se observa que a medida que aumenta la concentración

de GlcNAc6P las curvas van aproximándose a hipérbolas. La explicación que el modelo de MWC da a este fenómeno es que la unión de la GlcNAc6P y de la GlcN6P se favorecen de manera recíproca.

Al igual que en el efecto homotrópico, la expresión termodinámica vinculada para el complejo RS_6A_6 sería:

$$\frac{[RS_6A_6]}{[R_0][S]^6[A]^6} = \frac{1}{K_{SR}^6 K_{aR}^6}$$

A partir de esta expresión podemos realizar la siguiente proposición: la estabilización de complejos de alta estequiometría (para cada uno de los ligantes) se favorece mucho más con los dos ligantes en el sistema que en la presencia de uno solo de ellos. Además de que el equilibrio está determinado por una función de potencias, ésta es a su vez un producto de las mismas. Obviamente hay una expresión de este tipo para cada uno de los complejos en el sistema, y hay una ecuación de MWC que describe la respuesta sumada de todos los complejos en dicho sistema, la cual analizaremos más adelante. Como la unión del activador es a sitios distintos a los que ese une el sustrato, no es mutuamente excluyente y no hay competencia entre ligantes. Si se invierte el experimento y se observa la unión de GlcNAc6P con GlcN6P a concentraciones fijas, este último también es un activador alostérico para la unión de la GlcNAc6P.

En la EcGNPD no se ha observado inhibición alostérica, el otro caso de los efectos heterotrópicos. De manera hipotética, una inhibición alostérica se manifestaría en la EcGNPD si un ligante que denominaremos Inhibidor se uniera a los sitios alostéricos de los confórmeros T. Si se analizara la catálisis de la GlcN6P, al aumentar la concentración del inhibidor el equilibrio se desplazaría hacia la conformación T. Como la GlcN6P tiene baja afinidad por este confórmero, a medida que aumentara la concentración del inhibidor las curvas tenderían a ser hiperbólicas con un aumento en la constante de disociación para la GlcN6P (Figura 7B). A concentraciones saturantes de inhibidor la constante de disociación para la GlcN6P tomaría el valor de K_{ST} de la *Ecuación 1* (página 7). En la EcGNPD, un inhibidor alostérico nunca sería un inhibidor total asumiendo que los dos confórmeros son igualmente catalíticos.

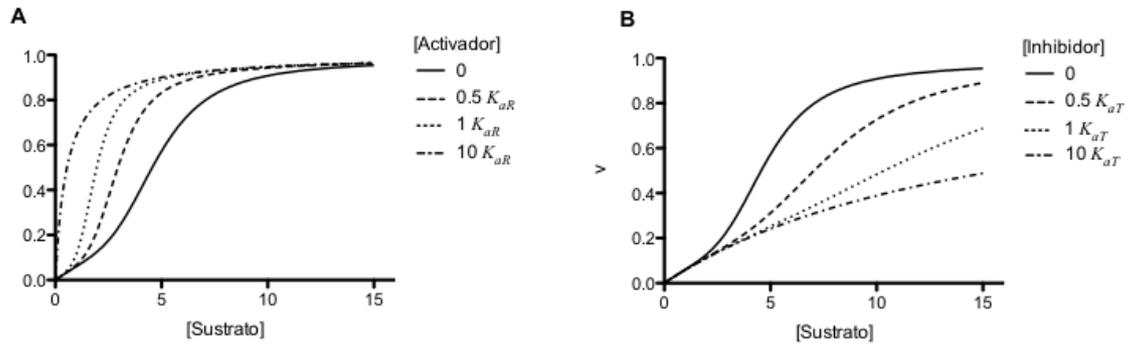


Figura 7. Simulaciones de efectos heterotr3picos. (A) Efecto de un activador alost3rico. (B) Efecto de un inhibidor alost3rico.

La ecuaci3n cin3tica que describe la activaci3n y la inhibici3n causada por efectores alost3ricos se construye a partir la *Ecuaci3n 1*: el numerador de la ecuaci3n es la sumatoria de la concentraci3n molar de los sitios catal3ticos productivos de R y de los sitios catal3ticos productivos de T; y en el denominador se expresa la sumatoria de la concentraci3n molar de todos los sitios catal3ticos tanto en R como en T. La diferencia entre la ecuaci3n con efectores alost3ricos y la ecuaci3n general consiste en la adici3n de complejos adicionales a la sumatoria: los complejos con efector alost3rico. Estos complejos est3n descritos por expresiones como la descrita en la p3gina anterior; se a3adan estos complejos a las sumatorias del numerador y del denominador de la ecuaci3n de MWC, se ordenan algebraicamente (ver ap3ndice) y se obtiene:

Ecuaci3n 2:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha+1)^{n-1} + L \frac{(1+e\theta)^n}{(1+\theta)^n} c\alpha(c\alpha+1)^{n-1}}{(\alpha+1)^n + L \frac{(1+e\theta)^n}{(1+\theta)^n} (c\alpha+1)^n}$$

Donde:

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}} \quad c = \frac{K_{SR}}{K_{ST}} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]} \quad K_{aR} \text{ constante de disociaci3n del efector y el sitio alost3rico de R}$$

$$\theta = \frac{[A]}{K_{aR}} \quad e = \frac{K_{aR}}{K_{aT}} \quad K_{aT} \text{ constante de disociaci3n del efector y el sitio alost3rico de T}$$

$$n \text{ es el n3mero de subunidades}$$

Si definimos a L' como la constante alostérica aparente:

Ecuación 3:

$$L' = L \frac{(1 + e\theta)^n}{(1 + \theta)^n}$$

Se sustituye L' en la *Ecuación 2*:

Ecuación 4:

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

La *Ecuación 4* tiene la misma forma que la ecuación general de MWC (*Ecuación 1*), donde L se sustituye por la constante alostérica aparente L' . Se pueden obtener todos los parámetros a partir de experimentos de velocidad inicial en función de sustrato donde varía la concentración de efector alostérico como los ilustrados en la Figura 7, realizando un ajuste global a la *Ecuación 4* definiendo L' como en la *Ecuación 3*.

Una forma alternativa al ajuste global de analizar los efectos heterotrópicos, es realizar experimentos cinéticos a distintas concentraciones de efector alostérico y ajustar cada una de las curvas a la ecuación general de MWC (*Ecuación 1*), manteniendo c y K_{SR} como parámetros compartidos y variando L . Si se re grafica L en función de la concentración del efector alostérico, podemos redefinir la variable dependiente como L' (Figura 8) y ajustar el gráfico a la *Ecuación 3*. Según esta ecuación, L' depende del valor de la constante L que se puede obtener de la serie del experimento en ausencia de efectores alostéricos. L' también depende de un cociente que incluye a θ , la concentración específica del efector; y al parámetro e , que multiplica a θ en el numerador de dicho cociente.

De manera análoga al parámetro c , el parámetro e define la exclusividad o preferencia de unión del efector por los sitios alostéricos de algún conformero, por lo que dependiendo de su valor se observan distintos patrones para el valor de L' en función de la concentración de efector.

Por ejemplo, si $e=1$ el cociente que multiplica a L en la *Ecuación 3* vale 1. En este caso el efector tiene la misma afinidad por sitios alostéricos R y T y estabiliza a ambos; y su unión no tiene consecuencia alguna sobre la cinética o unión del otro ligante; L' será constante (línea continua en la Figura 8).

Si $e>1$, el efector se une preferentemente a sitios alostéricos de T, y estabiliza este conformero. Según la *Ecuación 3*; L' aumenta a medida que aumenta θ (línea punteada en la Figura 8). En este caso el efector es un inhibidor alostérico. Cuando $e\gg>1$, el inhibidor tiene unión exclusiva a sitios alostéricos de T, también hay un aumento de L' en función del efector, y el equilibrio se puede desplazar totalmente hacia conformeros T a concentraciones saturantes de inhibidor.

Si $e<1$, el efector tiene preferencia por sitios alostéricos de R y a medida que aumenta su concentración estabiliza estos conformeros. Según la *Ecuación 3*, el valor de L' disminuye a medida que incrementa θ (línea discontinua en la Figura 8), el equilibrio es desplazado hacia conformeros R, por lo que el efector es un activador alostérico. Este fenómeno sucede también cuando $e=0$, donde hay exclusividad por sitios alostéricos de R. El numerador de la *Ecuación 3* toma el valor de 1, por lo que todo el equilibrio se puede desplazar hacia R a concentraciones saturantes de activador.

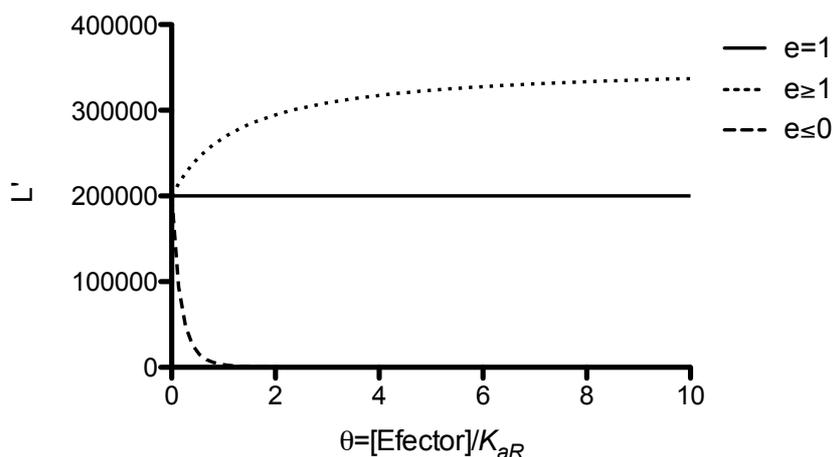


Figura 8. Simulación realizada con *Ecuación 3* utilizando los parámetros $L=200000$, $K_{aR}=1$, $n=6$. El valor de e es variable para cada curva y se aprecia en la acotación de la figura.

La activación ejercida por la GlcNAc6P sobre la cinética sigmoide de la EcGNPD se ha analizado tanto por el método de ajuste global como por el método de regráfico de L' . Los parámetros obtenidos del trabajo de Bustos-Jaimes (9) son los siguientes:

Parámetro	Valor	Interpretación
K_{aR}	0.030 mM	Afinidad de la GlcNAc6P por el sitio alostérico de los confórmers R
$e = K_{aR}/K_{aT}$	0	La unión de la GlcNAc6P es exclusiva de los sitios alostéricos de los confórmers R. A concentraciones saturantes de GlcNAc6P todas las moléculas de enzima están en conformación R.

Tabla 2. Parámetros que describen la activación ejercida por la GlcNAc6P sobre la cinética de la EcGNPD obtenidos del trabajo de Bustos-Jaimes *et. al* (9)

Inhibición competitiva en enzimas alostéricas

Cuando un sustrato y un inhibidor se unen de manera mutuamente excluyente a los sitios catalíticos de una enzima alostérica, hay un efecto de inhibición competitiva. Smith *et. al* propusieron que además del componente competitivo, la inhibición tiene un componente alostérico (10). Predicen teóricamente que este componente alostérico puede dar lugar a dos fenómenos.

El primero ha sido reportado con más frecuencia en la literatura (11) (12) (13) (14), y se le ha denominado 'activación paradójica'. En la EcGNPD se ha observado este efecto sobre la cinética de la GlcN6P en presencia del análogo de transición GlcN-ol-6P (9). En ese reporte se observa que en las curvas de velocidad inicial en función de la concentración de GlcN6P a concentraciones fijas de GlcN-ol-6P hay una activación a concentraciones bajas de ambos ligantes. Explicado bajo el modelo de MWC-Smith, esta activación se debe a la afinidad mayor de la GlcN-ol-6P por los sitios catalíticos de los confórmers R ($K_{IR}=0.002\text{mM}$). A concentraciones bajas la unión de sustrato e inhibidor se favorecen de manera recíproca, promoviendo la formación de complejos en los que la estequiometría del sustrato es mayor que la de los complejos que se podrían formar a la misma concentración de sustrato pero en ausencia del inhibidor competitivo. Al aumentar la concentración de GlcN-ol-6P el efecto alostérico de activación se hace menos evidente ya

que el efecto competitivo predomina, o sea la formación de complejos con una estequiometría predominante de inhibidor.

El segundo caso que predijo Smith es aquel en el que un inhibidor se une con mayor afinidad a los sitios catalíticos de los confórmers T. El resultado de este comportamiento es una inhibición dual: además de la competencia, el inhibidor favorece la población de confórmers de baja afinidad por el sustrato. Esta estabilización se favorece además por el predominio de dichos confórmers, descrito por un valor $L > 1$. Hay un efecto inhibitorio en todo el intervalo de concentraciones, y no se observa la activación paradójica. En la EcGNPD no se había observado un efecto de este tipo hasta la realización de esta tesis.

La ecuación cinética propuesta en el modelo de MWC-Smith aplicada para la EcGNPD (Ecuación 5) se basa en el modelo general de MWC, por lo que los parámetros K_{SR} , L , c vuelven a aparecer en la ecuación. Los términos adicionales son aquéllos correspondientes a la unión mutuamente excluyente de la GlcN6P y del inhibidor por los sitios catalíticos tanto de los confórmers R como de los confórmers T. La unión del inhibidor está expresada en el parámetro β , su concentración específica. En la definición de β se incluye el parámetro K_{IR} , la afinidad del inhibidor por el sitio catalítico de R.

Ecuación 5:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha + \beta + 1)^{n-1} + Lc\alpha(c\alpha + d\beta + 1)^{n-1}}{(\alpha + \beta + 1)^n + L(c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Donde:

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}} \quad c = \frac{K_{SR}}{K_{ST}} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

$$\beta = \frac{[I]}{K_{IR}} \quad d = \frac{K_{IR}}{K_{IT}}$$

K_{SR} constante de disociación del sustrato y el sitio catalítico de R

K_{ST} constante de disociación del sustrato y el sitio catalítico de T

K_{IR} constante de disociación del inhibidor y el sitio catalítico de R

K_{IT} constante de disociación del inhibidor y el sitio catalítico de T

n es el número de subunidades

De manera análoga al parámetro c , el parámetro d define la exclusividad o preferencia de unión del inhibidor por algún conformero: $d=1$ misma afinidad por los sitios catalíticos de R y T. Si $d<1$ hay preferencia por los sitios catalíticos de R; este valor da lugar a la activación paradójica. En el caso de la GlcN-ol-6P $d=0.07$ (9). Si $d=0$ hay exclusividad por los sitios catalíticos de R; este valor también da lugar a la activación paradójica. Cuando $d>1$ hay preferencia por los sitios catalíticos T; este valor da lugar al segundo caso de MWC-Smith: la inhibición dual. Si $d\gg>1$ hay exclusividad por los sitios catalíticos T; este valor también da lugar al segundo caso de MWC-Smith.

La estructura de la EcGNPD en distintas conformaciones y con distintos ligantes

Las estructuras del conformero T y del conformero R de la EcGNPD han sido resueltas por difracción de rayos X. Se ha resuelto la estructura en ausencia de ligantes (15, 16), conformero que ha sido denominado como el conformero T. La estructura del conformero R fue resuelta mediante la cocrystalización o “soaking” con distintos ligantes, como el análogo de transición GlcN-ol-6P (6), el producto Fru6P (16), iones fosfato (6, 16), y el activador GlcNAc6P (6).

Los conformeros R y T difieren en su estructura cuaternaria: la rotación de cada subunidad alrededor de un eje perpendicular al eje de orden 3 del oligómero y un acercamiento entre las interfases intermonoméricas. También hay un cambio en la movilidad de una región denominada “tapa del sitio catalítico”, la cual ha sido considerada como un componente entrópico esencial en la transición alostérica de la enzima (17).

Además, hay una serie de cambios geométricos locales en cada subunidad, especialmente en un asa que consiste en los residuos 144-154. Esta asa contiene al residuo Glu148, cuya red de contactos en el estado R es exclusiva con residuos del sitio catalítico (His143) y en el estado T es con residuos del sitio alostérico (Lys160).

La Manosamina 6-P (ManN6P)

El análogo del estado de transición GlcN-ol-6P se ha utilizado previamente en la caracterización del mecanismo de reacción (5) y en la resolución de estructuras tridimensionales (6, 16) de la EcGNPD. Sin embargo, no se había explorado el potencial de otros análogos ni del estado de transición ni del sustrato.

La ManN6P es el epímero en el carbono 2 del sustrato GlcN6P (Figura 9). Originalmente, la ManN6P fue concebida como un auxiliar en la caracterización del mecanismo químico de la EcGNPD. Uno de los experimentos complementarios a ese proyecto, era caracterizar el patrón de inhibición sobre la reacción completa de desaminación de la GlcN6P. Este experimento tenía como objetivo analizar si la ManN6P era un ligante del sitio catalítico. Lo que se descubrió fue que la inhibición no guardaba ninguna similitud con la causada por otros inhibidores de la enzima. Además, esta inhibición era muy similar a la inhibición dual que predijo Smith, de cuya existencia en la EcGNPD no había evidencia; además, las pruebas de su manifestación en otras enzimas son escasas. También se sintetizó ManNAc6P, el análogo del activador GlcNAc6P, ya que a diferencia de la ManN6P, sí es un metabolito fisiológico y podría ser un regulador de la vía de utilización de los aminoazúcares (18). El objetivo de este trabajo es caracterizar los efectos inhibitorios de la ManN6P sobre la cinética de desaminación de GlcN6P catalizada por EcGNPD y proponer un modelo cinético que los describa.

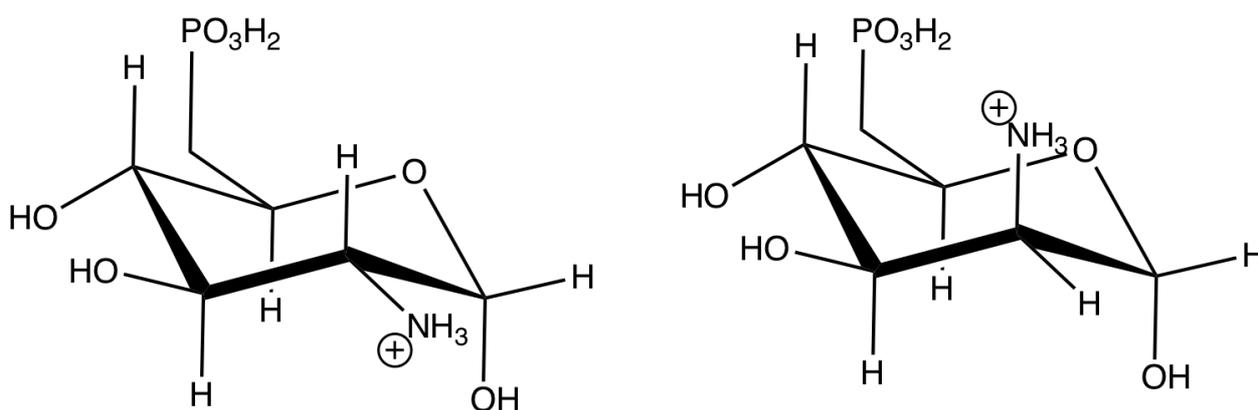


Figura 9. α -D-GlcN6P (izquierda) y α -D-ManN6P (derecha) en forma piranósica.

Materiales y métodos

Síntesis de la Manosamina 6-Fosfato (ManN6P)

Se logró la fosforilación de *D*-ManN catalizada por hexocinasa de levadura siguiendo la metodología publicada por Cochrane *et al.* (19). En un volumen de 160 ml se preparó una solución MgCl₂ 26 mM, se añadieron 6.0 mmoles de ManN (clorhidrato) y 6.6 mmoles de ATP (sal disódica). Se ajustó el pH a 7.5 con KOH 0.5 M. La reacción se desencadenó con 1320 U de hexocinasa de levadura (Sigma H4502). Durante el curso de la reacción se mantuvo un pH de 7.5 añadiendo KOH 0.5 M cada 30 min. El curso de la reacción se siguió mediante cromatografía de placa fina. Se corrió 1 µL de la solución a distintos tiempos en placas de sílice en el disolvente 5:2:1:1 (EtOH:AcO(NH₄) 1 M: AcOH:H₂O), después se reveló la placa mediante el rociado de una solución de ninhidrina 0.4% en ButOH saturado de H₂O (Figura 10) y se calentó durante 2 min a 100° C en horno convencional. Se consideró la reacción como finalizada cuando el pH se mantuvo estable en 7.5. El tiempo total de la reacción fue de 3.5 h. Posteriormente se añadió HCl concentrado hasta obtener un pH de 3.9 para evitar reacciones de autocondensación.

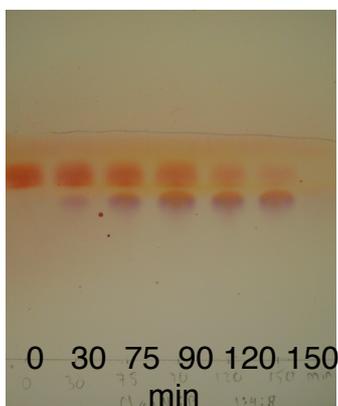


Figura 10. Curso temporal de la reacción de fosforilación de la ManN, desde t=0min hasta t=150min. Placa de TLC corrida con el disolvente 5:2:1:1 y revelada con ninhidrina

El producto se pasó a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min por una columna de 50x3 cm empacada con Dowex 50 H⁺. Los productos de elución se evaluaron por spot test en placas de TLC, utilizando absorbancia de luz UV para detectar nucleótidos o el revelado por ninhidrina descrito anteriormente para detectar aminoazúcares. Se recuperaron en el

frente tubos con ATP y sin aminoazúcares. Posteriormente se eluyó la columna con 500 ml de H₂O a un flujo de 1.7 ml/min. Se colectaron más tubos con ATP y sin aminoazúcares, y posteriormente se colectaron tubos sin ATP y con aminoazúcares. Se juntaron estas últimas fracciones dando un volumen de 300 ml, el cual se evaporó al vacío durante 72 h. Se recuperó una mezcla de sólidos cristalinos amarillos y blancos. La masa se resuspendió en MeOH y se liofilizó durante 12 h. El producto se resuspendió en H₂O y se pasó por un filtro de 2 µm. Se liofilizó durante 48 h dando 750 mg de un sólido cristalino blanco homogéneo. El rendimiento de la reacción y purificación fue del 46%. La pureza del producto fue evaluada por placas de TLC (Figura 11A), y espectrometría de masas (Figura 11B).

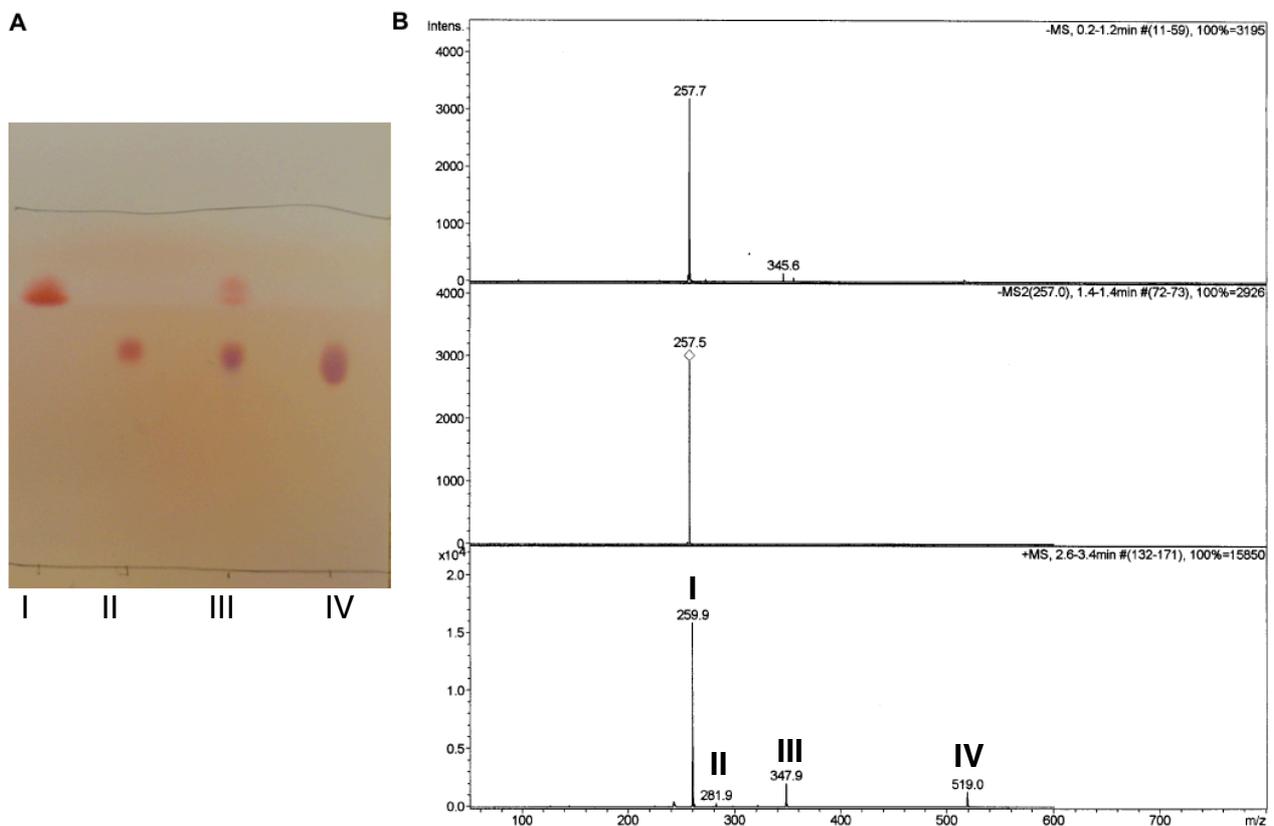


Figura 11. (A) Placa de TLC corrida en disolvente 5:2:1:1 (ver texto). La muestra del carril I es la GlcN, el carril II es la GlcN6P, el carril III es la reacción de fosforilación de la ManN a los 90 min, y el carril IV es la ManN6P purificada. (B) Espectro de masas por electrospray. En los dos paneles superiores se muestran la ionización aniónica, con un solo pico correspondiente a la masa de la ManN6P⁻. En el panel inferior la ionización catiónica, con varios picos. El primero (I) corresponde a la ManN6P totalmente protonada, el siguiente pico (II) representa la sal de Na⁺, el siguiente pico (III) son productos indeterminados, y el último pico (IV) es el dímero ManN6P-ManN6P, el cual ha sido reportado previamente (20).

Síntesis de la *N*-Acetil Manosamina 6-P (ManNAc6P)

Se utilizaron 500 mg de ManN6P en presencia de un exceso estequiométrico de anhídrido acético en un volumen de 9.5 ml de H₂O y 500 ul de metanol. Se incubó la reacción a 277 K durante 4 horas. El producto fue pasado a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min por una columna de 15.0x1.0 cm empacada con Dowex 50 H⁺. Se concentró al vacío y se verificó la pureza del producto por medio de placas de TLC utilizando el disolvente de corrida 5:2:1:1 (ver síntesis de ManN6P). La placa fue revelada introduciéndola en un recipiente sellado con cristales de Yodo durante 2 min.

Expresión y purificación de la EcGNPD silvestre

La enzima silvestre (gen *nagB*) fue expresada mediante un vector pTZ18R en la cepa *590Δnag* (5). La purificación se realizó por cromatografía de afinidad alostérica (21)

Expresión y purificación de la mutante Lys160Ala de la EcGNPD

La mutación del gen *nagB* insertado en el vector pTZ18R se realizó por mutagénesis sitio-dirigida por oligonucleótidos usando el kit Stratagene QuickChange según los procedimientos descritos por el fabricante. La expresión se realizó de la forma descrita para la enzima silvestre. Debido a que la mutación provoca una pérdida de afinidad en el sitio alostérico la enzima no pudo ser purificada por afinidad alostérica. Por lo tanto, se realizó por cromatografía de intercambio iónico. La enzima en sulfato de amonio (40-55%) se dializó contra 100 mM Tris-acetato pH 8.5 y aplicada a una columna 16/10 Mono-Q equilibrada con el mismo amortiguador. La enzima fue eluída con un gradiente lineal de acetato de potasio (0-0.4 M) preparado en el buffer 40 mM Tris-Acetato pH 8.5. La enzima eluyó alrededor de una concentración 0.2 M. Las fracciones se recolectaron y se pasaron por la misma columna bajo las mismas condiciones. La pureza de la enzima se verificó por medio de SDS-PAGE.

Ensayos cinéticos

Los ensayos cinéticos se realizaron a pH 7.7 a 30° C, en 50 mM TRIS-HCl, 15 mM EDTA (21, 22). La formación de producto se cuantifica a tiempo fijo mediante el ensayo de

Seliwanoff, midiendo la absorbancia del producto a 512 nm (21). La ManN6P se diluyó en H₂O y se mantuvo a 4° C hasta ser añadida a la mezcla de reacción.

Análisis de datos y ajustes por regresión no lineal

Las regresiones no lineales y simulaciones fueron realizadas en el programa GraphPad Prism®. Los datos de los experimentos cinéticos fueron normalizados a la V_{max} del control sin inhibidor. Los modelos estructurales fueron generados con el programa Pymol versión educativa.

Resultados y discusión

La ManN6P no es sustrato de la reacción desaminante de la EcGNPD

Para descartar que la reacción $\text{ManN6P} \rightarrow \text{Fru6P} + \text{NH}_4$ fuese catalizada por la EcGNPD, se realizó un ensayo cinético utilizando ManN6P como sustrato. Las absorbancias obtenidas a 512 nm fueron nulas. La ManN6P no es sustrato de la reacción completa catalizada por la EcGNPD.

La inhibición causada por la ManN6P es distinta a la inhibición competitiva clásica en enzimas alostéricas

Para evaluar la naturaleza de la inhibición por ManN6P se realizaron ensayos cinéticos utilizando la GlcN6P como sustrato y la ManN6P como ligante fijo variable (Figura 12A). A primera vista es evidente que el fenómeno de inhibición es distinto a la mayoría de los fenómenos reportados para inhibidores competitivos de enzimas alostéricas, ya que como se menciona en la introducción, en esos casos el inhibidor a concentraciones bajas ocasiona activación a concentraciones bajas de sustrato (Figura 12D). Como caracterización cuantitativa inicial del fenómeno se usó la ecuación de Hill, la cual provee dos parámetros que describen a una curva sigmoide: el coeficiente de Hill h , que describe la sigmoidicidad cuando $h > 1$; y el parámetro $K_{0.5}$, que representa el punto de inflexión. Al realizar un ajuste a dicha ecuación manteniendo como constante la velocidad máxima, el parámetro $K_{0.5}$ aumenta en función de la concentración de ManN6P y no hay una alteración significativa en el coeficiente de Hill (Figuras 12B, 12C). El comportamiento de estos parámetros en función de ManN6P también difiere del reportado para la mayoría de inhibidores competitivos de enzimas alostéricas, donde el parámetro $K_{0.5}$ aumenta en función del ligante, y hay una abolición total de la cooperatividad a medida que se alcanzan concentraciones saturantes de inhibidor (Figura 12E, 12F)

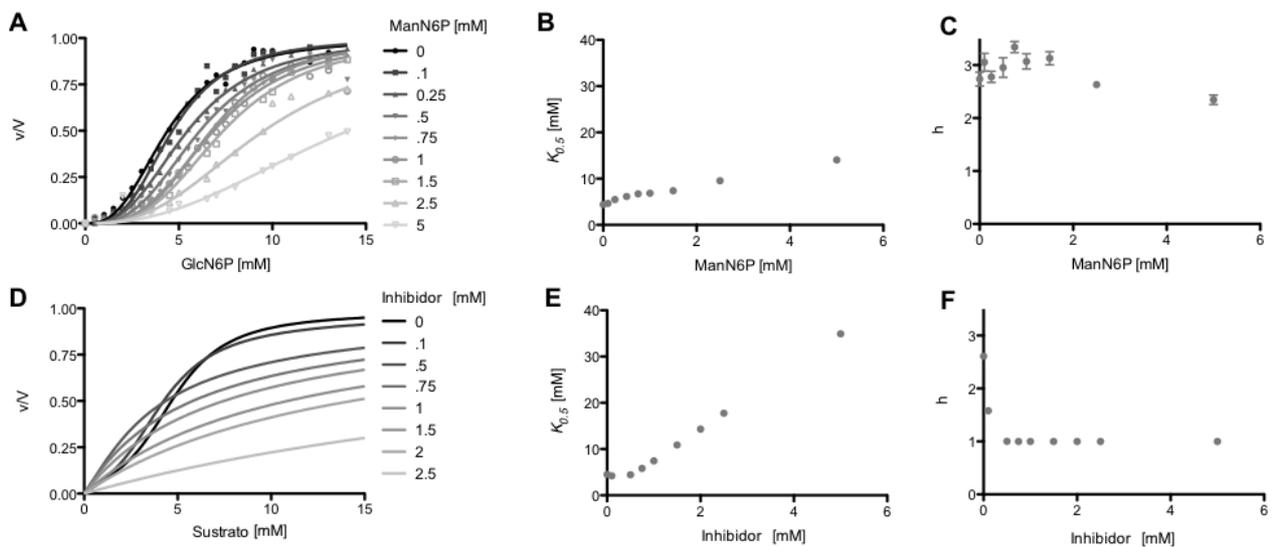


Figura 12. (A) Velocidades iniciales en función de [GlcN6P] a distintas concentraciones de ManN6P. El ajuste es a la ecuación de Hill. (B) Parámetro $K_{0.5}$ en función de [ManN6P] del ajuste a Hill de la Figura 12A. (C) Parámetro h o coeficiente de Hill en función de [ManN6P] del ajuste de la Figura 12A. (D) Simulación de la cinética de una enzima alostérica a distintas concentraciones de un inhibidor competitivo. La simulación se realizó con la *Ecuación 5* (página 17) utilizando los parámetros $V=1$, $L=200000$, $c=0.041$, $K_{SR}=0.55$, $d=0$, $K_I=0.09$ (E) Parámetro $K_{0.5}$ en función de [ManN6P] del ajuste de la simulación en la Figura 12D a la ecuación de Hill. (F) Parámetro h o coeficiente de Hill en función de [ManN6P] del ajuste de la simulación en la Figura 12D a la ecuación de Hill.

El objetivo de este trabajo es proponer un modelo que explique el efecto de la ManN6P sobre la cinética de la EcGNPD. En la siguiente sección se expone el proceso por el cual se llegó al modelo que más se aproxima a explicar los efectos observados.

El fenómeno se puede describir por un modelo basado en el modelo original de Monod, Wyman y Changeux.

La ManN6P como un inhibidor puramente alostérico

Se consideró la posibilidad de que la ManN6P fuera un inhibidor puramente alostérico: sin embargo, cuando los confórmers R y T tienen la misma constante catalítica, como en el modelo cinético de la EcGNPD, un inhibidor puramente alostérico nunca es un inhibidor total incluso a concentraciones saturantes. Un inhibidor alostérico a concentración saturante se une a los sitios alostéricos de los confórmers T, desplazando todo el equilibrio hacia ese conformero; todos los sitios catalíticos quedan libres para la unión del

sustrato y se observa la cinética de la forma T (Figura 7B en la sección Introducción). A concentraciones saturantes de ManN6P en el ensayo (>10 mM, datos no mostrados), se obtuvo inhibición total, por lo que se descartó que el efecto inhibitorio observado fuera consecuencia de la unión de la ManN6P en el sitio alostérico.

Modelo de MWC-Smith: inhibición competitiva

Al ser un epímero de la GlcN6P, la ManN6P puede considerarse como un análogo del sustrato. Esta alta similitud estructural y la inhibición total a concentraciones saturantes hacen evidente que la ManN6P se une al sitio catalítico de la enzima y compite con la GlcN6P.

Como se menciona en la introducción, Smith postuló un modelo basado en el de MWC que describe inhibiciones competitivas en enzimas alostéricas, con dos casos particulares en los que la alostería toma relevancia: la activación paradójica y la inhibición por unión preferente del inhibidor a los sitios catalíticos de los conformeros T.

Como se observa en el ajuste a la ecuación de Hill, la ManN6P no causó el efecto de activación paradójica: sin embargo, el segundo caso de Smith no se podía descartar. Por lo tanto se probó la *Ecuación 5* (página 17) con el objetivo de establecer si los efectos inhibitorios eran un caso de unión preferente por sitios catalíticos de conformeros T.

Mediante una regresión no lineal, manteniendo constante el parámetro L , que es una de las restricciones del modelo (*Ecuación 5*), el ajuste obtenido fue ambiguo. Un ajuste ambiguo significa que los intervalos de confianza para los parámetros ajustados son muy amplios. En lenguaje coloquial un ajuste de este tipo es un ajuste “deficiente”. Sin embargo, al dejar variar L para cada una de las series de ManN6P, se obtuvo un ajuste con intervalos de confianza aceptables (Tablas 3 y 4).

Parámetro	Valor±DE	Interpretación
K_{IR}	0.62±0.07 mM	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios catalíticos de los confórmers R
$d=K_{IR}/K_{IT}$	1.5±0.2	La ManN6P es más afín por los sitios catalíticos de los confórmers T
$K_{IT}=K_{IR}/d$	0.41± 0.07 mM	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios catalíticos de los confórmers T

Tabla 3. Parámetros de ajuste global de los datos de la Figura 12A a la *Ecuación 5*, variando L en función de ManN6P. $R^2=0.99$

ManN6P [mM]	$L\pm DE$
0	$17\pm 1 \times 10^4$
0.1	$8\pm 1 \times 10^4$
0.25	$5\pm 1 \times 10^4$
0.5	$16\pm 6 \times 10^3$
0.75	$7\pm 3 \times 10^3$
1	$3\pm 2 \times 10^3$
1.5	926.8±539.6
2.5	312.5±198.4
5	94.8±63.5

Tabla 4. Variación del parámetro L en función de ManN6P obtenidos del ajuste global de los datos de la Figura 12A a la *Ecuación 5*. $R^2\geq 0.98$

La interpretación de los valores de la Tabla 3 es que la ManN6P se une preferentemente al sitio catalítico del conformero T ($d>1$), a diferencia de otro inhibidor competitivo de esta enzima, el GlcNol6P, que tiene unión preferente al sitio catalítico de R y da lugar al fenómeno de activación paradójica. Además de actuar como un inhibidor competitivo, la ManN6P puede estabilizar los confórmers T mediante su unión en sitios catalíticos. El acoplamiento termodinámico de las dos inhibiciones hace de la ManN6P el inhibidor de naturaleza dual que predijo Smith teóricamente.

A pesar que el modelo de Smith es una aproximación al fenómeno, mencionamos previamente que una de las restricciones del modelo es que L no puede variar en función de la ManN6P; una variación en este parámetro es evidencia de que está modificado por alguna expresión como en el caso de la *Ecuación 4* (página 14). Por lo tanto se consideró la posibilidad de que la ManN6P se uniera a otro sitio además del catalítico; el modelo de Smith se descartó.

Cuando L varía en función de algún ligante es útil transformar este parámetro en una constante alostérica efectiva llamada L' , como se describe en la página 14. De esta manera, se puede diagnosticar la naturaleza del cambio de L' . Por lo tanto, se regraficaron los valores L' en función de la concentración de ManN6P obtenidos de la Tabla 4 (Figura 13).

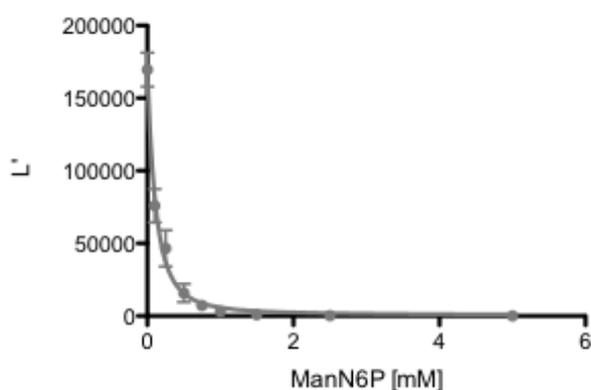


Figura 13. Regráfico del parámetro L' en función de la concentración de ManN6P. La línea describe el ajuste de los datos a la *Ecuación 3* (página 14)

El mecanismo general de modificación del parámetro L es la unión del ligante en un sitio alostérico (ver sección Efectos heterotrópicos). Esta unión puede ser a ambos conformeros, exclusiva al conformero R o al conformero T. Como se menciona en esa sección, el parámetro que define la preferencia conformacional es $e=K_{aR}/K_{aT}$. Donde $e=1$ para unión idéntica, $e<1$ para unión preferente a R, $e=0$ unión exclusiva a R, $e>1$ unión preferente a T y $e\gg>1$ unión exclusiva a T. La *Ecuación 3* (página 14) describe estos casos y fue usada para realizar el ajuste de la Figura 13. Los valores de los parámetros ajustados se encuentran en la Tabla 5.

Parámetro	Valor±DE	Interpretación
K_{aR}	0.5±0.1mM	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios alostéricos de los confórmers R
e	0.38±0.09	La ManN6P es más afín por los sitios alostéricos de los confórmers R
n	=6	Número de subunidades de la EcGNPD
L	168314±4882	Los confórmers T predominan en ausencia de ligantes

Tabla 5. Parámetros de ajuste global de los datos de la Figura 13 a la Ecuación 3 $R^2=0.9944$

Este ajuste indica que la ManN6P puede unirse al sitio alostérico de ambas conformaciones, y que esta unión es preferente a la forma R. Con base en estas evidencias se construyó el modelo final.

Modelo de MWC con inhibición competitiva y con unión del inhibidor al sitio alostérico

Al sustituir L en la Ecuación 5 (página 17) por L' de la Ecuación 3 (página 14) obtenemos la Ecuación 6, la cual contiene las consideraciones del modelo de Smith y las consideraciones descritas para la unión de ManN6P al sitio alostérico. Además de poder deducirse por inspección, este modelo se puede deducir a partir de un mecanismo, proceso descrito en el Apéndice.

Ecuación 6:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha + \beta + 1)^{n-1} + L \left[\frac{(e\theta + 1)^n}{(\theta + 1)^n} \right] c\alpha(c\alpha + d\beta + 1)^{n-1}}{(\alpha + \beta + 1)^n + L \left[\frac{(e\theta + 1)^n}{(\theta + 1)^n} \right] (c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Donde:

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}} \quad \beta = \frac{[I]}{K_{IR}} \quad \theta = \frac{[I]}{K_{aR}} \quad c = \frac{K_{SR}}{K_{ST}} \quad d = \frac{K_{IR}}{K_{IT}} \quad e = \frac{K_{aR}}{K_{aT}} \quad L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

continúa de la página 29:

K_{SR} constante de disociación del sustrato y el sitio catalítico de R

K_{ST} constante de disociación del sustrato y el sitio catalítico de T

K_{IR} constante de disociación del inhibidor y el sitio catalítico de R

K_{IT} constante de disociación del inhibidor y el sitio catalítico de T

K_{aR} constante de disociación del inhibidor y el sitio alostérico de R

K_{aT} constante de disociación del inhibidor y el sitio alostérico de T

n es el número de subunidades

Mediante un ajuste global de los datos de la Figura 12A a la *Ecuación 6*, obtuvimos los parámetros de la Tabla 6. El ajuste de los datos se puede apreciar en la Figura 14.

Parámetro	Valor±DE	Interpretación
K_{IR}	0.58±0.07mM	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios catalíticos de los confórmers R
$d= K_{IR}/K_{IT}$	1.6±0.2	La ManN6P es más afín por los sitios catalíticos de los confórmers T
$K_{IT}= K_{IR}/d$	0.36±0.06	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios catalíticos de los confórmers T
K_{aR}	0.6±0.1mM	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios alostéricos de los confórmers R
$e= K_{aR}/K_{aT}$	0.16±0.02	La ManN6P es más afín por los sitios alostéricos de los confórmers R
$K_{aT}= K_{aR}/e$	3.8±0.8	Constante de disociación de la ManN6P por los sitios alostéricos de los confórmers T
L	170886±10241	Los confórmers T predominan en ausencia de ligantes

Tabla 6. Parámetros de ajuste global de los datos de la Figura 14 a la *Ecuación 6*. $R^2=0.9904$

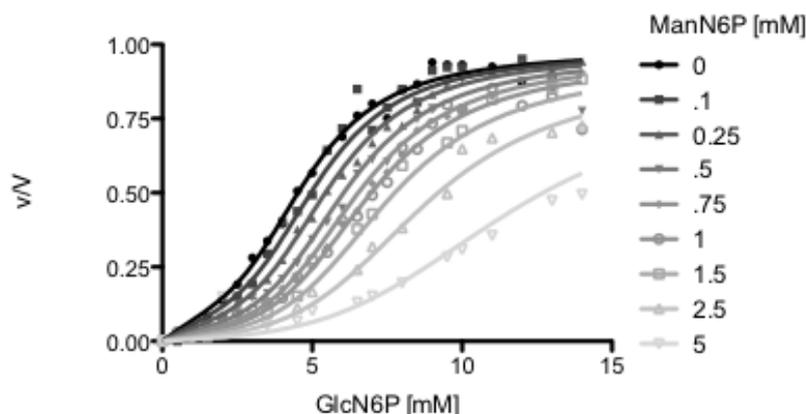


Figura 14. Datos de la figura 12A ajustados a la *Ecuación 6*. $R^2=0.9904$

La interpretación del valor de estos parámetros es que la ManN6P se puede unir tanto a los sitios alostéricos (un conjunto de sitios equivalentes) como a los catalíticos (otro conjunto de sitios equivalentes), fenómeno que ha sido denominado como promiscuidad, y se ha observado para el activador GlcNAc6P en esta enzima (tesis de licenciatura de S. Zonszein). Además, la preferencia de la unión de ManN6P a cada conjunto de sitios equivalentes de cada conformero es distinta, y se tratará una a la vez:

La unión a los sitios catalíticos es de fijación no exclusiva: es decir, la ManN6P se une a sitios catalíticos tanto de los conformeros R como a los de los conformeros T, compitiendo con la unión de GlcN6P en ambos. Sin embargo, a diferencia del sustrato GlcN6P y otros ligantes de los sitios catalíticos de esta enzima, la preferencia de unión de la ManN6P es por los sitios de conformeros T ($d=1.6$). El acoplamiento de la inhibición alostérica causada por la estabilización de conformeros T y la inhibición competitiva hace de la ManN6P un inhibidor de naturaleza dual.

En relación con la unión a los sitios alostéricos, la ManN6P se une a los sitios tanto del conformero R como del conformero T. La preferencia de unión es por los sitios alostéricos de R. A continuación se analiza cómo se relacionan los fenómenos que se manifiestan en el sistema cinético de desaminación de GlcN6P ante la presencia de distintas concentraciones de ManN6P.

En ausencia de ligantes, los conformeros T predominan ($L=1.7 \times 10^{-5}$). En presencia de concentraciones bajas de GlcN6P ($<0.5\text{mM}$), la probabilidad de que ésta se una a conformeros R es baja. En presencia de **concentraciones bajas de ManN6P ($<0.5\text{mM}$)**

en el sistema, la probabilidad de que GlcN6P se una a conformeros R es aún menor, ya que la ManN6P se une principalmente a sitios catalíticos de los abundantes conformeros T, estabilizándolos en esta conformación desfavoreciendo la unión del sustrato a conformeros R. Este es el componente alostérico de la inhibición por ManN6P. Además de dicho componente, la ManN6P ocupa sitios a los que GlcN6P se podría unir para sufrir catálisis en ambos conformeros; éste es el componente competitivo. Al aumentar la concentración de GlcN6P, el efecto homotrópico por unión a sitios en conformeros R empieza a predominar y a concentraciones cada vez más altas de GlcN6P hay una abolición tanto del efecto de inhibición alostérica como del de inhibición competitiva provocados por la ManN6P.

A **concentraciones altas de ManN6P (>1 mM)** y a concentraciones bajas de GlcN6P (<0.5mM), predominan los efectos inhibitorios alostéricos y competitivos de la ManN6P. Cuando la concentración de GlcN6P es más alta (>5 mM), se estabilizan más conformeros R. Sin embargo, debido a la alta concentración de ManN6P en el sistema, el efecto alostérico inhibitorio provocado por la unión a sitios catalíticos de T continúa, pero empieza a manifestarse un efecto de activación causado por la unión de la ManN6P a sitios alostéricos de conformeros R, por lo que el efecto inhibitorio es menos evidente. En otras palabras, la unión de la ManN6P a los sitios alostéricos de R “amortigua” el efecto inhibitorio causado por la unión a sitios catalíticos de conformeros T. Es en esta unión promiscua y la amortiguación donde radica la diferencia entre el modelo de Smith y el modelo propuesto en esta tesis.

La amortiguación se ilustra en las simulaciones de la Figura 15. En la Figura 15A se observa cómo sería la inhibición si la ManN6P sólo se uniera a los sitios catalíticos, con preferencia a los de los conformeros T (modelo Smith-MWC). En la Figura 15B se observa cómo es la inhibición cuando la ManN6P se une tanto a los sitios catalíticos con preferencia a los de los conformeros T, como a los sitios alostéricos, con preferencia a los de los conformeros R. Un aspecto interesante es que en presencia de ManN6P como ligante único, el sistema nunca estará en conformación R. Esto es consecuencia de que de todas las afinidades de la ManN6P por los distintos sitios de las dos conformaciones, la afinidad por los sitios catalíticos de los conformeros T es la mayor ($K_{IT}=0.36\pm 0.06$ mM). De esta afirmación podemos concluir que la unión de ManN6P a los sitios alostéricos y

catalíticos de conformeros R solamente se puede dar a concentraciones altas de algún ligante (GlcN6P o GlcNAc6P) que estabilice moléculas en dicha conformación.

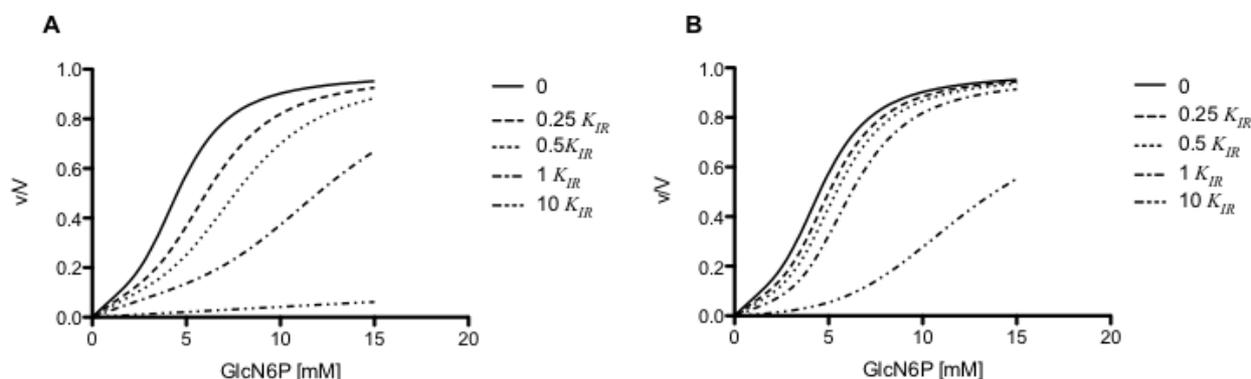


Figura 15. Simulaciones. (A) Modelo de Smith, Ecuación 5 (B) Modelo descrito por la Ecuación 6. Los parámetros compartidos en ambas simulaciones fueron $V=1$, $L=200000$, $c=0.041$, $K_{SR}=0.55$, $d=1.6$, $K_{IR}=0.58$ Los parámetros adicionales para la figura B fueron $K_{aR}=0.6$ $e=0.16$

Los fenómenos alostéricos observados en presencia de más de un ligante implican una competencia en el desplazamiento del equilibrio de conformaciones provocado por la unión de los distintos ligantes en los distintos sitios de las distintas conformaciones. ¿Cómo analizar de manera más intuitiva el desplazamiento del equilibrio conformacional? Aparentemente el análisis de la constante alostérica efectiva L' , como en el caso de efectores alostéricos, sería una manera práctica de analizar dicho equilibrio. En el caso de la Ecuación 6 eso no se puede ni se debe hacer. En primer lugar, L' disminuye a medida que aumenta la concentración de ManN6P. Esto es contradictorio con el patrón de L' esperado para un inhibidor alostérico (aumento en el valor de L') causado por el enriquecimiento de conformeros T a medida que incrementa la concentración de inhibidor.

En segundo lugar, L' es una expresión matemática obtenida del ordenamiento algebraico de la ecuación, y no representa una entidad fisicoquímica real. La ecuación se reordena de esa manera porque históricamente coincidió que esa forma era una opción intuitiva de analizar los efectos heterotrópicos (23). Es válido decir que representa una modificación numérica en L provocada la unión de ManN6P al sitio alostérico: sin embargo, no define qué conformero es el más abundante en todo el sistema. El equilibrio de conformaciones en presencia de la combinación de distintas concentraciones de ligantes no solamente está implícito en ese término, sino en todos los términos de la Ecuación 6 (página 29).

Las verdaderas entidades fisicoquímicas que nos permiten analizar el equilibrio conformacional en presencia de uno o múltiples ligantes son las funciones de estado conformacional (7). En la siguiente sección se describen las funciones de estado conformacional para el modelo descrito por la *Ecuación 6* y se contrastan con las funciones de estado conformacional para un inhibidor que produce activación paradójica.

Contraste de las funciones de estado conformacional de un inhibidor que produce activación paradójica y de las funciones de estado de la ManN6P

La variable dependiente de una ecuación cinética de MWC es la velocidad de reacción, que a su vez depende de la formación de complejos productivos en distintas conformaciones. El predominio en el sistema de uno u otro conformero es el fundamento tanto de los efectos cinéticos homotrópicos como de los heterotrópicos. La utilidad de las funciones de estado conformacional es que proveen una manera cuantitativa indirecta de analizar la concentración molar de cada conformero a distintas concentraciones de sustrato, inhibidores y efectores. Es una medida indirecta ya que se construyen a partir de los parámetros obtenidos de las ecuaciones cinéticas.

Como mencionamos previamente, el componente alostérico de la inhibición competitiva descrito con más frecuencia en la literatura es la activación paradójica descrita por el modelo de Smith. También mencionamos que la explicación a este fenómeno de activación es la afinidad exclusiva o preferente del inhibidor por la forma R ($d=0$ ó $d<1$). La ManN6P tiene varias características que la hacen un ligante de naturaleza especial, la inhibición competitiva y alostérica acopladas, y la promiscuidad. Las funciones de estado conformacional proveen una manera de contrastar cuales conformaciones predominan en el caso de activación paradójica contra las que predominan en la inhibición causada por la ManN6P, a distintas concentraciones tanto de inhibidores como de sustrato.

Matemáticamente una función de estado conformacional es igual al cociente de todas las formas de la enzima en una conformación sobre todas las formas de la enzima, en función de la concentración del sustrato GlcN6P. Las ecuaciones de las funciones de estado para el modelo de Smith (*Ecuaciones 7*) y el modelo para ManN6P (*Ecuaciones 8*) son las siguientes:

Ecuaciones 7:

$$\bar{R} = \frac{(\alpha + \beta + 1)^n}{(\alpha + \beta + 1)^n + L(c\alpha + d\beta + 1)^n} \quad \bar{T} = \frac{L(c\alpha + d\beta + 1)^n}{(\alpha + \beta + 1)^n + L(c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Ecuaciones 8:

$$\bar{R} = \frac{(\alpha + \beta + 1)^n}{(\alpha + \beta + 1)^n + L\left[\frac{(1 + d\theta)^n}{(1 + \theta)^n}\right](c\alpha + d\beta + 1)^n} \quad \bar{T} = \frac{L\left[\frac{(1 + d\theta)^n}{(1 + \theta)^n}\right](c\alpha + d\beta + 1)^n}{(\alpha + \beta + 1)^n + L\left[\frac{(1 + d\theta)^n}{(1 + \theta)^n}\right](c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Utilizando los parámetros ($V=1$, $L=200000$, $c=0.041$, $K_{SR}=0.55$, $d=0$, $K_{IR}=0.09$) y las Ecuaciones 7 se generó la Figura 16A, las funciones de estado conformacional para un inhibidor con activación paradójica. Utilizando los parámetros de la Tabla 6 y las Ecuaciones 8 se generó la Figura 16B.

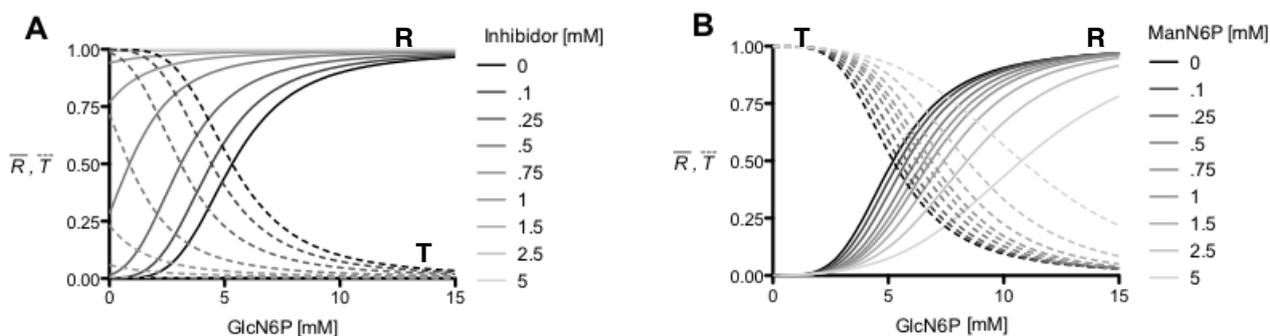


Figura 16. Simulaciones de las funciones de estado conformacional R y T en función de [GlcN6P] a distintas concentraciones de un inhibidor. A) Las curvas se generaron con las Ecuaciones 7 con los parámetros del pie de Figura 12D. B) Las curvas se generaron con las Ecuaciones 8 y los parámetros de la Tabla 6

Las funciones de estado conformacional son una manera práctica de apreciar las alteraciones sobre el equilibrio de conformaciones que puede ocasionar la unión de uno o varios ligantes. En la Figura 16A, la curva de función de estado para la forma R (líneas continuas) se va desplazando hacia la izquierda a medida que aumenta la concentración de inhibidor, hasta llegar a una concentración en la cual todo el equilibrio ha sido

desplazado hacia R. ¿Por qué si todo el equilibrio está desplazado a R a altas concentraciones de inhibidor, no hay mayor catálisis? La respuesta es que el inhibidor es competitivo, por lo que ocupa todos los sitios catalíticos a concentraciones altas. En el caso de la Figura 16B, la curva de función de estado para la forma R se va desplazando hacia la derecha a medida que aumenta la concentración de inhibidor. Aquí se aprecia la inhibición alostérica provocada por la unión de ManN6P a sitios catalíticos del conformero T; los conformeros T se estabilizan a medida que aumenta la concentración de ManN6P que se suma a la inhibición competitiva. El acoplamiento de los efectos se observa en el experimento cinético.

Con el objetivo de obtener más evidencias en apoyo del modelo, se realizaron los experimentos descritos en las siguientes secciones.

La cinética de la EcGNPD a concentración saturante del activador alostérico GlcNac6P, y con la ManN6P como un ligante fijo variable

La molécula GlcNac6P es un ligante de fijación exclusiva al sitio alostérico de R; al usarlo a concentraciones saturantes en un experimento cinético podemos asumir que la mayoría de las moléculas de la EcGNPD se encuentran en dicha conformación (ver efectos heterotrópicos, página 4). Por lo tanto, es una herramienta útil para caracterizar los efectos de la ManN6P en un sistema desplazado totalmente a conformación R. El experimento de la Figura 17 se realizó a una concentración fija saturante de activador (1mM), GlcN6P como sustrato y ManN6P como ligante fijo variable. Para analizar el patrón de inhibición bajo un esquema libre de modelo, se ajustó cada serie de manera individual a la ecuación de Michaelis-Menten y se regraficaron los parámetros K_m y V .

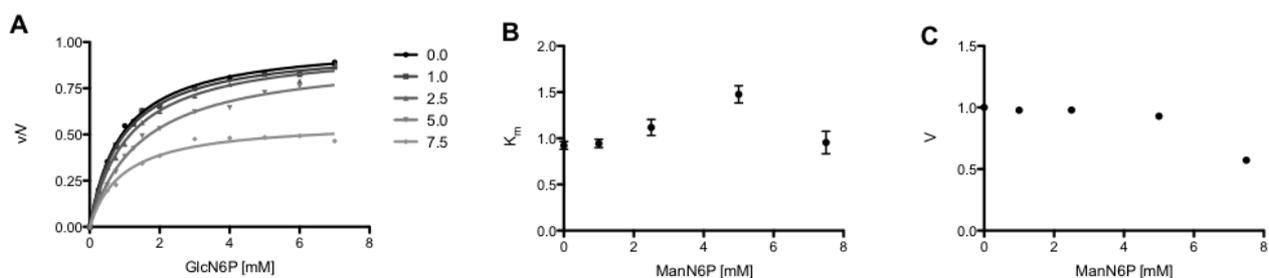


Figura 17. (A) Cinética en presencia de 1 mM GlcNac6P y varias concentraciones de ManN6P (B) Variación del parámetro K_m en función de [ManN6P] (C) Variación de V en función de [ManN6P]

Para este experimento el comportamiento esperado era una inhibición de naturaleza competitiva, lo cual estaría de acuerdo con el modelo de la *Ecuación 6* (página 29) si consideramos que saturando de GlcNAc6P las formas T se reducen prácticamente a cero. Matemáticamente se puede mostrar mediante la *Ecuación 9*.

Ecuación 9:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha + \beta + 1)^{n-1} + L \left[\frac{(e\theta + 1)^n}{(\gamma + \theta + 1)^n} \right] c\alpha(c\alpha + d\beta + 1)^{n-1}}{(\alpha + \beta + 1)^n + L \left[\frac{(e\theta + 1)^n}{(\gamma + \theta + 1)^n} \right] (c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Esta ecuación parte del mismo mecanismo descrito por la *Ecuación 6*, con la novedad de la unión de GlcNAc6P al sitio alostérico. Esta unión se incluye en el modelo mediante la adición del parámetro γ dentro del término de modificación de L , el cual en la ecuación se encuentra entre corchetes. Es un término aditivo ya que compite con la ManN6P por el sitio alostérico. Previamente se ha demostrado que GlcNAc6P tiene una afinidad exclusiva por el sitio alostérico de R de 35 μM (24). En el experimento de la Figura 17, se utilizó una concentración de 1000 μM ; resolviendo aritméticamente el denominador del término entre corchetes da como resultado 4×10^{26} , número astronómico que nos reduce el término de las formas T a cero.

Sin embargo, la naturaleza de la inhibición no es competitiva. Hay un componente que influye sobre la V_{max} a concentraciones altas de ManN6P, y el patrón de K_m en función de ManN6P no sigue un incremento en todo el intervalo de concentraciones.

La *Ecuación 9* predice la formación de complejos asimétricos $ES_xI_{n-x}AyI_{n-y}$, donde “ x ” es la estequiometría de unión a sitio catalítico; “ y ” es la estequiometría de unión al sitio alostérico. Evidencias recientes indican que la activación heterotrópica por GlcNAc6P tiene un componente terciario (comunicación personal del proyecto de doctorado de S. Zonszein). Es probable que los complejos asimétricos previamente mencionados tengan constantes catalíticas perturbadas o anuladas, producto de la combinación de múltiples efectos alostéricos terciarios provocados por la unión de los tres ligantes en sitios distintos.

Además, Zonszein demostró en su tesis de licenciatura que la GlcNAc6P también tiene un efecto promiscuo, es decir que se puede unir al sitio catalítico, por lo que la diversidad de complejos crece significativamente si se incluye este factor en el mecanismo. Consideramos que la complejidad del fenómeno en presencia de tres ligantes, dos de ellos de unión promiscua y con la posibilidad de ejercer efectos terciarios desconocidos, está fuera del alcance metodológico de este proyecto. Debido a que aún no se contaba con más evidencia para apoyar el modelo de la *Ecuación 6*, se utilizó una mutante cuya afinidad por el activador en el sitio alostérico está abolida: la mutante Lys160Ala.

La cinética de la mutante Lys160Ala de la EcGNPD con la ManN6P como un ligante fijo variable

El residuo Lys160 forma parte de una red de cargas positivas del sitio alostérico, cada una de las cuales es crítica para la interacción del grupo fosfato del activador y la enzima (16). La mutación por alanina provoca la pérdida de esta propiedad. Además, esta enzima carece tanto de transición homotrópica ($h=1$ en ausencia de activador), como de transición heterotrópica ($V_1=V_2$ $K_1=K_2$ en ausencia y presencia de activador respectivamente). Estas razones hacen de esta mutante una herramienta para evaluar los efectos de la unión de la ManN6P solamente al sitio catalítico, con la simplificación adicional de la ausencia de transiciones alostéricas.

El ensayo cinético se realizó a concentraciones variables de ManN6P, a una concentración 60 nM de enzima. La cinética resultante (Figura 18) se ajustó a la ecuación de Hill. Todas las gráficas tuvieron un coeficiente de Hill de 1, evidencia de que la transición homotrópica está abolida por la mutación. Además, la V_{max} fue constante en función de [ManN6P], y la $K_{0.5}=K_m$ aumentó en función de [ManN6P]. Por lo tanto, se ajustaron los datos a un modelo de inhibición competitiva clásica. Debido a que a concentraciones altas de sustrato se observa una inhibición por sustrato en cada una de las curvas, se restringió el ajuste a las concentraciones de sustrato mostradas en la gráfica (25).

Los parámetros obtenidos del ajuste se encuentran en la Tabla 7. La conclusión de este experimento fue que la ManN6P y la GlcN6P sí se unen de manera mutuamente excluyente al sitio catalítico de la enzima, o sea que la ManN6P sí es un inhibidor competitivo.

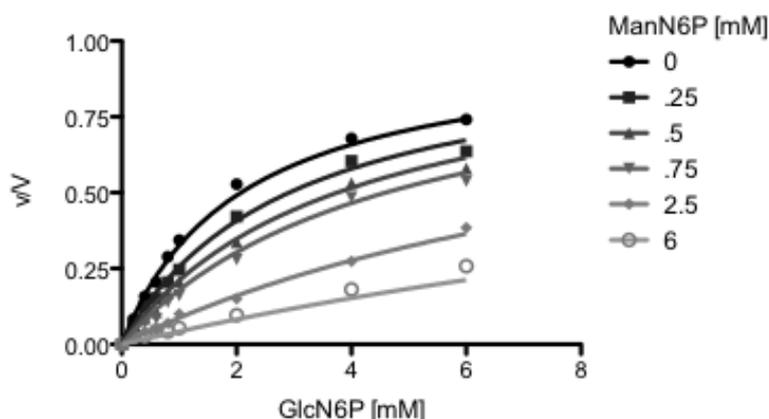


Figura 18. Velocidades iniciales de la mutante Lys160Ala en función de GlcN6P a distintas concentraciones de ManN6P. La serie de curvas se ajustó a la ecuación de inhibición competitiva clásica.

Parámetro	Valor±DE
K_m	2.07±0.06mM
K_i	0.62±0.04mM

Tabla 7. Parámetros de ajuste global de los datos de la Figura 18 a la ecuación de inhibición competitiva clásica. $R^2=0.9904$

La cinética de la EcGNPD silvestre con ManNAc6P como ligante fijo variable

A diferencia de ManN6P, el ligante ManNAc6P sí es un metabolito fisiológico (18). Está presente en la vía de utilización de aminoazúcares, por lo que fue sintetizado con el objetivo de evaluar si ejercía efectos competitivos o alostéricos sobre la EcGNPD similares a los causados por ManN6P. El resultado fue que no ejerce efectos inhibitorios ni de activación en el intervalo de concentración 0.035 mM - 3.5 mM (Figura 19).

Es posible que el sustituyente acetamido sea demasiado voluminoso y cause impedimentos estéricos que imposibiliten la unión de ManNAc6P a los sitios de la enzima.

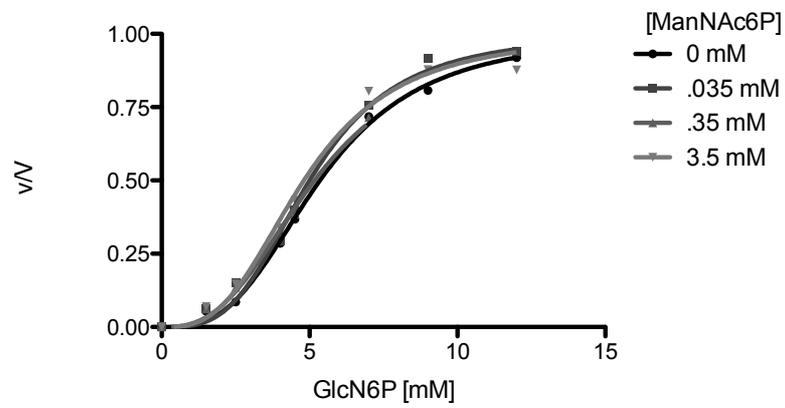


Figura 19. (A) Cinética en presencia de varias concentraciones de ManNAc6P. Las curvas están ajustadas a la ecuación de Hill.

Discusión general y perspectivas

Los parámetros cinéticos pueden confirmarse mediante experimentos de unión directa

Al suponer condiciones de equilibrio rápido, las constantes de disociación expresadas en las ecuaciones cinéticas pueden confirmarse mediante experimentos de unión directa de los ligantes. El primer abordaje que proponemos es realizar experimentos de unión con ManN6P³² para caracterizar directamente la unión de la ManN6P a la enzima.

Otra aproximación para confirmar las constantes de los modelos es hacer uniones al equilibrio de GlcN-ol-6P y GlcNAc6P tritadas en presencia de ManN6P, para confirmar las constantes de inhibición obtenidas de los experimentos cinéticos.

La unión preferente de la ManN6P al sitio catalítico del confórmero T desde un punto de vista estructural

Según el parámetro $d=1.6$ obtenido a partir de la *Ecuación 6* (páginas 29-30), la ManN6P se une preferentemente a los sitios catalíticos de confórmeros T. A continuación propongo cómo la ManN6P podría unirse con mayor afinidad a dichos sitios desde un punto de vista estructural.

La estructura del sitio catalítico del confórmero R, así como la red de interacciones que establece con el ligante GlcN-ol-6P se resolvió en 1995 (PDB ID: 1HOR); la estructura del sitio catalítico del confórmero T a 1.9Å de resolución se resolvió en 2002 (PDB ID: 1FSF). A partir del contraste de la estructura de estos dos sitios y del análisis de las interacciones de la GlcN-ol-6P con el sitio del confórmero R, propongo una serie de hipótesis sobre la unión preferente de la ManN6P al sitio catalítico del confórmero T y las posibles consecuencias estructurales y dinámicas de dicha unión.

En la Figura 20 se muestran en estéreo y desde la misma perspectiva, el sitio catalítico del confórmero R (A) y el sitio catalítico del confórmero T (B). En ambas figuras he distinguido dos regiones: una formada por los residuos Ala145, His143, Lys208 (representada en verde); otra formada por los residuos Tyr85 y Arg172 y el asa

conformada por los residuos que comprenden la región de Pro41 a Pro45 (representada en turquesa).

El ligante GlcN-ol-6P está representado en palos y esferas transparentes en la figura A; el ligante en el sitio catalítico del conformero T no existe en la estructura 1FSF. En ambas figuras las moléculas de agua están representadas por esferas rojas.

En el sitio catalítico de R (Figura 20A) el ligante GlcN-ol-6P forma contactos (líneas punteadas rojas) tanto en la región verde como en la turquesa, ya que éstas últimas se encuentran cercanas una de la otra, o dicho de otra manera, el sitio está en una conformación “cerrada”. En la región verde el ligante establece tres interacciones directas con la proteína, mientras que en la región turquesa puede establecer hasta 14. Además, puede formar una red de interacciones con las moléculas de agua que lo rodean. Algunos de los contactos de esta red establecen interacciones indirectas proteína-agua-ligante.

La distancia que separa a las regiones verde y turquesa en el sitio del conformero T es mayor que aquélla que las separa en el conformero R. Esta distancia se tomó de $N\epsilon_2$ en His143 al oxígeno del grupo carbonílico de la cadena principal de Thr41 del asa turquesa; en el sitio de R la distancia es de 8.2 Å y en el sitio de T es de 10.4 Å. En el sitio de T es probable que la distancia entre ambas regiones impida que un ligante interactúe con ambas, además el número de moléculas de agua que ocupan la cavidad del sitio catalítico del conformero T es mayor que en el conformero R.

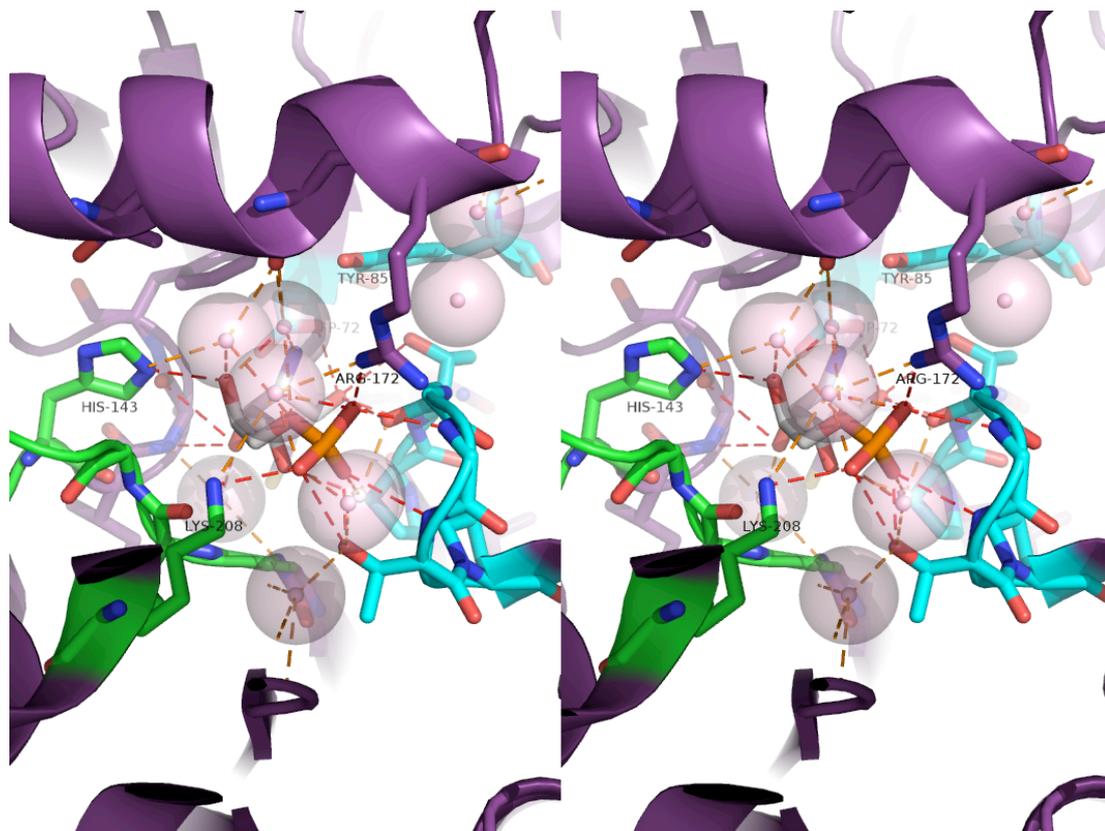
A pesar de la distancia entre las regiones verde-turquesa y otros cambios geométricos en el sitio catalítico, la estructura de la cara turquesa se mantiene constante en los dos conformeros (RMSD=0.233, 67 átomos). El asa Pro40-Pro45 no cambia su conformación (RMSD=0.198, 34 átomos), y su posición relativa a los otros residuos que conforman la región turquesa, Tyr85 y Asp72 cambia poco. Esta posición se estableció utilizando como un punto de referencia al grupo hidroxilo del residuo Tyr85. Las distancias de Asp72 a dicho grupo (distancia en R=4.7 Å, distancia en T=4.8 Å), y la distancia de Pro40-Pro45 al mismo grupo hidroxilo (distancia en R=4.1 Å, distancia en T=4.7 Å) se mantienen prácticamente constantes.

Como mencionamos previamente, en la región turquesa hay más interacciones del ligante GlcN-ol-6P que en la región verde (líneas punteadas rojas en la Figura 20). Como la

conformación de esta cara es prácticamente idéntica en ambos conformeros, es probable que la ManN6P forme interacciones con esta región en el conformero T y no con la región verde, debido a su lejanía. En cambio, en el sitio del conformero R la ManN6P podría formar interacciones con ambas caras. Es probable que la configuración distinta del grupo amino cause impedimentos estéricos o electrostáticos en la región verde, y eso cause la disminución en la afinidad por ese sitio. Además, la abundancia de moléculas de H₂O en la cavidad del sitio catalítico del conformero T podría ser un componente importante en los términos entrópicos de las constantes de disociación de los ligantes por ese sitio e incluso podrían ser determinantes en los términos entrópicos correspondientes a la transición alostérica.

La estructura del conformero T de la EcGNPD sólo se ha resuelto en ausencia de ligantes, por lo que obtener la estructura de la enzima en presencia de la ManN6P ofrece la oportunidad de analizar por primera vez el sitio catalítico del conformero T ligado; se podrán conocer cuáles son las interacciones que forma la ManN6P en el sitio catalítico y sus consecuencias en la estructura y dinámica de todo el conformero, especialmente en la región denominada tapa del sitio catalítico, cuyas características dinámicas son esenciales en la transición alostérica (16, 17).

A (sitio de R)



B (sitio de T)

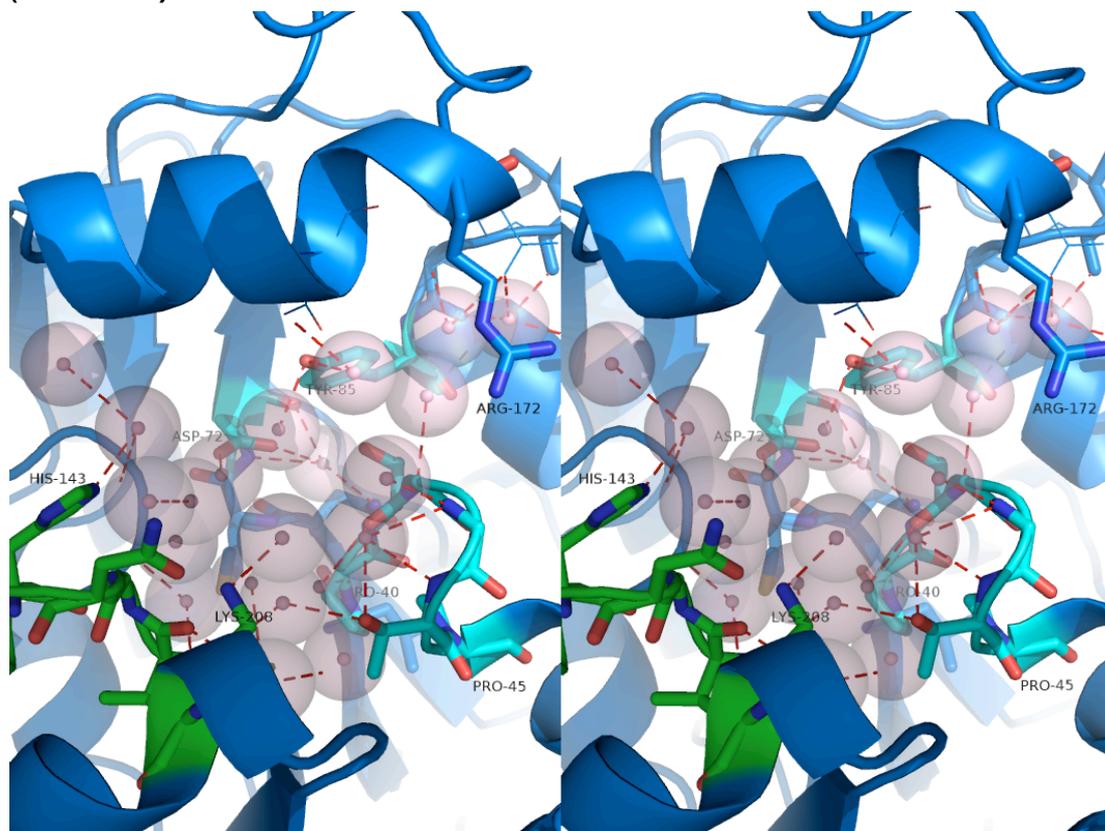


Figura 20. Representación en estéreo (*cross-eye*) del sitio catalítico del conformero R (A) y del sitio catalítico del conformero T (B). La descripción completa de la figura se encuentra en el texto. Imagen generada en el programa PyMol a partir de las estructuras 1HOR y 1FSF

El acoplamiento termodinámico de la inhibición alostérica y competitiva desde el punto de vista de diseño de inhibidores

El diseño de inhibidores enzimáticos se centra en dos tipos de moléculas: los inhibidores competitivos de alta afinidad (26, 27), y los inhibidores alostéricos (28). Para ejercer ambas inhibiciones simultáneamente se ha propuesto la combinación de inhibidores de las dos clases, por ejemplo en el caso de la cinasa oncogénica Bcr-Abl donde se han utilizado análogos del sustrato ATP junto con inhibidores alostéricos que se unen a sitios de unión a miristato (29).

Los efectos causados por la ManN6P sobre la EcGNPD sugieren que es posible inhibir a una enzima tanto competitivamente como alostéricamente sin la necesidad de combinar dos moléculas. La ManN6P es un inhibidor dual de la catálisis de GlcN6P: es un inhibidor alostérico porque es un ligante sin equivalencia estereoquímica, que desplaza el equilibrio hacia conformeros de baja afinidad por GlcN6P; es un inhibidor competitivo porque su unión y la de la GlcN6P al sitio catalítico son mutuamente excluyentes. El acoplamiento termodinámico de las inhibiciones hace de la ManN6P un inhibidor "ideal" desde el punto de vista del diseño de inhibidores, y hace plausible la búsqueda y el diseño de inhibidores de este tipo para el estudio de otras enzimas oligoméricas con transiciones conformacionales concertadas.

Apéndice

El modelo construido por Smith (10) está basado en el modelo de MWC. El modelo que describe la inhibición causada por ManN6P es un caso particular del modelo de Smith-MWC; a pesar de que se puede construir por inspección a partir de los mencionados anteriormente, en este apéndice se ilustra cómo se construyó utilizando los procedimientos descritos por Segel (7) para verificar su validez. Además, cada uno de los modelos descritos en esta tesis se puede construir con este procedimiento, y la nomenclatura aquí utilizada es la hallada comúnmente en la literatura.

Antecedentes: Constantes efectivas y constantes microscópicas

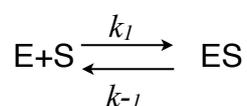
Constante de disociación efectiva: expresa el equilibrio entre sustrato libre, enzima libre y complejo enzima sustrato.

$$K_{efectiva} = \frac{[E_0][S]^x}{[ES_x]}$$

Constantes de disociación intrínsecas: también conocidas como constantes de disociación microscópicas, expresan el equilibrio entre sustrato libre, sitio libre y complejo sitio-sustrato.

$$K_{micro} = \frac{[Sitios_{libres}][S]}{[Sitio \wedge Sustrato]}$$

Son constantes para el sitio aislado, sin importar su asociación con otros sitios en la misma molécula. Se pueden relacionar con las constantes de disociación efectivas de la siguiente manera: considerando un trímero, la reacción de unión de la primera molécula de ligante para formar el primer complejo ES, está descrita por:



Donde k_1 y k_{-1} son constantes cinéticas microscópicas para el sitio, no para el complejo ES. Nuestro objetivo es obtener la expresión que describa la velocidad de formación de complejos [sitio[^]sustrato], en función de [E]. Esta velocidad es proporcional a la concentración de sitios libres y a la concentración de sustrato, y sabemos que la molécula [E] tiene tres sitios libres, por lo tanto:

$$v_{E+S \rightarrow ES_1} = k_1 3[E][S]$$

De la misma manera, la velocidad de disociación del complejo [sitio[^]sustrato] es proporcional al número de complejos [sitio[^]sustrato]. En el complejo [ES] solamente hay un sitio ocupado, por lo tanto hay un solo complejo [sitio[^]sustrato] por molécula [ES]:

$$v_{E+S \leftarrow ES_1} = k_{-1} [ES]$$

En equilibrio, las dos velocidades son iguales.

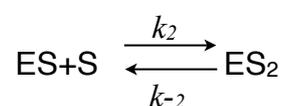
$$v_{E+S \rightarrow ES_1} = v_{E+S \leftarrow ES_1}$$

$$k_1 3[E][S] = k_{-1} [ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{3 k_1}$$

$$K_{efectiva[ES]} = \frac{K_{microscópica}}{3}$$

Siguiendo el mismo razonamiento, para la unión de la segunda molécula de sustrato:



$$k_2[ES] = 2k_{-2}[ES_2]$$

$$\frac{[ES][S]}{[ES_2]} = \frac{k_{-2}}{k_2}$$

Pero estamos definiendo que la unión de la segunda molécula de sustrato es a un sitio equivalente al que se pegó la primera, por lo tanto $k_1=k_2$ y $k_{-1}=k_{-2}$:

$$K_{efectiva[ES_2]} = K_{microscópica}$$

Por inspección, podemos concluir que:

Ecuación 1:

$$K_{efectiva[ES_x]} = K_{microscópica} \left(\frac{\text{sitios ocupados en } [ES_x]}{\text{sitios libres en } [ES_{x-1}]} \right)$$

La utilidad de este procedimiento, es que podemos construir mecanismos y ecuaciones que contengan las constantes microscópicas, en función de la concentración de enzima total y de sustrato, información que generalmente conocemos en un experimento.

La construcción de un modelo basado en el de MWC: Modelo que explica la inhibición causada por la ManN6P

El primer paso es elegir el sistema: será un trímero con dos conformaciones preexistentes en equilibrio (R y T). Cada conformero tendrá dos conjuntos de sitios: uno conformado por tres sitios catalíticos equivalentes entre sí y otro por tres sitios alostéricos equivalentes entre sí. Se eligió un trímero ya que es la mínima unidad oligomérica con la cual se construyen ecuaciones que se pueden generalizar para n número de subunidades, como se apreciará a lo largo de este apéndice.

El siguiente paso es establecer el tipo de ligantes a evaluar y los sitios a los que se unirá. De esta manera podemos proponer un mecanismo. Consideraremos dos ligantes:

Ligante S: *productivo*

Ligante I: *improductivo*

Asumiremos que el ligante S se une al sitio catalítico tanto de R como de T, con una constante de disociación microscópica K_{SR} para sitios en R y una constante de disociación microscópica K_{ST} para sitios en T.

Asumiremos que el ligante I se une al sitio catalítico tanto de R como de T con una constante de disociación microscópica K_{IR} para sitios en R y una constante de disociación microscópica K_{IT} para sitios en T. Además se une al sitio alostérico de ambos conformeros, con una constante microscópica K_{aR} para sitios R y una constante de disociación microscópica K_{aT} para sitios en T. Durante el transcurso de esta construcción, la unión de moléculas *I* en el sitio alostérico será denotado con un superíndice 'a': I^a , para distinguirlo de la unión en sitios catalíticos.

El mecanismo sugerido basado en las descripciones anteriores se encuentra en la Figura 21. *R* y *T* describen la conformación de la proteína. En un complejo $RXXX$, *S* describe unión de ligante S en sitio catalítico, *I* describe unión del ligante *I* en sitio catalítico. Estas dos uniones son mutuamente excluyentes. I^a describe la unión del ligante *I* en el sitio alostérico de la enzima. Las flechas horizontales en negritas describen los equilibrios entre complejos con la misma estequiometría de ligantes unidos, pero distinta conformación. Las flechas verticales describen la unión de *I* en el sitio alostérico.

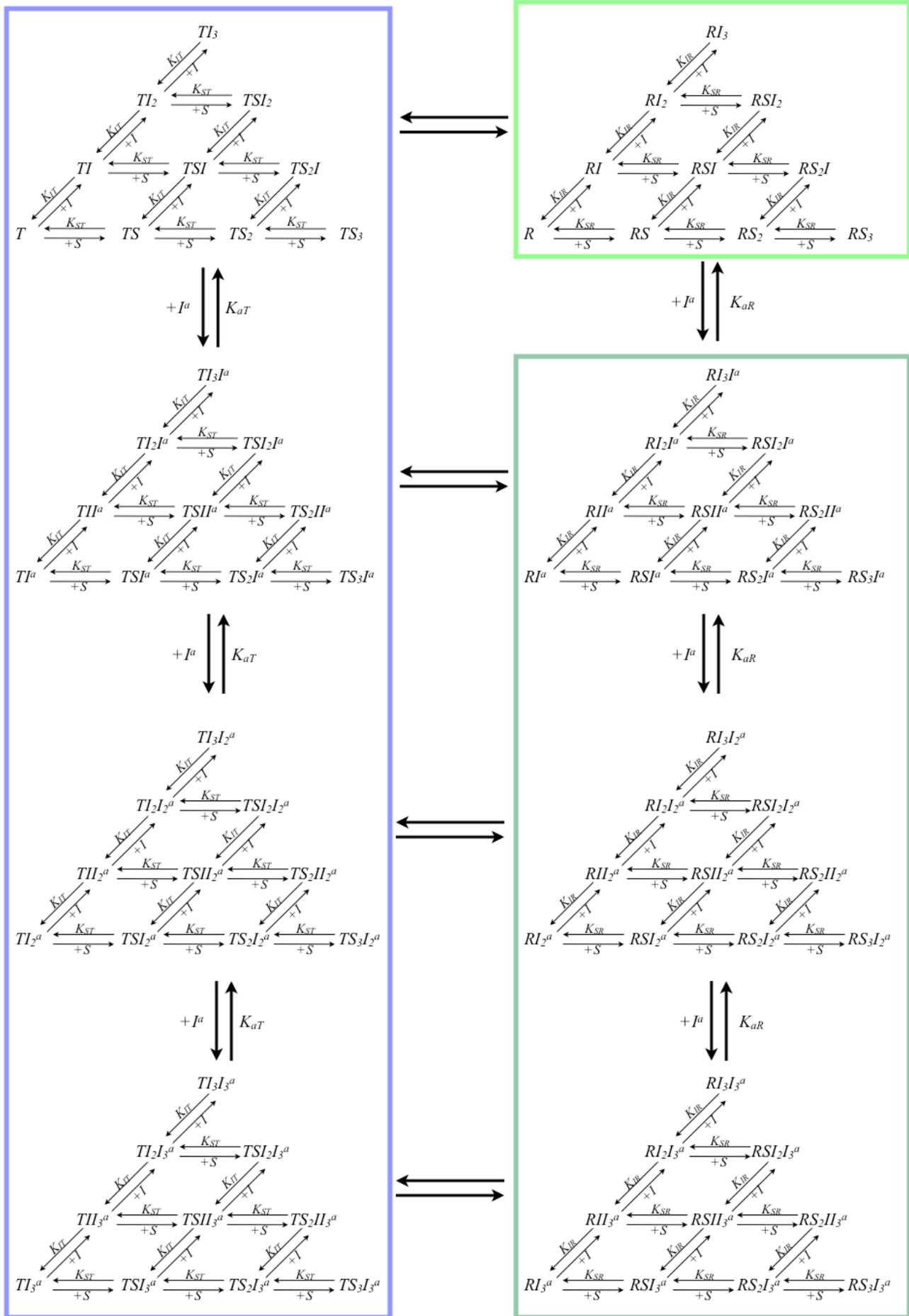


Figura 21. Mecanismo sugerido para la inhibición causada por la ManN6P en un trómero

Para construir una ecuación de la cual podamos obtener las constantes de disociación microscópicas, necesitamos establecer lo siguiente:

En una enzima con n sitios catalíticos y haciendo suposición de equilibrio rápido, la velocidad inicial de formación de producto v es proporcional a la concentración molar de sitios catalíticos productivos. Un sitio catalítico productivo es aquél sitio catalítico con una molécula de sustrato unida a él. Por lo tanto, $v \propto \sum [ES_x]$. Siendo k_{cat} la constante catalítica microscópica del sitio, $v = k_{cat} \sum ([ES] + [ES_2] + \dots + [ES_n])$

La velocidad máxima V es proporcional al total de sitios catalíticos, o sea $V \propto n[E_{total}]$, donde $[E_{total}]$ es la sumatoria de la concentración molar de todas las formas de la enzima. Siendo k_{cat} la constante catalítica microscópica, $V = nk_{cat}[E_{total}]$. Siguiendo estas suposiciones, para el mecanismo B con n sitios (en un momento regresamos al ejemplo con tres sitios) el cociente de v y V es:

Ecuación 2:

$$\frac{v}{V} = \frac{\sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y I_z^a] + \sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [TS_x I_y I_z^a]}{n \left(\sum_{x=0, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} [RS_x I_y I_z^a] + \sum_{x=0, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} [TS_x I_y I_z^a] \right)}$$

Podemos observar que las constantes catalíticas se cancelan en la parte derecha de la expresión, por lo que podemos decir que el cociente v/V es igual al cociente de la concentración molar de sitios catalíticos productivos y la concentración molar de sitios catalíticos existentes.

El siguiente paso es definir cada complejo en relación a la concentración molar del complejo R sin ligantes, $[R]$, y en relación a constantes microscópicas:

$$[RS] = \frac{[R][S]}{\frac{1}{3} K_{SR}} = \frac{3[R][S]}{K_{SR}}$$

Definimos como concentración específica al cociente de la concentración molar de ligante libre y la constante microscópica. A la concentración específica la denotamos con una letra griega, en el caso de S , α :

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}}$$

La concentración del complejo RS , en función de concentración específica de S es:

$$[RS] = 3[R]\alpha$$

En el caso de los complejos con inhibidor en el sitio catalítico hay que incluir la naturaleza competitiva. Esto se hace al declarar constantes microscópicas, considerando que la unión de ambos ligantes es mutuamente excluyente. Por ejemplo, el complejo RSI se construye considerando la secuencia siguiente de unión: una molécula de S se une a un confórmero R con 3 sitios libres y se disocia de un complejo RS con un sitio ocupado, de ahí el coeficiente $1/3$ que modifica a K_{SR} . La molécula I se une a un complejo RS con DOS sitios catalíticos libres, y se disocia de un complejo RIS con un sitio ocupado por I . De ahí el coeficiente $2/1$ que modifica a K_{IR} . Finalmente, se define la concentración específica de inhibidor para sitio catalítico como β :

$$[RIS] = \frac{[R][S][I]}{\frac{1}{3} \frac{1}{2} K_{SR} K_{IR}} = 6 \frac{[R][S][I]}{K_{SR} K_{IR}}$$

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}}, \beta = \frac{[I]}{K_{IR}}$$

$$[RIS] = 6[R]\alpha\beta$$

Cuando el inhibidor se une al sitio alostérico, la unión es independiente al sitio catalítico, por lo que los coeficientes de modificación de K_{aR} , la constante microscópica de I y el sitio alostérico, también lo son.

$$[RSII^a] = \frac{[R][S][I][I^a]}{\frac{1}{3} \frac{1}{2} \frac{1}{3} K_{SR} K_{IR} K_{aR}} = 18 \frac{[R][S][I][I^a]}{K_{SR} K_{IR} K_{aR}}$$

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}}, \beta = \frac{[I]}{K_{IR}}, \theta = \frac{[I^a]}{K_{aR}}$$

$$[RSII^a] = 18[R]\alpha\beta\theta$$

Seguindo estas reglas podemos obtener todos los complejos en conformación R, en función de $[R]$. Para obtener los complejos en conformación T en función de $[R]$, debemos definir las siguientes relaciones:

$$L = \frac{[T]}{[R]}$$

$$[T] = [R][L]$$

$$c = \frac{K_{SR}}{K_{ST}}, d = \frac{K_{IR}}{K_{IT}}, e = \frac{K_{aR}}{K_{aT}}$$

Inicialmente se construye el complejo en función de $[T]$ y de constantes microscópicas para T. Después se define en función de L y de $[R]$, y de constantes microscópicas para R usando las relaciones previamente descritas:

$$[TSII^a] = \frac{[T][S][I][I^a]}{\frac{1}{3} \frac{1}{2} \frac{1}{3} K_{ST} K_{IT} K_{aT}} = 18 \frac{L[R][S][I][I^a]}{\frac{K_{SR} K_{IR} K_{aR}}{cde}}$$

$$\alpha = \frac{[S]}{K_{SR}}, \beta = \frac{[I]}{K_{IR}}, \theta = \frac{[I^a]}{K_{aR}}$$

$$[TSII^a] = 18 L c d e [R] \alpha \beta \theta$$

Seguindo este procedimiento, los complejos de la región del mecanismo bordeada en verde claro son:

$[R]=[R]$
$[RS]=3[R]\alpha$
$[RS_2]=3 [R] \alpha^2$
$[RS_3]=[R] \alpha^3$
$[RSI]=6 [R]\alpha\beta$
$[RSI_2]=3/2 [R] \alpha \beta^2$
$[RI]=3[R]\beta$
$[RI_2]=3 [R] \beta^2$
$[RI_3]=[R] \beta^3$
$[RS_2I]=3 [R] \alpha^2 \beta$

Tabla 1. Complejos de la sección verde clara

Nuestro objetivo es construir las sumatorias de la *Ecuación 2*. Aparentemente necesitamos conocer todas las expresiones de equilibrio de los complejos para realizarlo. Sin embargo, por inspección de los complejos del área verde clara podemos construir las sumatorias y la ecuación final sin necesidad de definir cada uno de los 80 complejos de las otras partes del mecanismo. Esto se realiza de la siguiente manera:

El primer paso es obtener el numerador ν de la ecuación, por lo que necesitamos la sumatoria de la concentración de todos los complejos ligados multiplicados por la estequiometría de sustrato correspondiente. Los complejos con sitios catalíticos productivos del área verde clara están marcados en negritas en la Tabla 1, su sumatoria es:

$$\sum_{x=1, y=0}^{x=3, y=(3-x)} x [RS_x I_y] = [R] (3\alpha + 6\alpha^2 + 3\alpha^3 + 6\alpha\beta + 3\alpha\beta^2 + 6\alpha^2\beta)$$

Factorizando $[R]$, 3 , α y el otro término del producto:

$$\sum_{x=1, y=0}^{x=3, y=(3-x)} x [RS_x I_y] = 3 [R] \alpha (1 + \alpha + \beta)^2$$

Generalizamos para n sitios:

Ecuación 3:

$$\sum_{x=1, y=0}^{x=n, y=(n-x)} x [RS_x I_y] = n [R] \alpha (1 + \alpha + \beta)^{(n-1)}$$

Hasta ahora sólo tenemos los complejos del área verde clara. Todavía necesitamos construir las partes del mecanismo donde se une una molécula de I al sitio alostérico, o sea los complejos con I^a . Si inspeccionamos la función del equilibrio del complejo $RSII^a$ del mecanismo con 3 sitios podemos ver que:

$$[RSII^a] = [R] 18\alpha\beta\theta = [RSI] 3\theta = [RSI] \frac{[RI^a]}{[R]}$$

Esta expresión se puede generalizar para n sitios. Como mencionamos en párrafos anteriores, la unión de I^a al sitio alostérico es independiente de la unión al sitio catalítico, por lo que cualquier complejo con I en el sitio alostérico será igual al producto del

complejo sin I ligado en sitio alostérico por el cociente del complejo con I unido al sitio alostérico y la forma R sin ligantes. Expresado matemáticamente:

$$[RS_x I_y I_z^a] = [RS_x I_y] \frac{[RI_z^a]}{[R]}$$

El siguiente paso es definir la sumatoria que representa a todos los sitios *productivos* en conformación R , o sea toda el área bordeada en tonos verdes (claro y oscuro):

$$\sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y I_z^a] = \sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y] \frac{[RI_z^a]}{[R]}$$

Sustituyendo por la *Ecuación 3*:

Ecuación 4:

$$\sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y I_z^a] = n [R] \alpha (\alpha + \beta + 1)^{(n-1)} \sum_{z=0}^{z=n} \frac{[RI_z^a]}{[R]}$$

Los primeros tres complejos de la *Tabla 1* representan los complejos con S en el sitio catalítico y el sitio alostérico vacío. Podemos concluir que los complejos con I en el sitio alostérico y el sitio catalítico vacío se construyen con los mismos coeficientes, pero con constantes microscópicas distintas:

$[R] = [R]$
$[RI^a] = 3[R]\theta$
$[RI^a_2] = 3[R]\theta^2$
$[RI^a_3] = [R]\theta^3$

Por lo tanto, las sumatoria de los complejos es:

$$\sum_{z=0}^{z=3} [RI_z^a] = [R](1 + 3\theta + 3\theta^2 + \theta^3)$$

Factorizando:

$$\sum_{z=0}^{z=3} [RI_z^a] = [R](1 + \theta)^3$$

Generalizando para n sitios y dividiendo entre $[R]$:

$$\sum_{z=0}^{z=n} \frac{[RI_z^a]}{[R]} = (1 + \theta)^n$$

Ahora, sustituimos esta ecuación en la *Ecuación 4* y obtenemos:

$$\sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y I_z^a] = n [R] \alpha (\alpha + \beta + 1)^{(n-1)} (\theta + 1)^n$$

Recordemos que todavía nos hacen falta los sitios productivos en complejos T. Por inspección de la ecuación del complejo *TSII* (p. 43), los complejos T son iguales a los complejos R, pero multiplicados por L y la literal o literales correspondientes que relacionan las constantes de disociación microscópicas de ambas formas de la enzima (c , d , e). Sabiendo esto, y siguiendo todo el procedimiento antes descrito:

$$\sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [TS_x I_y I_z^a] = n [R] L c \alpha (c \alpha + d \beta + 1)^{(n-1)} (e \theta + 1)^n$$

La sumatoria de todos los sitios ligados productivos tanto en R como en T es igual a v , o el numerador de la parte derecha de la *Ecuación 2*:

$$v = \sum_{x=1, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y I_z^a] + x [TS_x I_y I_z^a]$$

La parte derecha es la suma de las ecuaciones de T y de R, por lo que:

$$v = n [R] \alpha (\alpha + \beta + 1)^{n-1} (\theta + 1)^n + n [R] L c \alpha (c \alpha + d \beta + 1)^{n-1} (e \theta + 1)^n$$

Factorizando n y $[R]$:

$$v = n [R] \{ \alpha (\alpha + \beta + 1)^{n-1} (\theta + 1)^n + L c \alpha (c \alpha + d \beta + 1)^{n-1} (e \theta + 1)^n \}$$

Ya tenemos el numerador de nuestro modelo. El denominador se obtiene con el mismo procedimiento para el total de sitios catalíticos existentes, y es igual a V :

$$V = \sum_{x=0, y=0, z=0}^{x=n, y=(n-x), z=n} x [RS_x I_y I_z^a] + x [TS_x I_y I_z^a]$$

Para declarar matemáticamente que son todos los sitios catalíticos existentes, se pone el coeficiente $x = n$ ya que en cada complejo EXISTEN n sitios. Por ejemplo, R sin ligantes tiene 3 sitios catalíticos. La expresión es:

$$V = n[R](\alpha + \beta + 1)^n (\theta + 1)^n + n[R]L(c\alpha + d\beta + 1)^n (e\theta + 1)^n$$

Factorizando n y $[R]$:

$$V = n[R]\{(\alpha + \beta + 1)^n (\theta + 1)^n + L(c\alpha + d\beta + 1)^n (e\theta + 1)^n\}$$

Realizando el cociente v/V para obtener la ecuación final:

$$\frac{v}{V} = \frac{n[R]\{\alpha(\alpha + \beta + 1)^{n-1}(\theta + 1)^n + Lc\alpha(c\alpha + d\beta + 1)^{n-1}(e\theta + 1)^n\}}{n[R]\{(\alpha + \beta + 1)^n (\theta + 1)^n + L(c\alpha + d\beta + 1)^n (e\theta + 1)^n\}}$$

Eliminando $n[R]$ y dividiendo entre $(\theta + 1)^n$, obtenemos la *Ecuación 6* (página 29) de la sección de resultados:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha + \beta + 1)^{n-1} + Lc\alpha \frac{(e\theta + 1)^n}{(\theta + 1)^n} (c\alpha + d\beta + 1)^{n-1}}{(\alpha + \beta + 1)^n + L \frac{(e\theta + 1)^n}{(\theta + 1)^n} (c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Aún se puede simplificar la expresión definiendo la constante alostérica aparente L' :

$$L' = L \frac{(1 + e\theta)^n}{(1 + \theta)^n}$$

Para finalmente obtener:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha(\alpha + \beta + 1)^{n-1} + L'c\alpha(c\alpha + d\beta + 1)^{n-1}}{(\alpha + \beta + 1)^n + L'(c\alpha + d\beta + 1)^n}$$

Bibliografía

1. Plumbridge J, Vimr E. Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(1):47-54.
2. Plumbridge JA. Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon. *Molecular Microbiology*. 1989;3(4):505-15.
3. Álvarez-Añorve LI B-JI, Calcagno ML, Plumbridge J. Allosteric Regulation of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (NagB) and Growth of *Escherichia coli* on Glucosamine. *Journal of Bacteriology*. 2009 Oct 2009;191(20):6401-7.
4. Alvarez-Anorve LI, Calcagno ML, Plumbridge J. Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *J Bacteriol*. 2005 May; 187(9):2974-82.
5. Montero-Moran GM, Lara-Gonzalez S, Alvarez-Anorve LI, Plumbridge JA, Calcagno ML. On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. 2001 Aug 28;40(34):10187-96.
6. Oliva G, Fontes MR, Garratt RC, Altamirano MM, Calcagno ML, Horjales E. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure*. 1995;3(12):1323-32.
7. Segel IH. *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. New York: Wiley; 1975.
8. Monod J, Wyman, J. y Changeux J.P. On the nature of allosteric transitions. *J Mol Biol*. 1965(12):88-118.
9. Bustos-Jaimes I, Ramirez-Costa M, De Anda-Aguilar L, Hinojosa-Ocana P, Calcagno ML. Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. 2005 Feb 1;44(4): 1127-35.
10. Smith GD RD, Kuchel PW. Active site directed effectors of allosteric enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1975(377):197-202.
11. Jawali N. Hysteretic nature of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1990 Feb;277(1):69-73.
12. Kuo LC. Allosteric cofactor-mediated enzyme cooperativity- a theoretical treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America- Biological Sciences*. 1983;80(17):5243-7.

13. Erneux C, Miot F, Boeynaems JM, Dumont JE. Paradoxical stimulation by 1-Methyl-3-Isobutylxanthine of rat liver cyclic-AMP phosphodiesterase. *FEBS Letters*. 1982;142(2):251-4.
14. Kaletha K, Skladanowski A. Regulatory properties of rat-heart AMP deaminase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1979;568(1):80-90.
15. Horjales E, Altamirano MM, Calcagno ML, Garratt RC, Oliva G. The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure with Folding & Design*. 1999;7(5):527-37.
16. Rudino-Pinera E, Morales-Arrieta S, Rojas-Trejo SP, Horjales E. Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002 Jan;58(Pt 1):10-20.
17. Bustos-Jaimes I, Sosa-Peinado A, Rudino-Pinera E, Horjales E, Calcagno ML. 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 May 24;319(1):183-9.
18. Brigham C et al. Sialic Acid (N-Acetyl Neuraminic Acid) Utilization by *Bacteroides fragilis* Requires a Novel N-Acetyl Mannosamine Epimerase. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(11):3629-38.
19. Cochrane. Structural and Chemical Basis for Glucosamine 6-Phosphate Binding and Activation of the glmS Ribozyme. *Biochemistry*. 2008;48(15):3239-46.
20. M H. Nonenzymatic Modifications of Amino Sugars In Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1991;288(2):317-23.
21. Calcagno M, Campos PJ, Mulliert G, Suastegui J. Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1984;787(2):165-73.
22. Montero-Moran GM, Horjales E, Calcagno ML, Altamirano MM. Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. 1998;37(21):7844-9.
23. Blangy D, Buc H, Monod J. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 1968 Jan 14;31(1):13-35.
24. Altamirano MM, Plumbridge JA, Horjales E, Calcagno ML. Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry*. 1995;34(18):6074-82.
25. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of enzyme kinetics*. Rev. ed. London Brookfield, VT: Portland ; Ashgate Publishing [distributor]; 1995.
26. Singh V, Shi W, Evans GB, Tyler PC, Furneaux RH, Almo SC, et al. Picomolar transition state analogue inhibitors of human 5'-methylthioadenosine phosphorylase and X-ray structure with MT-immucillin-A. *Biochemistry*. 2004;43(1):9-18.

27. Singh V, Evans GB, Lenz DH, Mason JM, Clinch K, Mee S, et al. Femtomolar transition state analogue inhibitors of 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(18):18265-73.
28. Adrian FJ, Ding Q, Sim TB, Velentza A, Sloan C, Liu Y, et al. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nature Chemical Biology*. 2006;2(2):95-102.
29. Zhang JM, Adrian FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE, et al. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature*. 463(7280):501-U116.