



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Propiedades alostéricas de una GlcN6P desaminasa con plegamiento SIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Jorge Angel Marcos Viquez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario L. Calcagno Montáns
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Facultad de Química

Dra. Adela Rodríguez Romero
Instituto de Química

Ciudad de México. Marzo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Adriana de antemano, por los logros que nos esperan.

Agradecimientos

- Al CONACYT por el financiamiento a los proyectos:
 - 99857
 - 116074
 - 235831
- Al CONACYT por la beca de Posgrado.
- Al PAPIIT por el apoyo a los proyectos
 - IN213312
 - IN216615
- Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM), por el apoyo en el trabajo estructural en este proyecto.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo para la asistencia al PABMB Congress (Chile, 2013) y al Taller de Simulación y Modelado en GPU's (México, 2015).
- A la Dra. Adela Rodríguez Romero y la Dra. Rosario Muñoz Clares por la contribución, revisión y discusión del proyecto.
- A la Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva, al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, al Dr. Rogelio Rodríguez Sótres y al Dr. Enrique Rudiño Piñera por la revisión y comentarios a este documento.
- A Andrea Celeste Medina García por el apoyo experimental, discusión de resultados y contribución al proyecto.
- Al Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez por la contribución en la simulación de dinámica molecular, por la revisión y discusión de este documento y durante el proyecto.
- A Alfonso Labra Núñez por el apoyo técnico en los experimentos preliminares de ITC.
- Al Dr. Ismael Bustos Jaimes por permitir que el proyecto continúe.
- A la Técnico Académico M. en C. Laura I. Álvarez Añorve por el apoyo en la purificación y sobreexpresión de la cepa *S. oneidensis*.

Abstract

The GlcN6P deaminase (EC 3.5.99.6) catalyses the isomerisation-deamination of glucosamine 6-phosphate (GlcN6P) releasing fructose 6-phosphate (Fru6P) and ammonium NH_4 . In some species this reaction is a regulated metabolic step displaying homotropic cooperativity and allosteric activation by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P). Most of the best known GlcN6P deaminases have a Rossmann-like fold, but the enzyme from *Shewanella oneidensis* (*Son. nagBII* gene) has an entirely different fold, known as SIS (sugar isomerase) fold. This enzyme is a remarkable case of homoplasy due its functional convergence both in allosteric regulation as in homotropic cooperativity.

We constructed a structural model of SonNagBII based on the high identity templates. The enzyme is a homodimer, with a single allosteric site per dimer, located in the intersubunit space. This site, apparently evolutionary recent, was identified by molecular docking and verified by site-directed mutagenesis. The expected binding stoichiometry was confirmed by direct binding experiments. The conformational transition associated with activator-protein interaction was described by techniques such as intrinsic protein fluorescence, circular dichroism, dynamic light scattering and molecular dynamics simulation. Using site-directed mutagenesis, His242 was identified as the responsible for the catalysis of sugar ring-opening step and in the allosteric transition this residue moves close enough to the sugar-binding site in order to catalyse this step. The allosteric activation is well explained by the MWC model, nevertheless, enzyme kinetics analysis demonstrates that homotropic cooperativity depends on a different molecular mechanism. Both behaviours can be experimentally dissociated by site-directed mutagenesis, allosteric inhibition by citrate and under conditions of total suppression of the conformational transition by nanoencapsulation wet silica sol-gels. The homotropic cooperativity was not explained in the light of the kinetic cooperativity nor oligomeric equilibrium induced by the ligands. We postulate that this behavior depends on the emergence of a non-productive binding site for the substrate found by molecular docking and supported by site-directed mutagenesis.

Resumen

La GlcN6P desaminasa (EC 3.5.99.6) es la enzima que cataliza la isomerización y desaminación de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) liberando fructosa 6-fosfato (Fru6P) y amonio NH_4 . En algunas especies, esta reacción es un punto de regulación metabólico ya que la enzima presenta cooperatividad homotrópica y activación alostérica por la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). La gran mayoría de las GlcN6P desaminasas tiene un plegamiento derivado de Rosmann, sin embargo, la enzima en *Shewanella oneidensis* (gen *Son. nagBII*) tiene un plegamiento distinto, conocido como plegamiento de azúcar isomerasa (SIS). Esta enzima es un caso excepcional de homoplasia, debido no solo a la convergencia funcional, sino a la regulación alostérica y a la cooperatividad homotrópica.

Se construyó un modelo estructural de SonNagBII con base en proteínas homólogas con alta identidad en secuencia. La enzima es un homodímero, en el cual existe un solo sitio alostérico de unión a la GlcNAc6P, localizado en el espacio intersubunitario. Este sitio, aparentemente reciente en la evolución, fue identificado por acoplamiento molecular y fue confirmado por mutagénesis sitio-dirigida. La estequiometría fue medida por experimentos de unión al equilibrio. La transición conformacional asociada a la unión de la GlcNAc6P fue descrita por fluorescencia, dicroísmo circular, dispersión dinámica de luz y simulación de dinámica molecular. Mediante mutagénesis dirigida, comprobamos que la His242 es la responsable de la catálisis de la apertura del anillo del azúcar; este residuo se acerca al sitio activo en la transición conformacional inducida por el activador alostérico. La activación alostérica es bien explicada por el modelo MWC, sin embargo, los resultados cinéticos muestran que la cooperatividad homotrópica depende de un mecanismo molecular distinto al propuesto en este modelo. Los comportamientos cooperativos y alostéricos pueden ser separados experimentalmente por mutagénesis sitio-dirigida, inhibidores alostéricos y bajo condiciones de supresión de la transición conformacional encapsulando a la proteína en geles nanoporosos de sílice. Se demostró que la cooperatividad en esta enzima no es producida por cooperatividad cinética ni por un cambio en el estado de agregación inducido por ligantes. Se ha postulado que este comportamiento depende de la emergencia de un sitio alostérico de unión por el sustrato, encontrado por acoplamiento molecular y estudiado por mutagénesis dirigida.

Abreviaturas

c Constante que determina la relación entre las afinidades del conformero R y el conformero T definida como: $c = K_R / K_T$

BCA Ácido bicinconínico

BLAST Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico.

CD Dicroísmo circular

DLS Dispersión dinámica de luz

EDTA Acido Etilendiamintetracético

Fru6P D-fructosa-6-fosfato

GFAT Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa

GlcN Glucosamina

GlcNAc *N*-acetil-D-glucosamina

GlcNAc6P *N*-acetilglucosamina-6-fosfato

GlcNol6P Glucitolamina-6-fosfato

GlcN6P D-glucosamina 6-fosfato

h Coeficiente de Hill

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

IF Intensidad de fluorescencia

IPTG Isopropil-tio- β -galactopiranósido

$K_{0.5}$. Concentración a la cual se llega a la mitad de la V_{max} en curvas de saturación sigmoides.

k_{cat} Constante catalítica

kDa Kilodaltones

K_m Constante de Michaelis-Menten

K_R Constante de disociación del conformero R

K_T Constante de disociación del conformero T

L Constante alostérica definida como $L = T_0 / R_0$

LB Luria-Bertani

LGT Transferencia lateral de genes

NAG Vía del catabolismo de aminoazúcares
NagBI Glucosamina-6-fosfato desaminasa con plegamiento derivado de Rossmann
NagBII Glucosamina-6-fosfato desaminasa con plegamiento SIS
NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NISE Enzimas isofuncionales no-homólogas
MWC Modelo alostérico concertado de Monod, Wyman y Changeux
PEG Polietilenglicol
PDB Banco de Datos de Proteínas
PTS Sistema de fosfotransferasas
R Confórmero de la proteína de mayor afinidad por su ligando
SIS Tipo de plegamiento común en azúcar isomerasas
T Confórmero de la proteína de menor afinidad por su ligando
Tris Tris(hidroximetil) aminometano
 V_{\max} Velocidad máxima
 v/V o \bar{y} Fracción de saturación

Índice

Agradecimientos	2
Resumen (Abstract)	3
Abreviaturas	5
Introducción	8
Antecedentes	13
Objetivos	18
Métodos	19
Resultados y discusión	23
Filogenia	25
Cristalogénesis	25
Modelo	34
NMA	36
Dinámica molecular	38
Dicroísmo circular	44
Fluorescencia	46
Cinética	48
Modelo propuesto	60
Discusión general	68
Conclusiones	71
Perspectivas	72
Bibliografía	74

Introducción

Alostería

Novick y Szilard en 1950 expusieron que las enzimas que catalizan la primera etapa de una vía metabólica a menudo pueden ser inhibidas por el producto final de la misma, fenómeno conocido como inhibición por retroalimentación (39). Tomando en cuenta que el producto final de la vía y el sustrato de la enzima inhibida son de forma distinta (alo-estéricos), Monod, Jacob y Changeux le llamaron efector alostérico al inhibidor e introducen el término de alostería (33) que ha sido ampliamente usado en diversos contextos dentro de las ciencias biológicas.

La alostería fue definida como el mecanismo de regulación de una proteína que permite cambios en la afinidad por un ligando en presencia de otro, estéricamente distinto, mediante un acoplamiento termodinámico entre los sitios de unión. Este concepto no solo explicó la inhibición por retroalimentación, sino que permitió entender la comunicación entre vías metabólicas que al ser químicamente independientes, adquieren su relevancia fisiológica solo al precio de una estrecha comunicación. También, se entendió la acción hormonal y la función del represor del operón *lac* recién descrito por Jacob y Monod (32). Monod, Wyman y Changeux publicaron el primer modelo alostérico al que se le refiere como modelo MWC (33).

El modelo MWC considera en la proteína la existencia de dos conformaciones estables de diferente afinidad por sus ligantes, ambas existen en ausencia de éstos. El equilibrio entre estas poblaciones puede ser desplazado por activadores si seleccionan a la conformación de mayor afinidad, o inhibidores si seleccionan a la conformación de menor afinidad. Otra restricción importante del modelo es el criterio de simetría, que establece que las proteínas alostéricas y cooperativas deben ser oligoméricas, y que todas las

subunidades de la misma macromolécula deben estar en el mismo estado conformacional al mismo tiempo.

Antes del modelo MWC, las propiedades dinámicas de las proteínas ya tenían relevancia en su función; la imagen de la llave y la cerradura rígida con la que se describía la interacción entre el sustrato y el sitio activo ya había sido sustituida por Koshland por una cerradura adaptativa. Las proteínas pueden sufrir cambios estructurales y estos cambios pueden ser relevantes en el acoplamiento entre sitios en proteínas alostéricas. Koshland, Nemethy y Filmer, dos años después del modelo de MWC, propusieron un modelo diferente (modelo KNF) que explicaba satisfactoriamente el comportamiento cooperativo de la hemoglobina pero no comportamientos alostéricos (25). El modelo KNF no requiere la conservación de la simetría y se basa en el ajuste inducido, esto es que existe exclusivamente una conformación de la proteína en ausencia de ligantes y una conformación distinta en presencia de éstos.

Ambos modelos, MWC y KNF en general funcionan en términos fenomenológicos y continúan siendo parte central del entendimiento de la regulación enzimática (14). A lo largo del tiempo se han generado un gran número de evidencias respaldando a cada uno, y algunos autores han sugerido que ambos modelos pueden ser considerados como casos particulares de modelos más generales, los cuales no están restringidos a la selección conformacional ni al ajuste inducido (19).

El modelo MWC ha sido, sin embargo, el de uso más amplio por su capacidad explicativa (33) y su variedad de aplicaciones (57), además de que es capaz de explicar tanto el comportamiento alostérico como el cooperativo, que a menudo aparecen juntos en la evolución y para muchas proteínas alostéricas son parte del mismo evento molecular. Actualmente, a pesar del entendimiento profundo de los mecanismos de regulación de algunas enzimas, el marco

teórico de la alostería se ha visto escasamente ampliado más allá de estos modelos (14).

Las GlcN6P desaminasas

La GlcN6P desaminasa (2-amino-2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato aminohidrolasa–cetol isomerasa, EC 3.5.99.6 o NagBI) es una enzima clave en el metabolismo de aminoazúcares ya que convierte la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en ion amonio (NH_4^+) y fructosa 6-fosfato (Fru6P), un intermediario glucolítico. En algunas especies es alostéricamente activada por la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P), que tiene su propio sitio de unión en la molécula. Esta enzima ha sido bien estudiada en bacterias (32, 44, 13, 56) y en algunos eucariontes como hongos, insectos y mamíferos (8, 29, 43, 51, 7). Todas ellas presentan un plegamiento derivado del de Rossmann y sus secuencias revelan homología.

La GlcN6P desaminasa (NagBI) de *E. coli* es una de las proteínas alostéricas más estudiadas. Su estructura, mecanismo catalítico y cinética alostérica han sido ampliamente estudiados por química de proteínas, cinética enzimática, espectrofotometría, métodos cristalográficos y recientemente con técnicas de restricción conformacional (2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 16, 23, 26, 27, 36, 37, 42, 48, 54, 60).

NagBI de *E. coli* es un sistema alostérico que se puede describir en términos operativos con el modelo MWC (13). Presenta cooperatividad positiva con respecto a la concentración de su sustrato, la GlcN6P, lo que se manifiesta en la forma sigmoide de las curvas de velocidad contra la concentración de sustrato. En presencia de GlcNAc6P, la enzima presenta activación heterotrópica que se manifiesta como un aumento en la afinidad por la GlcN6P

(13). Este sistema es de tipo K , esto es que la afinidad de la enzima por el sustrato aumenta conforme la concentración de GlcNAc6P aumenta, mientras que la V_{max} se mantiene constante (Figura 1). Los sitios de unión en la proteína están termodinámicamente acoplados entre subunidades, y los cambios de afinidad van acompañados de una transición conformacional (13). En esta enzima la cooperatividad y la activación alostérica dependen de mecanismos estrechamente acoplados, así como en la mayoría de las proteínas alostéricas estudiadas, hasta ahora.

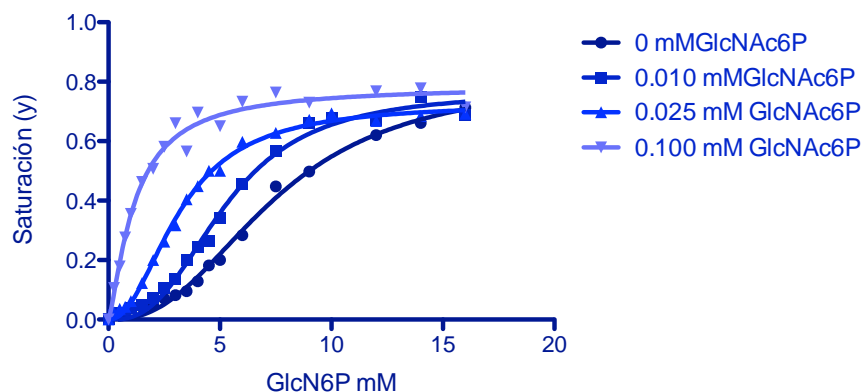


Figura 1. Cinética de la reacción de la NagB de *E. coli*. Es un sistema alostérico tipo K ya que la afinidad por la GlcN6P aumenta a medida que aumenta la concentración de GlcNAc6P, mientras que la V_{max} no cambia. Modificado de Calcagno y col. 1984.

Las enzimas alostéricas, en general, tienen un papel indispensable en la regulación de las vías metabólicas. El carácter alostérico de NagBI es generalmente esencial en la regulación del catabolismo de aminozúcares, ya que la enzima puede responder a sutiles variaciones en las concentraciones de sus ligantes aumentando o disminuyendo su afinidad por el sustrato en periodos de tiempo mas breves que los que requiere la regulación por la transcripción de nuevos genes.

La mayoría de las enzimas que participan en el catabolismo de aminoazúcares están ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida, sin embargo NagBI, que es la enzima regulatoria en esta vía metabólica presenta una distribución irregular (1, 6). Existe en eucariontes, en bacterias solo en algunos grupos y no se encuentra en arqueas.

En 2005 Takeshi Takana y colaboradores reportaron una GlcN6P desaminasa distinta a las reportadas anteriormente en la arquea *Thermococcus kodakaraensis* (55), esta enzima tiene plegamiento conocido como SIS (*Sugar Isomerase*) y es dimérica. En el 2006, Yang y colaboradores reportan en la bacteria *Shewanella oneidensis* una GlcN6P desaminasa con este mismo plegamiento (59), que además tiene activación alostérica por la GlcNAc6P y presenta curvas de saturación sigmoides en ausencia de este compuesto. A este tipo de GlcN6P desaminasas, isofuncionales no homólogas de NagBI, se les dio el nombre de NagBII y, hasta el momento, no hay mas reportes de este tipo de GlcN6P desaminasas, a pesar de que el análisis de sus secuencias sugiere que tienen una amplia distribución en bacterias y arqueas (31).

Homoplasia

Las enzimas que en diferentes especies catalizan la misma reacción bioquímica con afinidades por el sustrato comparables usualmente son transcritas por genes homólogos (ortólogos). En ellas la similitud funcional se acompaña típicamente de una similitud estructural (41). No obstante, se han reportado casos excepcionales de proteínas que tienen la misma función pero no presentan similitud significativa en su secuencia de aminoácidos ni en su estructura, por lo que se plantea que carecen de un origen en común y se les ha referido como proteínas análogas o isofuncionales no-homólogas (NISE, 41).

El evento evolutivo en el que dos estructuras convergen en función sin tener un origen en común es llamado homoplasia. Se han reportado 224 de estos casos en proteínas, siendo el caso de NagBI y NagBII particularmente interesante, ya que no solo apareció en ambas enzimas un sitio catalítico con afinidad comparable por el mismo sustrato, la GlcN6P, sino que además la catálisis es cooperativa. Más aún estas enzimas poseen un sitio de unión por la GlcNAc6P acoplado termodinámicamente con el sitio activo, de manera que su unión aumenta la afinidad por la GlcN6P en ambas enzimas. Hasta el momento no se ha documentado un caso similar, en el que la convergencia no solo sea en la función catalítica sino también en el comportamiento alostérico y cooperativo.

Antecedentes

Como parte de mi trabajo de tesis de Licenciatura trabajamos con la sobreexpresión y purificación de la enzima NagBII de *S. oneidensis*, así como en la caracterización de su cinética alostérica y en un estudio estructural preliminar. Se optó por continuar con el estudio de NagBII ya que esta enzima es un modelo experimental único, no solo por ser un caso de homoplasia, sino también debido a que la cooperatividad homotrópica que presenta es independiente del mecanismo que da origen a la activación alostérica. Esta independencia en mecanismos escapa a lo predicho por los modelos de alostería y cooperatividad existentes, que en general señalan que ambos comportamientos son parte del mismo mecanismo molecular.

Clonación y purificación

El gen *nagBII* de *S. oneidensis* fue clonado por la Dra. Jacqueline Plumbridge del Inst. de Biologie Physico-Chimique (París). Nosotros logramos una excelente sobreexpresión de la enzima utilizando tres cepas inducibles

derivadas de *E. coli* BL21, que se han utilizado para la sobreexpresión de NagBI. No fue posible purificar NagBII por afinidad al sitio alostérico con la resina de 6-aminohexanoil-glucosamina 6-P agarosa, diseñada para la purificación de NagBI de *E. coli* (36) debido a que la estructura del sitio alostérico lo hace inaccesible a la matriz de afinidad. La purificación se logró usando cromatografía de intercambio aniónico y de interacción hidrofóbica a pH 7.5, dos unidades arriba de su punto isoelectrico, con un rendimiento del 39% (tabla 1).

Tabla 1. Purificación de NagBII de *Shewanella oneidensis* por métodos cromatográficos.

Paso de Purificación	Volumen (ml)	Concentración proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad total (U*)	Actividad específica (U* /mg)	Veces purificada (n)	Rendimiento (%)
Extracto soluble	35	8.3	290.5	2153950.015	7414.63	1	100
Columna Source 15Q	29	4.45	129.05	1367090.53	10593.495	2.25	63.46
Columna Phenyl sepharose	140	0.37	51.52	845262.88	16406.500	5.62	39.24

*U= Fru6P(μmol)/min a 30°C

Estudios estructurales

Para obtener el estado oligomérico se utilizó: cromatografía de exclusión molecular; geles de poliacrilamida con gradiente de poro en condiciones nativas; geles en condiciones desnaturizantes con el oligómero entrecruzado con glutaraldehído; y medidas de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) en ausencia y en presencia de ligantes, a distintas concentraciones de proteína. En todos, los casos identificamos al dímero como la forma estable de la proteína en solución .

No contamos con estructura cristalográfica para NagBII de *S. oneidensis* por lo que se construyó un modelo del dímero por homología (figura 2A.) utilizando Modeller y con base en la estructura de una proteína que presenta un 84% de

identidad con la nuestra (PDB 3HBA). Esta proteína está reportada como posible fosfoazúcar isomerasa de *Shewanella denitrificans* debido a que no hay estudios funcionales de ella. Dado el alto porcentaje de identidad es altamente probable que sea una proteína ortóloga y que compartan las mismas características funcionales. Su estado oligomérico es el dímero con una simetría C2, lo que es consistente con resultados experimentales previos y con lo visto para la ortóloga en arqueas (55). La estructura 3HBA es de buena calidad: fue afinada en un intervalo de resolución de 29.14 a 2.0 Ångström, aunque el valor de I/Σ (10.6) indica que el modelo pudo haberse refinado; la validación *Molprobit* señala que no presenta inconsistencias estereoquímicas.

El sitio alostérico se buscó por acoplamiento molecular rígido sobre toda la superficie del modelo usando el ligando alostérico, la GlcNAc6P, utilizando AutoDock Vina. Los mejores resultados indican que se une una única molécula del ligando alostérico a la proteína en el centro del dímero, haciendo contactos idénticos con ambas subunidades, particularmente con los residuos Ser51 y Lys218 (figura 2B). El sitio fue comprobado por mutagénesis dirigida con la mutante Lys218-Ala. Los ensayos cinéticos muestran que esta mutante pierde la capacidad de ser alostéricamente activada por la GlcNAc6P, evidencia de que la Lys218 es esencial en la unión del activador alostérico en particular de la interacción con el grupo fosfo de este compuesto. El sitio alostérico está en el núcleo del dímero, lejano de la superficie; la GlcNAc6P se acomoda con el grupo acetamido oculto, esto explica por que la enzima no se pudo purificar por afinidad por el sitio alostérico, tal como se ha podido hacer con la desaminasa de *E. coli* (Montero Morán, 2001). Cinéticas de unión del activador alostérico marcado radioactivamente (^3H -GlcNAc6P) confirman que se une una sola molécula de GlcN6P por dímero, con una K_d de $85 \pm 17 \mu\text{M}$, consistente con la calculada por ensayos cinéticos. El sitio activo no se pudo definir con la

misma metodología hasta esta parte del proyecto, como se detallará mas adelante.

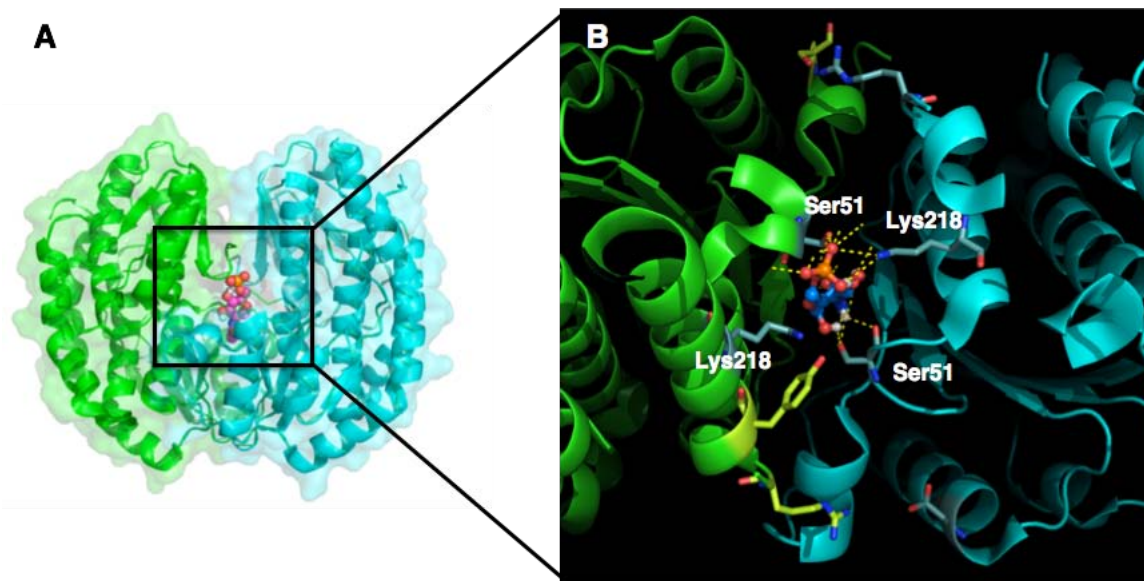


Figura 2. (A) Modelo del dímero de la proteína, azul y verde representan distintas cadenas. Se muestra el sitio de unión de la GlcNAc6P en el centro del dímero. (B) La GlcNAc6P hace contactos idénticos con cada una de las subunidades de la proteína, el grupo fosfo de la GlcNAc6P se estabiliza por las Lys218 de ambas subunidades.

Estudios cinéticos

Inicialmente los estudios cinéticos se realizaron a las mismas condiciones en las que se estudia a NagBI de *E. coli* (pH 7.5, 30°C, 10 min.). Los resultados indican que la convergencia evolutiva funcional se genera con gran detalle entre NagBI y NagBII ya que no solo llevan a cabo la misma reacción con parámetros cinéticos comparables, sino que presentan efectos heterotrópicos y homotrópicos similares (Tabla 2): NagBII presenta activación heterotrópica con la GlcNAc6P y cooperatividad homotrópica positiva en ausencia del activador, lo que se aprecia en la forma sigmoide de las curvas cinéticas (Fig. 3A). Se

puede ver que el efecto heterotrópico (con respecto a la concentración de GlcNAc6P) es sobre la afinidad de la enzima por la GlcN6P (Fig.3B); sin embargo también se modifica la V_{max} (Fig. 3D) a diferencia de lo que ocurre con un sistema tipo K puro. NagBI y NagBII también comparten curvas de saturación sigmoides en ausencia de GlcNAc6P y el coeficiente de Hill (h), que es un parámetro válido para para cuantificar la magnitud de la respuesta cooperativa (58), es semejante en ambas enzimas.

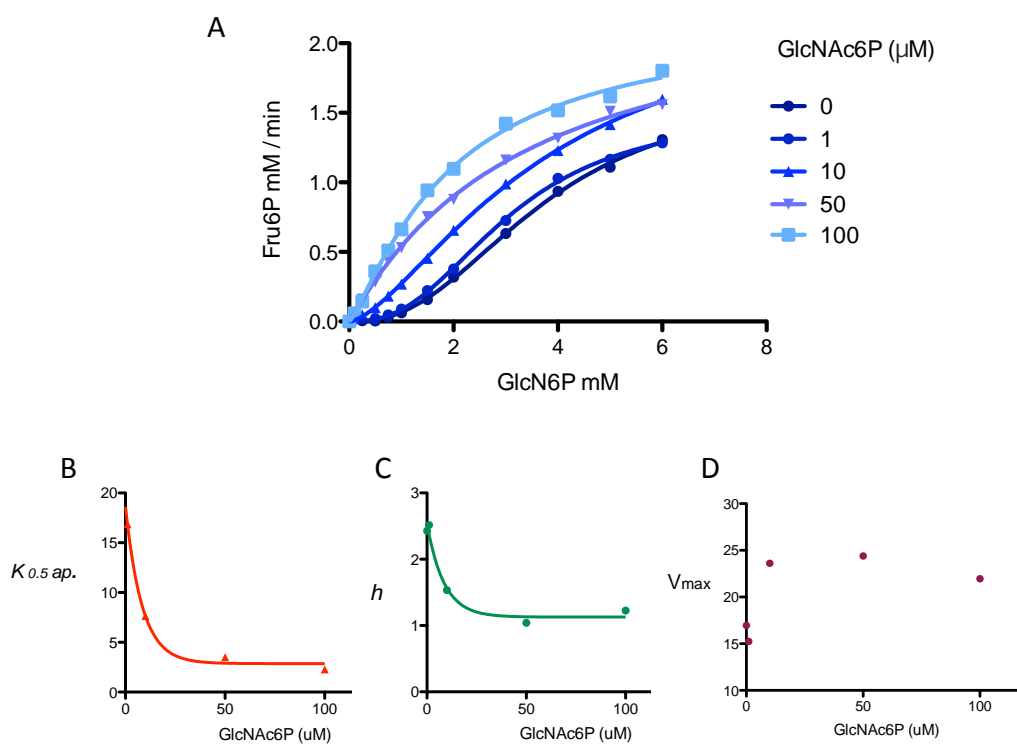


Figura 3. Resultados cinéticos de NagBII. (A) Curvas de velocidades iniciales de la enzima a concentraciones crecientes de GlcNAc6P. Ajustado a la ecuación de Hill; (B) Re gráfico de las $K_{0.5}$ ap. por la GlcN6P; (C) Re gráfico de los coeficientes h ; (D) Re gráfico de las V_{max} .

	K_{mR} (100 μ M de GlcNAc6P)	k_{cat} (s^{-1})	h (sin GlcNAc6P)	K_d GlcNAc6P
NagBII	3.7 ± 0.18 mM	133.98	2.6 ± 0.1	0.035 ± 0.005 mM
NagBI	0.55 ± 0.05 mM	157 ± 6	2.5 ± 0.1	0.084 ± 0.01 mM

Tabla 2. Comparación de parámetros cinéticos de NagBII de *S. oneidensis* y NagBI de *E. coli*

Paradoja de la cooperatividad

La cooperatividad homotrópica positiva es la asistencia mutua de ligandos idénticos para unirse a sitios equivalentes en una proteína. Esta definición relaciona por lo tanto el estado oligomérico de la proteína con la magnitud de la respuesta cooperativa, medida con el coeficiente de Hill (h). Según los modelos de cooperatividad termodinámica, incluyendo a los modelos MWC y KNF, la cooperatividad máxima que puede presentar una proteína alostérica está limitada por el número de subunidades (n), tal que $h \leq n$ (58).

El comportamiento cooperativo de NagBII, a diferencia de los de NagBI, no se pudo describir con el modelo MWC, y con ningún otro modelo basado en las leyes del equilibrio químico. Esto es debido a que la cooperatividad que presenta NagBII excede a la cooperatividad máxima que podría alcanzar según su estado oligomérico que es el dímero, ya que su coeficiente de Hill es de 2.6 (figura 3). Lo anterior llevó a proponer que la sigmoidicidad de las curvas de saturación en esta enzima dependían de un mecanismo alternativo y que para describirlo era oportuno ampliar el marco teórico de la cooperatividad.

Objetivos

Objetivos generales

- Describir los mecanismos moleculares que generan la activación alostérica.
- Describir los mecanismos moleculares que generan la aparente cooperatividad.

Objetivos particulares

Métodos

Cristalogénesis

Las pruebas de cristalización y de difracción se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM), bajo la asesoría de la Dra. Adela Rodríguez Romero.

Se probaron 96 distintas condiciones de la cristalización de las proteínas utilizando los kits comerciales Crystal Screen de Hampton 1 y Crystal Screen de Hampton 2. Para el primer kit se usó el método de gota sedente; La proteína se dializó en Tris HCl 50 mM pH 8 (a 18°C), se llevó hasta 2 mg/ml y se pusieron las pruebas en ausencia de ligantes. Se observaron las pruebas sistemáticamente cada mes.

Para probar el kit 2, la proteína fue dializada en las mismas condiciones que se usaron para el kit1: Tris HCl 50 mM pH 8 (a 18°C), pero esta vez a 2.8mg mL⁻¹. En esta ocasión además se usó como método de cristalización la gota colgante, de manera que se pusieron tres muestras de proteína por condición, estas fueron: proteína sin ligantes, proteína con GlcNol6P (inhibidor competitivo) saturante y proteína con GlcNAc6P (activador alostérico) saturante.

Como se detallará mas adelante, de los dos kits de Hampton, la mejor condición de cristalización fue la condición 4 del kit 1, esto es 0.1 M Tris pH 8.5 y 2 M (NH₄)₂SO₄ (Tabla 3; en rojo). Con base en esta condición se diseñó una matriz de condiciones semejantes, en ésta se varió en pH hacia valores mas

bajos y la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ igualmente hacia valores mas bajos. La proteína se dializó en Tris HCl pH 8 (a 18°C) a 3.5 mg/ml y se probó en esta matriz sin ligantes, saturada de GlcNol6P y saturada de GlcNAc6P. La matriz de condiciones fue la siguiente:

	BIS-TRIS	BIS-TRIS	HEPES	TRIS	TRIS	TRIS
pH	6	6.5	7	7.5	8	8.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						
2 M	SA 1A	SA 2A	SA 3A	SA 4A	SA 5A	SA 6A
1.5 M	SA 1B	SA 2B	SA 3B	SA 4B	SA 5B	SA 6B
1 M	SA 1C	SA 2C	SA 3C	SA 4C	SA 5C	SA 6C
0.5 M	SA 1D	SA 2D	SA 3D	SA 4D	SA 5D	SA 6D

Tabla 3. Condiciones basadas en la condición 4 del Kit 1. En rojo se marca la condición que coincide totalmente con la del kit de Hampton; en azul las condiciones en las que crecen microcristales (ver resultados).

Modificaciones a la purificación

Debido a que no se obtuvieron cristales en las pruebas anteriores se hicieron modificaciones al protocolo de purificación que se tenía montado, esto con la finalidad de optimizar la pureza de la proteína, aun sacrificando el rendimiento. La primera modificación fue lisar las células con una *French Press* en vez de hacerlo por sonicación con la finalidad de no someter a la proteína a demasiado estrés físico. La segunda modificación fue en el último paso de purificación que depende de una columna de interacción hidrofóbica, esta vez se restringió la colecta a las fracciones con mayor absorbancia a 280 nm para garantizar la máxima pureza de la proteína. Se añadió un paso de cromatografía de exclusión molecular al final de la purificación con la finalidad de aumentar aún mas la pureza.

Cada vez que se obtuvo la enzima pura se hicieron pruebas para comprobar su estado de pureza, integridad estructural y actividad. Se hicieron medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) de la proteína en solución en cada una de las condiciones en las que se iba a trabajar. Se hicieron ensayos de actividad y espectros de dicroísmo circular que muestran que la proteína mantiene íntegra su estructura secundaria. Para comprobar la pureza de la proteína, adicionalmente a las pruebas anteriormente descritas, se hizo espectrometría de masas de la proteína dializada en Tris 50 mM pH 7.8 y concentrada hasta 1.5 mg/ml. En los espectros de masas se puede ver que existe una población homogénea cuya masa es consistente con la calculada a partir de la secuencia.

Análisis estructural

Se generaron modelos estructurales usando Robetta y se realizó una minimización de energía usando Amber12. Para el estudio de las transiciones moleculares reutilizó en Análisis de Modos Normales (NMA) en el servidor en línea (EINémo) (24). El análisis de la estructura secundaria se llevó a cabo utilizando el complemento DSSP-STRIDE para PyMOL. Los modelos estructurales y el diseño de los segmentos de interés fueron hechos en Rosseta design (47). La dinámica molecular se realizó para el monómero hasta 100 nanosegundos y para el dímero hasta 150 nanosegundos (31300000 pasos), utilizado Amber12 SANDER, con el campo de fuerzas ff12SB; La celda fue un octaedro trunco con 14 nanómetros del centro al borde de la caja; Se simuló un total de 56066 átomos, 11592 fueron heteroátomos; El modelo de agua fue TIP4P/EW; Presión de 1 atmósfera, temperatura de 300°K. Se utilizó

UCSF Chimera-1.8.1 para la visualización y edición de las imágenes presentadas en éste documento.

Cinética enzimática

Los ensayos cinéticos se realizaron a velocidades iniciales empleando una concentración de enzima 200nM e incubando a tiempo fijo de 10 minutos a temperatura de 30°C y a pH 7.5 en 50mM de Tris-HCL, 15mM EDTA. Se añadieron concentraciones variables de GlcNAc6P para evaluar la activación alostérica; y de la misma manera se añadieron concentraciones variables de GlcNol6P y de Glc6P para evaluar la inhibición. La formación del producto se cuantifica mediante el ensayo colorimétrico de Seliwanoff (13).

En el experimento en el que se tiene que variar el tiempo de incubación de la reacción, se de manera inversamente proporcional la concentración de enzima, para mantener unidades comparables en todos los experimentos cinéticos, la velocidad se medirá como el cambio en la absorbancia a 512 nm, que es proporcional a la concentración de producto generada.

Espectrofotometría

Para el estudio de las transiciones conformacionales se buscaron señales en la fluorescencia intrínseca de la proteína, así como en dicroísmo circular (CD), con cambio detectable en la transición molecular; los ensayos fueron realizados a pH 7.5 a 30°C a una concentración de proteína de 0.4 a 1 mg/ml en presencia de Glucitolamina-6-fosfato (GlcNol6P) y *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P) a concentraciones variables. Se obtuvieron espectros de la enzima en un intervalo de 305 a 405 nm para encontrar el máximo y poder calibrar el equipo antes de utilizarlo. Se midió también el tiempo en el que la celda llega a la temperatura deseada. Se midieron espectros completos de la enzima en ausencia de ligantes y en presencia de GlcN-ol-6P y GlcNAc6P

para identificar inicialmente si la ocupación de los sitios de unión de la enzima produce cambios en la intensidad de fluorescencia o en el centro espectral de masas, o en ambos.

Resultados y Discusión

Aparición de los genes nagBI y nagBII

La convergencia evolutiva funcional es una justificación poco común para las enzimas isofuncionales en distintos organismos. Generalmente ocurre cuando organismos evolutivamente distantes se enfrentan a presiones de selección convergentes y logran responder de manera distinta a ellas. No obstante, *Escherichia coli* y *Shewanella oneidensis* que son organismos cercanos evolutivamente ya que pertenecen a la misma clase, Gammaproteobacteria, presentan GlcN6P desaminasas totalmente distintas (genes nagBI y nagBII respectivamente).

Mirando la aparición de genes homólogos para nagBI y nagBII en los tres dominios de la vida, parece que ambos genes son mutuamente excluyentes, pues no los encontramos juntos en algún organismo. El análisis filogenético de las GlcN6P desaminasas tipo NagBII permitiría entender más a cerca de los patrones de distribución de estas enzimas, con qué otras enzimas están emparentadas y cuáles son los aminoácidos que les dan identidad como GlcN6P desaminasa.

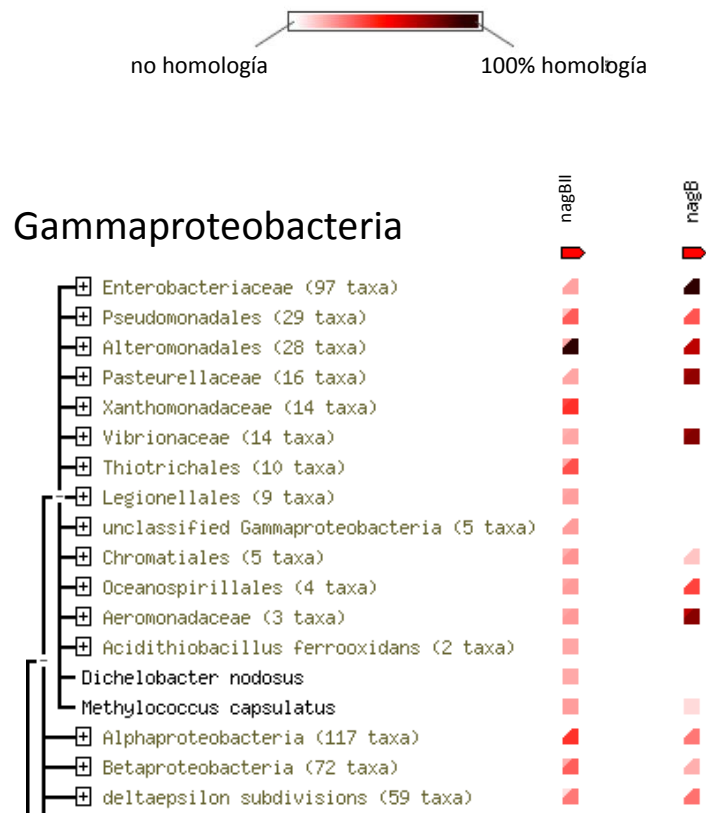


Figura 4. Aparición de genes homólogos de nagBI de *E. coli* y nagBII de *S. oneidensis* de en los distintos ordenes de la clase Gammaproteobacteria.

Filogenia

Como ya se ha mencionado, el gen de la GlcN6P desaminasa (*nagBII*) de *S. oneidensis* tiene homólogos en prácticamente todos los seres vivos, estas enzimas comparten el plegamiento SIS y a pesar de que isomerizan distintos tipos de azúcares, se ha reportado que varias de ellas conservan, junto con el plegamiento, la actividad de Glc6P isomerasa, que pudo haber sido la actividad de la enzima ancestral. Inclusive en *E. coli* se pueden encontrar genes homólogos, entre ellos destaca el gen de la Galactosamina 6-fosfato desaminasa, enzima que también tiene plegamiento SIS y que tiene también actividad de aminoazúcar desaminasa.

En la gran mayoría de organismos, el gen homólogo de *nagBII* de *S. oneidensis* con mayor identidad es el gen de la glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) o GlcN6P sintasa, ya que es la enzima que se encarga de su síntesis. Sin embargo en algunos estudios funcionales de los productos de estos genes no se ha encontrado esta función, y algunos han demostrado estar en un contexto genómico catabólico (59). Además, la actividad de Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa requiere indispensablemente de un dominio de glutaminasa, que no está presente en muchas enzimas etiquetadas como GFAT. Es oportuno proponer que las enzimas carentes de este dominio han sido erróneamente etiquetadas y que podrían ser GlcN6P desaminasas de tipo NagBII.

Cristalogénesis

En la mayoría de las condiciones probadas en el kit de Hampton I se observó la formación de agregados, lo que señala que la proteína presenta problemas de solubilidad a concentraciones mayores a 2 mg/ml en las condiciones particulares en las que se dializó. Las condiciones en las que crecieron cristales se muestran en la tabla 4.

Condition	Salt	Buffer	Precipitant
4	None	0.1 M TRIS HCl pH 8.5	2.0 M Ammonium sulfate
10	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	30% w/v Polyethylene glycol 4000

Tabla 4. Condiciones exitosas del Kit 1 de Hampton

Ambas condiciones presentaron cristales muy pequeños, no obstante, los cristales de la condición 4 tuvieron el tamaño necesario para capturarse con un asa y se pudieron difractar en una prueba preliminar, en la que se observó que son de proteína y no de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), que es la sal precipitante. A pesar de que estos cristales se pudieron difractar, los datos de la difracción preliminar no fueron de buena calidad y los cristales fueron muy

pequeños como para completar una colecta, por lo cual fue necesario buscar condiciones en donde crecieran cristales de mejor calidad.

Tras probar con las condiciones del kit 2 de Hampton, se encontraron pequeños cristales difíciles de pescar en las condiciones 9, 10 y 12 del kit de Hampton. Estos cristales sin embargo, nunca tuvieron el tamaño requerido para poder ser sujetos y difractados, aún a concentraciones más altas de proteína y a tiempos mayores de crecimiento.

Condition	Salt	Buffer	Precipitant
9	None	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	2.0 M Sodium chloride
10	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	30% v/V (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
12	0.1 M Cadmium chloride hydrate	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	30% v/v Polyethylene glycol 4000

Tabla 5. Condiciones exitosas del Kit 2 de Hampton

Debido al tamaño de los cristales obtenidos en ambos kits, la estrategia a seguir fue encontrar las condiciones en las que la proteína se pudiera mantener soluble a mayores concentraciones y probar condiciones de cristalización entorno a la condición 4 del Kit 1 (tabla1), que fue el mejor resultado (0.1 M Tris pH 8.5 y 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Tras probar las condiciones de cristalización que se detallan en la tabla 2 con base en la condición 4 del kit 1, que en lo sucesivo se referirá como la matriz de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se observó que nuevamente se formaron agregados en la mayoría de las condiciones, y los cristales que crecieron en exactamente las mismas condiciones del kit 1 de Hampton no fueron del tamaño suficiente para poder ser sujetos y difractados, aún después de seis meses de crecimiento y a mayores concentraciones de proteína. La falta de reproducibilidad en la cristalogénesis probablemente se debe a que los reactivos usados en la elaboración de esta matriz fueron comprados a Sigma-Aldrich que no tienen la misma calidad que los reactivos de Hampton.

Fue necesario encontrar las condiciones en las que la proteína se mantuviera soluble a mayores concentraciones. De los resultados observados en las condiciones de los kits de Hampton, se seleccionaron aquellas en las que la proteína se presentaba soluble a pesar de que no formara cristales, con la idea de identificar cuales son las sales y los aditivos que favorecen la solubilidad de la proteína. Se probó la solubilidad de la proteína en estas condiciones midiendo periódicamente la formación de agregados con la proteína a una alta concentración inicial (3 mg/ml). Las condiciones en las que no se formaron agregados se muestran en la tabla 6.

Condición	buffer	pH	sal
1	TRIS HCl	8.5	citrato 0.1 M
2	HEPES	7	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1M
3	Ácido cítrico	4.8	

Tabla 6. Condiciones de preparación de la enzima en las que se mantiene soluble a altas concentraciones.

Condiciones de cristalización de proteínas homólogas.

Una herramienta para elegir las condiciones de cristalización a probar es usar las condiciones en la que proteínas homólogas se han cristalizado. Si el porcentaje de identidad es alto, las probabilidades de que las condiciones de cristalización sean semejantes es mayor, aunque esto no es una regla general. La GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* tiene una proteína ortóloga en *S. denitrificans* (con 84% de identidad) con estructura cristalográfica reportada en el *Protein Data Bank* (PDB: 3HBA). Las condiciones de cristalización de esta proteína están descritas en el archivo PDB, sin embargo las pocas diferencias en la secuencia entre la enzima en *S. oneidensis* y en *S. denitrificans* están en la superficie, tal que sus puntos isoeléctricos son 5.6 y 7.6 respectivamente. Esto hace poco probable que las mismas condiciones de cristalización funcionen para ambas.

Desafortunadamente, la proteína homóloga de *S. oneidensis* mas parecida después de la reportada con el código 3HBA, solo es 37% idéntica. En el Protein Data Bank (PDB) no hay muchas estructuras reportadas de proteínas con alta identidad. A pesar de esto, se buscaron las condiciones de cristalización de las proteínas homólogas con identidad mayor a 23%, mismas que están reportadas en la siguiente tabla:

% Identidad	PDB	Aditivos	Amortiguador	Precipitante	pH	T (K)	Método
100	3HBA		0.1M Ácido Nítrico	17.5 PEG 6000	4.64	277	Gota Sedente
37.1	3FJ1	0.2 MGCL2		20% PEG 3350	5.8	277	Gota Sedente
23.5	2PUW		0.15M KSCN	20% PEG 600	8.5	277	Gota Colgante
26.1	2AML	0.17M Acetato de Amonio	0.1M Citrato	15% glicerol, 25.5% PEG 4000	5.6	277	Gota Sedente
26	3KNZ	0.05M Acetato de Calcio	0.1M Imidazol	37.1% 2-ethoxietanol	7.5	277	Gota Sedente
24.1	2POC	0.2M Acetato de Magnesio	0.1M Cacodilato de Sodio	30% 2-metil-2,4-pentanediol	6.5	277	Gota Colgante
24.7	2PUV	0.2M Acetato de Magnesio	0.1M Cacodilato de Sodio	30% 2-metil-2,4-pentanediol	6.5	277	Gota Colgante
25	2ZJ3	0.08M Acetato de Amonio	0.04M Tris	12% glicerol, 12%isopropanol	8.5	277	Gota Colgante
27.1	1J5X	0.1M Imidazol		40% PEG-400	8	293	Gota Sedente
23.5	3EUA	0.17M Acetato de Amonio	0.1M Citrato	15% Glicerol, 12.5% PEG 4000	5.6	277	Gota Sedente
24	2PUT	0.2M Acetato de Magnesio	0.1M Cacodilato de sodio		6.5	277	Gota Colgante
25.2	2CBO						
24.6	3G68	0.2M (NH4)2H Citrato		20% PEG 3350	5	277	Gota Sedente
25.8	3FKJ	0.2M Natiocianato		20% PEG 3350	6.9	277	Gota Sedente
26.8	1JEO	0.2M Citrato de sodio	0.1M Tris	40% PEG 400	8.5	298	Gota Colgante
23.5	2DEC	Acetato de Litio		20% PEG 3350	7.8	295	Microbatch
30.3	3TBF	0.2 Óxido de Trimetilamina	0.1M Tris	20% PEG MME 2000	8.5	289	Gota Colgante
28.3	2VF4		0.070 Acetato de sodio	7% PEG 4000, 30% Glicerol	5.3		

28.3	1MOQ				6		
------	------	--	--	--	---	--	--

Tabla 7. Condiciones de cristalización de enzimas homólogas.

Condiciones de cristalización mixtas

Conociendo las condiciones en las que la proteína se mantiene soluble (tabla 6), se dializó la proteína y se llevó a 3 mg/ml para poner las siguientes pruebas de cristalización: Condiciones de los kits 1 y 2 de Hampton en las que anteriormente habían crecido cristales (tablas 4 y 5); condición en la que cristalizó la proteína de más identidad reportada en el Protein Data Bank (PDB: 3HBA); y condiciones de la matriz de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que dieron mejor resultado (tabla 3; en azul). La disposición de estas pruebas en la caja de cristalización se muestra en la tabla 8.

	1	2	3	4	5	6
A	Kit1 cond4	Kit1 cond10	Kit2 cond9	Kit2 cond 10	Kit2 cond12	3HBA
B	SA 3A	SA 4A	SA 5A	SA 6A	Kit1 cond4	Kit2 cond9
C	kit2cond10	3HBA	SA 3A	SA 5A	SA 6A	Kit1 cond4
D	Kit2 cond9	Kit2 cond10	3HBA	SA 3A	SA 5A	SA 6A

Tabla 8. Condiciones exitosas de los Kits de Hampton, de las condiciones de la tabla 3 y de la ortóloga 3HBA. El código de colores es consistente con el de la tabla 4, e indica las condiciones iniciales del stock de proteína.

Para estas pruebas además se utilizó el método de gota colgante, y se pusieron tres gotas de proteína en las siguientes condiciones: la proteína libre de ligantes, saturada de GlcNol6P y saturada de GlcNAc6P. Esta caja de cristalización fue puesta a 18°C y una réplica idéntica fue puesta a 4°C, ya que es la temperatura a la que cristalizaron algunas de las proteínas homólogas (tabla 7).

Las pruebas de cristalización se revisaron cada mes; sin embargo, la de 4°C solo estuvo a esa temperatura cerca de dos meses, cuando aún no se

formaban cristales de tamaño adecuado para la difracción . A 18°C no se encontró alguna condición en donde crecieran cristales de tamaño adecuado. Por lo que se decidió poner las pruebas a concentraciones mayores.

Pruebas de cristalización a concentraciones altas de proteína.

En esta ocasión se repitieron las mismas pruebas de cristalización de la tabla 8, que son las que hasta el momento han dado mejores resultados, la diferencia es que en esta ocasión se puso la proteína en la máxima concentración posible en la que la proteína se mantiene soluble y sin formar agregados. Estas condiciones se reportan en la tabla 9.

<u>Condición</u>	<u>buffer</u>	<u>pH</u>	<u>sal</u>	Concentración máxima (mg/ml)
1	TRIS HCl	8.5	citrato 0.1 M	5.85
2	HEPES	7	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1M	8
3	Ácido cítrico	4.8		4.14

Tabla 9. Condiciones en las que se obtienen las concentraciones máximas de la proteína.

Se volvió a poner la proteína en las tres condiciones de solubilidad que han dado resultado (tabla 9) y en cada condición se colocó la proteína: libre de ligantes, saturada de GlcNAc6P y saturada de GlcNol6P. Se han observado cristales pequeños en algunas de las condiciones, sin embargo, aún no son del tamaño adecuado para poder ser difractados. En esta ocasión se vieron con más frecuencia precipitados de la proteína.

Adicionalmente se repitieron algunas de las pruebas de cristalización usando como métodos de cristalización el gota sedente, que es el método que había dado resultado en las primeras pruebas de cristalización puestas con el kit 1 de Hampton. Este método tiene la desventaja de que se puede poner solo una muestra de proteína por pozo; sin embargo, en cada prueba se puede poner el doble de volumen que en gota colgante, tal que la concentración final al

reducirse este volumen sea mayor. Las pruebas que se seleccionaron para usar el método de gota sedente están en la tabla 10.

	1	2	3	4	5	6
A	Kit1 cond 4	kit 1 cond 4 (GlcNAc6P)	kit 1 cond 4 (GlcNol6P)	Kit1 cond 4	Kit1 cond 4 (GlcNAc6P)	Kit1 cond 4 (GlcNol6P)
B	Kit1 cond 4	Kit1 cond 4 (GlcNAc6P)	Kit1 cond 4 (GlcNol6P)	3HBA	3HBA (GlcNAc6P)	3HBA (GlcNol6P)
C	3HBA	3HBA (GlcNAc6P)	3HBA (GlcNol6P)	3HBA	3HBA (GlcNAc6P)	3HBA (GlcNol6P)
D	SA 4 ^a (GlcNAc6P)	SA 4 ^a (GlcNol6P)	SA 4 ^a (GlcNAc6P)	SA 4 ^a (GlcNol6P)	SA 4 ^a (GlcNAc6P)	SA 4 ^a (GlcNol6P)

Tabla 10. Condiciones probadas en gota sedente. El código de colores es el mismo de la tabla 4.

A dos meses de haber puesto estas pruebas de cristalización, la proteína solo presenta cristales pequeños en algunas condiciones. Dado que muchas de las proteínas homólogas cristalizaron a 4°C, se pusieron pruebas de cristalización a esta temperatura. Sin embargo, después de 6 meses, la enzima no cristalizó a 4°C.

Otra cosa interesante a destacar es que la estructura de la ortóloga en *S. denitrificans* presenta ácido cítrico unido a cada subunidad y cerca de la interfase del dímero, en un sitio distinto al activo y al alostérico. Por lo que sabemos de los cambios conformacionales de la proteína, la unión de este ligante puede restringirlos de manera importante (Ver cinética).

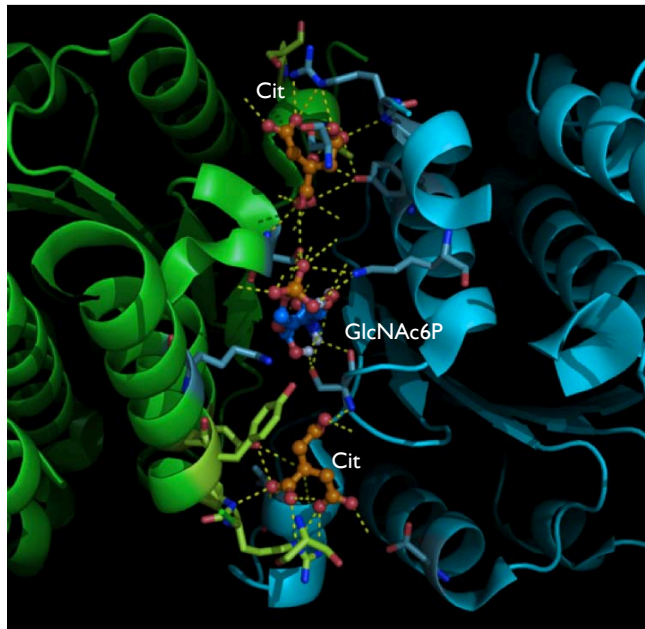


Figura 5. Sitio de unión del citrato en la estructura cristalográfica de la enzima ortóloga (3HBA).

A pesar de que hasta el momento no hemos podido tener la estructura cristalográfica de la enzima, este puede no ser un factor limitante en el entendimiento de los mecanismos de regulación. En las últimas décadas se ha generado una gran cantidad de estructuras cristalográficas de enzimas alostéricas. Sin embargo, la visión puramente estructural de la alostería es limitada. Por un lado no todos los cambios conformacionales inducidos por un ligante son relevantes en términos funcionales (21), y por otro lado, el conocimiento de la estructura de la proteína vacía y ocupada en sus sitios no permite describir mecanísticamente la naturaleza de la alostería y la cooperatividad.

Con herramientas cristalográficas se pueden determinar las estructuras químicas de las proteínas de manera exacta, a partir de modelos estáticos, promedios espaciales y temporales, sin embargo los átomos presentan movimientos fluidos de amplitudes variables sobre esos promedios (Domínguez, 2008; Qiang, 2009). A pesar de ello, para un número muy reducido de proteínas entre las que se encuentra la GlcN6P desaminasa de *E.*

coli (48), los métodos cristalográficos han permitido identificar no solo las transiciones conformacionales cuaternarias sino también sutiles cambios locales relevantes en los mecanismos alostéricos.

Seguimos buscando las condiciones adecuadas para la obtención de cristales de calidad adecuada para la difracción. Los resultados experimentales obtenidos hasta el momento se pueden usar como punto de partida en una nueva estrategia experimental, que incluye aumentar la concentración de proteína, disminuir la temperatura durante la cristalogénesis y hacer una mutación en la superficie (ver en perspectivas).

Dispersión dinámica de luz

Tras la purificación de la enzima, una herramienta de recurrente uso para evaluar su pureza es la dispersión dinámica de luz (DLS). Esta técnica nos permite medir con precisión el radio hidrodinámico de las partículas en solución en una muestra. Midiendo a la proteína en solución encontramos que tiene un radio hidrodinámico de 7.4 ± 0.1 nm, lo que es consistente con radio calculado para su estado oligomérico de dímero.

Se observó por medidas de DLS que la enzima muestra una reducción de su diámetro aparente en presencia de GlcNAc6P (de 7.4 ± 0.1 a 6.5 ± 0.2 nm), es decir, que la transición alostérica produce un cambio conformacional grande que implica una compactación. Esta reducción del radio hidrodinámico no ocurrió al medir a la enzima en presencia de inhibidores competitivos, es decir, ocupando sus sitios activos. Como se ha discutido, la ocupación de la proteína en su sitio alostérico y en sus sitios activos la llevan a conformaciones distintas entre sí y, por lo tanto, con distinta afinidad.

Modelo estructural

El modelo estructural construido por homología muestra que la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* tiene un plegamiento formado por dos dominios SIS con la misma topología, el primero que va del primer residuo al residuo 168 (el dominio del N terminal) y el segundo que va del residuo 171 al 332 (el dominio del C terminal) (Figura 6) ambos dominios están conectados por una asa corta compuesta de una glutamina y una serina.

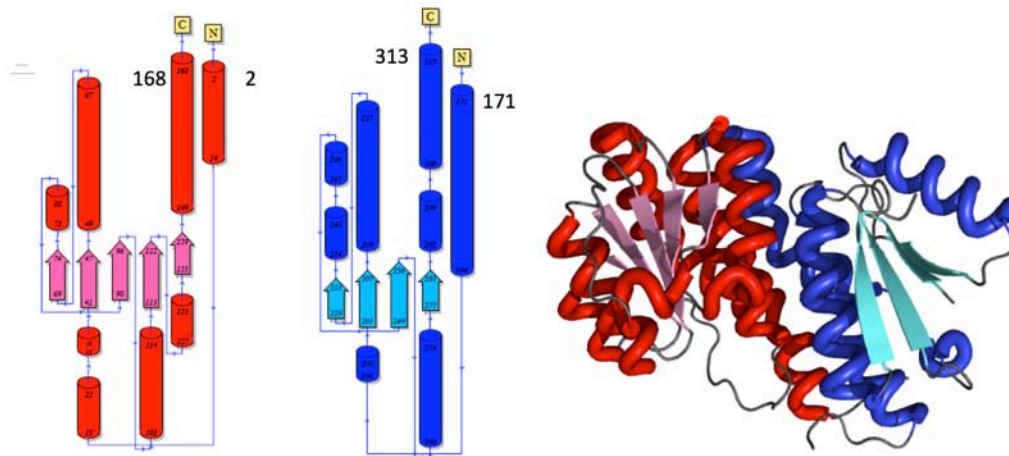


Figura 6. Plegamiento de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*. En rojo el dominio SIS correspondiente al N terminal y en azul el dominio SIS correspondiente al C terminal.

En la estructura cristalográfica de NagBII de *S. denitrificans*, que es la que se utilizó para construir el modelo estructural de la ortóloga en *S. oneidensis*, existe una región conservada que no presenta densidad electrónica. Esta región que va de los residuos 238 al 252 en *S. oneidensis*, se modeló empleando el programa *Rosetta design*. Se encontró que este segmento, al igual que el segmento 84-90, puede presentar distintos arreglos en su estructura secundaria (Figura 7) sin afectar de manera importante a la energía libre global del modelo en su forma dimérica, es decir, que estas regiones podrían tener diferentes arreglos en su estructura secundaria.

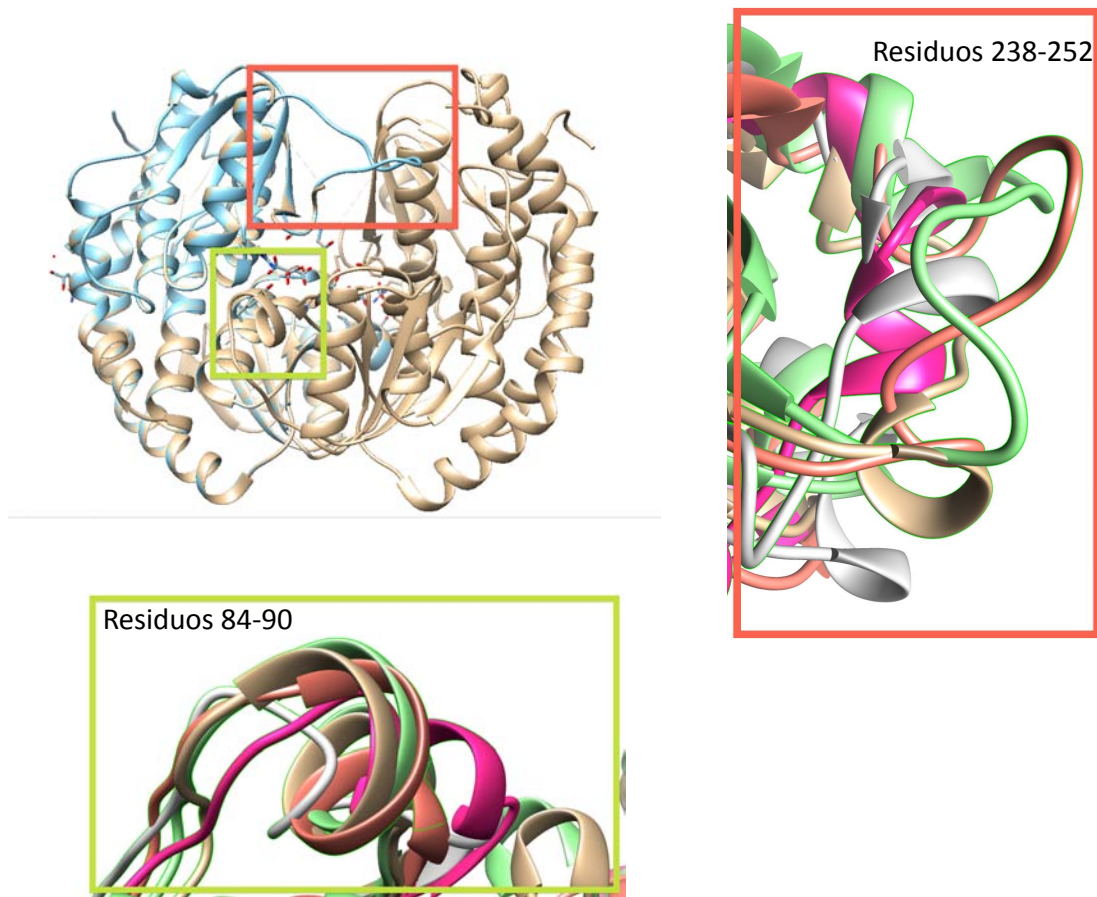


Figura 7. Posible cambio en la estructura secundaria de NagBII sobre el dímero.

Análisis de Modos Normales

Sobre el modelo de la proteína como monómero y como dímero se hizo un análisis de modos normales con el fin de entender los principales movimientos estructurales que podrían estar asociados a la transición alostérica.

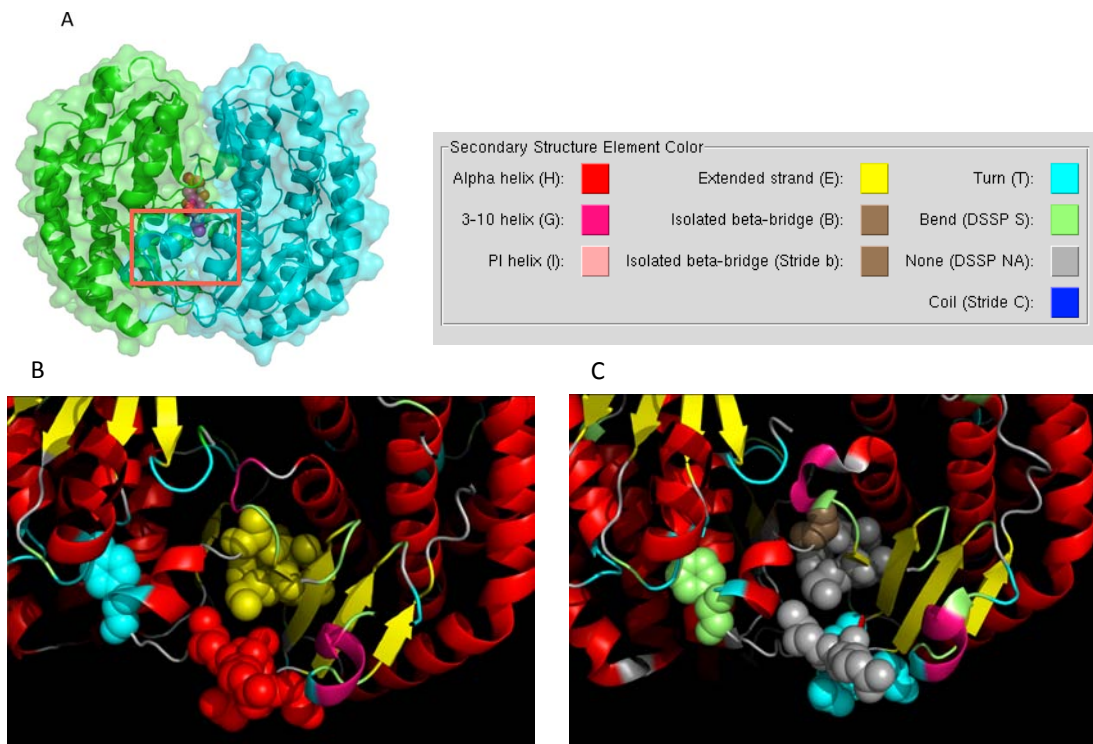


Figura 8. Cambios en la estructura secundaria vistos en el análisis de modos normales de NagBII de *S. oneidensis*: (A) Región del dímero en donde se observaron estos cambios; (B) Estructura secundaria del modelo antes del análisis de modos normales; (C) Estructura secundaria del modelo después del análisis de modos normales.

El análisis de modos normales (NMA) hecho para el monómero nos permitió ver que ambos dominios SIS se mueven cada uno como bloques parcialmente rígidos e independientes. No fue posible delimitar un área de bisagra, sin embargo este análisis permite ver una posible coordinación en el movimiento de ambos dominios, que podría ser relevante en la coordinación conformacional del dímero. El análisis del dímero permitió ver los mismos movimientos, sólo que con las restricciones conformacionales impuestas por los contactos de la intercara. Dadas las limitaciones del método en cuanto a la precisión de los movimientos moleculares, la zona de la intercara aparecieron cambios en la estructura secundaria y choques estéricos (Figura 8). Esta zona de la proteína, al estar comprometida en su dinámica por los contactos de la

intercara, podría ser de relevancia en la transmisión de señales importantes en la cooperatividad o en la alostería.

El movimiento descrito por el NMA para el monómero de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* se vuelve relevante al ver la disposición espacial de estos dos dominios SIS de cada subunidad en la estructura del dímero de la enzima: La mayoría de los contactos de la intercara se dan prácticamente sólo entre los dominios del N terminal de cada subunidad (Figura 9). Los dominios C terminales presentan pocos contactos en la intercara, de tal manera que aún en el dímero, el dominio C terminal de cada subunidad presenta libertad conformacional.

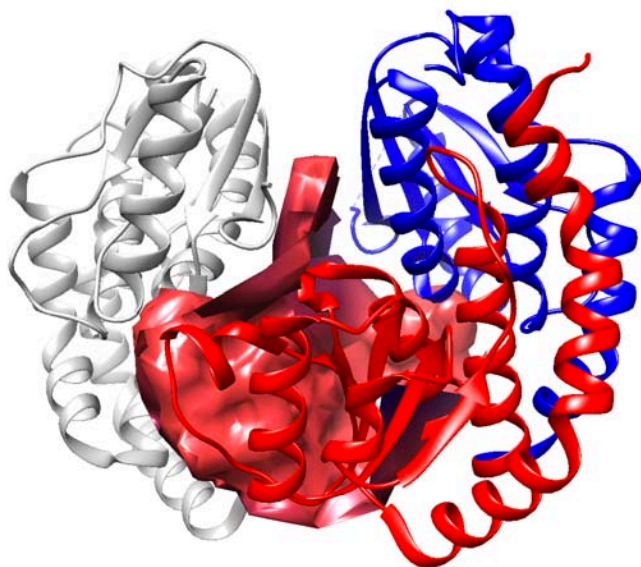


Figura 9. Superficie de la intercara del dímero. Se muestra un monómero con el código de colores de la figura 6.

Esta metodología sólo permite ver los cambios conformacionales globales en la proteína y es poco precisa para evaluar cambios locales. Sin embargo, fue posible identificar cuales son las regiones en el dímero más comprometidas conformacionalmente y cuales son las que presentan mayor movilidad. La

restricción conformacional en la intercara del dímero podría estar asociada a la comunicación entre subunidades como ocurre a menudo en enzimas alostéricas.

Dinámica molecular

La GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* cuenta con un modelo estructural de buena calidad con el que se ha podido entender parte de los mecanismos regulatorios de la enzima. Experimentalmente sabemos por DLS que la unión de GlcNAc6P al sitio alostérico promueve una compactación en el radio hidrodinámico de la proteína, sin embargo no conocemos en detalle la conformación de la proteína favorecida por la ocupación de su sitio alostérico. Una estrategia con gran potencial en la exploración del paisaje energético de las proteínas, así como de las bases físicas de la estructura y función de macromoléculas es la simulación por dinámica molecular. Esta información nos permitirá un entendimiento más profundo de los requerimientos de la alostería.

Utilizando el análisis de dinámica molecular para el monómero de la enzima, se pudo ver que desde los 50 nanosegundos la estructura secundaria en dos regiones comienza a modificarse de manera significativa. Estos cambios abarcan los residuos 84 al 90 y del 238 al 252 (Figura 10). Cabe resaltar que la región que va del residuo 238 al 252 en la estructura cristalográfica de la enzima de *S. denitrificans* (3HBA) no presentaba densidad electrónica. En la región que va del residuo 84 al 90, sin embargo, hay que considerar que probablemente los cambios conformacionales sean menores en la forma dimérica, ya que forma parte de la intercara del dímero.

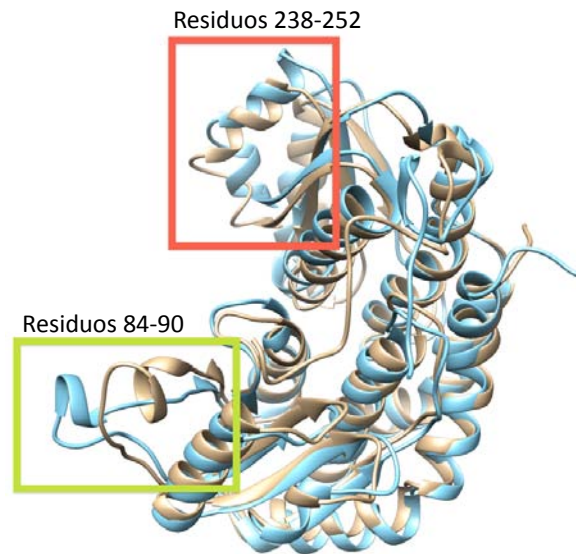
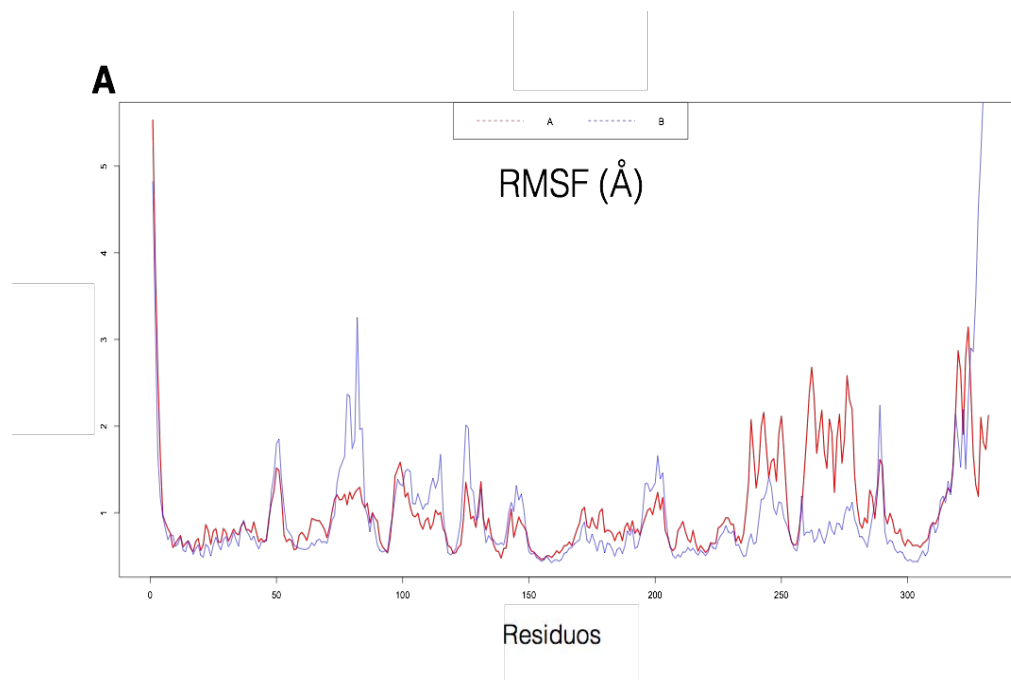


Figura 10. Alineamiento estructural de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* al inicio (café) y a los 50 nanosegundos de dinámica molecular (azul). Se encierran en cuadros los segmentos que cambian su estructura secundaria.

En la dinámica molecular hecha para el dímero, se puede comprobar que la región 84-90 está mas restringida conformacionalmente, ya que en el dímero no hay cambio en estructura secundaria. Para evaluar las regiones en la proteína de mayor movilidad, se hizo un gráfico de los valores de RMSF para cada residuo en un a trayectoria de 150 nanosegundos (Figura 11A). Adicionalmente se observaron los valores de RMSD de cada residuo con respecto asimismo al inicio y al final de la trayectoria (figura 11B). Los residuos en los extremos C terminal y N terminal tuvieron valores de RMSD mayores a 10 Å, muy por arriba de los obtenidos para la mayoría de los residuos, de manera que no se tomaron en cuenta en la asignación de colores en este esquema. Es evidente que los valores de RMSD más altos (alrededor de 6 Å) se encuentran localizados principalmente en el dominio C terminal de cada subunidad. Los valores de RMSD son consistentes no solo con el Análisis de Modos Normales sino también con los factores B cristalográficos de la enzima

ortóloga en *S. denitrificans* (3HBA), que se usó para construir el modelo de NagBII (figura 11B y 11C).

Otro detalle interesante que nos permitió ver este esquema es que los cambios estructurales vistos en la dinámica son muy semejantes para las dos subunidades del dímero, es decir, hay una sincronía aparente, que es bien aceptada en el marco teórico clásico de las transiciones cuaternarias.



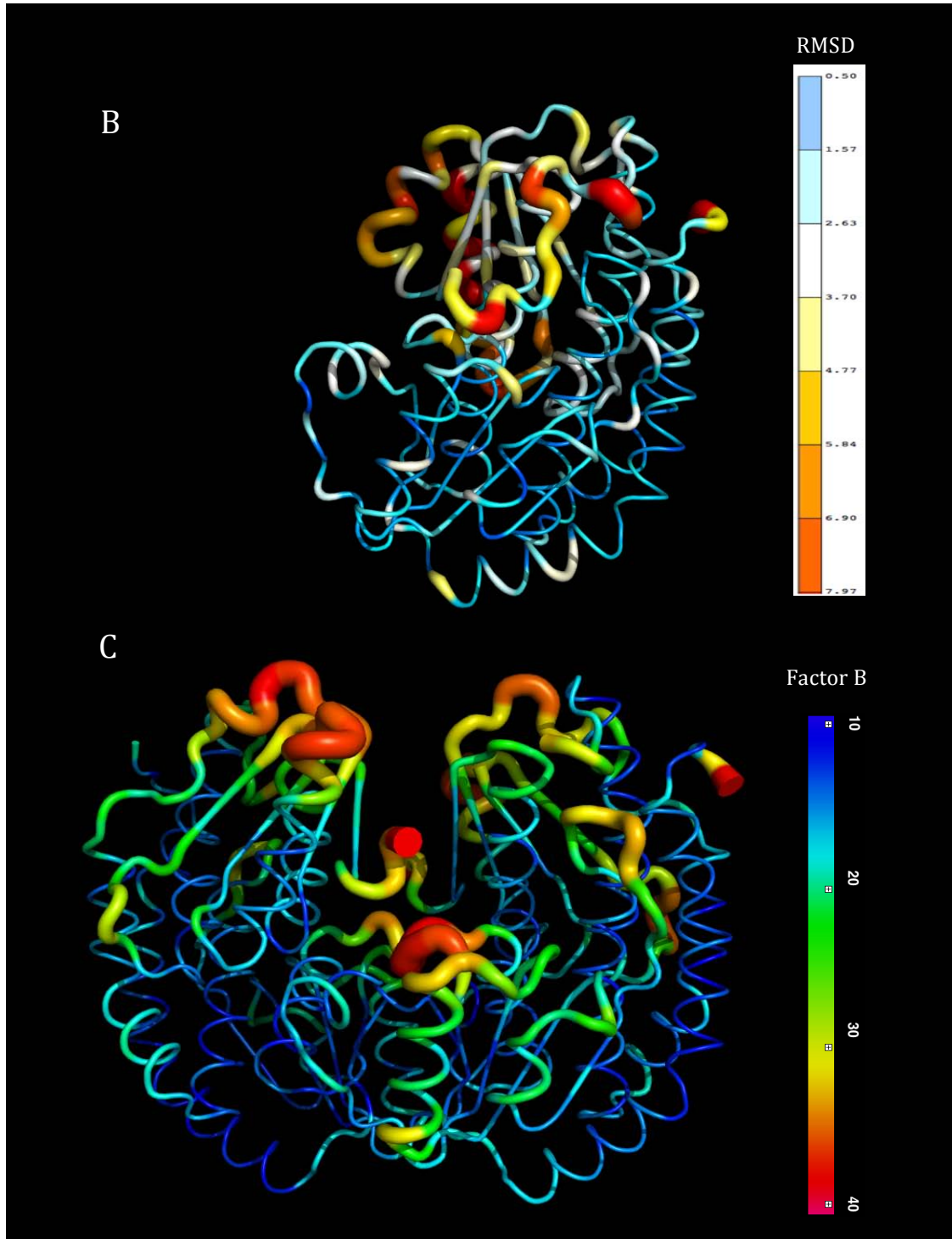


Figura 11. Valores de RMSD para cada residuo (A) en el tiempo en 150 nanosegundos; (B) RMSD por residuos sobre la estructura al final de 150 nanosegundos; (C) Factores B cristalográficos de 3HBA.

El análisis de la superficie de la molécula en la dinámica molecular nos permitió identificar dos conformaciones con una diferencia en el área superficial muy grande (Figura 12), estas conformaciones no son muy estables, pero la proteína oscila entre ambas en la ventana de tiempo muestreada. Las diferencias estructurales muestran que la reducción en superficie es debido a la aproximación concertada del dominio C terminal a la subunidad vecina. Este movimiento, que es consistente con el análisis de modos normales, explica satisfactoriamente la compactación de la molécula observada por DLS.

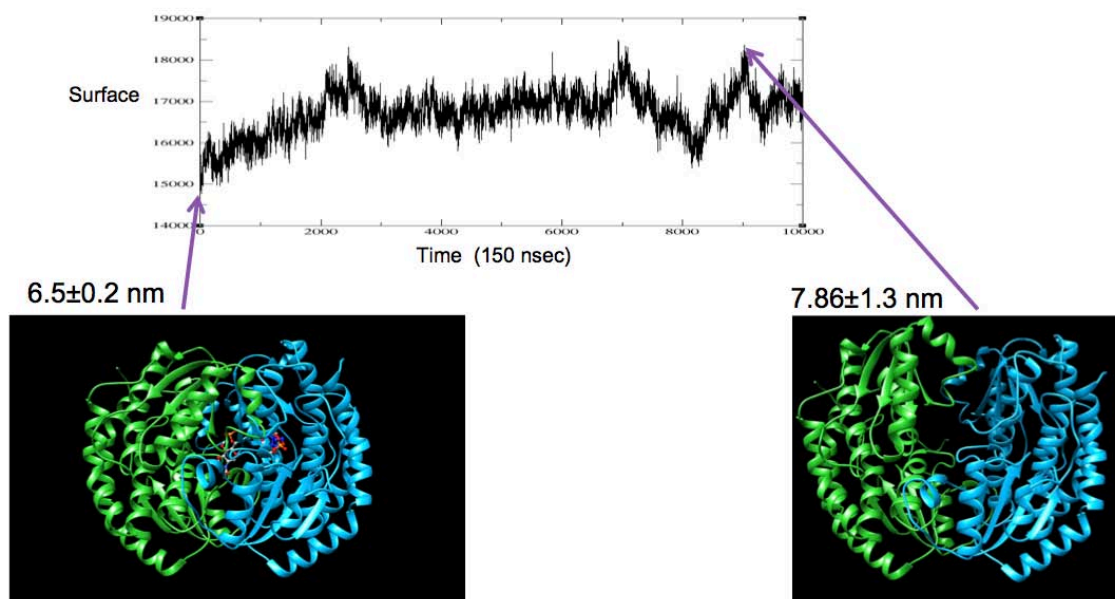


Figura 12. Análisis del área expuesta al solvente (superficie) en la dinámica molecular. En cuadro rosa la estructura de menor superficie y en cuadro azul la estructura de mayor superficie.

Se ha comprobado por mutagénesis dirigida que la lisina 218 participa en la unión del fosfato de la GlcNAc6P. Este residuo se encuentra en el dominio C terminal. La GlcNAc6P se une en el centro del dímero. La lisina 218 de cada subunidad se acerca al grupo fosfato de este compuesto, moviendo consigo al dominio C terminal (Figura 13). Este cambio conformacional explica

satisfactoriamente la reducción del radio hidrodinámico de la enzima observado por DLS al unirse la GlcNAc6P en el sitio alostérico.

La relevancia funcional de esta transición conformacional, es que en el dominio C terminal, justamente en la hélice más móvil (residuos 238-252) se encuentra la His242, que es la histidina catalítica (31) y se encarga de la apertura del anillo del sustrato unido al sitio activo de subunidad vecina. En enzimas homólogas, como la GFAT, se ha demostrado que el sitio activo de una subunidad requiere de una histidina en la subunidad vecina que abra el anillo del sustrato. Razón por la que probablemente las enzimas con plegamiento SIS son diméricas.

En NagBII de *S. oneidensis* el acercamiento espacial de la His242 al sitio activo de la subunidad vecina es promovido por la ocupación del activador en el sitio alostérico (Figura 13). Al compactarse la enzima, la His242 queda cerca del sitio activo vecino. Cabe mencionar que la histidina 242 conservada es la catalítica, sin embargo, el resto del sitio de reconocimiento al sustrato es distinto.

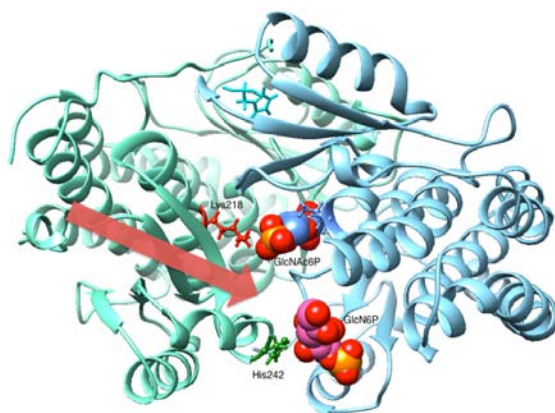


Figura 13. La interacción de la Lys218 (en rojo) con la GlcNAc6P (carbonos azules) promueve el desplazamiento del dominio C terminal (como lo indica la flecha) y con ello el acercamiento de la His242 (en verde) al sitio activo de la otra subunidad, este residuo abre el anillo del sustrato (carbonos rosas).

Anteriormente se ha descrito el comportamiento cinético de la enzima restringida conformacionalmente por nanoencapsulación en geles de ortosilicatos. Los resultados muestran que la nanoencapsulación no impide la activación alostérica, a pesar de que esta depende de grandes cambios conformacionales. La explicación radica en que la nanoencapsulación no impide la compactación de la enzima ya que el gel se forma sobre la superficie de la enzima en su conformación expandida y la transición es hacia un estado más compacto.

Espectrofotometría

Dicroísmo circular

Por DLS se observó que, al menos para la unión de la proteína con GlcNAc6P hay una transición conformacional. El estudio de los cambios conformacionales producidos por los ligantes de la proteína, en muchas ocasiones, es posible mediante el empleo de técnicas espectroscópicas, en particular Dicroísmo Circular (CD) y espectrometría de fluorescencia.

No se pudo detectar cambio significativo en el UV lejano al titular el sitio alostérico de la enzima con GlcNAc6P; pero se mostró en el UV cercano, es decir, en donde se aprecia la contribución de los aminoácidos aromáticos (figura 14A). Titulando con el inhibidor competitivo, GlcNol6P, no se encontraron cambios significativos en los espectros de CD ni en los del UV, ni cercano ni lejano. Cabe mencionar que se buscaron cambios en el UV lejano debido a que en dinámica molecular se vieron cambios conformacionales en la estructura secundaria en presencia de GlcNol6P, a concentraciones saturantes de ligante y evaluando su comportamiento en el tiempo (figura 14B). Sin embargo, no se encontraron cambios en los espectros de CD de NagBII al ocuparse su sitio activo. Probablemente, aunque existieran cambios en la estructura secundaria de las zonas de la proteína anteriormente descritas

(Residuos del 238 al 252) estos no son detectables por métodos espectroscópicos, dada su baja contribución al espectro de la proteína completa.

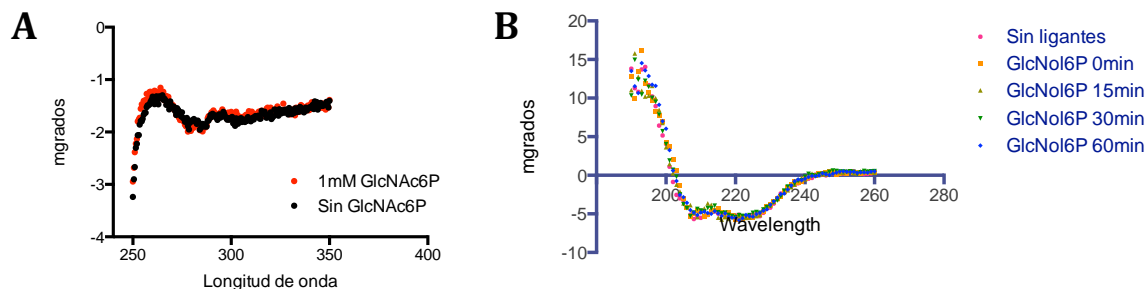


Figura 14. Cambios espectroscópicos asociados a la unión de GlcNAc6P. Dicroísmo Circular (CD) de NagBII en la longitud de onda correspondiente a los residuos aromáticos; en ausencia de ligantes o con GlcNAc6P saturante, los espectros son semejantes.

Fluorescencia

La enzima presenta cambios en la intensidad de fluorescencia inducidos únicamente por cambio de temperatura de 4° a 30° C, temperatura a la que se almacena y a la que se hacen las mediciones, respectivamente. Estos cambios espectroscópicos son lentos (vida media de 40.26 min) y suceden aún en ausencia de ligantes (Figura 15), por lo cual no están solamente influidos por la ocupación de los sitios. La proteína medida a 30°C se llevó nuevamente a 4°C, se incubó una hora y se midió nuevamente con el mismo protocolo, se observó exactamente el mismo comportamiento, de manera que esta transición conformacional es reversible y dependiente de la exposición de la proteína 30°C.

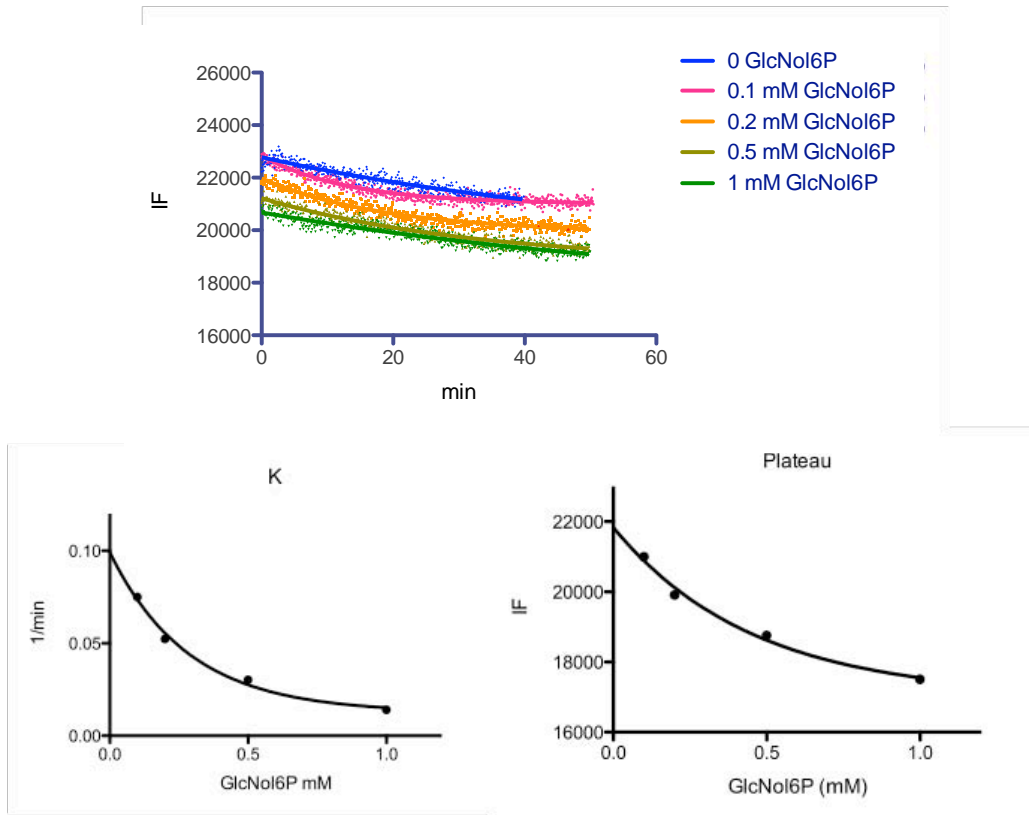


Figura 15. Espectros de fluorescencia de la enzima a 328 nm, en ausencia de ligantes y a diferentes concentraciones de GlcNol6P. Se muestran también los regráficos de K y Plateau a distintas concentraciones de GlcNol6P.

El único triptofano que tiene esta enzima está alejado de los sitios de unión, en una zona que en dinámica molecular presenta alta movilidad (figura 16), razón por la cual no sirve como reportero de la unión de sus ligantes, ni en fluorescencia ni en CD en el UV cercano; su lento cambio en la intensidad de fluorescencia puede estar asociado a un cambio conformacional local.

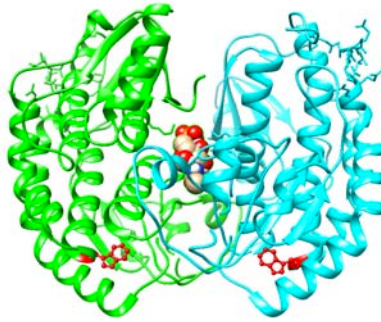


Figura 16. Posición del único triptófano (en rojo) para cada cadena. En esferas se representa el activador alostérico unido a su sitio

Cinética

Inductor de cooperatividad

Fru6P

Para el estudio de las transiciones conformacionales asociadas a la ocupación del sitio activo de la enzima fue necesario encontrar un análogo no hidrolizable del sustrato. Anteriormente, se había estudiado la fructosa-6-fosfato (Fru6P) en ausencia de amonio (NH_4^+), puesto que es sustrato incompleto de la reacción en el sentido anabólico. Encontramos que la unión de la Fru6P es cooperativa (con h de hasta 2.6); sin embargo, la afinidad de la enzima por este compuesto es muy baja, con una K_m de 10 mM, lo que hace difícil usarla en concentraciones saturantes. Dado que en sentido reverso la reacción de la enzima es pseudo bi-uni ($\text{Fru6P} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{GlcN6P} + \text{H}_2\text{O}$), también se puede evaluar la unión del NH_4^+ ; encontramos que ésta es significativamente cooperativa ($h = 1.6 \pm 0.3$), algo que no sucede en NagBI y que no se puede explicar en términos de cooperatividad termodinámica (30).

GlcNol6P

Debido a la semejanza funcional que existe entre NagBII y NagBI, se probó el inhibidor competitivo no hidrolizable de mayor afinidad por NagBI (37), la glucitolamina-6-fosfato (GlcNol6P), la cual además se ha reportado que es inhibidor competitivo de la GFAT de *E. coli* (22) que también tiene plegamiento de azúcar isomerasa (SIS). Si el compuesto se une al sitio activo de la enzima con alta afinidad, no sólo se podría utilizar en la caracterización de las transiciones conformacionales, sino también en la medida de la estequiometría y para ocupar el sitio activo para estudios cristalográficos.

La glucitolamina-6-fosfato (GlcNol6P) es un inhibidor competitivo de alta afinidad ($K_i = 5.21 \pm 0.9 \mu\text{M}$) cuando la enzima está saturada de activador alostérico. Esto es debido a que es un análogo del estado de transición de la reacción de la GlcN6P desaminasa (37). El efecto de la inhibición es atípicamente más complejo que el efecto que pudiera tener un inhibidor competitivo en una enzima con cooperatividad termodinámica. Debido a que aún no tenemos una ecuación de velocidad que incluya de manera integral los componentes del mecanismo de cooperatividad que hemos observado, se presentan los resultados de los ensayos de inhibición de la enzima saturada con activador alostérico (GlcNAc6P).

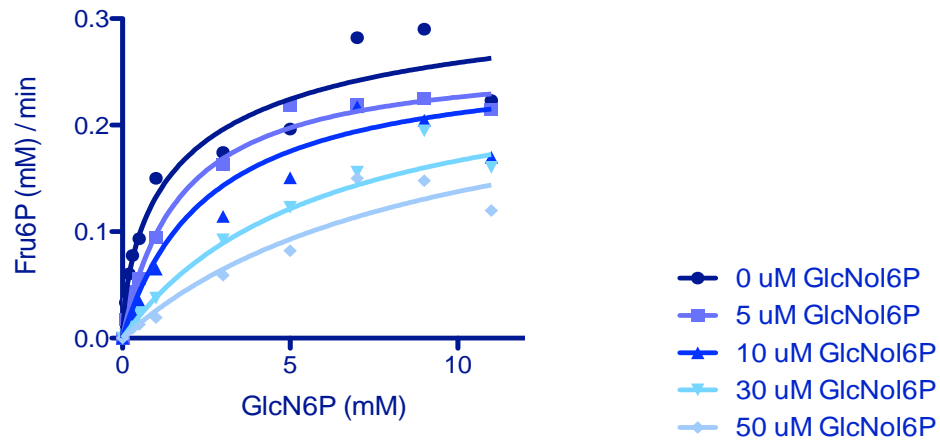
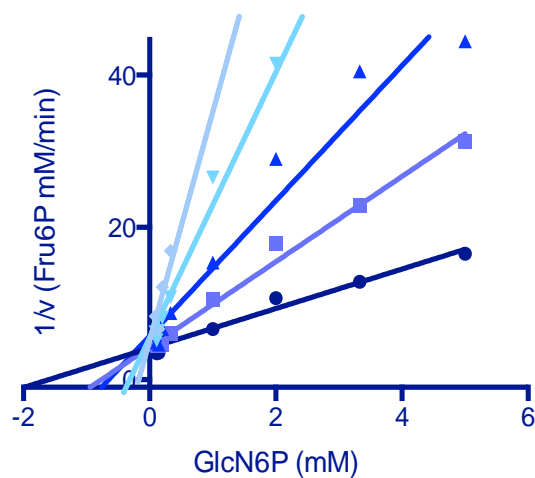
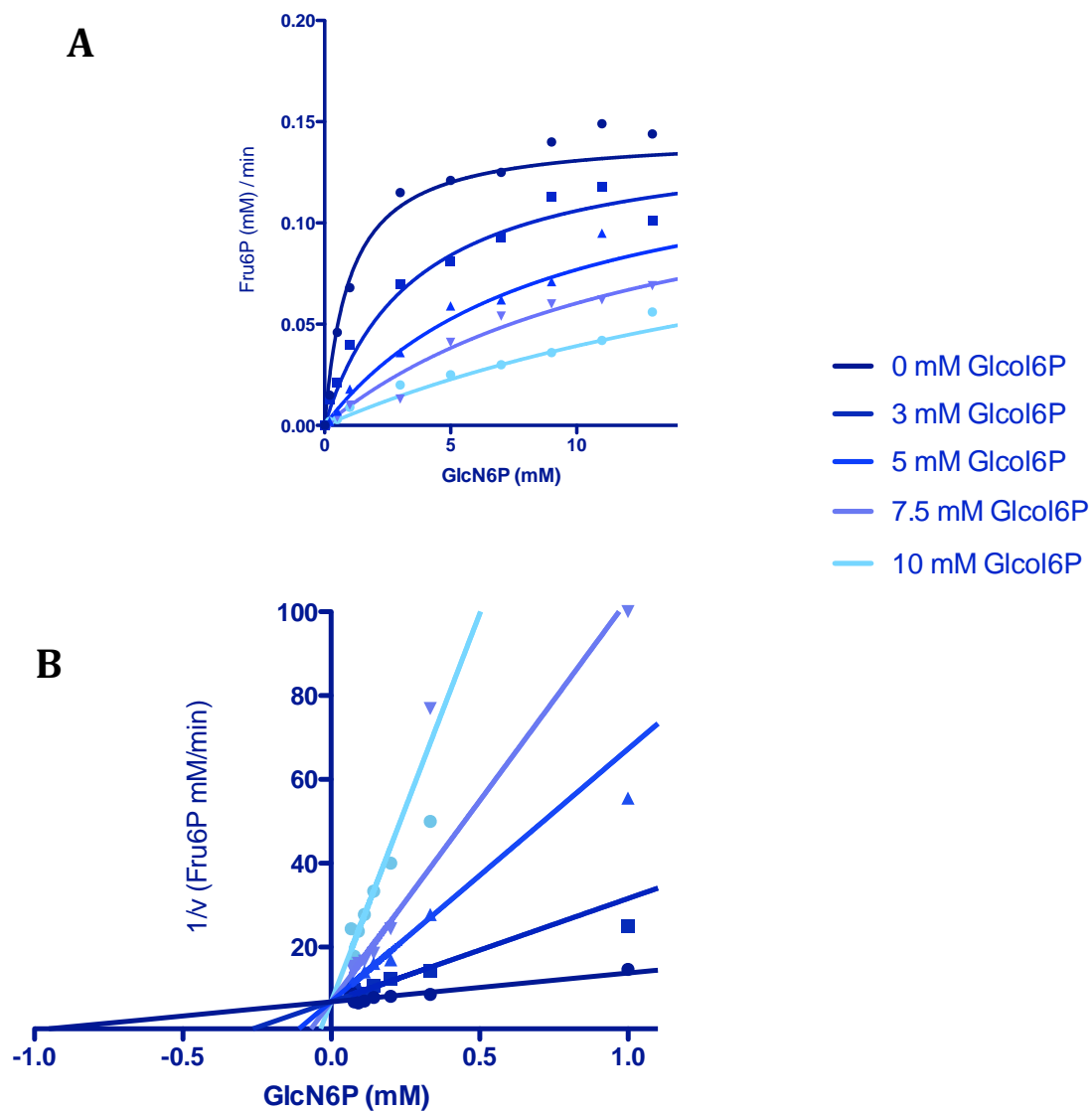
A**B**

Figura 17. Gráfico de dobles recíprocos de la reacción de la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis* en presencia de GlcNAc6P saturante y concentraciones variables de GlcNol6P.

Glc-ol6P

Como se ha mencionado anteriormente, de manera recurrente las enzimas con plegamiento SIS, a pesar de la diversidad de reacciones que catalizan, tiene conservado el sitio activo y presentan actividad vestigial de Glc6P isomerasa. De esta manera, el análogo de transición de esta reacción de isomerización, el Glcol6P, suele ser un inhibidor competitivo de alta afinidad. Se probó la

inhibición de este compuesto en NagBII de *S. oneidensis* encontrando que es inhibidor competitivo pero de baja afinidad ($K_i = 380 \pm 60 \mu\text{M}$), razón por la cual no se eligió para hacer los estudios de fluorescencia y dicroísmo circular.



Citrato

El citrato es un compuesto no relacionado metabólicamente con el catabolismo de aminoazúcares. Sin embargo en la enzima ortóloga de *S. denitrificans*, el citrato sirvió para limitar los cambios conformacionales y favorecer su cristalización. En la estructura de la ortóloga (3HBA) el citrato tiene un sitio bien definido en la intercara del dímero (Figura 18A). Se observó densidad electrónica para este compuesto con ocupancia cercana a 1. Por el sitio de unión de este compuesto, es fácil justificar el mecanismo por el cual impide algunos cambios conformacionales, y era de interés evidente probar sus consecuencias en la cooperatividad y en la activación alostérica.

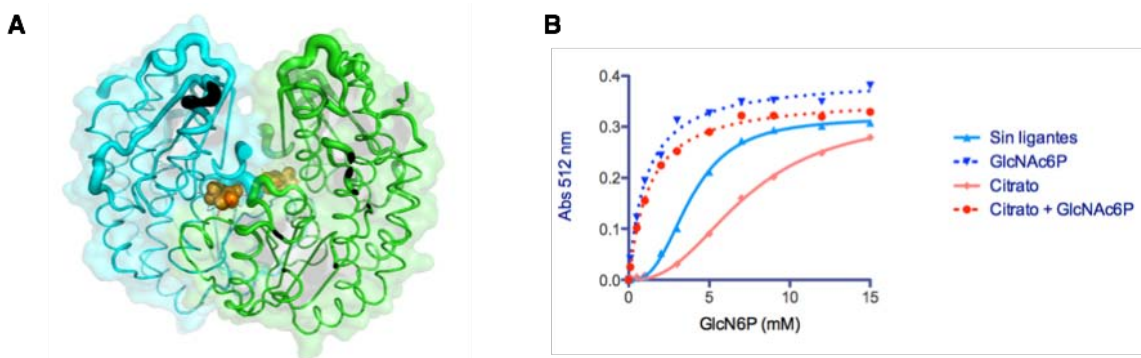


Figura 18. El citrato como inhibidor alostérico. (A) sitio de unión en la intercara del dímero, (B) efecto del citrato 10mM en la enzima sin y con activador alostérico saturante (1mM).

El citrato en 3HBA hace contacto con las dos zonas identificadas como las de mayor movilidad en la proteína (residuos 238-252 y 84-90), así como con el asa que da origen al sitio alostérico. El citrato se comportó como un inhibidor alostérico con el sustrato, debido a que interactúa con la enzima en un sitio distante del sitio activo y del sitio alostérico (Figura 5 y 18A). A pesar de ello, el citrato no interfiere en la unión del activador alostérico, la GlcNAc6P.

Cooperatividad

Una de las pocas explicaciones al comportamiento cooperativo de las enzimas, además del acoplamiento entre sitios equivalentes en proteínas oligoméricas, es la llamada cooperatividad cinética. Este mecanismo implica la existencia de cambios conformacionales lentos entre estados de diferente afinidad por el sustrato, mismos que generan la sigmoideidad de las curvas de velocidad sustrato, al estar la enzima fuera del equilibrio (14). Si una enzima con cooperatividad cinética se midiera al equilibrio debería perder la cooperatividad; en el caso contrario, se comprobaría que el comportamiento cooperativo de esta enzima no está relacionado con cambios conformacionales lentos.

Primeramente había que entender si los cambios conformacionales lentos vistos por fluorescencia tenían algún efecto en la cinética. Ya se había observado que el decaimiento en la intensidad de fluorescencia era independiente de la unión de ligantes en el sitio activo (Ver sección fluorescencia), y que era dependiente de la temperatura. Se diseñó un experimento para medir las propiedades cinéticas de la enzima a diferentes tiempos de preincubación a 30°C. Es decir, en diferentes momentos de la transición conformacional vista por fluorescencia, pero a los mismos tiempo de incubación con el sustrato.

El experimento diseñado consistió en probar la enzima a diferentes tiempos de incubación con su sustrato, es decir en diferentes momentos de una transición conformacional lenta. Para mantener a la enzima dentro de velocidades iniciales, fue necesario diluirla proporcionalmente con el tiempo de incubación. De esta manera, la enzima que más tiempo estuvo con su sustrato, también estuvo más diluida. El experimento tiene entonces dos variables: el tiempo de incubación de la enzima con su sustrato y la

concentración de enzima. Los resultados muestran que independientemente del tiempo de incubación de la enzima con su sustrato, ésta muestra siempre el mismo comportamiento cooperativo, ya que todas las curvas tienen exactamente el mismo coeficiente de Hill (figura 18).

Los resultados muestran que hay una variación en los parámetros cinéticos que no tiene una tendencia definida. Sin embargo, es evidente que la cooperatividad no disminuye en ningún caso. Esto implica que hay un cambio conformacional local en la enzima cerca del único triptofano visto por su decaimiento en la intensidad de fluorescencia al estar a 30°C, el cual es independiente de sus propiedades cinéticas.

En este experimento hay un efecto evidente en la velocidad máxima, que podría estar relacionado con la dilución de la enzima. La enzima diluida podría disociarse y, como ya se ha mencionado, el sitio activo requiere de la participación de la His242 de la otra subunidad para la apertura del anillo del sustrato. De esta manera si se disocian los monómeros la velocidad de la enzima estará limitada por la apertura espontánea (no catalizada) del azúcar. La normalización de las curvas a fracción de saturación permite ver que las curvas mantienen su sigmoidicidad independientemente del tiempo de incubación de la reacción. Este experimento permite descartar a la cooperatividad cinética como la causa de la sigmoidicidad de las curvas, ya que a pesar de que existe una transición conformacional lenta, como se ha predicho para las enzimas que presentan cooperatividad cinética, ésta no tiene ningún efecto, particularmente sobre la magnitud de la respuesta cooperativa.

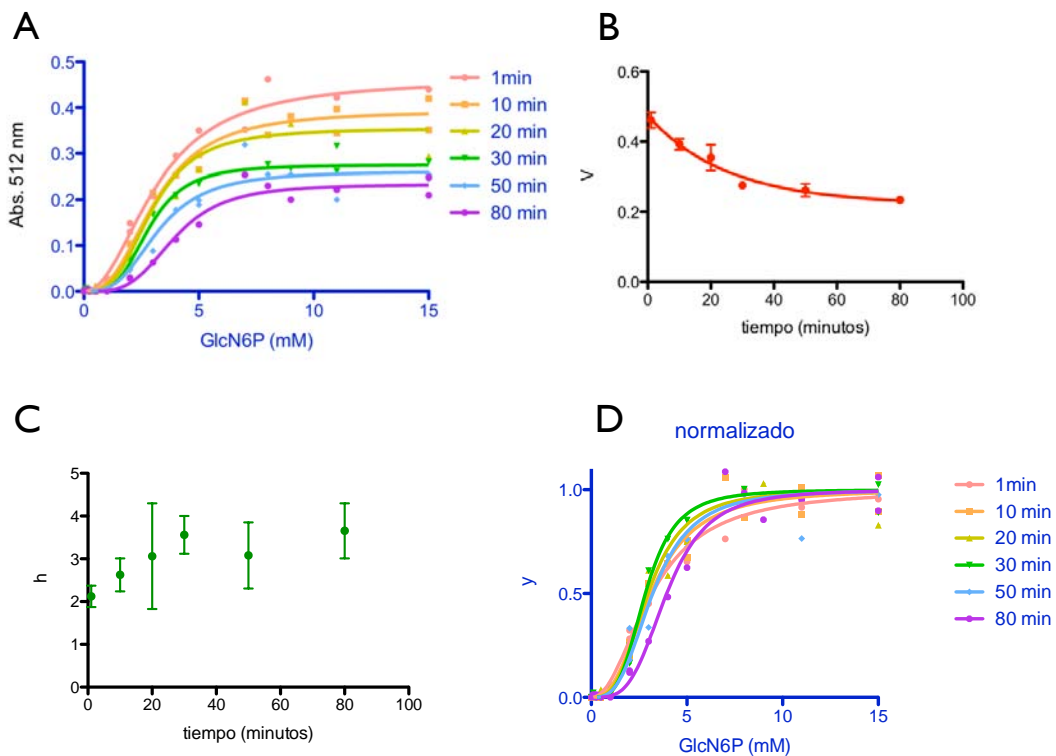


Figura 18. Cinética de la enzima variando el tiempo de incubación de la reacción (A) Ajuste global a la ecuación de Hill. (B) Regráfico de las V_{max} . (C) Regráfico de los coeficientes de Hill (h) en función del tiempo. (D) Ajuste global a la ecuación de Hill a los datos normalizado a fracción de saturación.

El efecto que tiene el tiempo de incubación en la k_{cat} de la enzima es claro, este parámetro disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación. La siguiente pregunta era ver si este efecto es consecuencia de la disociación de la enzima o de la inestabilidad del sustrato ante las condiciones del ensayo (mayor dilución y mayor tiempo de incubación a 30°C). Se sabe que la GlcN6P es inestable a temperaturas mayores a 30°C (31) a pH superiores a 7.5, y que en solución puede reaccionar consigo misma formando dímero por reacción entre sus grupos amino y carbonilo, formando una doble aldimina

cíclica, Este dímero fue identificado por espectrometría de masas. Su gran tamaño hace improbable que sea sustrato de la enzima.

Una primera aproximación para estudiar el problema fue hacer el mismo experimento pero con la enzima saturada de activador alostérico. Este compuesto, como ya se ha mencionado, se une en la intercara del dímero y promueve una compactación y la formación de nuevos contactos entre las subunidades, de manera que si la disminución de la k_{cat} se debe a la disociación del dímero, con GlcNAc6P debería verse atenuado este efecto. Si hubiera un decaimiento similar en la k_{cat} en ambos experimentos, entonces la pérdida de k_{cat} no podría atribuirse a la disociación del dímero.

Los resultados muestran que el activador alostérico también presenta un decaimiento exponencial en su k_{cat} , sin embargo su constante de velocidad es cinco veces menor a la de la enzima sin efectores (tabla 11 y figura 19B y 19D). Este resultado indica que la disminución de la k_{cat} en la enzima sin activador (figura 18A y 18B), es una propiedad de la enzima misma, probablemente asociada a la disociación del dímero por la dilución. El activador alostérico disminuye el decaimiento en la velocidad ya que promueve la compactación de la enzima y con ello la formación de nuevos enlaces que favorecen la asociación del dímero. El efecto de la inestabilidad del sustrato no se puede descartar totalmente, sin embargo estudios de inestabilidad del sustrato muestran que a 30°C es despreciable (31).

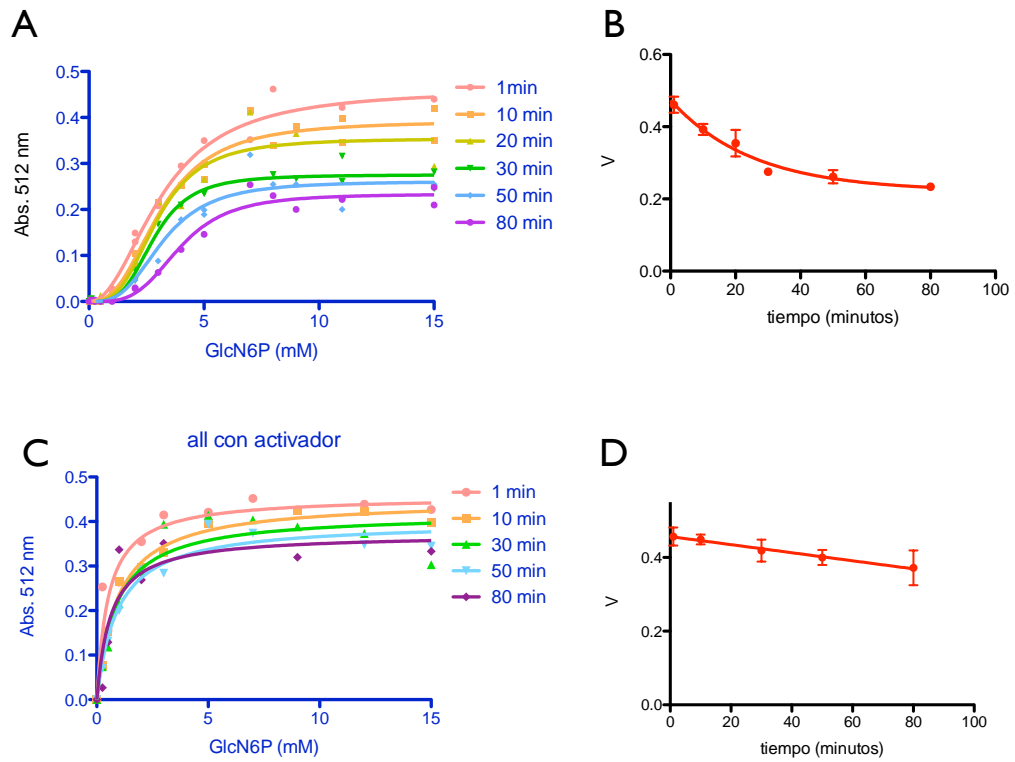


Figura 19. Comparación del efecto en la Vmax en la enzima sin ligantes (A y B) y saturada de GlcNAc6P (C y D).

	Sin activador	Con activador
\bar{y}_0	0.4738	0.4599
Plateau	0.2215	0.2565
K	0.03953	0.007081
vida media	17.53	97.89
Tau	25.3	141.2
amplitud	0.2523	0.2033

Tabla 11 Ajuste a un decaimiento de una exponencial de los regráficos de Vmax (Figuras 19B y 19D).

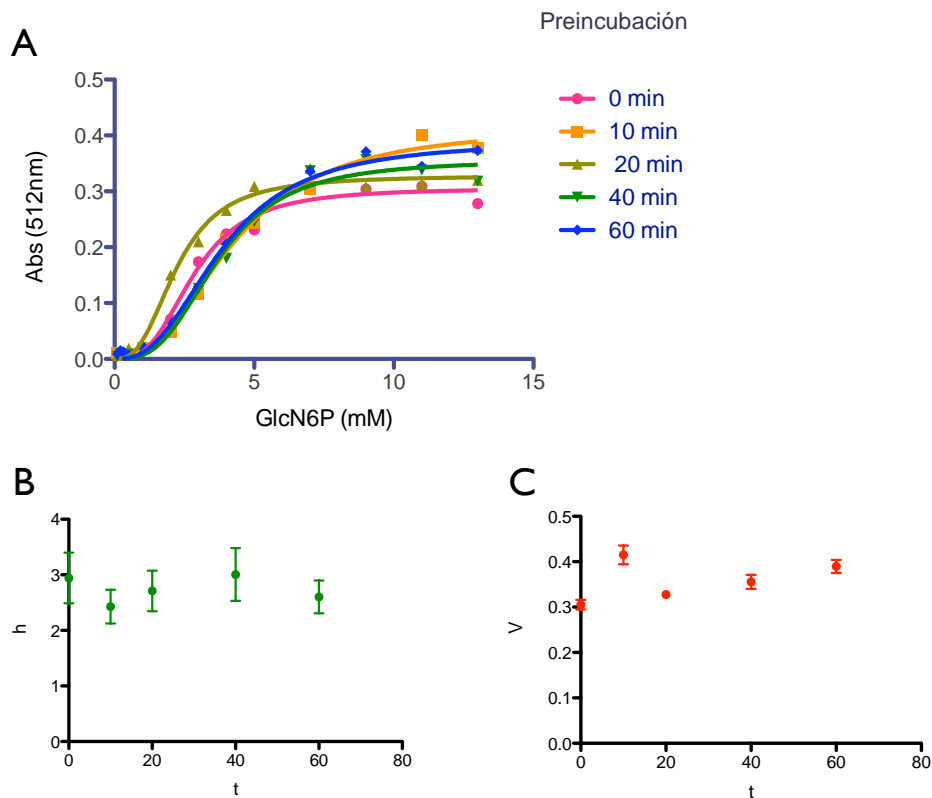


Figura 20. Cinética con la enzima preincubada sin sustrato a 30°C a tiempos variables. (B) Regráfico de los coeficientes de Hill. (C) Regráfico de las velocidades máximas.

Es posible afirmar que en la ventana de tiempo en la que se observaron los cambios conformacionales de la enzima por métodos espectroscópicos, no existen variaciones en la magnitud de la cooperatividad. En otras palabras, no disminuye la cooperatividad a medida que avanzan las transiciones conformacionales, como sería de esperarse su fuese una enzima con cooperatividad cinética.

Con la finalidad de descartar el efecto que pudiera tener la temperatura en el cambio en la magnitud de la respuesta cooperativa, se hicieron cinéticas a la misma concentración de la enzima y al mismo tiempo de incubación pero a tres diferentes temperaturas 20°C, 30°C y 40°C. Los resultados muestran que la enzima, independientemente de la temperatura presenta una cooperatividad mayor a la que puede presentar un dímero con cooperatividad termodinámica (figura 21). En general, las transiciones conformacionales tienen una dependencia de la temperatura ya que tienden a ser favorecidas entrópicamente.

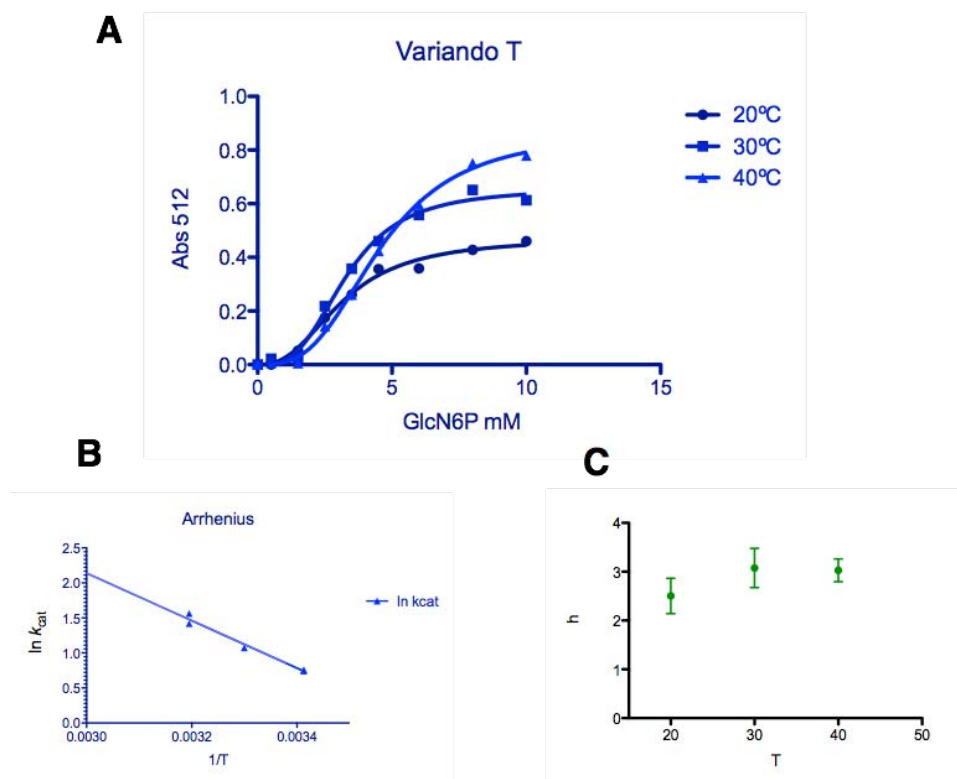


Figura 21.(A) Cinética con la enzima a diferentes temperaturas. (B) Gráfico de Arrhenius. (C) Regráfico de los coeficientes de Hill.

Según una revisión reciente (19), se han reportado algunos mecanismos de cooperatividad alternativos a la clásica comunicación física entre subunidades. Una de ellas evidentemente es la cooperatividad cinética, que permite que una enzima monomérica presente cooperatividad; otra es un cambio en el estado de agregación inducido por ligantes, es decir, que la enzima aumente el número de subunidades por molécula al ocuparse en un sitio; una más es la modificación covalente de la enzima, como ejemplo un corte proteolítico o un fosforilación, si esta modificación conduce a la enzima a un estado de mayor afinidad, se puede generar un comportamiento cooperativo. No hay modelos reportados.

Se ha demostrado que la cooperatividad en esta enzima no depende solamente de la comunicación entre subunidades (30). En este trabajo se ha demostrado que la enzima no presenta cooperatividad cinética. Otra fuente de cooperatividad reportada en la literatura es un cambio en el estado oligomérico dependiente de la unión de sus ligantes. El ejemplo de este mecanismo es la Glutamato deshidrogenasa del hígado de bovino, que tiene un cambio de oligómero a monómero cuando une el GTP (39). En las enzimas cuya cooperatividad es la consecuencia de un cambio en el estado de agregación, habrá una dependencia de la magnitud de la cooperatividad con la concentración de la enzima, ya que la dilución favorecerá la disociación. En esta NagBII de *S. oneidensis* se ha demostrado que la dilución no altera la magnitud de la respuesta cooperativa. También se demostró que la enzima en ausencia y en presencia de ligantes no presenta estado oligomérico diferente al dímero. Esto permite descartar un cambio en el estado de agregación dependiente de la ocupación de sus sitios. De entre las causas de cooperatividad reportadas en la literatura quedaba por descartarse la cooperatividad producida por una modificación covalente, la cual fue descartada por el análisis de la espectrometría de masas, que demuestra que la enzima presenta la masa calculada teóricamente con su secuencia.

El modelo de cooperatividad propuesto

La glutamina fructosa-6P amidotransferasa (GFAT) y la GlcN6P desaminasa de arqueas comparten su plegamiento con nuestra enzima, y se ha demostrado que tienen una estrecha relación filogenética (31). Estas enzimas comparten el sitio de unión por sus ligantes e inclusive los residuos catalíticos; nuestra enzima conserva estos residuos (His242, Lys326 y Glu226) en una geometría equivalente. Una evidencia de la conservación del sitio fue el efecto inhibitorio de la Glc-ol-6P, que se ha reportado como inhibidor competitivo para enzimas con plegamiento SIS, que en general conservan actividad vestigial de Glc6P isomerasa. El Glc-ol-6P es análogo al estado de transición de esta reacción.

La enzima NagBII en *S. oneidensis*, a diferencia de sus ortólogas en arqueas y de la GFAT, carece de otros residuos involucrados en el reconocimiento del sustrato como los del segmento 50-54; los cuales, a pesar de estar conservados, tienen una diferente estructura secundaria. Esta diferencia estructural, en NagBII de *S. oneidensis* es la que da origen al sitio alostérico (figura 22) y al mismo tiempo provoca que la cavidad en el sitio activo sea mayor. Esto permite suponer que ni en la GFAT ni en la GlcN6P desaminasa de bacteria existe un sitio alostérico. Cabe resaltar que en ningún estudio funcional de estas enzimas se ha reportado que sean alostéricas o cooperativas. Entonces el cambio en estructura secundaria puede ser la causa de la aparición del sitio alostérico y puede estar relacionado con el comportamiento cooperativo de la enzima.

El sitio activo de la enzima no pudo ser determinado con tanta precisión siguiendo el protocolo que se usó para definir el sitio alostérico, es decir, hacer acoplamiento molecular sobre el modelo y diseñar mutantes sistemáticamente sobre éste. Por acoplamiento molecular el sustrato se une con significativa

reproducibilidad a un sitio distinto al sitio activo conservado en proteínas homólogas. Este sitio de unión está en donde se da el cambio en estructura secundaria de esta enzima con respecto a sus homólogas. La formación del asa (52-65) que da origen al sitio alostérico también es responsable de que la cavidad sea mas profunda en la enzima homóloga en *S. oneidensis* y en el fondo de esta cavidad se une el sustrato en los métodos del acoplamiento molecular. Usando el mismo método pero con otros ligantes del sitio activo, como la Fru6P, GlcN-ol-6P y Glc-ol-6P señalan con alta reproducibilidad al mismo sitio de unión. En ningún caso se encontró unión al sitio conservado.

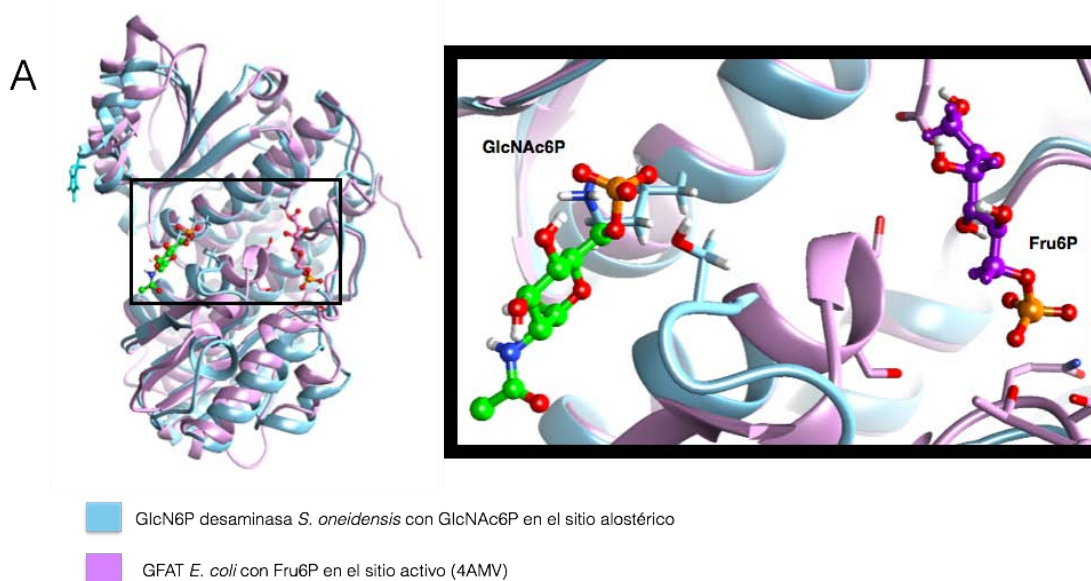


Figura 22. Superposición de nuestra enzima con la GFAT de *E. coli*. Se resalta el cambio de estructura secundaria que da origen al sitio alostérico y que desarma al sitio catalítico homólogo.

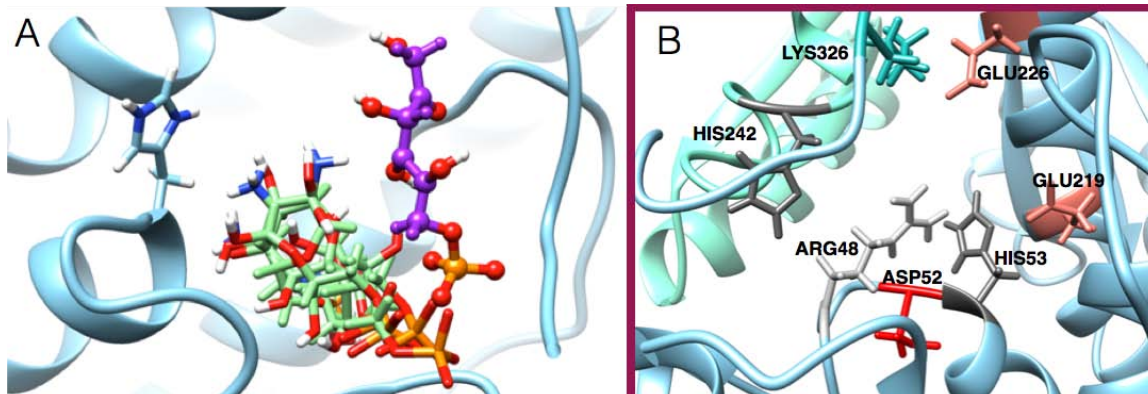


Figura 23. (A) Acoplamiento molecular de la GlcN6P (verde) sobre la GlcN6P desaminasa de *S. oneidensis*, se muestra el sitio de unión de la Fru6P (morado) en las enzimas homólogas. (B) Residuos con posible relevancia en la catálisis.

El sitio de unión identificado por acoplamiento molecular, alejado del sitio activo conservado, presenta alta restricción conformacional evaluada por dinámica molecular. En este aparente sitio de unión se encuentran otros residuos que podrían tener participación en la catálisis por sus características fisicoquímicas y su disposición geométrica, como son la Arg48, His53 y Glu219 (Figura 23B). Es esencial resaltar que se descartó el papel de la His53 como la responsable de la apertura del anillo del sustrato mediante mutagénesis dirigida (Medina-García, 2016).

Aunque el sitio de unión encontrado por acoplamiento no fuera productivo, una vez ocupado queda suficiente espacio en la cavidad para que entre una segunda molécula de sustrato en el sitio activo conservado. Haciendo un segundo acoplamiento molecular usando Fru6P sobre el complejo Enzima-GlcN6P, se encontró que se podía unir en el sitio señalado como el homólogo y en la disposición adecuada para la catálisis (Figura 24).

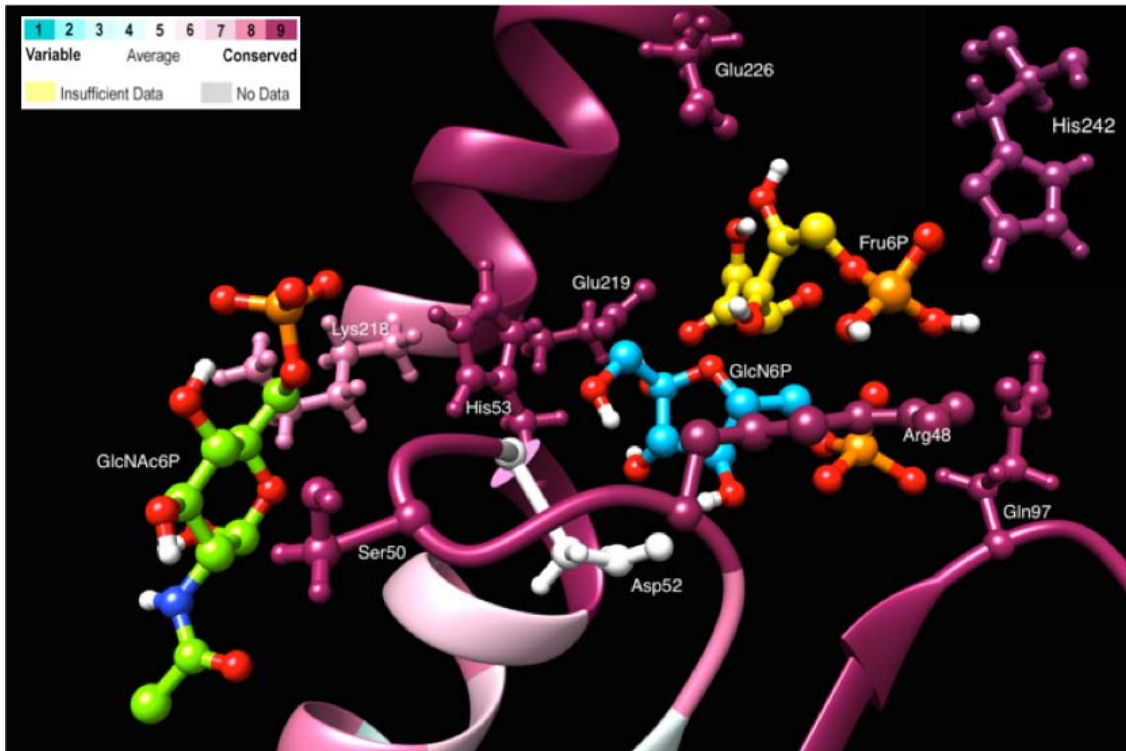


Figura 24. Resultados de acoplamiento múltiple sobre el modelo de la proteína con máxima área expuesta al solvente. En carbonos verdes el activador alostérico (GlcNAc6P) en su sitio; en carbonos azules el sustrato (GlcN6P) en el sitio encontrado por acoplamiento; y en carbonos amarillos el producto (Fru6P) en el sitio equivalente al sitio activo en las enzimas homólogas. Los colores de los residuos son asignados por su conservación en un alineamiento de 100 secuencias.

La observación anterior nos permite proponer un modelo en el que una molécula de sustrato se une a la proteína en el sitio encontrado por acoplamiento y una vez ocupado este sitio, una segunda molécula del sustrato se une al sitio que es equivalente al sitio activo en las proteínas homólogas, que sería el sitio productivo. Esto implica que la enzima presenta activación esencial por el mismo sustrato (ecuación 2). Modelando esta ecuación encontramos que este puede ser un componente del comportamiento cooperativo de esta enzima.

$$v(S) := \frac{S}{S + K_m \cdot \left(1 + \frac{K_a}{S}\right)}$$

Ecuación 2. de velocidad en una activación esencial por sustrato.

Evidencias cinéticas son que los resultados cinéticos solamente ajustan a la ecuación MWC con los par los gráficos de Hill muestran que a bajas concentraciones de sustrato, la cinética de saturación presenta pendiente de cero a bajas concentraciones de sustrato, lo que significa que a esas concentraciones la catálisis no depende de la concentración de sustrato, probablemente solo hasta que se ocupa el primer sitio la enzima empieza a ser productiva(Figura 25B), es decir, activación esencial por el mismo sustrato.

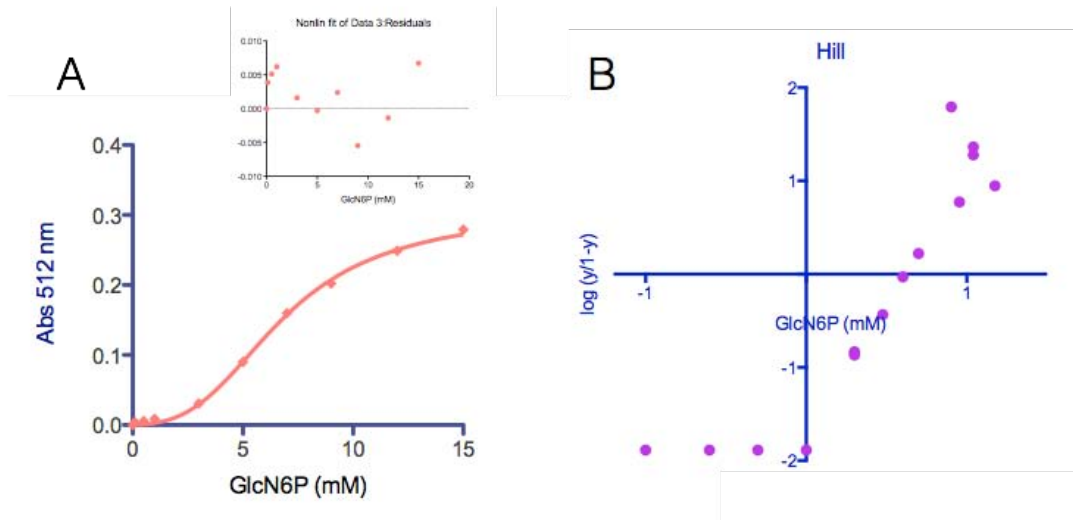


Figura 25. (A) Ajuste de los datos cinéticos a la ecuación de MWC considerando fijación exclusiva a una forma de la enzima y cuatro sitios de unión. (B) Gráfico de Hill en donde se ve pendiente cero a bajas concentraciones.

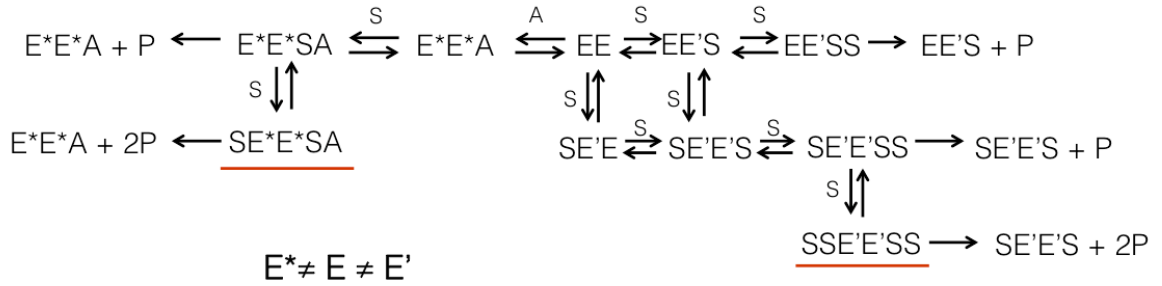
En términos estructurales el modelo de la activación esencial, también nos permite explicar la compactación de la enzima cuando se une el activador alostérico, pero no cuando solo hay sustrato. Cuando la enzima está ocupada en su sitio alostérico está en una forma mas compacta, el sustrato se une al

sitio encontrado por acoplamiento, es decir el más profundo, y la histidina catalítica (His242) tiene que adentrarse a la cavidad de la subunidad vecina para abrir el anillo del sustrato. La His242 solo puede alcanzar este sitio en la conformación compacta. En ausencia del activador alostérico, el sustrato ocupa el mismo sitio encontrado por acoplamiento, sin embargo, al no compactarse no se puede justificar que la histidina 242 catalice la apertura del anillo del sustrato. Lo propuesto es que la unión del primer sustrato permite que se una un segundo sustrato en el sitio activo conservado, en el cual, la histidina 242 queda suficientemente cerca para catalizar la apertura del anillo del azúcar (figura 26).

Además el marcado efecto de activación V (en la velocidad máxima), se puede explicar con la existencia de dos formas catalíticas diferentes de la enzima; una alcanzada por la activación homotrópica (E^* en figura 26) y otra por la heterotrópica (E' en figura 26); en otras palabras, una activada por el activador alostérico y otra activada por otra molécula del mismo sustrato; ambos estados conformacionales son diferentes estructural y catalíticamente.

No obstante, este mecanismo por sí solo no permite explicar la alta cooperatividad que presenta la enzima. Modelando una ecuación cinética con el mecanismo de activación esencial por sustrato, la cooperatividad también está limitada por dos sitios, el encontrado por acoplamiento y el catalítico conservado. Sin embargo, es importante señalar que estos sitios podrían estar comunicados con los de la subunidad vecina, de tal manera que podría haber hasta cuatro sitios de unión al sustrato por dímero. Entonces el número de sitios que limite la magnitud de la cooperatividad sería cuatro, y sería posible explicar la alta cooperatividad que presenta el dímero.

A



B

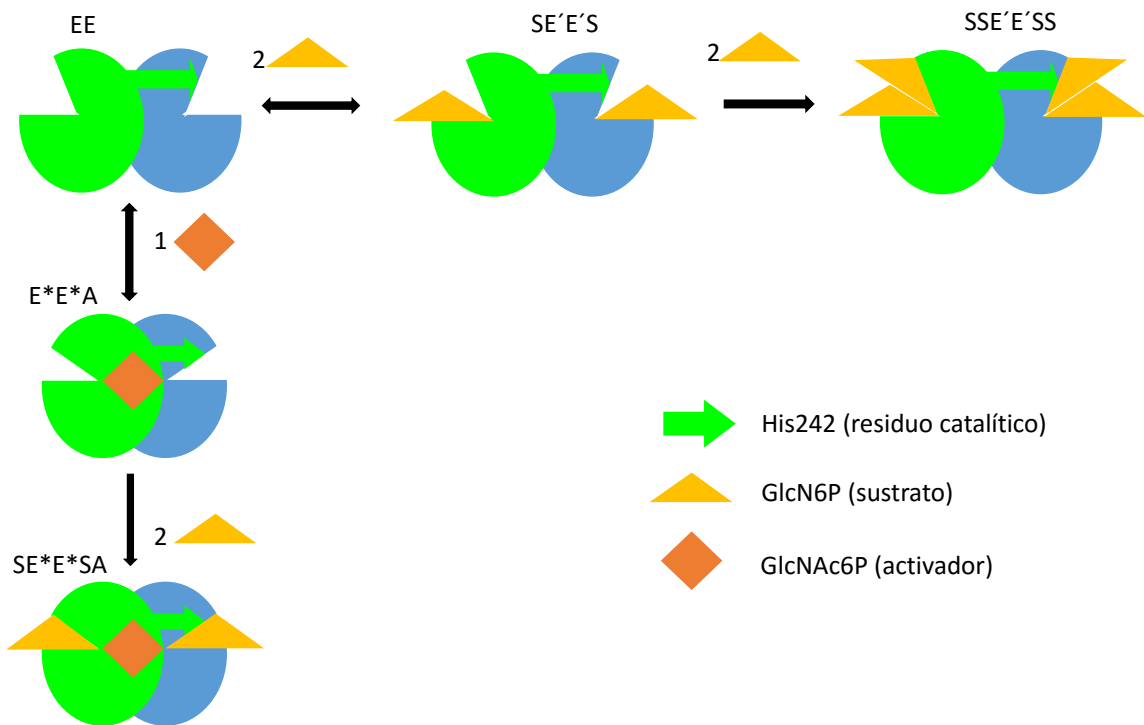


Figura 26. (A) Esquema que muestra las especies posibles de la enzima, según el mecanismo propuesto; (B) Esquema estructural simplificado que muestra los tipos de activación en la enzima. A para activador alostérico, S para sustrato y E para enzima: E* para enzima con activador; E' para enzima con sustrato en el sitio no productivo.

Comunicación entre subunidades.

Anteriormente, se ha explicado que la cooperatividad de esta enzima también depende de la comunicación entre subunidades. El sitio de unión del citrato está exactamente en la intercara del dímero (ver figura), en una zona de relativa rigidez que permanece casi inmóvil en la dinámica molecular, es decir, el sitio de unión al citrato no se modifica aún en la compactación de la enzima. Esto explica por que la unión del citrato no interfiere en la activación alostérica. Dada la posición y rigidez del sitio de unión del citrato, éste sí puede tener relevancia en la comunicación cuaternaria, lo que justifica por qué el citrato sí modifica la cooperatividad, disminuyendo la $K_{0.5}$.

Este efecto de inhibición competitiva se puede explicar por observaciones hechas en dinámica molecular: La Arg48, que tiene contactos con el citrato, también forma parte de la arquitectura del sitio de unión al sustrato, el no productivo. En la dinámica molecular esta arginina oscila entre distintos rotámeros y solo podría formar uno de los dos contactos, con el citrato o con el sustrato, no con ambos. Esta competencia por la arginina permite explicar la disminución en la afinidad de la enzima al unirse el citrato, sin ningún efecto típico de inhibición competitiva en enzimas alostéricas con cooperatividad termodinámica, como la activación paradójica.

Otra evidencia de la comunicación entre subunidades es la cinética de la enzima nanoencapsulada en geles de sílice. La enzima encapsulada en ausencia de ligantes era capaz de activarse alostéricamente ya que esta activación depende de una compactación, la cual no es evitada con la encapsulación (ver encapsulación); sin embargo, la cooperatividad en esta enzima es disminuida considerablemente ($h = 1.4$). Esto se debe a que la encapsulación suprime la comunicación entre subunidades, pero no el mecanismo de activación esencial por el mismo sustrato, que opera de forma independiente en la cavidad de cada subunidad. La nanoencapsulación, por lo

tanto es una herramienta adecuada para estudiar el componente de la cooperatividad dado por la activación esencial del sustrato.

Discusión general

A pesar de desarrollo tecnológico y la profundidad en el entendimiento de los mecanismos de regulación de algunas proteínas, se han realizado esfuerzos por mantener el nuevo conocimiento al margen del marco teórico de alguno de los modelos fundadores, el MWC o el KNF. Ambos modelos, sin embargo, no describen a detalle mecanismos, y no responden a la pregunta fundamental de como la unión de un ligante o su modificación conduce a los efectos alostéricos observados a nivel atómico. Por otro lado, los modelos generales no son suficientes para describir la diversidad biológica de los mecanismos de regulación molecular.

El modelo MWC ha formado parte del estudio de un gran número de proteínas bien estudiadas desde hace 50 años debido a que la formulación original es muy precisa y ha sido base para el desarrollo de nuestra posterior comprensión de la alostería, sin embargo, en sentido literal tiene limitaciones. Un ejemplo es el criterio de simetría, con el que Wyman no estuvo de acuerdo en su formulación inicial, que consiste en suponer que independientemente de la diversidad estructural que se presenta en proteínas alostéricas, todas ellas deben ser oligoméricas y conservar su simetría cuaternaria en una transición conformacional única.

Otra limitación del modelo MWC en términos estructurales, y que nos concierne en esta discusión, es la recurrente aparición de la cooperatividad y la alostería como parte del mismo fenómeno. Esto implica que la ocupación de cualquiera de los sitios de la proteína, independientemente de su distinta naturaleza, genera exactamente las mismas consecuencias estructurales

globales. Este mismo postulado, sin embargo, no ha sido una limitación del modelo en términos de sus aplicaciones, pues ha permitido describir favorablemente en términos fenomenológicos, el comportamiento de una gran variedad de enzimas alostéricas. Aunque algunos autores se han dado cuenta de las limitaciones estructurales y mecánicas del modelo, han preferido no sacrificar la elegancia de su capacidad explicativa.

Los mecanismos moleculares que dan origen a la alostería o la cooperatividad actualmente son poco entendidos en la mayoría de las enzimas, probablemente esta sea la razón por la cual sean recurrentemente interpretados como parte del mismo mecanismo molecular. María de la Luz Cárdenas (14) quien considera que son “dos caras de la misma moneda” en términos puramente fisiológicos, sostiene que el desarrollo tecnológico ha limitado en gran medida el progreso en esta área de la ciencia.

En la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, un sistema explorado con múltiples herramientas de la ciencia de proteínas, aún se siguen encontrando sutiles detalles de sus mecanismos de regulación. En esta enzima se ha podido ver que mientras que la cooperatividad depende estrictamente de la comunicación cuaternaria del oligómero, la activación alostérica puede ser un fenómeno local para aquella subunidad ocupada en su sitio alostérico. A pesar de esto en solución ambos fenómenos están acoplados en esta enzima, aunque en forma incompleta. El detalle que hace que el modelo MWC continúa siendo válido para describir la cinética alostérica de la GNPDA en solución, ya que los métodos comunes de análisis no permiten detectar el carácter parcial de este acoplamiento. Sin embargo, el estudio de las propiedades alostéricas de las mutantes y la nanoencapsulación en gel de sílice, han demostrado que las transiciones terciarias son la causa de la activación alostérica, mientras que la cooperatividad requiere la comunicación entre subunidades.

La diversidad biológica supera las interpretaciones intuitivas generales, esto significa que, eventualmente la selección natural fijará mecanismos adaptativos alternativos a los generales, siempre y cuando estos respondan favorablemente a presiones de selección particulares. En enzimas alostéricas se han descrito mecanismos vistos como excepciones a la luz de los modelos alostéricos más comunes. Algunos ejemplos son la comunicación alostérica en enzimas monoméricas o en enzimas oligoméricas pero independiente de transiciones conformacionales cuaternarias (18). El estudio profundo de las proteínas alostéricas ha puesto en duda la generalidad de los modelos más populares, ya que a medida que avanza el entendimiento de la alostería en un sistema es más frecuente encontrar particularidades que promueven la ampliación de este marco teórico. En este contexto nos hemos encontrado con una enzima que escapa a las interpretaciones intuitivas generales y cuyo estudio participa en el enriquecimiento de este marco teórico.

La activación alostérica en la GlcN6P desaminasa con plegamiento SIS se puede describir con el modelo de MWC ya que la unión del activador alostérico promueve una transición conformacional concertada en la proteína que lleva a ambos monómeros a un estado de mayor afinidad por su sustrato. Sin embargo, como ya se ha discutido, el mecanismo que genera la cooperatividad homotrópica es diferente del mecanismo de la activación alostérica y se puede separar experimentalmente, lo que implica que los mecanismos regulatorios en esta enzima son más complejos y que cooperatividad y alostería no son necesariamente consecuencias del mismo mecanismo molecular, como ocurre con muchas proteínas alostéricas. Más aún, el mecanismo de cooperatividad que presenta esta enzima no corresponde con ninguno de los mecanismos descritos en la literatura.

Conclusiones

- La enzima es un dímero obligado ya que el sitio activo se forma por residuos de ambas subunidades, razón por la cual disminuye su velocidad al promoverse su disociación por dilución. Este efecto es evitado cuando la enzima está saturada de GlcNAc6P, ya que este ligante promueve la compactación del dímero y con ello la formación de nuevos contactos intersubunitarios.
- La cooperatividad en esta enzima no es dependiente de un cambio en el estado oligomérico ya que la dilución, que promueve la disociación, no modifica la magnitud de la cooperatividad.
- Existe una transición conformacional lenta y reversible que se puede ver por métodos espectroscópicos. No obstante estas transiciones no tiene consecuencias en el funcionamiento de la enzima, de manera que la cooperatividad en esta enzima no es cooperatividad cinética.
- La cooperatividad y la activación alostérica en esta enzima dependen de mecanismos moleculares distintos y se pueden separar experimentalmente. Asimismo el estado activado por la GlcNAc6P y activado por la ocupación del sustrato son estructural y cinéticamente diferentes.
- La enzima presenta dos dominios SIS. Cada uno de los cuales puede moverse como un bloque estructural rígido aún en la formación del dímero. Estos movimientos son relevantes en la activación alostérica ya que permiten explicar la compactación de la enzima, la cual promueve el acercamiento de la His242 al sitio activo de la subunidad vecina.
- Existe una relación filogenética entre GFAT, GlcN6P desaminasas de arqueas y de bacterias.
- El sitio de unión por la GlcNAc6P no existe en las estructuras reportadas de enzimas homólogas. El análisis de secuencias sugiere

que es una característica exclusiva de las GlcN6P desaminasas SIS de bacterias. Este sitio apareció como consecuencia de una modificación en la estructura secundaria de la enzima.

- El cambio estructural que da origen al sitio alostérico asimismo produce que la cavidad del sitio activo sea más profunda, dando lugar a un posible sitio de unión al sustrato, distinto al sitio activo. Este segundo sitio de unión permite aumentar la magnitud de la respuesta cooperativa, justificando la cooperatividad que tiene esta enzima. El mecanismo de cooperatividad además depende de la comunicación entre subunidades. Esto implica que la enzima tiene efectos cooperativos de naturaleza distinta.

Perspectivas

- Medir la estequiometría de la unión del sustrato a la proteína mediante la medida directa de la unión de inhibidores competitivos marcados radioactivamente, principalmente GlcNol6P y ManN6P.
- Se puede utilizar también la Calorimetría de Titulación Isotérmica usando los ligantes mencionados fríos. El análisis calorimétrico en función de la temperatura será una gran herramienta en el estudio del componente entrópico de las transiciones conformacionales asociadas a los mecanismos de regulación de la enzima.
- Resolver la estructura cristalográfica de una GlcN6P desaminasa con plegamiento SIS, vacía y en complejo con sus ligantes.
- Diseño de señales reporteras de los cambios conformacionales globales en la enzima asociados a la ocupación de sus sitios de unión. Esto

después del conocimiento de los cambios conformacionales esenciales en la transición conformacional inducida por el ligante alostérico.

- Separar mediante mutaciones puntuales cooperatividad y la activación alostérica para su estudio independiente.

Referencias

1. Almeida F.C., Leszczyniecka M., Fisher P. y DeSalle R. (2008). Examining Ancient Inter-domain Horizontal Gene Transfer. *Evolutionary Bioinformatics*. **4**:109-119
2. Altamirano M.M., Mulliert, G. y Calcagno M.L. (1987). Sulfhydryl groups of glucosamine-6-phosphate isomerase deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **258**: 95-100
3. Altamirano M.M., Plumbridge J.A., Hernández-Arana, A. y Calcagno, M.L. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1076**: 266-272
4. Altamirano M.M., Hernández-Arana A., Tello-Solis, S. y Calcagno M.L. (1994). Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate desaminasa from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **220**: 409-13
5. Altamirano M. M., Plumbridge J. A., Horjales E. y Calcagno M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* **34**: 6074-6082
6. Anderson J.A., Hirt R., Foster P. y Roger A. (2006). Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: influx of genes into protist genomes. *BMC Evolutionary Biology* **6**:27-30
7. Arreola R., Valderrama B., Morante M.L. y Horjales E. (2003). Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Letters*, **551**: 63–70
8. Benson R.L. y Kress H. (1980). Glucosamine metabolism in *Drosophila virilis* salivary glands: ontogenic changes of enzyme activities and metabolite synthesis. *Developmental Biology* **78**: 63-75
9. Bustos-Jaimes I. y Calcagno M. L. (2001) Allosteric Transition and Substrate binding Are Entropy Driven in Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **394**
10. Bustos-Jaimes I., Sosa Peinado A., Rudiño-Piñera E., Horjales E. y Calcagno M. L. (2002). On the Role of the Conformational Flexibility of the Active-site Lid on the Allosteric Kinetics of Glucosamine-6-phosphate Deaminase. *Journal of Molecular Biology* **319**:183-189

11. Bustos-Jaimes I., Ramírez-Costa M., De Anda-Aguilar L., Hinojosa-Ocaña P. y Calcagno M.L. (2005). Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. **44**:1127-35
12. Bustos-Jaimes I., De Anda-Aguilar L. y Calcagno M. L. (2008) Allostery and cooperativity in protein function. *Advances in Protein Physical Chemistry*. Transworld Research Network, Kerala, India
13. Calcagno M.L., Campos P.J., Mulliert G. y Suástegui (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **787**: 165-173
14. Cárdenas M.L. (2013) Michaelis and Menten and the long road to the discovery of cooperativity. *FEBS Letter* **587**: 2767–2771
15. Carol M. y Miller B. (2012) Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites. *Bioorganic Chemistry* **43**: 44–50
16. Cisneros A.D., Montero-Morán G., Lara-González S.y Calcagno M.L. (2004). Inversion of the allosteric response of *Escherichia coli* glucosamine-6-P deaminase to N-acetylglucosamine 6-P, by single amino acid replacements. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **421**: 77-84
17. Copeland Robert (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Second Edition. Wiley-VCH, Inc. New York, USA
18. Cornish-Bowden A. (2002). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Third edition. Portland Press, Ltd, London
19. Cornish-Bowden A. (2013) Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes. *FEBS Journal* **281**: 621–632
20. Dominguez Dueñas L. (2008). Dinámica molecular de la transición entre los dos conformeros T y R de la glucosamina 6-fosfato desaminasa. Tesis de maestría, UNAM
21. Fenton Aaron (2008) Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life' *Trends in Biochemical Sciences*. **33**(9): 420–425
22. Floquet Nicolas (2007). Discovering new inhibitors of bacterial glucosamine-6P synthase (GlmS) by acoplamiento simulations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**: 1966–1970
23. Horjales E., Altamirano M., Calcagno M., Garrant R. y Oliva G.(1999). The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the state T at 2.3 Å resolution. *Structure* **7**: 527-537.

24. Karsten Suhre y Yves-Henri Sanejouand (2004). *EINémo*: a normal mode web server for protein movement analysis and generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Research* **32**: 610-614.
25. Koshland Jr D. E., Némerthy G. y Filmer D. (1966) Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry*, **5** (1): 365–385
26. Lara-González S., Dixon H.B.F., Mendoza-Hernández G., Altamirano M.M. y Calcagno, M.L. (2000). On the role of the N-terminal group in the allosteric function of Glucosamine-6-phosphate desaminase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **301**: 219-227.
27. Lara González S. (2001) Desencadenamiento y propagación de la transición alostérica en la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química UNAM.
28. Larion Miora, Salinas RK, Bruschweiler Li L., Miller BG. y Bruschweiler R. (2012) Order-Disorder Transitions Govern Kinetic Cooperativity and Allostery of Monomeric Human Glucokinase. *PLoS Biol* **10**: *journal.pbio.1001452*
29. Leloir L.F. y Cardini C. (1956) Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochimica et Biophysica Acta* **20**: 33-42.
30. Marcos Viquez J. (2013). Convergencia evolutiva funcional de dos fosfoglucoaminas desaminasas pertenecientes a diferentes familias estructurales. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM
31. Medina García A. (2016) Efectos homotrópicos del sustrato de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Shewanella oneidensis* estudiados mediante mutagénesis dirigida. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM
32. Midelfort C. F. y Rose I. A. (1977) Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* **16**: 1590-1596.
33. Mizraji E. (1999) El segundo secreto de la vida. Ed. Trilce. Montevideo, Uruguay
34. Monod J., Wyman J. y Changeux J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions. *Journal of Molecular Biology* **12**: 88-118
35. Monod J. (1970). El azar y la necesidad Tusquets Ed. Francia
36. Montero-Morán G.M., Horjales E., Calcagno M.L. y Altamirano M.M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **37**: 7844-7849.

37. Montero Morán G. M. (2001). Estudio del mecanismo catalítico de la enzima Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis de doctorado, Facultad de Química. UNAM.
38. Neet Kennet (2009). Cooperativity in Enzyme Function: Equilibrium and Kinetic Aspects. En: Purich Daniel. Contemporary Enzyme Kinetics and Mecanism: Reliable Lab Solutions. pp. 227-262
39. Nichol LW, Jackson WJH y Winzor DJ (1967) A theoretical study of binding of small molecules to a polymerizing protein system: a model for allosteric effects. *Biochemistry* 6, 2449–2456.
40. Novick A. y Szilard L. (1950). Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36 , 708-719
41. Omelchenko Marina., Galperin M., Wolf Y y Koonin E.(2010). Non-homologous isofunctional enzymes : A systematic análisis of alternative Solutions in enzyme evolution. *Biology direct* 5: 31
42. Oliva G., Fontes M. R. M., Garratt R. C., Altamirano M.M., Calcagno M.L. y Horjales E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure*. 3: 1323-1332.
43. Pattabiraman T.N. (1961) Purification of glucosamine-6-phosphate deaminase from human brain. *Biochimica et Biophysica Acta*: 273-283.
44. Plumbridge J. A., Cochet O., Souza J.M., Altamirano M.M., Calcagno M.L. y Badet B (1992). Coordinated Regulation of Amino Sugar Synthesizing and Degrading Enzymes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 175: 4951-4956.
45. Plumbridge J.A. y Vimr E. (1999). Convergent phatways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and n-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181: 47-54.
46. Ricard, J. and Cornish-Bowden, A. (1987), Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *European Journal of Biochemistry*, 166: 255–272.
47. Rohl Carol A., Strauss M.E., Misura M.S. Baker D. (2004) Protein Structure Prediction Using Rosetta. *Methods in Enzymology* 383: 66-93.
48. Rudiño-Piñera E., Morales A., Trejo-Rojas P. y Horjales E. (2002). Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Crystallographica Section D*. 58, 10-20.
49. Serres M. y Riley M. (2006) Genomic Analysis of Carbon Source Metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus Experiments. *Journal of Bacteriology* 188: 4601–4609

50. Schagger H.(2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria, *Methods in Cell Biology*. **65**: 231–244.
51. Shevchenko V., Hogben M., Ekong R. Parrington J. y Lai F. (1998) The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* **216**: 31-38.
52. Shibayama Naoya y Saigo S. (1995) Fixation of the Quaternary Structures of Human Adult Haemoglobin by Encapsulation in Transparent Porous Silica Gels. *Journal of Molecular Biology*, **251**: 203–209.
53. Silva D-A, Bowman GR, Sosa-Peinado A. y Huang X. (2011). A Role for Both Conformational Selection and Induced Fit in Ligand Binding by the LAO Protein. *PLoS Computational Biology* **7**(5): e1002054
54. Sosa-Peinado A. y González- Andrade M. (2005). Site-Directed Fluorescence Labeling Reveals Differences on the R-Conformer of 6-Phosphate Deaminase of Escherichia coli Induced by Active or Allosteric Site Ligands at Steady State. *Biochemistry*, **44**: 46.
55. Takeshi Takana, Fumikasu T., Toshiaki F., Shinsuke F., Haruyuki A. y Tadayuki I. (2005). Characterization of a Novel Glucosamine-6-phosphate deaminase from a Hyperthermophilic Archaeon. *Journal of Bacteriology* **187**: 7038-7044
56. Vincent F., Davies G. y Brannigan J. (2005). Structure and kinetics of a monomeric glucosamine-6-phosphate deaminase: missing link of the Nag B Superfamily. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 19649-55.
57. Qiang Cui y Karplus M. (2007). Allostery and cooperativity revisited. *Protein Science* (2008), **17**:1295–1307.
58. Wyman, J., y Gill, S. J. (1990) Binding and linkage : functional chemistry of biological macromolecules, University Science Books, Mill Valley, Cali.
59. Yang Chen; Rodionov D.; Li X.; Laikova O.; Gelfand M.; Zgnitko O.; Romine M.; Obratsova A.; Nealson K. y Ostermn A. (2006) Comparative Genomics and Experimental Characterization of N-Acetylglucosamine Utilization Pathway of *Shewanella oneidensis*. *The Journal of Biological Chemistry* **40**: 29872-29885.
60. Zonszein S., Álvarez-Añorve L, Vazquez-Nuñez R, Calcagno ML, (2014). The Tertiary Origin of the Allosteric Activation of E. coli Glucosamine-6-Phosphate Deaminase Studied by Sol-Gel Nanoencapsulation of Its T Conformer. *PLoS ONE* **9**(5): e96536.