



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Alostería y cooperatividad en la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*:  
un enfoque mecanístico**

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

LIBB SERGIO ZONSZEIN STRAUSS

DIRECTOR DE TESIS  
DR. MARIO L. CALCAGNO  
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSARIO MUÑOZ CLARES  
Facultad de Química

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ  
Facultad de Medicina



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Agradecemos la financiación a este trabajo y a las líneas de trabajo paralelas que nos han permitido conocer la importancia de la desaminasa en el contexto metabólico y su comportamiento alostérico.**

**Hemos podido plantear un posible mecanismo alostérico a nivel atómico de la EcGNPDA y los resultados experimentales obtenidos en este trabajo fueron interpretados en los términos teóricos más modernos.**

**La desaminasa es una enzima alostérica modelo. Es una enzima alostérica con catálisis uni-bi al azar reversible, cuyo estudio se simplifica y permite probar el sistema bajo distintos modelos alostéricos con éxito.**

**El presente es producto de múltiples esfuerzos.**

PAPIIT Proyectos IN213312 y IN216615

Fondo Infraestructura Conacyt (INFR-2015) Proyecto No. 252140

Cooperación Francia-México International GRONAG, (ANR-09-BLAN 0399 en Francia y Conacyt 116074 en México) 2019-2015.

Conacyt Ciencia Básica CB-2016 Proyecto 254337

Conacyt por la beca brindada durante mis estudios de posgrado

Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para asistir al 26<sup>avo</sup> simposio de la Protein Society

## Agradecimientos y dedicatorias

A Mario con quien siempre es un placer conversar y convivir. Renacentista-ilustrado como él no he conocido a otro. Siempre me ha apoyado en mis múltiples búsquedas y me ha compartido el privilegio de comprender a la desaminasa un poco mejor.

Al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas y todos sus integrantes a través del tiempo, ya que ha sido mi hogar por más tiempo que ningún otro hogar en mi vida.

A mis colegas y colaboradores, que siempre tienen un gran lugar en mi corazón.

A mi comité tutor quienes tuvieron infinita paciencia en ayudarme a moldear y entender este trabajo.

A mi familia y amigos. Su presencia y constante apoyo en buenos y malos momentos es esencial para mi vida.

A Steven y Olga. Su amor incondicional me cobija en los peores momentos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, por tener siempre sus puertas abiertas y ser una bella isla de conocimiento y libertad.

# Índice

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
MECANISMOS DE REGULACIÓN ALOSTÉRICA .....	5
DETERMINANDO EL MECANISMO DE UNIÓN DE LIGANTES A TRAVÉS DE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN... 8	8
<i>Interpretación del equilibrio rápido.....</i>	8
<i>Ajuste inducido un caso particular de la selección conformacional.....</i>	9
<i>Determinando el mecanismo de unión de ligantes: constantes de velocidad de las relajaciones cercanas al equilibrio, considerando la concentración de proteína total. ....</i>	10
DESAMINASA: OPERÓN NAG Y LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL CATABOLISMO DE AMINOAZÚCARES.....	11
LA DESAMINASA DE <i>E. COLI</i> COMO SISTEMA MODELO DE ALOSTERÍA Y COOPERATIVIDAD .....	12
LA NANOENCAPSULACIÓN EN GELES DE SÍLICE .....	14
SEÑAL FLUORESCENTE REPORTERA DEL CAMBIO CONFORMACIONAL.....	14
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
NANOENCAPSULACIÓN DE LA DESAMINASA, RESTRICCIÓN DEL CAMBIO CONFORMACIONAL CUATERNARIO .....	19
CATÁLISIS DE LA ECGNPDA NANOENCAPSULADA EN EL ESTADO T .....	21
CATÁLISIS DE LA ECGNPDA NANOENCAPSULADA EN EL ESTADO R .....	23
CATÁLISIS DE LAS FORMAS T Y R NANOENCAPSULADAS: UN MODELO ESTRUCTURAL PARA EXPLICAR LA APARICIÓN DEL EFECTO HOMOTRÓPICO EN SOLUCIÓN.....	25
CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE FLUORESCENCIA DE LA MUTANTE F NANOENCAPSULADA.....	28
CONCLUSIONES.....	35
MÉTODOS.....	36
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ECGNPDA SILVESTRE Y MUTANTES .....	36
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA .....	37
ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	37
NANOENCAPSULACIÓN DE LA DESAMINASA EN GELES NANOPOROSOS DE ORTOSILICATOS.....	37
<i>Preparación de monolitos.....</i>	37
<i>Preparación de geles en suspensión para ensayos de cinética de catálisis.....</i>	38
ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR .....	40
ENSAYOS DE FLUORESCENCIA CON LA MUTANTE F NANOENCAPSULADA EN MONOLITOS .....	40
ENSAYOS DE FLUORESCENCIA CON LA MUTANTE F NANOENCAPSULADA EN POZOS .....	41
AJUSTE DE DATOS Y SIMULACIÓN DE ECUACIONES .....	42
APÉNDICE 1. ARTÍCULO S. ZONSZEIN ET AL. PLOS ONE 2014.....	43
APÉNDICE 2. SIMULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE $K_{OBS}$ CON ECUACIONES PARA UN SISTEMA ACOPLADO DE TRES ESTADOS CONFORMACIONALES. ....	54
REFERENCIAS .....	61

## Resumen

La glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPDA, E.C. 3.5.99.6) es un homohexámero de 179 kDa y la única enzima alostérica que participa en el catabolismo de los aminoazúcares. Cada subunidad de 266 aminoácidos tiene un sitio activo y un sitio alostérico. La EcGNPDA cataliza la desaminación e isomerización reversible de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en fructosa 6-fosfato (Fru6P) y ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).

Las estructuras cristalográficas de la EcGNPDA han sido reportadas en dos estados conformacionales: cristaliza en el conformero T el estado de baja afinidad en ausencia de ligantes (PDB:1FSF) y en el conformero R en presencia de distintos ligantes como el activador alostérico, la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P) (PDB:1FRZ), el producto de la reacción Fru6P (PDB:1FQO) o el inhibidor competitivo no fisiológico, que es un análogo del estado de transición, la glucitolamina 6-fosfato (GlcNol6P) (PDB:1HOR). La catálisis en solución de la EcGNPDA presenta cooperatividad positiva por el sustrato en ausencia de activador alostérico y puede ser descrita en términos de las ecuaciones de Monod-Wyman-Changeux (MWC); también la unión al equilibrio de la GlcNAc6P presenta cooperatividad positiva.

En este trabajo recurrimos a la nanoencapsulación de la desaminasa en geles húmedos de ortosilicatos, sol-gel, con el fin de enlentecer la relajación conformacional y restringir la movilidad cuaternaria. La nanoencapsulación nos permite estudiar el comportamiento de estados poco poblados o prácticamente inaccesibles en fase soluble, principalmente el estado T en presencia de ligantes y la forma R libre de ligantes. La EcGNPDA nanoencapsulada en geles puede ser medida con técnicas y aparatos comunes para el estudio de la proteína en solución; los geles micro disgregados en forma de suspensión para los estudios de catálisis se obtienen mediante una ultrasonificación suave del sol-gel. La EcGNPDA en geles en forma de monolitos sobre láminas de cuarzo y en el fondo de placas de pozos, se utilizaron para realizar distintos experimentos de espectrometría de dicroísmo circular y de fluorescencia.

En los experimentos de catálisis se abolió la cooperatividad positiva observada en la enzima en solución, utilizando la enzima nanoencapsulada en cada estado conformacional restringido T o R. Las constantes de disociación por el sustrato calculadas para ambos estados, en ausencia y a saturación de activador alostérico, son similares a las obtenidas de los experimentos de catálisis en solución ajustados con las ecuaciones de MWC. Estimamos las constantes de equilibrio terciarias para cada estado cuaternario,  $l_T$  y  $l_R$ , en el marco teórico del modelo de dos estados terciarios (TTS por las siglas en inglés *Two-tertiary states*), de Eaton-Hofrichter-Henry.

Mediante experimentos espectrofluorométricos con la enzima nanoencapsulada en monolitos, calculamos velocidades de cinética de relajación en presencia de distintas concentraciones de activador alostérico. Utilizamos el desarrollo matemático propuesto por F. Paul y C. L. Weikl en 2016 para interpretar los resultados de velocidad de relajación. En el estado T, el mecanismo de transición conformacional de las subunidades en la unión de ligante es de ajuste inducido, mientras que en el estado R, es de selección conformacional. La interpretación del mecanismo alostérico en cada estado cuaternario estudiado con cinética de relajación por fluorescencia se confirma con los resultados de cinética de catálisis con la enzima nanoencapsulada.

Los estudios de catálisis de geles en T, muestran dos constantes de velocidad y dos constantes de disociación por el sustrato, ambas distintas y no acopladas, cada una puede observarse independientemente en ausencia y a saturación de GlcNAc6P. En la forma T, a concentraciones intermedias de activador alostérico, la heterogeneidad conformacional se vuelve más aparente y muestra cooperatividad negativa (número de Hill  $< 1$ ). En un mecanismo de ajuste inducido, donde el estado conformacional de cada subunidad se modifica concomitante a la unión del activador alostérico, lo esperado sería observar estados independientes y desacoplados, similar a lo que se aprecia en T por sus ligantes.

Los experimentos de catálisis de los geles en R muestran un sistema alostérico de activación tipo K con subunidades independientes, el desacoplamiento entre las subunidades se detecta por ausencia de efecto homotrópico por los ligantes; el equilibrio conformacional entre dos estados terciarios se modifica por la presencia de activador alostérico, cambia la constante de disociación aparente por el sustrato, pero a diferencia de T la constante de disociación y la velocidad está compartida por todo el ensamble (número de Hill = 1). En R cuando el cambio conformacional terciario  $t \rightarrow r$  ocurre en ausencia de ligantes, se observa un único estado promedio que cataliza la reacción, por lo que observamos una sola velocidad para todo el sistema y una constante de disociación aparente, que depende del equilibrio del estado conformacional que es desplazado por el activador, un comportamiento así puede esperarse de un mecanismo de selección conformacional; al contrario de dos velocidades y constantes separadas que se observan con los geles en T.

En este trabajo propongo una interpretación mecanística del origen de la influencia del estado cuaternario sobre el equilibrio terciario. El sesgo del equilibrio terciario en cada estado cuaternario es uno de los postulados del modelo TTS; en el caso de la EcGNPDA la influencia cuaternaria es consecuencia del cambio de mecanismo de unión de ligantes en dos pasos, que va de un mecanismo de ajuste inducido en el estado T, a uno de selección conformacional en el estado R.

## Abstract

*Escherichia coli* Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (EcGNPDA, E.C. 3.5.99.6) is a homohexamer of 179 kDa and the only allosteric enzyme of the amino sugar catabolism. Each subunit formed of 266 residues has one allosteric site and one active site. The EcGNPDA catalyzes the reversible reaction of deamination and isomerization of Glucosamine-6-Phosphate (GlcN6P), giving Fructose-6-Phosphate (Fru6P) and ammonium ion ( $\text{NH}_4^+$ ).

EcGNPDA crystallographic structures have been reported in two conformational states: its low-affinity conformer the T state in absence of ligands (PDB:1FSF) and in its high affinity conformation the R state, in the presence of diverse ligands. The forms co-crystalized with allosteric activator *N*-acetylglucosamine 6-Phosphate (GlcNAc6P, PDB:1FRZ), the reaction product Fru6P (PDB 1FQO) and the non-physiologic competitive inhibitor that is a transient-state analogous Glucitolamine-6-Phosphate (GlcNol6P, PDB 1HOR). Its catalysis in soluble phase show positive cooperativity for its substrate in absence of allosteric activator, which can be described in terms of the Monod-Wyman-Changeux (MWC) equations. GlcNAc6P binding also shows positive cooperativity.

The nanoencapsulation of EcGNPDA in wet orthosilicate gels (sol-gels) to slow down conformational relaxations and restrict its quaternary mobility. Nanoencapsulation study some inaccessible or low populated states of EcGNPDA in solution, mainly the T-state in the presence of ligands and the ligand-free R-state. The nanoencapsulated enzyme can be measured with standard methods and equipment common with the enzyme in soluble phase. Micro-disaggregated gels in suspension obtained by mild ultra-sonication of sol-gels were used for the catalysis experiments. The sol-gels in form of monoliths formed over quartz slabs or at the bottom of well-plates were used in circular dichroism and fluorescence spectroscopy.

Catalysis experiments with nanoencapsulated enzyme in each conformational state, T or R, abolished the positive cooperativity observed in the enzyme in solution. The obtained substrate dissociation constants measured in both states and in absence and presence of allosteric activator, were in good correlation with the known constants of the enzyme in solution. We calculated the tertiary state equilibrium constants,  $l_T$  and  $l_R$ , in the context of the Eaton-Hofrichter-Henry two-tertiary states model (TTS).

We obtained the fluorescence relaxation rates of the nanoencapsulated EcGNPDA in presence of increasing allosteric activator concentrations; this data was interpreted using the theoretical framework proposed by F. Paul and C. L. Weikl in 2016; we found that in the T state, the tertiary allosteric transition behaves as an induced-fit mechanism, while in R state is of conformational

selection. The fluorescence relaxation experiments are confirmed within the observed catalytic behavior. In T-gels, the tertiary species equilibrium shows two uncoupled conformations in equilibrium, showing two different velocity constants and two separate dissociation constants for the substrate.

At subsaturating allosteric activator concentrations, the appearance of the conformational heterogeneity is more pronounced and negative cooperativity is observed, as would be expected for an induced-fit mechanism, where the tertiary conformation of each subunit is modified upon interaction with the allosteric ligand. In R-gels the catalysis kinetics behaved as a K-type allosteric system of independent subunits, supporting a conformational selection mechanism; where the apparent conformational equilibrium is defined by the allosteric activator presence, modifying the apparent dissociation constant for the substrate where a single velocity is shared throughout the system. When the conformational tertiary-state t to r change occurs in absence of ligands, the catalysis can be achieved by a single state independently of the binding state, showing the expected behavior for a conformational selection mechanism; inversely of what happens in the T-gels where velocities for each state are discernible.

A mechanistic interpretation of the origin of the tertiary conformational equilibrium bias, one of the postulates of the TTS model. Is the consequence of a quaternary transition change in EcGNPDA that modifies the allosteric binding mechanism at the tertiary level, shifting from induced-fit in the T-state to conformational selection in the R-state.

# Introducción

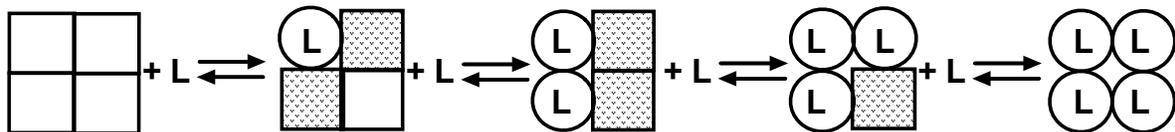
## Mecanismos de regulación alostérica

La regulación alostérica encierra secretos de la adaptación que controla las respuestas de los seres vivos a su entorno. Jacques Monod al conceptualizarla la llamó “el segundo secreto de la vida”.<sup>1</sup> La alostería es el cambio de actividad o afinidad de un sitio ligante por efecto del estado ligante de otro sitio en la misma molécula; la palabra fue acuñada del griego “allos” distinto y “stereos” sólido (distinto ligante o distinto sitio) el sitio alostérico es el sitio ligante distinto al sitio activo y es capaz de regular su función o actividad.

Existe una gran diversidad de proteínas alostéricas con funciones distintas como factores de transcripción, proteínas de transporte, transducción de señales y enzimas.<sup>2-4</sup> Existen tanto homooligómeros como heterooligómeros, algunas que pueden exhibir cambios conformacionales con grandes rearrreglos estructurales con cambios en la posición de las subunidades de un mismo ensamble que incluyen cambios cuaternarios y terciarios; incluso cambios como la posición de una cadena lateral.<sup>5</sup> Otras en las que el cambio alostérico se puede propagar como una redistribución de los contactos o de la dinámica entre dominios.<sup>6,7</sup>

Las proteínas oligoméricas muestran dos tipos de efectos alostéricos el homotrópico y el heterotrópico. El efecto homotrópico, se propaga entre sitios ligantes semejantes del oligómero y da origen a la cooperatividad positiva. Este se observa como un comportamiento de unión sigmoide, donde la unión de un sitio ligante favorece la unión de los sitios de la misma naturaleza en el ensamble.

Existen dos posibles modelos generales que surgieron contemporáneamente entre sí para explicar el comportamiento de unión sigmoide o cooperativos; las ecuaciones de ambos modelos están basadas en la suma de ecuaciones de Adair por lo que cumplen con las leyes del equilibrio termodinámico.<sup>8</sup> Por una parte, tenemos el modelo de Koshland-Némethy-Filmer (KNF),<sup>9</sup> que interpreta el fenómeno como un cambio secuencial en la afinidad de los sitios ligantes; es decir, en el momento en que uno de los sitios se llena cambia su estado conformacional. Para explicar los efectos de cooperatividad positiva el modelo supone que un sitio vecino ligado se vuelve más capaz de ligar y así subsecuentemente (figura 1).



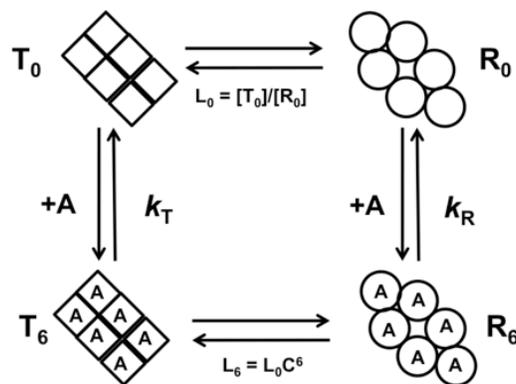
**Figura 1.** Esquema del modelo de KNF para un tetrámero. Las subunidades en el estado de baja afinidad (cuadros), unen el ligante y transitan al estado de alta afinidad (círculos), los cuadros rellenos son los vecinos a una subunidad ligada que tienen mayor probabilidad de unir el siguiente ligante, cuando la cooperatividad que se simula es positiva.

Las ecuaciones de este modelo dependen del número de subunidades y de la geometría del ensamble, lo que genera mayor complejidad matemática a mayor número de subunidades en el ensamble. La idea central del modelo secuencial es el mecanismo de unión de ligantes de dos pasos de ajuste inducido lo que la transición cc conformacional se propaga en un paso posterior a la interacción de la proteína con el ligante. En el ajuste inducido la transición conformacional se encuentra impedida en el estado libre de ligantes y el equilibrio conformacional observado es entre dos estados ligados.

El ajuste inducido puede ser apreciado a través de la perspectiva planteada por Weikl y Paul, quienes proponen que lo que vemos como ajuste inducido en un sentido, en realidad es la salida de un ligante del sitio a través de un mecanismo de selección conformacional observado en reversa.<sup>10</sup> Lo plantean para el caso de proteínas con cambio conformacional que tienen acoplada la transición conformacional a la entrada y salida de los ligantes del ciclo catalítico.

Por otra parte, para interpretar el efecto homotrópico tenemos el modelo de MWC que propone un equilibrio conformacional entre dos estados ligantes con distinta afinidad (figura 2).<sup>11</sup> El ligante es capaz de recorrer el equilibrio conformacional al ir seleccionando el estado de mayor afinidad. El cambio de estado cuaternario produce cambios en las interfaces entre las subunidades causando un rearrreglo simétrico en el estado de las subunidades del ensamble. Esto implica que el estado cuaternario define todas las constantes cinéticas y se va recorriendo en el equilibrio al estado de mayor afinidad por el ligante. En las ecuaciones de MWC es posible obtener el ajuste de las constantes de disociación de cada estado conformacional, T y R, y el equilibrio entre ellas. Además, la ecuación de MWC permite incrementar el número de subunidades sin agregar más complejidad en la cantidad de constantes de disociación simuladas.

Una de las ideas centrales de este modelo es la unión de ligantes por selección conformacional; donde el cambio conformacional ocurre independientemente del estado ligante. El mecanismo de unión de selección conformacional implica que la transición al estado de mayor afinidad ocurre en un paso previo del paso de unión del ligante. El modelo asume dos estados cuaternarios de afinidades distintas que coexisten y se interconvierten al equilibrio. Que desplaza el equilibrio hacia la conformación que une al ligante con mayor afinidad.



**Figura 2.** Esquema mínimo del modelo de MWC para un número de sitios de 6. Las formas libres de ligantes y las formas unidas se encuentran en equilibrio en ambos estados cuaternarios.

Aunque el ajuste inducido y selección conformacional fueron vistas como modelos opuestos; el estado actual propone que ambos mecanismos forman parte del paisaje energético conformacional de las proteínas alostéricas.<sup>12, 13</sup> Lo que permite estudiarlas como partes de un mecanismo acoplado de cuatro estados en donde ambas rutas son posibles.<sup>14</sup>

El modelo de MWC considera a los dos sitios ligantes, el alostérico y el activo, como funciones ligadas que comparten el mismo estado conformacional, lo cual es útil para explicar la propagación de la transición alostérica de un sitio a otro.<sup>8</sup> Generalmente los sitios alostéricos se forman en las

interfaces de las subunidades del ensamble. La unión del efector al sitio alostérico produce efectos de activación e inhibición sobre el sitio activo modificando el equilibrio conformacional.

El efecto homotrópico o de cooperatividad positiva y el efecto heterotrópico o alostería son propiedades que frecuentemente se pueden encontrar relacionadas en la naturaleza, probablemente debido a que la cooperatividad amplifica los efectos de la alostería.<sup>15</sup> Aunque aparecen asociados, esto no implica que los mecanismos de activación homotrópica y heterotrópica compartan las mismas rutas o estrategias a nivel microscópico para modificar el equilibrio conformacional del ensamble.

En el planteamiento original del modelo de Monod en 1963 no se hace una distinción clara entre los niveles estructurales terciario y cuaternario; la información cristalográfica de la hemoglobina disponible en la época llevó a Monod a considerar el uso del mecanismo más sencillo para la definición de los estados conformacionales y posteriormente en 1965 proponer el modelo alostérico con simetría absoluta; lo que lo llevó a sacrificar el detalle mecanístico a nivel atómico, el cual parecía más bien una complicación para el modelo y sus ecuaciones.<sup>2,11</sup>

A nivel macroscópico el modelo cumple con la posibilidad de describir el equilibrio conformacional, en conjunto con una gran variedad de comportamientos cinéticos de cooperatividad, efectos alostéricos y efectos cinéticos clásicos simultáneamente. La simetría o acoplamiento absoluto de la transición cuaternaria-terciaria en el modelo de Monod es debatible. Existen ejemplos experimentales en donde los efectos de cooperatividad y alostería pueden disociarse, demostrando que no existe un acoplamiento total.<sup>17,18</sup> Las ecuaciones del modelo de MWC tienen plasticidad por su origen modular, lo que les permite simular un amplio conjunto de efectos cinéticos.<sup>16</sup>

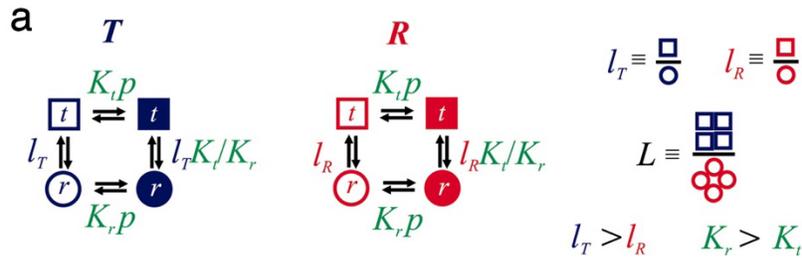
$$\bar{y} = \frac{\frac{L}{(1+\gamma)^n} c \alpha (1+c\alpha)^{n-1} + \alpha (1+\alpha)^{n-1}}{\frac{L}{(1+\gamma)^n} (1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n}$$

**Ecuación 1.** Ecuación general de MWC para efecto homotrópico y heterotrópico. Donde, L es la constante de equilibrio entre los estados T y R,  $\gamma$  es la concentración específica para el activador alostérico  $\frac{[A]}{K_A}$  de fijación exclusiva al estado R,  $\alpha$  es la concentración específica de sustrato  $\frac{[S]}{K_R}$ , n el número de sitios del ensamble y c define la relación  $\frac{K_R}{K_T}$

El modelo de MWC y aquellos que surgieron de éste están basados en el mecanismo de selección conformacional. El desarrollo de nuevos modelos y ecuaciones derivadas del modelo de Monod explican principalmente las evidencias estructurales de la hemoglobina, que es la principal proteína alostérica modelo.<sup>19,20</sup>

Uno de los modelos que prevé transiciones conformacionales en dos niveles estructurales terciario y cuaternario, es el modelo TTS (figura 3).<sup>21</sup> Este modelo introduce constantes de equilibrio terciario, las constantes  $l_R$  y  $l_T$ , que definen los equilibrios entre subunidades en dos estados, [t] y [r], en cada estado cuaternario T y R. En el TTS, la transición cuaternaria  $T \rightleftharpoons R$ , definido por la constante de equilibrio conformacional cuaternario L, cambia la proporción entre los equilibrios terciarios  $t \rightleftharpoons r$ , definidos por las constantes de equilibrio terciario para cada estado cuaternario,  $l_T$  y  $l_R$ . La unión de los ligantes ocurre a nivel de las subunidades, definiendo la constante de disociación por el ligante de la forma r como  $K_r$  y del estado t como  $K_t$ .

En el modelo TTS se descarta la simetría conformacional absoluta del modelo de MWC, al incluir la coexistencia de subunidades en estados conformacionales terciarios distintos dentro de un mismo estado cuaternario. El TTS permite explorar toda la gama de combinaciones de estados ligantes, de dos estados terciarios y dos cuaternarios posibles. En este trabajo se utiliza el TTS conceptualmente y no sus ecuaciones para el ajuste de datos experimentales.



**Figura 3.** Tomada de <sup>22</sup>. Esquema mínimo del modelo TTS para hemoglobina. Las K están definidas como constantes de unión. Se muestra un equilibrio conformacional terciario de subunidades libres y unidas en cada estado cuaternario. La L se define de la misma manera que en el modelo de MWC y representa el equilibrio entre estados cuaternarios simétricos vacíos, T y R, y las  $l_T$  y  $l_R$ , representan los equilibrios entre estados terciarios, t y r, de cada estado cuaternario.

### Determinando el mecanismo de unión de ligantes a través de la cinética de relajación.

Estudiar el cambio conformacional en el tiempo en presencia de ligantes es necesario para determinar el mecanismo de unión de ligantes más probable, ya sea de ajuste inducido o selección conformacional. Los experimentos de cinética rápida miden el cambio de una señal que sigue el cambio conformacional dependiente de los ligantes, haciendo posible medir la cinética del cambio de señal respecto al tiempo.

El ajuste de las constantes de velocidad de relajación,  $k_{obs}$ , a concentraciones variables de ligante se obtiene por medio de una regresión no lineal de los resultados de la relajación conformacional a una ecuación biexponencial. En los mecanismos de unión de ligantes de dos pasos existen distintas aproximaciones para diagnosticar el tipo de interacción proteína-ligando. La interpretación del mecanismo de unión correlaciona las  $k_{obs}$  más lentas respecto a la concentración de ligante para determinar el paso limitante del mecanismo. Conocer el mecanismo de unión no es un problema trivial debido a que los mecanismos de unión de ligantes en dos pasos contienen 4 velocidades distintas involucradas en el mecanismo y pueden depender tanto de la concentración del ligante como la de la proteína.<sup>23</sup>

### Interpretación del equilibrio rápido

En equilibrio rápido se asume que la velocidad de unión del ligante es mucho más rápida que la velocidad del cambio conformacional de la proteína, por lo que el cambio de señal respecto al tiempo produce una  $k_{obs}$  dependiente del cambio conformacional de la proteína. Las ecuaciones de velocidad se plantean asumiendo pseudo-primer orden, donde la concentración total de ligante excede por mucho la concentración total de la proteína; de forma que el ligante unido sea despreciable y la concentración de ligante libre pueda ser utilizada como constante respecto a su  $k_{obs}$ . De esta manera las ecuaciones de velocidad contienen términos lineales respecto a la proteína dependientes del

tiempo. Esta aproximación ha sido la herramienta estándar de diagnóstico para determinar el mecanismo de unión como selección conformacional o ajuste inducido.<sup>24, 25</sup>

En el mecanismo mínimo de unión de ligantes de selección conformacional,  $P_1 \rightleftharpoons P_2 + L \rightleftharpoons P_2L$ , el estado  $P_2$  une el ligante,  $L$ , y la población depende de una constante de equilibrio previo entre las formas  $P_1$  y  $P_2$ ; esto ocasiona que el estado  $P_2$  se va a ir agotando proporcionalmente a mayores concentraciones de  $L$  y el cambio de  $k_{obs}$  se vuelve asintótico a la velocidad de transformación de  $P_1 \rightarrow P_2$ , que es más lenta que la velocidad de unión de ligante por lo que la  $k_{obs}$  tendería hacia velocidades menores a mayor concentración de ligante.

En el mecanismo de ajuste inducido,  $P_1 + L \rightleftharpoons P_1L \rightleftharpoons P_2L$ , la  $k_{obs}$  aumenta con respecto a la concentración de ligante, ya que es esencial para producir el cambio conformacional y la velocidad a saturación estaría relacionada con las velocidades del equilibrio  $P_1L \rightleftharpoons P_2L$ .

### Ajuste inducido un caso particular de la selección conformacional

La visión comúnmente aceptada para interpretar el mecanismo de unión de dos pasos produjo muchos casos descritos como mecanismos de ajuste inducido, sin embargo, en el trabajo de Austin D. Vogt and Enrico Di Cera se expone que una curva de  $k_{obs}$  respecto a la concentración de ligante hiperbólica ascendente no es evidencia inequívoca de un mecanismo de ajuste inducido, tal como se plantea con la simplificación del equilibrio rápido.<sup>14, 25, 26, 27</sup>

El caso del ajuste inducido efectivamente produce curvas de  $k_{obs}$  ascendentes y no puede producir curvas descendentes (ecuación 2). Pero en el caso de la selección conformacional, también es posible obtener curvas de  $k_{obs}$  ascendentes, además de las curvas descendentes esperadas; el cambio de sentido de la relación de  $k_{obs}$  respecto al ligante, depende de la relación entre la constante de velocidad de salida del ligante  $k_{off}$  y las constantes de velocidad del cambio conformacional,  $k_t$  y  $k_r$  (ecuación 3).

Vogt y Di Cera plantean que los trabajos en la literatura interpretados como mecanismos de unión de ajuste inducido, al ser solamente un caso matemático descrito dentro del mecanismo de selección conformacional, probablemente deban ser reinterpretados como mecanismos de selección conformacional.<sup>14,28</sup> Los autores proponen ecuaciones de velocidad para los mecanismos más sencillos de dos pasos (ecuación 2 y 3) y explican como obtener simulaciones numéricas de los comportamientos de las  $k_{obs}$  de mecanismos con mayor complejidad, utilizando matrices de ecuaciones diferenciales de cada especie en el mecanismo respecto al tiempo. Los autores proponen ecuaciones de los valores propios que describen la matriz de los comportamientos de  $k_{obs}$  en los mecanismos. Para los casos más sencillos de dos pasos de selección conformacional (ecuación 3) y de ajuste inducido (ecuación 2), los valores propios que se obtienen tienen solución analítica.<sup>14, 27</sup> También proponen utilizar los resultados de las  $k_{obs}$  rápidas y lentas en conjunto para intentar identificar los mecanismos.<sup>28</sup>

$$k_{obs\ 1,2} = \frac{k_t + k_r + k_{on}L + k_{off} - \sqrt{(k_{off} + k_{on}L - k_t - k_r)^2 + 4k_r k_{off}}}{2}$$

**Ecuación 2.** Valores propios para la constante de velocidad en el mecanismo de ajuste inducido<sup>26</sup>.

$$k_{obs\ 1,2} = \frac{k_t + k_r + k_{on}L + k_{off} - \sqrt{(k_{off} + k_{on}L - k_t - k_r)^2 + 4k_t k_{on}L}}{2}$$

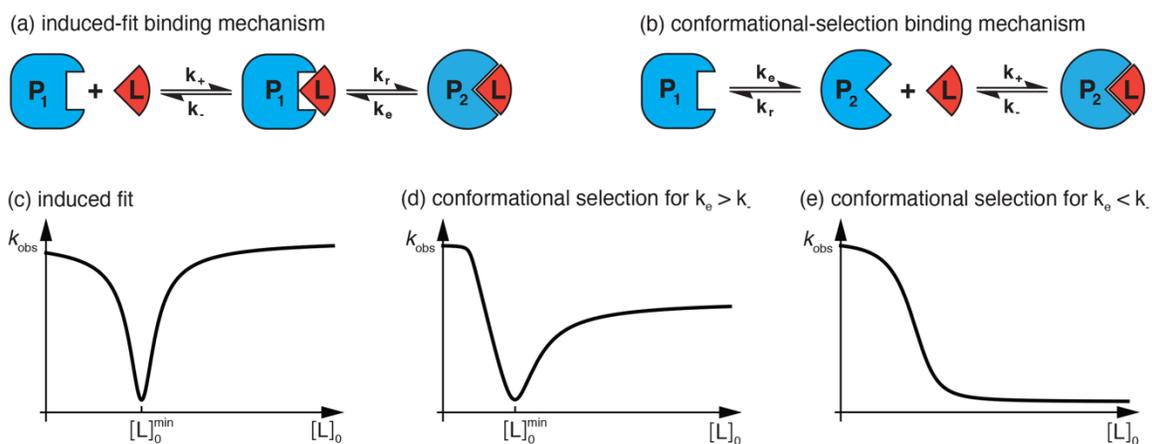
**Ecuación 3.** Valores propios de la constantes de velocidad para el mecanismo de unión de selección conformacional<sup>26</sup>.

### Determinando el mecanismo de unión de ligantes: constantes de velocidad de las relajaciones cercanas al equilibrio, considerando la concentración de proteína total.

Cuando se exploran concentraciones de ligante menores que la concentración de proteína, se obtienen patrones con los que podemos revelar el mecanismo asociado. Otros autores F. Paul y T.R. Weikl, plantearon teóricamente una manera de distinguir con cinética de relajación química, directamente en los patrones de  $k_{obs}$  más lentas observadas, entre los mecanismos de ajuste inducido y selección conformacional.<sup>23</sup> Para acceder a estas relajaciones, suele ser necesario equipo sofisticado como NMR, microscopios de fuerza atómica y fluorómetros adaptados con laser para experimentos con moléculas aisladas.

Los autores utilizaron simulaciones de las curvas de relajación que se obtienen para cada mecanismo y propusieron los sistemas de ecuaciones para ajustar los resultados de velocidad contra concentraciones de ligante por debajo y por encima de la concentración de proteína. Los sistemas de ecuaciones que describen el comportamiento de los mecanismos de dos pasos, los obtuvieron del planteamiento de las ecuaciones diferenciales de velocidad de las especies del sistema respecto al tiempo, considerando todas las especies libres y unidas con ligante, L, y de la proteína en sus dos estados conformacionales, [P1] y [P2] (figura 4).

Este desarrollo teórico introduce términos de conservación de la concentración de proteína en dos estados distintos y del ligante. Para obtener las ecuaciones de velocidad utilizan matrices Jacobianas para escribir de forma vectorial las ecuaciones; resolviendo las matrices, obtienen un par de valores propios de los cuales sólo uno de ellos describe la  $k_{obs}$  de cada mecanismo.



**Figura 4.** Tomada de<sup>23</sup>. (a) y (b) muestra los esquemas de los mecanismos de ajuste inducido y selección conformacional. (c) comportamiento de constantes de velocidad del mecanismo de ajuste inducido, la “v” es simétrica; es decir, la  $k_{obs}$  en el origen limita la  $k_{obs}$  a saturación, en selección conformacional la  $k_{obs}$  a saturación

puede estar por abajo y por arriba de la  $k_{obs}$  en el origen. (d) y (e) comportamiento de constantes de velocidad del mecanismo de selección conformacional.

Ecuación de la  $k_{obs}$  más lenta observable para el mecanismo dominante de selección conformacional (ecuaciones 4-6 y 8). [tomadas de <sup>23</sup>]

$$\alpha = k_r - k_e + \left( k_{off} \frac{(2k_e + k_r) \delta + k_r ([L]_0 - [P]_0 - K_d)}{2k_e K_d} \right) \quad (\text{ecuación 4})$$

$$\beta = 2k_r \left( 2k_e - k_{off} - \frac{k_{off}(d - [L]_0 + [P]_0)}{K_d} \right) \quad (\text{ecuación 5})$$

$$k_{obs} = k_e + \frac{\alpha}{2} - \frac{\sqrt{(\alpha^2 + \beta)}}{2} \quad (\text{ecuación 6})$$

Con la ecuación de la constante de disociación del mecanismo de selección conformacional

$$K_d = \frac{k_{off}(k_e + k_r)}{k_{on}k_e} \quad (\text{ecuación 7})$$

Ecuación de la  $k_{obs}$  más lenta observable para el mecanismo dominante de ajuste inducido y la ecuación correspondiente de la  $K_d$  (ecuaciones 8-11). [tomadas de <sup>23</sup>]

$$\delta = \sqrt{([L]_0 - [P]_0 + K_d)^2 + 4 [P]_0 K_d} \quad (\text{ecuación 8})$$

$$\gamma = -k_e - k_r + k_{off} + k_{on}(\delta - K_d) \quad (\text{ecuación 9})$$

$$k_{obs} = k_e + k_r + \frac{\gamma}{2} - \frac{\sqrt{\gamma^2 + 4 k_{off} k_r}}{2} \quad (\text{ecuación 10})$$

$$K_d = \frac{k_{off}k_e}{k_{on}(k_e + k_r)} \quad (\text{ecuación 11})$$

## **Desaminasa: Operón *nag* y la regulación en la expresión del catabolismo de aminoazúcares.**

La glucosamina 6 fosfato desaminasa de *E. coli* está codificada en el operón divergente *nagE-nagBACD*. La expresión del operón está regulada por el represor transcripcional NagC, que tiene un dominio de interacción con el DNA de hélice-vuelta-hélice y al igual que la desaminasa, su efector alostérico o inductor en este caso es la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P), uno de los principales aminoazúcares componente de los peptidoglicanos de la pared celular.<sup>29,30</sup>

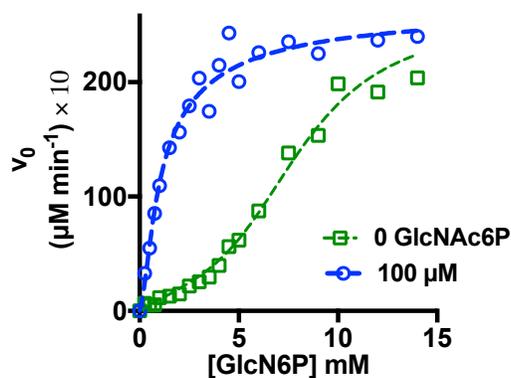
El catabolismo de aminoazúcares está relacionado con el reciclaje de la pared celular. Además, es útil en condiciones de crecimiento en donde se encuentra glucosamina (GlcN) o *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en el medio; por ejemplo, la quitina que es un polímero de GlcNAc es muy abundante en la naturaleza. Actualmente suponemos que la expresión del operón y el control alostérico de la desaminasa no están relacionadas directamente en condiciones de crecimiento con GlcNAc o GlcN en el medio; la concentración de sustrato observada en los estudios de metabolómica implican que la desaminasa se encuentra funcionando a la velocidad máxima y el control alostérico aparentemente

no tiene ninguna relevancia.<sup>31</sup> Es posible que la alostería en la desaminasa esté relacionada en otras condiciones de crecimiento de *E. coli* como en eventos de ayuno.<sup>31</sup>

NagE es un componente específico para GlcNAc del sistema de fosfotransferasas (PTS), que es el sistema de transporte de azúcares que utiliza fosfoenolpiruvato (PEP) para la fosforilación y transporte del aminoazúcar al interior de la célula.<sup>31</sup> El gen *nagB* codifica para la EcGNPDA que cataliza la desaminación e isomerización reversible de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en fructosa 6-fosfato (Fru6P) y ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y es activada alostéricamente por la GlcNAc6P. El gen *nagA* codifica para la GlcNAc6P desacetilasa, que cataliza la hidrólisis del *N*-acetilo de la GlcNAc6P, dando como producto GlcN6P y acetato, alimentando así la vía para EcGNPDA en el sentido catabólico. Esta enzima alimenta la vía catabólica. *nagC* que codifica para la proteína que controla la expresión de este mismo operón. Finalmente, *nagD* codifica para una ribonucleótido monofosfatasa que se expresa en conjunto con las enzimas del catabolismo de aminoazúcares; aparentemente podría tener relación en alimentar las pozas de fosfato inorgánico y comparte con NagC la presencia de iones metálicos divalentes en su estructura.

### La desaminasa de *E. coli* como sistema modelo de alostería y cooperatividad

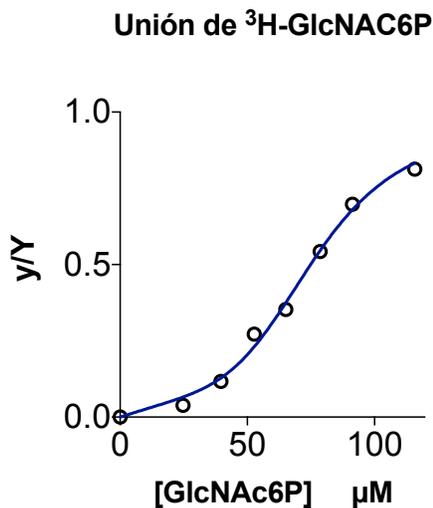
La EcGNPDA es una enzima alostérica con efecto homotrópico y heterotrópico que cataliza una reacción reversible con mecanismo uni-bi de equilibrio rápido al azar. Su cinética se comporta como un mecanismo alostérico de activación de tipo K, es decir que el activador alostérico recorre la constante de disociación aparente por el sustrato sin cambiar la velocidad máxima (figura 5).



**Figura 5.** Cinética de catálisis en sentido desaminante. Se muestran únicamente los datos en ausencia (cuadros vacíos) y en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de activador alostérico (círculos vacíos). Datos ajustados globalmente la ecuación general de MWC con activador alostérico. La regresión no lineal incluye datos de concentraciones intermedias de GlcNAc6P no mostrados en la gráfica.  $L = 52477 \pm 31514$ ,  $K_A = 27.8 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ,  $c = 0.056 \pm 0.008$ ,  $K_R = 1.163 \pm 0.1416 \text{ mM}$ ,  $V = 25.4 \pm 0.5 \mu\text{M min}^{-1}$ . El ajuste de los datos de catálisis en ausencia de activador alostérico se ajusta a un  $L = 10^6 \pm 2 \times 10^4$ ,  $K_R = 0.55 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ,  $c = 0.025 \pm 0.002$

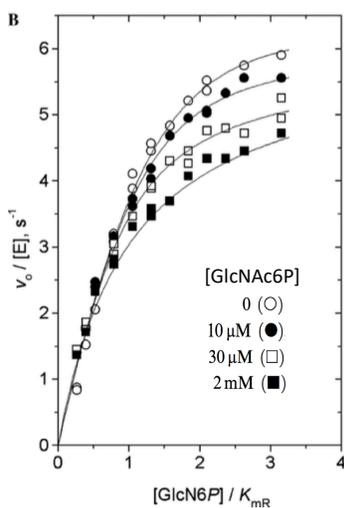
La unión del activador alostérico también muestra cooperatividad positiva. Al analizar la unión del activador alostérico medida con  $^3\text{H}$ -GlcNAc6P (figura 6) con la ecuación general de MWC, asumiendo que el equilibrio conformacional es igual al que se observa en catálisis por el sustrato en ausencia de activador, fijando la  $L$  en  $1 \times 10^6$ , se obtiene un buen ajuste con una  $K_R$  de  $7.08 \pm 0.15 \mu\text{M}$

y una  $c$  de  $0.019 \pm 0.002$ . Lo que implicaría, que la constante de  $27\mu\text{M}$  que se calcula de los datos de cinética como de fijación exclusiva a la forma R, en realidad esta compuesta por un equilibrio entre dos especies con constantes distintas por el activador.



**Figura 6.** Experimento de unión al equilibrio de  $^3\text{H-GlcNAC6P}$  de la EcGNPDA en solución, datos tomados de [IBJ]. Fracción de saturación contra concentración de GlcNAC6P, ajustados a una ecuación general de MWC con  $L$  fija en  $1 \times 10^6$  que es la constante de equilibrio calculada de los datos de catálisis en ausencia de GlcNAC6P y que debe ser el mismo, ya que define el equilibrio de las formas vacías; se obtienen una  $K_R$  de  $7.08 \mu\text{M} \pm 0.15 \mu\text{M}$  y una  $c$  de  $0.019 \pm 0.002$

A través de los años el interés en el mecanismo químico y en los mecanismos de alostería y cooperatividad de la EcGNPDA ha producido gran cantidad de mutaciones sitio dirigidas. La mayoría de los estudios con mutantes y homólogos humanos de esta enzima, se han podido interpretar en el marco teórico y ecuaciones del modelo de Monod, en los que se pudo adaptar para interpretar relaciones estructura-función en los estudios<sup>32-35</sup>. Un par de casos interesantes son el de la mutante K160A, la cual no puede unir el activador alostérico en su sitio, presenta cinética hiperbólica por el sustrato, aunque es capaz de cristalizar en ambos estados cuaternarios<sup>36</sup>. Y en el caso de E148Q que pierde la cooperatividad por el sustrato y el efector alostérico se convierte en inhibidor (figura 7).<sup>35</sup>



**Figura 7.** Gráfica de velocidad inicial por concentración normalizada de sustrato de la mutante E148Q a distintas concentraciones de activador alostérico (figura tomada de [34]).

Estos dos residuos forman un puente salino en el sitio alostérico en el estado T, el cual es remplazado con el fosfato de la GlcNAc6P que interactúa con la K160 en el estado R. Impedir su interacción deja a la enzima sin cooperatividad por el sustrato. Lo que implica que la función de una de sus formas cuaternarias debe estar silenciada, impedida o poco poblada; lo que da pauta para pensar en la posible disociación de los efectos homotrópico, heterotrópico y su relación con la transición cuaternaria.

## La nanoencapsulación en geles de sílice

La nanoencapsulación en geles de ortosilicatos es una herramienta ideal para estudiar la existencia de estados conformacionales terciarios en proteínas alostéricas, impidiendo el cambio conformacional cuaternario. El entramado que forma el gel de poli-O-silicatos durante su polimerización y consolidación alrededor de las proteínas forma una estructura que impide la transición cuaternaria.<sup>37</sup> Esta técnica fue utilizada inicialmente con otras proteínas oligoméricas como la hemoglobina, fructosa-1,6-bisfosfatasa, aspartato transcarbamoilasa entre otras.<sup>38-40</sup>

Los geles de sílice húmedos son un material ideal, al ser suficientemente rígidos para restringir la movilidad de las proteínas, los grupos SiO<sub>2</sub> que quedan expuestos forman parte del disolvente que se encuentra entre el gel y la proteína. Son nanoporosos y permeables a la difusión de la mayoría de los solutos y moléculas pequeñas, lo que permite experimentar distintas condiciones ligantes con las proteínas dentro del gel.<sup>41</sup> Además, son completamente transparentes y pueden ser usados en estudios espectrofotométricos. La hemoglobina tuvo un papel esencial en el desarrollo de la técnica de nanoencapsulación en geles como método de restringir la movilidad conformacional.<sup>42</sup>

La restricción del cambio cuaternario por medio de la nanoencapsulación fue probada inicialmente por la similitud entre las curvas de unión del monóxido de carbono a la hemoglobina en geles y las curvas obtenidas en cristales de hemoglobina.<sup>18,22</sup> Junto con la técnica de nanoencapsulación se logró mayor evidencia experimental para proponer el modelo TTS.

La nanoencapsulación en geles de sílice abrió la posibilidad de estudiar estados poco visitados por las proteínas alostéricas en fase soluble. Esto nos permitió observar situaciones extremas para la EcGNPDA, como el comportamiento de T con activador alostérico o R en ausencia de ligantes. Esta técnica simplifica el estudio del sistema, lo que nos permitió observar el equilibrio de los estados terciarios *t* y *r*, en cada estado cuaternario T o R independientemente en ausencia de la transición cuaternaria. La nanoencapsulación, además de bloquear los cambios cuaternarios, también enlentece en varios órdenes de magnitud las velocidades de relajación del cambio conformacional terciario, brindándonos un escenario experimental favorable para el estudio de cinéticas de relajación química.

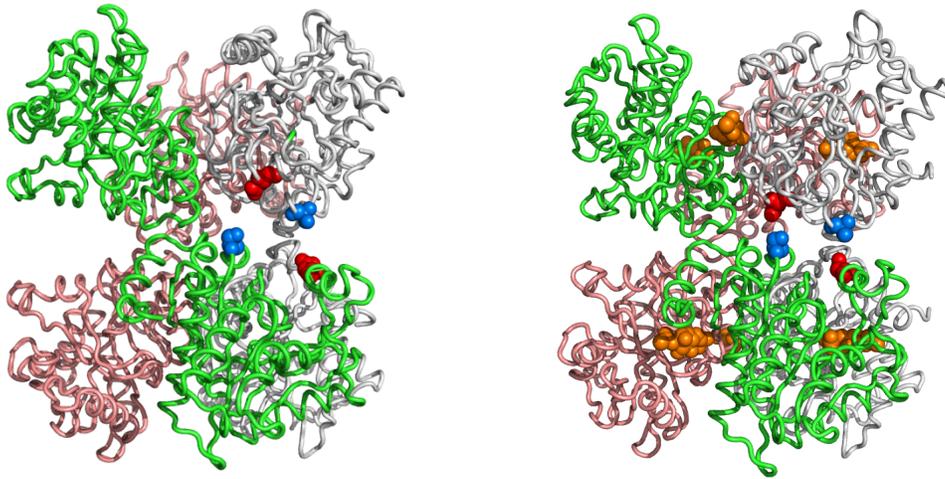
<sup>38, 43-46</sup>

## Señal fluorescente reportera del cambio conformacional

La señal del cambio conformacional, fue construida eligiendo algunas de las posiciones previamente utilizadas para introducir sondas fluorescentes.<sup>47</sup> Las posiciones puntuales para el estudio de transiciones conformacionales en EcGNPDA que elegimos son D165 y S206. La distancia entre las cadenas laterales de D165 y S206, presenta un cambio considerable entre estados cuaternarios, de 5.4 Å de diferencia entre los C $\alpha$  cristalográficos (figura 8).

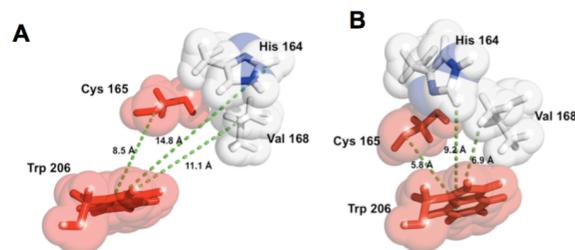
Las posiciones para los pares de apagamiento se encuentran entre subunidades de distinto trímero y distinto dímero del hexámero, haciendo estas posiciones ideales para una marca del cambio conformacional. De esta manera los residuos reporteros, no comparten una interfaz directa entre las subunidades que los portan (figura 8).

Otra ventaja de la posición 165 en el par reportero, es su ubicación en el dominio de la tapa del sitio activo, lo que permite detectar los cambios a nivel de cada subunidad independientemente del estado cuaternario en que se encuentre el ensamble; la combinación del cambio de distancia de los residuos reporteros del cambio cuaternario y el cambio asociado al estado terciario de cada subunidad, permite seguir la transición alostérica de la desaminasa con nuestro par reportero fluorescente (figura 9).



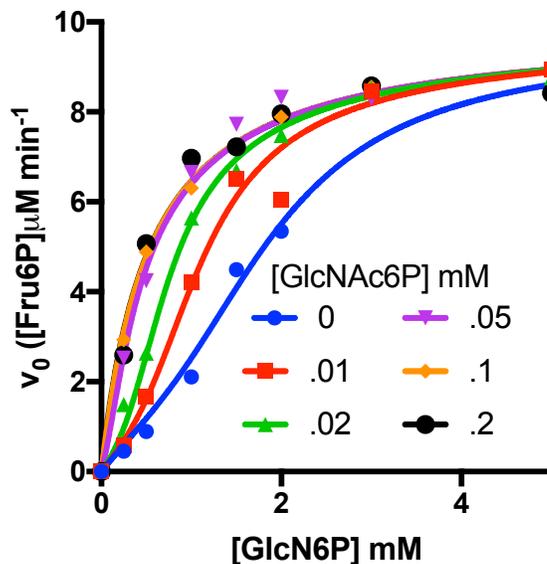
**Figura 8.** Hexámero de la EcGNPDA. A la izquierda en T (PDB 1FSF). A la derecha en R (PDB 1FRZ), la GlcNAc6P está representada en esferas color naranja unida a su sitio. Posiciones 165 y 206, representados en esferas rojas y azules respectivamente. Se muestran los tres dímeros en verde, salmón y gris. Las posiciones 165 y 206 se acercan en la transición alostérica de EcGNPDA, entre subunidades de distinto trímero y distinto dímero; únicamente se muestran las posiciones de los residuos reporteros entre un par de subunidades.

La mutante F, es una quintuple mutante con las cisteínas superficiales mutadas por serina, que evitan la interacción con la cisteína superficial mutante en 165. Observamos que trabajando con el par de apagamiento Cys – Trp obtenemos un buen reportero del cambio conformacional en solución siguiendo la fluorescencia del triptófano, específicamente con la mutante 165C y 206W (mutante F) (figura 9).



**Figura 9.** Reportero del cambio conformacional C165/W206 (Tomada de <sup>48</sup>). Cambio de posición entre los residuos mutantes 165 Cys y 206 Trp. A) forma T, B) forma R

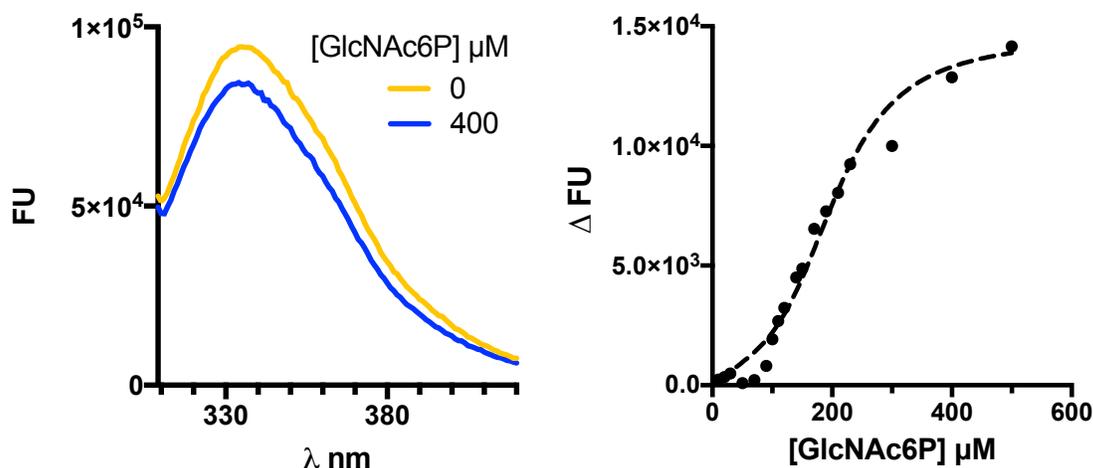
El comportamiento de la cinética de catálisis de la mutante F puede considerarse cercano al de la enzima silvestre; muestra cooperatividad positiva por el sustrato y se comporta como un sistema de activación de tipo K en concentraciones crecientes de GlcNAc6P (figura 10). La constante que se estima por el activador alostérico a través de la catálisis de la mutante F, es idéntica a la que se obtiene de la EcGNPDA silvestre (figuras 5 y 10).



**Figura 10.** Cinética de catálisis de la mutante F en solución a distintas concentraciones de GlcNAc6P (La concentración final de enzima utilizada es 2 nM). El comportamiento homotrópico respecto al sustrato y la activación tipo K es semejante a la enzima silvestre. Las constantes del ajuste mostrado a la ecuación de MWC para activador de fijación exclusiva a la forma R son,  $L$   $1074 \pm 384$ ,  $K_A$   $27 \pm 3 \mu\text{M}$ ,  $K_R$   $0.53 \pm 0.04$  mM,  $C=0.13 \pm 0.02$ ; los parámetros del ajuste de la curva de catálisis en ausencia de activador están resumidos en la tabla 1 de <sup>49</sup>.

La mutante F permite seguir en solución el equilibrio conformacional T-R con el apagamiento de fluorescencia. Los experimentos de unión de ligante al equilibrio con la mutante F en solución siguiendo el cambio total de la intensidad de fluorescencia excitando a 295 nm y midiendo la diferencia en el máximo de la emisión a 334 nm, muestran cooperatividad positiva respecto a la concentración de activador (figura 11).

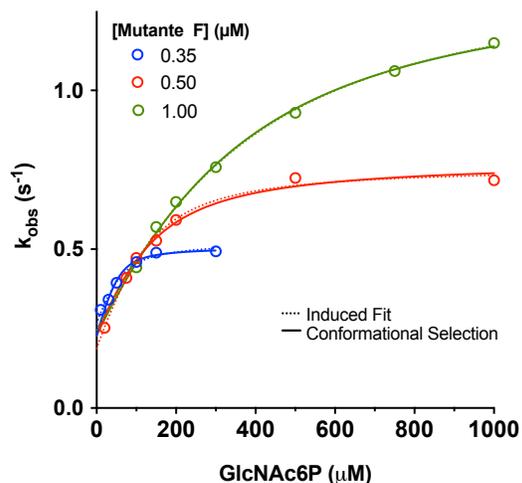
La constante de disociación del activador que se calcula para la enzima silvestre y para la enzima mutante F de los experimentos de catálisis es idéntica de  $27 \mu\text{M}$ . La intensidad de fluorescencia en equilibrio de la mutante F respecto al activador alostérico muestra un equilibrio conformacional,  $L$ , idéntico al estimado para mutante F por el sustrato. La  $L$  para el sustrato de mutante F en ausencia de activador es de  $10^5 \pm 10^3$  (apéndice 1, Tabla 1 de <sup>49</sup>).



**Figura 11.** Mutante F, izquierda, espectro de emisión excitando a 295 nm en ausencia y saturada de activador, se muestra un apagamiento que es lo que se espera del acercamiento de los residuos del par reportero. Derecha, cambio de intensidad de fluorescencia en solución al equilibrio dependiente de la concentración de activador alostérico (excitación 295 nm, emisión 334 nm). Los datos fueron ajustados a la ecuación general de MWC con lo que se obtienen las siguientes constantes  $K_R = 41.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ,  $c = 0.043 \pm 0.008$ ,  $L = 1.08 \times 10^5 \pm 0.17 \times 10^5$ .

La  $K_R$  de  $42 \mu\text{M}$  que se obtiene de los datos de fluorescencia es similar a la  $K_d$  por el activador obtenida por catálisis de  $27 \mu\text{M}$  (figura 5 y 11). La velocidad de las relajaciones en solución a distintas concentraciones de GlcNAc6P, se obtuvieron en un *Chiriscan de Applied Photophysics* con el accesorio de *stopped-flow* en el modo de fluorescencia (figura 12).

La velocidad de relajación en solución se encuentra entre  $0.2 \text{ s}^{-1}$  y  $1.2 \text{ s}^{-1}$ . Estas velocidades de relajación fueron medidas a distintas concentraciones de mutante F, entre  $0.35 \mu\text{M}$  y  $1 \mu\text{M}$ . La  $K_d$  para el activador calculada de los parámetros de ajuste de los datos a la ecuación 2 (tabla en figura 12) es  $45.8 \mu\text{M}$ , coincide con la constante que se calculó de la diferencia de intensidad de fluorescencia al equilibrio de  $41.8 \mu\text{M}$  (figuras 11 y 12).



*Caso general de selección conformacional (ecuación 2)*

	0.35 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
$kt$	$0.050 \pm 0.025$	$0.357 \pm 0.064$	$1.121 \pm 0.086$
$kr$	$0.507 \pm 0.019$	$0.779 \pm 0.025$	$1.385 \pm 0.031$
$kon$	$0.005 \pm 0.003$ Ajustado globalmente		
$koff$	$0.229 \pm 0.025$ Ajustado globalmente		

**Figura 12.** Cinética rápida de la mutante F en solución en condiciones de equilibrio rápido. Constante de velocidad,  $k_{obs}$ , a distintas concentraciones de activador alostérico. Los datos se ajustaron a las ecuaciones 2 y

3. Los ajustes obtenidos en ambos modelos son equivalentes como se muestra.<sup>28</sup> Sólo se muestran los valores de ajuste en la tabla a la izquierda para el modelo de selección conformacional. En las tres concentraciones  $k_r > k_{off}$ , por lo que el comportamiento de las curvas es ascendente.

El uso del reportero fluorescente de la mutante F en conjunto con la restricción conformacional de la nanoencapsulación ha sido esencial para descubrir la naturaleza del mecanismo cinético de la activación alostérica en EcGNPDA.

## Hipótesis

La EcGNPDA es un hexámero alostérico que presenta cooperatividad positiva por sus ligantes en solución. Es activado alostéricamente y su estado conformacional libre de ligantes tiende al estado T, lo cual la hace un sistema ideal para el estudio de distintos modelos alostéricos y de cooperatividad. De acuerdo con el planteamiento del modelo TTS, el bloqueo de la transición cuaternaria con la nanoencapsulación debe desaparecer la cooperatividad de la EcGNPDA por sus ligantes en cualquiera de sus estados T o R; en consecuencia, podremos profundizar en el estudio del mecanismo alostérico y las transiciones conformacionales a nivel terciario.

## Objetivos

- Restringir la movilidad cuaternaria de la EcGNPDA mediante la nanoencapsulación en geles de sílice.
- Estudiar los cambios conformacionales de las subunidades en los ambientes cuaternarios restringidos, mediante diversos métodos espectrofotométricos y catálisis al equilibrio.
- Definir la relevancia de la transición cuaternaria en el mecanismo homotrópico y heterotrópico de la EcGNPDA.
- Estudiar la asociación del estado ligante de cada sitio con el estado conformacional de las subunidades, para observar las funciones ligadas a nivel terciario.

## Resultados y Discusión

Esta sección presenta los datos publicados en S. Zonszein Et al. PLoS one 2014 <sup>49</sup> (Apéndice 1), donde se abordan la restricción de los estados cuaternarios por nanoencapsulación y las propiedades cinéticas del estado T.

Los resultados del artículo en conjunto con una visión más amplia de ambos estados, métodos experimentales mejorados y métodos analíticos que surgieron en la literatura de manera contemporánea o posterior a la publicación, permiten comprender mejor el mecanismo alostérico de la desaminasa.

## **Nanoencapsulación de la desaminasa, restricción del cambio conformacional cuaternario**

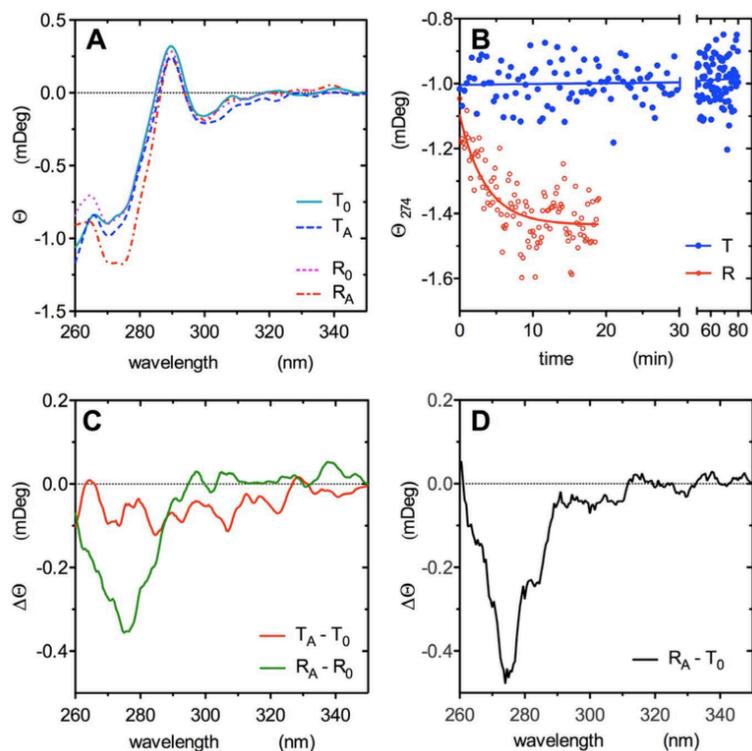
Una prueba estructural de la restricción cuaternaria de la EcGNPDA con geles se observa en los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano (figura 13). La EcGNPDA encapsulada libre de ligantes, T-gel, y la que se atrapó saturada de activador alostérico, R-gel, presentan comportamientos distintos. Se midió la respuesta de los espectros de dicroísmo a la presencia de GlcNAc6P. En ausencia de ligantes,  $T_0$  y  $R_0$ , presentan prácticamente el mismo espectro; al agregar 1 mM de GlcNAc6P se aprecia un gran cambio en la región de 270 y 280 nm en la forma R ligada, RA (figura 13 A).

Se registró el cambio conformacional de T con activador, TA, el cambio del espectro a 274 nm contra el tiempo se observa que es estable por más de una hora (figura 13 B); por otra parte, se observa una relajación de la forma RA que llega al equilibrio alrededor de 30 minutos.

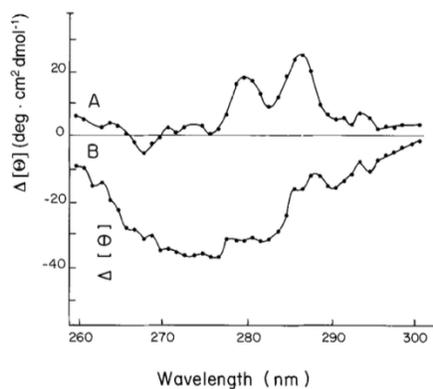
Se muestran los espectros diferenciales de cada una de las formas,  $T_A - T_0$  y  $R_A - R_0$ , para destacar el efecto del activador en cada forma; la forma R presenta un espectro diferencial muy similar al que se observa en la enzima en solución (figura 13 C y figura 14 B). El espectro diferencial  $R_A - T_0$ , es análogo a lo que ocurre en solución cuando vamos de la forma libre de ligantes a la forma saturada de activador (figura 13 D y figura 14 B).

El cambio de señal de dicroísmo circular es dependiente tanto del estado cuaternario, como del estado ligante. La señal de dicroísmo proviene de la tirosina 254, que se encuentra cercana al sitio alostérico y forma interacciones en la interfaz con la subunidad vecina; esto se demuestra con los espectros de dicroísmo circular en solución de las mutantes Y254F y Y254W (figura 15).

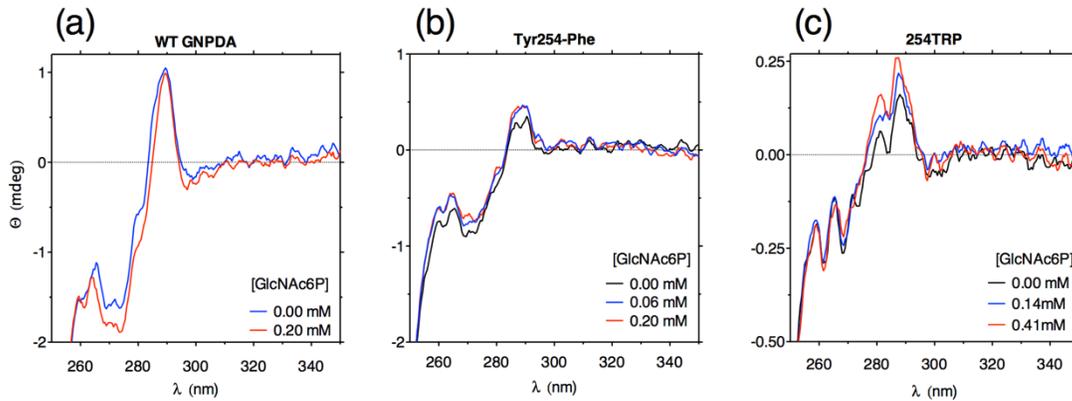
El cambio cuaternario que modifica las interfaces entre subunidades es capaz de bloquearse con el gel; ya que la forma restringida en T, aun en presencia de activador alostérico prácticamente no presenta cambio de dicroísmo, que implica que Y254 no cambio su posición en la interfaz respecto a su orientación y contactos con la subunidad vecina (figura 16).



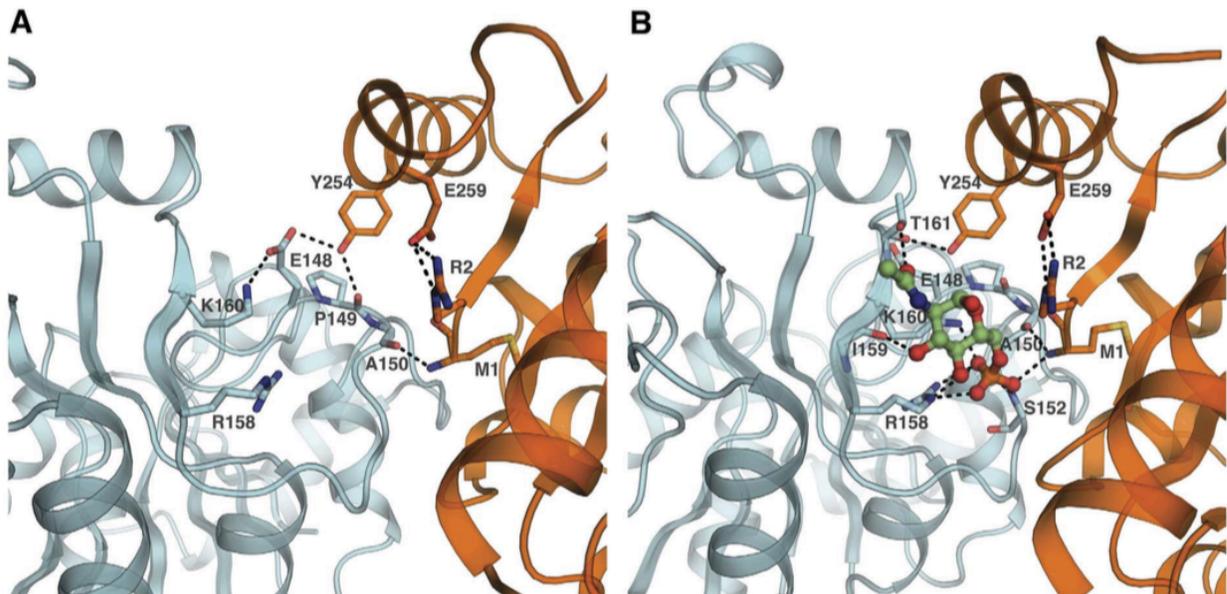
**Figura 13.** Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano de la EcGNPDA atrapada en geles en el estado T y R. A) Se muestran los espectros de los monolitos con enzima atrapada; en azul la forma T y en rojo la enzima atrapada en R; se muestran en tonos distintos los estados ligantes para cada estado cuaternario. B) curso en el tiempo de la señal de dicroísmo circular a 274 nm. C) Espectros diferenciales de las formas vacías y saturadas de activador alostérico de los monolitos en cada estado cuaternario. D) Espectro diferencial de la forma R saturada de activador y la forma T libre de ligante; este espectro es análogo a un espectro diferencial de la enzima libre y saturada de activador en solución. Tomada de <sup>49</sup>.



**Figura 14.** Espectros diferenciales de la EcGNPDA en solución, A) saturada con de GlcNol6P 0.1 mM y B) saturada con GlcNAc6P 2 mM. Tomada de <sup>50</sup>



**Figura 15.** Espectros de dicroísmo circular en solución. a) EcGNPDA silvestre, b) Mutante Y254F c) Mutante Y254W. Se muestran los espectros en ausencia y distintas concentraciones de activador alostérico. En (b), la respuesta al activador alostérico en 274 nm es prácticamente nula, en cambio, la señal en c) se mueve a la región del triptófano. Esto muestra como el componente de cambio del dicroísmo circular observado a 274 nm por la unión del activador alostérico a la enzima silvestre proviene de la Y254.



**Figura 16.** Cambio conformacional del sitio alostérico, cada subunidad formando la interfaz está representada de distinto color; A) es el estado T (PDB 1FSF), B) es R con activador alostérico (PDB 1FS5). La subunidad azul, muestra la tapa del sitio activo, con los residuos de la bisagra que forman parte del sitio alostérico K160 y R158. Se muestra el cambio de contactos de la Y254 entre estados. Proponemos un origen estructural de la propagación de la activación en el cambio cuaternario, respecto a cambios puntuales observados en las interfaces entre subunidades que forman al sitio alostérico. (Tomada de <sup>49</sup>)

### Catálisis de la EcGNPDA nanoencapsulada en el estado T

Los ensayos de cinética de catálisis en sentido desaminante se realizaron midiendo la formación de Fru6P a un tiempo fijo de 10 minutos, por el método del resorcinol <sup>51</sup>. Para utilizar la enzima

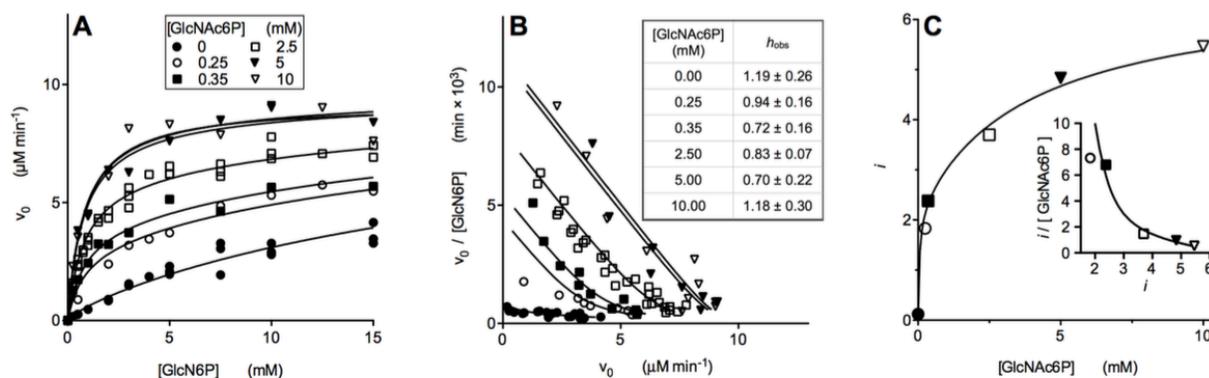
nanoencapsulada en ensayos de catálisis, desencadenando la reacción con la enzima como se hace con la enzima en solución, se utiliza una suspensión de gel. El gel una vez que termina su proceso de polimerización y consolidación, se somete a ultrasonificación suave para obtener una suspensión particulada homogénea; posteriormente se lava para retirar la proteína que llega a liberarse en el proceso. Se hace una dilución de la suspensión concentrada de proteína en el gel. La concentración de enzima se estima con el método de hidrólisis alcalina del gel en NaOH 2M.

La enzima atrapada en T libre de activador alostérico tiene un comportamiento hiperbólico de muy baja afinidad, consistente con la afinidad esperada para el estado terciario  $t$  (figura 17 A). En los geles se pierde el efecto homotrópico y únicamente el estado ligante del sitio alostérico puede mover el equilibrio conformacional. Al explorar concentraciones subsaturantes de GlcNAc6P en T-geles observamos cooperatividad negativa por el sustrato y a saturación de activador la cinética vuelve a ser hiperbólica, pero con una constante de disociación menor (figura 17 B).

Los datos los interpretamos con un modelo basado con dos estados terciarios desacoplados. Ajustamos los datos a una ecuación que es la suma de dos componentes hiperbólicos de los estados terciarios  $t$  y  $r$ , con un factor de conservación de la proteína o subunidades entre las dos especies,  $i$  y  $(n - i)$ , siendo  $n$  el número de subunidades e  $i$  las subunidades en el estado  $r$ . (ecuación 12) Así, podemos analizar las curvas con cooperatividad negativa, a través de la relación de dos componentes hiperbólicos.

$$v_{obs} = \frac{[S](n-i)v_t}{K m_t + [S]} + \frac{[S](i)v_r}{K m_r + [S]} \quad (\text{ecuación 12})$$

Este modelo explica las curvas de catálisis obtenidas en geles en T. Además, esta aproximación nos permitió estimar el equilibrio conformacional del sistema, a distintas concentraciones de activador (figura 17 C).



**Figura 17.** A) Gráficas de velocidad contra concentración de sustrato de T-gel (tomado de <sup>49</sup>), la concentración final de enzima es 2 nM. Se muestran las curvas a distinta concentración de activador alostérico. El ajuste global de los resultados se obtuvo mediante regresión no lineal a la ecuación dejando únicamente  $i$  independiente en el ajuste. B) Gráfico de Scatchard, se muestran los datos experimentales y el ajuste transformados. El gráfico de Scatchard amplifica los cambios de constante de disociación aparente en las pendientes. La cooperatividad positiva produce curvas cóncavas hacia arriba y la cooperatividad negativa, produce curvas ligeramente convexas. Se muestra la cooperatividad negativa de las concentraciones

subsaturantes de activador por un  $h < 1$ . C) Regráfico de  $i$  contra la concentración de GlcNAc6P, el ajuste se obtuvo por regresión no lineal a la ecuación 12 para unión; muestra como se desplaza la población de  $t$  a  $r$  en T por efecto del activador alostérico.

En el estado T la EcGNPDA se encuentra funcionando en dos estados terciarios distintos desconectados, cuyo equilibrio conformacional solo puede ser desplazado con el activador alostérico; lo que muestra el origen terciario de la activación alostérica. Esto implica que el efecto heterotrópico puede ocurrir en cada subunidad independientemente.

Las constantes que se obtuvieron del ajuste global de los datos a la ecuación 12, concuerdan con las constantes de disociación calculadas de la cinética en solución,  $K_t = 23.1 \pm 3.6$  mM,  $K_r = 0.98 \pm 0.06$  mM. La  $k_{cat}$  que se estima para la forma  $t$ ,  $k_{cat}t = 185 \pm 16$  s<sup>-1</sup>, es similar a la  $k_{cat}$  de la enzima en solución  $158 \pm 8$  s<sup>-1</sup>, mientras que para la forma  $r$  la  $k_{cat}$  observada es de  $279 \pm 27$  s<sup>-1</sup>. El aumento de la actividad por la nanoencapsulación en geles es un hecho conocido<sup>52</sup>, sin embargo, el cambio de  $k_{cat}$  entre estados se puede atribuir a cada estado terciario de la enzima.

Obtuvimos la constante de equilibrio terciario  $l_T$ , estimada de la catálisis libre de activador utilizando la fracción de  $r$ , ( $i$  en la ecuación 12), que se ajustó a 0.12 subunidades en  $r$  por 5.88 en  $t$ , lo que nos permite calcular una constante de equilibrio  $l_T$  de 49. Obtuvimos la constante de disociación por el activador de  $t$ ,  $K_{At}$ , graficando el parámetro  $i$  contra la concentración de activador y ajustando a la ecuación 12. Es necesario usar esta ecuación, debido a que se encuentra cooperatividad negativa en el cambio de  $i$  respecto a la concentración de activador.

En el experimento de catálisis (Figura 17) no hay resolución suficiente para calcular con confianza la constante de disociación de la forma  $r$ , el mejor ajuste a la ecuación 12 se obtuvo con una  $K_{Ar}$  fija de  $7 \mu$ M, tomada de la  $K_R$  del ajuste de los datos de unión de <sup>3</sup>H-GlcNAc6P en solución con la ecuación de MWC (figura 6), la  $K_{At}$  ajustada es de  $2.18 \pm 0.37$  mM. Se probó también la  $K_R$  de  $27 \mu$ M, obtenida de los experimentos de catálisis de la enzima silvestre, el ajuste de la  $K_{At}$  no cambia. Ésta es la primera prueba directa de la afinidad de T por el activador alostérico.

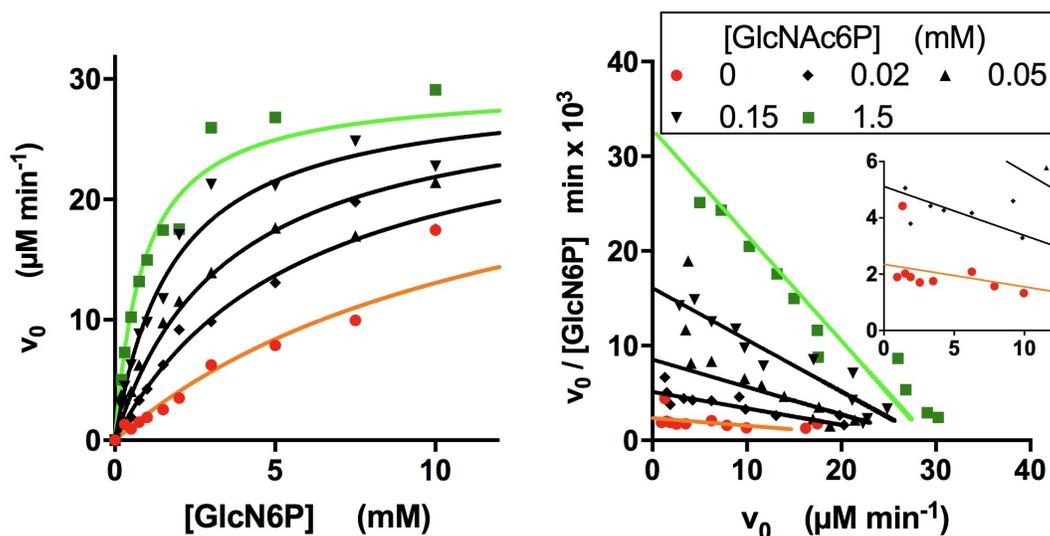
### **Catálisis de la EcGNPDA nanoencapsulada en el estado R**

La cinética de catálisis del estado R libre de ligantes muestra un comportamiento hiperbólico por el sustrato con una sola constante de disociación aparente, la constante va disminuyendo al aumentar la concentración de activador (figura 18). En el caso de los geles en R, se observa el patrón de un mecanismo de activación alostérica tipo K en ausencia de cooperatividad positiva; que produce, a concentración creciente de activador, una serie de curvas hiperbólicas con constante de disociación aparente variable y velocidad constante.

La cooperatividad positiva requiere el cambio cuaternario, la obtención de cinéticas hiperbólicas indica que estamos observando una sola conformación a nivel cuaternario y estados conformacionales terciarios con su transición acoplada en equilibrio; a diferencia de T-gel en donde la transición entre estados está desacoplada y las constantes entre los estados terciarios aparecen separadas, lo que produce cooperatividad negativa en condiciones subsaturantes de activador alostérico.

El estado R al ser un sistema de activación tipo K, se ajusta bien con una velocidad máxima compartida para todas las condiciones de saturación de activador alostérico, lo que implica que la catálisis se produce bajo un mismo estado conformacional, independientemente del equilibrio conformacional que une al ligante. El equilibrio conformacional en el caso de R define la afinidad

aparente por el sustrato. El modelo más simple que explica el patrón observado en la catálisis es el de una población de subunidades libres de ligantes, en dos estados conformacionales en equilibrio.



**Figura 18.** Cinética de catálisis al equilibrio de geles R libres de activador y relajados. La concentración de enzima utilizada en el ensayo fue de 1.2 nM. A la izquierda, gráfico directo de datos experimentales de velocidad a concentraciones variables de sustrato y de activador. Los resultados se ajustaron a una ecuación del modelo de Monod con activador alostérico de fijación exclusiva a r (Ecuación 1), se muestran las líneas del ajuste global de las curvas. Los parámetros de ajuste son  $K_A = 0.0065 \pm 0.0006$  mM,  $K_r = 0.77 \pm 0.10$  mM,  $c = 0.045 \pm 0.008$ ,  $K_t = 17$ ,  $l_R = 38 \pm 8$ . Se calculó una  $k_{\text{cat}}$  para el estado R de  $369 \pm 10$  s $^{-1}$ . A la derecha, se muestra el regráfico de Scatchard de los datos experimentales y los ajustes correspondientes. Se aprecia la ausencia de cooperatividad, el cambio de constante de disociación y la  $V_{\text{max}}$  compartida. La gráfica del recuadro cambia la escala para apreciar el comportamiento de la curva sin activador alostérico.

Los estados terciarios en R cuaternario pueden transitar libremente entre  $t$  y  $r$ , como se esperaría de un modelo de selección conformacional. De esta manera, la relación entre  $t$  y  $r$  modifica la constante de disociación aparente y la  $V_{\text{max}}$  se comparte para todo el sistema y el estado que cataliza es el mismo, independientemente del equilibrio conformacional inicial, que se desplaza a un estado de mayor afinidad mediante la interacción del activador alostérico. En cambio, el estado T presenta cooperatividad negativa por los ligantes, los estados conformacionales en las subunidades no pueden transitar libremente o están desconectados entre sí; la única manera de recorrer el equilibrio conformacional a un estado más catalítico es con el activador alostérico.

En los geles en R la cooperatividad positiva desaparece en ausencia de la transición cuaternaria y las subunidades actúan como unidades alostéricas independientes, sin embargo, el equilibrio entre  $t$  y  $r$  puede ocurrir espontáneamente y esto provoca que se comparta la misma  $V_{\text{max}}$ . Para ajustar globalmente los datos de cinética de catálisis de R gel, utilizamos la ecuación de Monod con activador (ecuación 1) (figura 18), esta ecuación prevé dos conformaciones en equilibrio, cambiando las constantes para interpretar el equilibrio a nivel terciario, donde las constantes de disociación corresponden a los estados de las subunidades y la  $L$  se representa como  $l_R$ , ya que solo estamos analizando un solo conformero cuaternario. Utilizamos una  $n$  de 1, que simula la independencia conformacional entre subunidades. Únicamente la concentración de activador alostérico recorre el equilibrio, modificando la constante alostérica  $l$  aparente. Esto nos permite, a partir de los datos de

catálisis, estimar una constante de equilibrio terciario en el estado R,  $l_R$ , y el valor ajustado de las constantes de disociación  $K_{AR}$  por el activador de fijación exclusiva a R, así como  $K_r$  y  $K_t$  por el sustrato; que son prácticamente idénticas a las observadas en los geles en T y en solución.

La  $K_{AT}$  estimada por el ajuste de los datos a la ecuación de MWC para fijación exclusiva a r, es tres órdenes de magnitud menor que la  $K_d$  dominante en los geles en T. En el estado R se estima una  $K_A$ , de  $6.5 \pm 0.6 \mu M$ , que es prácticamente la misma constante calculada en los datos de unión de activador al equilibrio en solución (Figura 6); en conjunto, la afinidad por el activador de T,  $K_{AT}$  2.2 mM se desplaza a la de R,  $K_{AR}$  6.5  $\mu M$ , siendo un cambio de tres órdenes de magnitud, puede explicar la cooperatividad positiva observada por el activador alostérico en solución por medio de un mecanismo de selección conformacional a nivel cuaternario.

### **Catálisis de las formas T y R nanoencapsuladas: un modelo estructural para explicar la aparición del efecto homotrópico en solución**

Observando el comportamiento de las formas nanoencapsuladas se intenta explicar el comportamiento cooperativo de la enzima en solución.

Las constantes de equilibrio conformacional terciario en el estado T,  $l_T = 49$ , es muy similar a la del estado R,  $l_R = 38$ . Este pequeño cambio de constante de equilibrio de estado conformacional terciario no explica por sí mismo el sesgo planteado por el modelo TTS que da origen a la cooperatividad positiva en solución, donde se espera que la constante  $l_T$  sea mucho mayor que la  $l_R$ .

Las constantes de disociación aparente por el sustrato en ambos conformeros restringidos son altas en ausencia de activador; en T la  $K_t$  calculada es de 23 mM, y en R es de 17 mM. Este discreto cambio de  $K_t$  entre estados cuaternarios restringidos se debe a que las subunidades en estado t pueden existir tanto en T como en R.

La  $k_{cat}$  calculada en geles en T libre de activador alostérico es de  $k_{catT}$   $185 \pm 16 \text{ s}^{-1}$  y en geles en R libre de activador es  $k_{catR}$   $369 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ , la transición en solución entre dos formas con la misma constante aparente por el sustrato igual pero distinta  $k_{cat}$ , tampoco explica directamente la aparición de cooperatividad en solución, debido a que el comportamiento de la activación del sistema en solución es de tipo K y no de tipo V.

Se observa que el comportamiento de las especies catalíticas de T y R relajados a  $t$  no es exactamente igual, lo que puede estar relacionado al acoplamiento de la transición conformacional a las transiciones del ciclo catalítico.<sup>10</sup> Este cambio de mecanismo se exploró con cinética rápida de las transiciones terciarias en cada estado cuaternario, como se describe más adelante en este trabajo.

La cooperatividad observada por la GlcNAc6P en solución ocurre por un cambio en la interfaz de las subunidades donde se forma el sitio alostérico; la transición cuaternaria influye directamente sobre la estructura y afinidad de los sitios alostéricos (figura 16). La estructura del sitio alostérico, al estar ubicado en la interfaz entre subunidades, se modifica radicalmente en la transición cuaternaria. Su estado ligante es capaz de estabilizar subunidades en estado r al interrumpir los contactos que estabilizan a t.

Estructuralmente no es igual el sitio activo en T que en R debido a los cambios de posición de cadenas laterales de algunos residuos catalíticos, como el Glu148 que se encuentra en el sitio alostérico en el

estado T y en el sitio activo en el estado R. Para entender la cooperatividad del sitio activo por el sustrato en solución, a partir de la información de catálisis, debemos de plantear una ruta o mecanismo que establezca el estado cuaternario a través del estado conformacional del sitio activo. De esta forma, al aparecer estados R cuya transición terciaria  $t \rightleftharpoons r$  parece libre, aumenta la probabilidad de que aparezcan más estados r vacíos.

Anteriormente, se había propuesto que el efecto homotrópico por el sustrato y la estructura de la tapa del sitio activo están ligados.<sup>53</sup> Propongo una ruta de conectividad en el ensamble, entre los dominios dinámicos de la tapa del sitio activo; capaz de estabilizar el estado cuaternario R, a partir de la sincronización de la dinámica entre las tapas de los sitios activos del hexámero.

En presencia de activador alostérico la conexión de la tapa del sitio activo con el resto de las tapas del ensamble se interrumpe dando lugar al origen de la ruta homotrópica para el sustrato, llevando en conjunto el equilibrio hacia R cuaternario y hacia r terciario. En el estado R con activador, el puente salino del Glu148 y la Lys160, se interrumpe cuando la Lys160 interactúa con el fosfato de la GlcNAc6P; por otro lado, el Glu148 se encuentra en el sitio activo en R, activando a la His143 que está relacionada con la abertura del anillo  $\beta$ -piranosa de la GlcN6P.<sup>54</sup> Esto sugiere que la presencia de E148 en el sitio activo hace más eficiente la catálisis, por lo que podría definir también una de las propiedades del estado r.

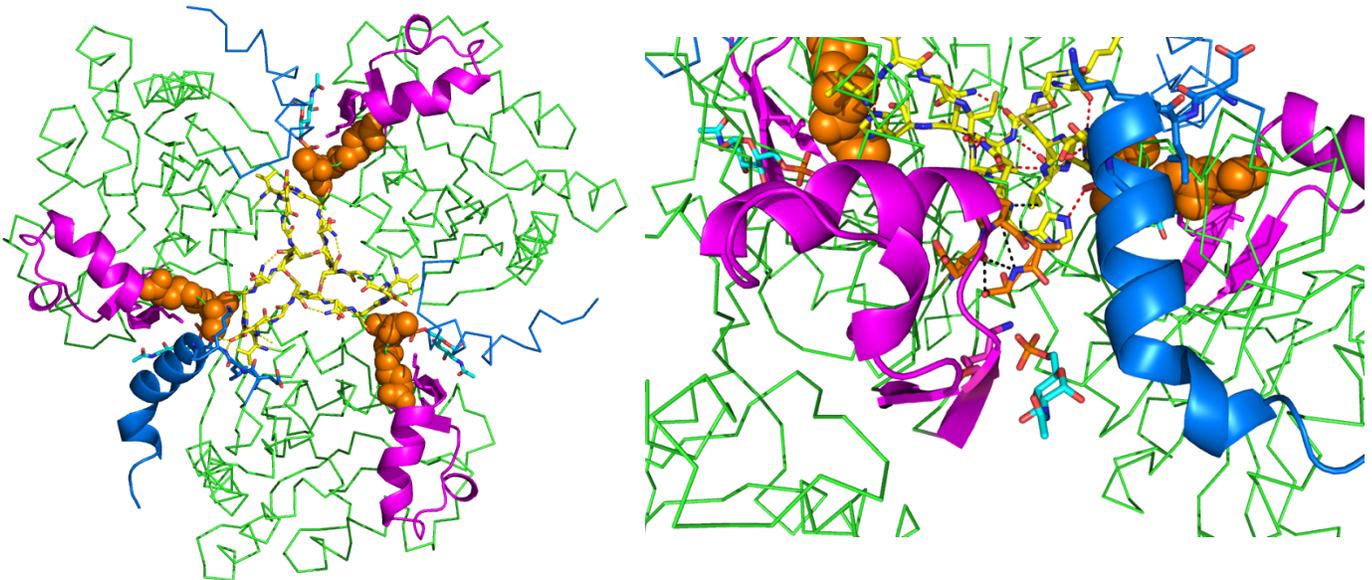
El movimiento de la cadena lateral del E148 desde el sitio alostérico hacia el sitio activo, se podría relacionar con la transición  $t \rightarrow r$ . Podemos notar su importancia en el mecanismo homotrópico debido a que la mutante E148Q pierde la cooperatividad positiva por el sustrato, además de que el activador se vuelve inhibidor (figura 7)<sup>35,54</sup>, lo que indica que la estructura en r con activador de esta mutante se encuentra peor adaptada a la catálisis que la forma t. Esta mutante nos indica nuevamente que puede existir un cambio de mecanismo catalítico entre estados conformacionales.

La ruta de interacción entre las tapas de los sitios activos va desde la bisagra de la tapa del sitio activo hasta la interfaz entre subunidades en el eje de orden 3. Los posibles residuos involucrados y contactos que forman la ruta tapa-interfaz trimérica desde la bisagra de la tapa del sitio activo son: la Lys160 en estado T forma un puente salino con el Glu148 (figura 16). El Glu148 tiene contactos a través de la cadena principal, pasando por Pro149, Ala150 y Ser151 y puentes de hidrógeno a nivel de la cadena principal de Ala150 y Ser151 con la His222. La His222 forma parte de la interfaz entre subunidades del trímero Val216-His222 (figura 19). Esta His222 contacta con la Val216 de la subunidad vecina en el trímero.

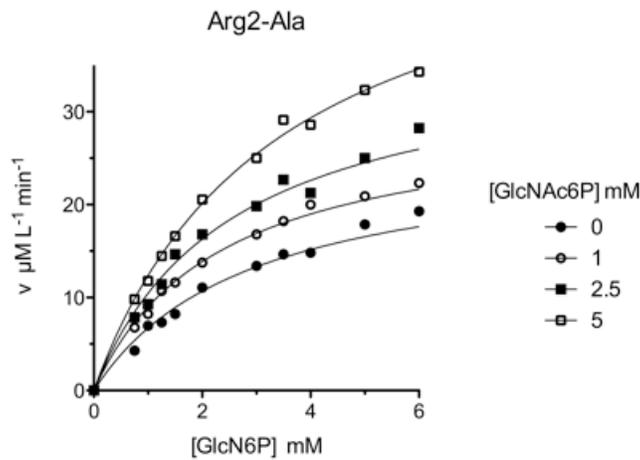
La señal conformacional se propaga a la subunidad vecina a través de la hélice del C-terminal. La cadena lateral del Glu217 contacta con la base de la hélice del C-terminal (figura 19), que forma el dominio C, N-terminal. Este dominio forma parte del sitio alostérico, el N-terminal forma interacciones con la GlcNAc6P, esto se ha demostrado mediante modificación química selectiva del amino terminal.<sup>33</sup> La dependencia de la conexión entre el C-terminal y el N-terminal; se muestra por la ausencia de cooperatividad en la mutante en Arg2 (figura 20), que impide la formación del puente salino entre el N-terminal y C-terminal con Glu259 (figura 16).

El cambio de posición del dominio N-C-terminal está relacionado a la transición cuaternaria, la interacción de la ruta entre las tapas con la base de este dominio podría indicar que la transición

cuaternaria a R libera la ruta de comunicación conformacional entre sitios activos, la ruta tapa-interfaz trimérica.



**Figura 19.** Vistas del eje de orden 3 de un trímero y del sitio alostérico de la EcGNPDA en estado R cristalográfico (PDB 1FRZ). La tapa del sitio activo está representada en caricatura y color magenta en las tres subunidades. El C-terminal en azul, se representó como caricatura en un solo sitio alostérico. La interfaz entre trímeros Val216-His222 está representada en amarillo. La GlcNAc6P está representada en cian. La ruta que conecta la interfaz con la base de la tapa está representada en esferas naranjas. En la vista del sitio alostérico mostrado, la ruta esta representada en palitos con los posibles contactos polares calculados en la estructura, Glu148 se encuentra desconectado de Lys160 que se encuentra haciendo contactos con el activador alostérico.



**Figura 20.** Gráficas de velocidad de la catálisis en sentido desaminante de la mutante R2A, a distintas concentraciones de activador alostérico. Nótese la falta de cooperatividad positiva por el sustrato y el efecto de activación tipo V.

Esto podría explicarse, si suponemos que una sincronización dinámica entre los sitios activos estabiliza a los estados t en T, y que sólo la transición espontánea a R permite la desconexión

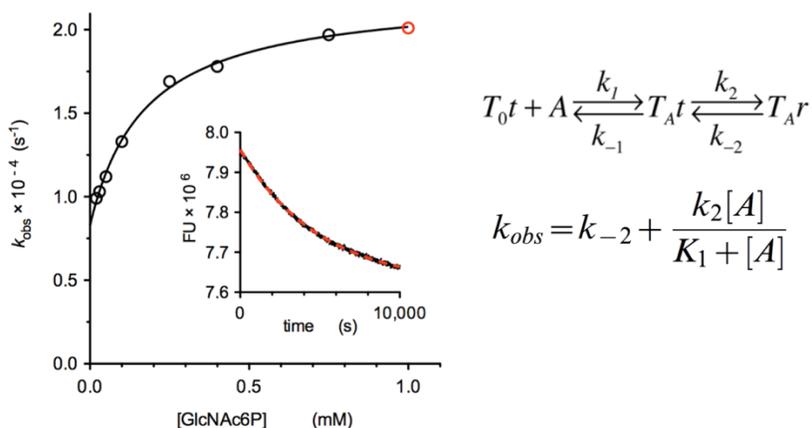
espontanea de las tapas del ensamble dinámico, lo que disminuiría la dinámica compartida con el resto de las tapas del ensamble, estabilizando el estado R al momento de encontrar su ligante.

Esta disminución de la dinámica compartida aumentaría la probabilidad de que otra subunidad del ensamble salte a r, desplazando el equilibrio y llevando al ensamble a la actividad de R, mientras tenga los sitios activos ocupados. En el momento que los sitios se vacían el Glu148 puede regresar a reconectar todas las tapas de los sitios activos, llevando a un estado de mayor dinámica compartida, estabilizando T de vuelta. En cristalografía, el cambio de T a R está acompañado con una estructuración de la tapa del sitio activo y una restricción de sus posiciones en R<sup>55</sup>. El acoplamiento dinámico de la tapa de los sitios activos es una explicación mecanística plausible del efecto homotrópico observado en la catálisis del sustrato en ausencia de activador.

Describimos al menos dos rutas de acoplamiento homotrópico en EcGNPDA, una para los sitios activos y otra para los sitios alostéricos. Estas dos rutas se intersectan en la formación del puente salino entre Lys160 y Glu148. En solución, ambos mecanismos de acoplamiento ocurren simultáneamente con la transición cuaternaria o con la unión del activador, que cambian la probabilidad de formación de esa interacción. Esto crea la ilusión de simetría absoluta a través de una sola ruta y transición conformacional única, aunque en geles estas rutas pueden ser disociadas.

### Cinética de relajación de fluorescencia de la mutante F nanoencapsulada

La cinética de relajación del estado T publicada, se realizó asumiendo condiciones de equilibrio rápido, lo que nos llevó a interpretar el fenómeno como de ajuste inducido (figura 21).<sup>49</sup>



**Figura 21.** Cinética de relajación de fluorescencia de la mutante F encapsulada en estado T asumiendo equilibrio rápido. Interpretación como mecanismo de ajuste inducido. Se muestra la ecuación de pseudo-primer orden del ajuste, corresponde al mecanismo de ajuste inducido mostrado.

En el estado T nanoencapsulado puede entenderse un resultado así que tiene correlación con lo observado en la catálisis. Un mecanismo de ajuste inducido explica que las subunidades se vayan activando de una en una, conforme unen el efector alostérico, dando como resultado una cinética de activación de tipo V (figura 17).

Inicialmente cuando se abordó este mismo problema con R, nos encontramos que en condiciones de pseudo-primer orden y asumiendo equilibrio rápido también aparenta ser un mecanismo de ajuste inducido (figura 23 B, con los puntos experimentales mayores a 30  $\mu$ M de GlcNAc6P; y figura 23 C,

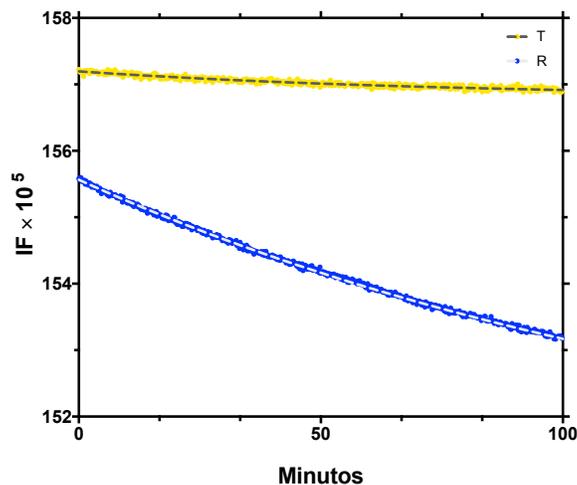
con los puntos experimentales mayores a  $100 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, los patrones de activación de la catálisis en la forma T (figura 17) y en la forma R (figura 18), no tienen mucho parecido entre si.

Posteriormente, a la luz de la interpretación de los mecanismos de Vogt y di Cera<sup>14</sup>, comprendimos que la cinética de relajación de R podía provenir de un mecanismo de selección conformacional. Sin embargo, la cinética de T podía estar mal interpretada a la luz de esta nueva teoría, puesto que el mecanismo de ajuste inducido solo produce curvas ascendentes que saturan, mientras que la selección conformacional puede producir curvas ascendentes y descendentes saturables con la concentración de ligantes.

La interpretación del mecanismo como ajuste inducido es válida solo para un caso especial de la selección conformacional dentro del planteamiento teórico de Austin D. Vogt and Enrico Di Cera<sup>26</sup>. Ellos descartan la validez de la mayoría de los casos de ajuste inducido interpretados con las simplificaciones del equilibrio rápido. Aunque no proponen un método definitivo para conocer el mecanismo descartan el mecanismo de ajuste inducido para explicarlo como selección conformacional, que para ellos en ciertos casos son equivalentes.<sup>26, 28</sup>

El método para conocer si la cinética observada es de ajuste inducido o selección conformacional propuesto es complejo, depende del conjunto de patrones de constantes de velocidad lentas y rápidas observadas a distintas concentraciones de ligante, utilizando distintos ligantes. Para la desaminasa su aplicabilidad fue limitada, aún así el tratamiento teórico de estos autores nos dio la posibilidad de entender los datos de R como de selección conformacional y nos planteo la importancia de obtener curvas con mayor resolución. Respecto a T, dejaron nuevamente abierta la incógnita de la naturaleza de su mecanismo ligante.

El estudio del estado R presentó un reto experimental por la dificultad para obtener suficientes puntos de concentraciones de GlcNAc6P comparables entre si. En R es muy evidente la relajación por el cambio de temperatura y en T es mínima. (figura 22).



**Figura 22.** Relajación por cambio de temperatura, medido por el cambio de fluorescencia de la mutante F encapsulada en T y en R. Las dos formas están libres de ligantes. Las medidas se registraron cada 10 segundos, excitando a 290 nm y midiendo la emisión a 334 nm, utilizando monolitos en placas de cuarzo medidas con el espectrofluorómetro ISS PC1. El cambio de temperatura se realizó al transferir el gel de 4 °C a la celda con amortiguador a 30 °C. La relajación que se observa depende del estado conformacional en que fue encapsulada la proteína. La velocidad,  $k_{\text{obs}}$ , estimada como una relajación exponencial en T es de  $2.15 \times 10^{-4} \pm 0.05 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  y en R de  $1.14 \times 10^{-4} \pm 0.06 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

Esta relajación por el cambio de temperatura se puede explicar como un cambio de dinámica del ensamble en relación al estado cuaternario en que se encapsula, de tal manera que el cambio observado en T es menor que la relajación por temperatura en R. Además, se probó que esta relajación por un cambio de temperatura sólo modifica la velocidad máxima y no la afinidad por el sustrato en la catálisis.

El cambio en catálisis es exclusivamente de velocidad y no de constante de disociación indica que el equilibrio terciario en el ensamble no está cambiando y se vuelve asintótico en aproximadamente 30 minutos. También el estado conformacional tiene cierta dependencia con la temperatura, este es un hecho conocido para la desaminasa en solución.<sup>56</sup> En los experimentos de catálisis se controla esta relajación, incubando previamente la suspensión de gel a la temperatura del ensayo.

Para poder controlar con precisión el avance de la transición seguido por fluorescencia en el cambio de temperatura, de manera que sean comparables las medidas de las velocidades a distintas concentraciones de activador, se sincroniza esa relajación. Con esta estrategia, se pueda analizar el sistema a todas las concentraciones en conjunto, controlando la relajación por temperatura experimentalmente.

La cinética de relajación de forma automatizada se utilizó para mejorar esta sincronización, esto lo logramos utilizando placas de pozos con fondo transparente en los que se forman los monolitos en el fondo de la placa y de esta manera se pueden sincronizar las diálisis. Las relajaciones de R cuaternario con r terciario en presencia de GlcNAc6P,  $r_{\text{R}}A$ , a la forma R cuaternaria libre de ligantes relajada a t,  $t_{\text{R}0}$ , y las incubaciones de un mayor número de puntos experimentales simultáneamente. También buscábamos obtener medidas instantáneas al tiempo cero del agregado del ligante.

Gracias al uso del Polarstar en conjunto con los sol-gel logramos observar comportamientos biexponenciales, como era esperado por el planteamiento de Vogt y Di Cera<sup>14</sup>. Usar esta técnica automatizada también tenía la finalidad de estimar a través de las cinéticas de relajación, las velocidades rápidas y lentas con mayor precisión. Aún así, para resolver el mecanismo, finalmente sólo fue necesario obtener con precisión la constante más lenta. Mediante nuestro diseño experimental, se sincroniza la relajación por cambio de temperatura en todos los geles de un mismo experimento, se automatiza el agregado de ligante y se sincroniza la medida del tiempo cero de la señal a partir del agregado del ligante. (Otros detalles del uso de geles en el Polarstar se describen en la sección de métodos).

Las condiciones de pseudo-primer orden que implican que el ligante está mucho más concentrado que la proteína, toma una perspectiva distinta en los experimentos con geles. La proteína está restringida en un volumen de gel mucho menor que el de la celda que lo contiene, la concentración de ligante se calcula para el volumen sumado del amortiguador en la celda y el volumen del gel. Así, se puede experimentar una concentración baja de ligante respecto a la concentración de proteína en

el gel, sin depletar la concentración de ligante en la celda y asumir que lo que se observa depende de la relación de la proteína con el ligante. Esto nos permitió medir concentraciones menores de ligante que la concentración de proteína, saliéndonos del rango de concentraciones que se explorarían en pseudo-primer orden en solución.

Se observan patrones descendentes en las  $k_{obs}$ , desde el origen  $[L]_0$  hasta la concentración de subunidades en las relajaciones medidas a concentraciones de ligante menores que la concentración de subunidades en el gel. El comportamiento de las velocidades se vuelve ascendente en concentraciones de GlcNAc6P mayores que la concentración de sitios. Estos patrones se observaban en geles en R y en T (figuras 23 y 24). Es más difícil sincronizar la relajación espontánea en R que hacerlo en T, cuando se trabaja con monolitos en el fluorómetro ISS PC1.

El cambio de fluorescencia con la temperatura en geles en estado R impide medir precisamente los patrones que suben y bajan en un fluorómetro común, solo pueden ser observados con un lector de placas como el Polarstar. Trabajando con el fluorómetro de mesa y cuidando bien los tiempos de incubación es posible reproducir el fenómeno con geles en T. El Polarstar nos permitió explorar concentraciones de proteína mayores sin depletar el ligante (figura 24 C), ya que la relación del volumen entre el gel y la celda es más limitada en los pozos, los cuales tienen 50  $\mu$ l de gel y su volumen final en el pozo es de 200  $\mu$ l. En cambio, en la celda el volumen del gel es de 120  $\mu$ l y el volumen final es de 1.5 ml.

Para describir nuestros resultados experimentales recurrimos a simular numéricamente los valores propios de un mecanismo complejo, pensando que se trata de un mecanismo de relajación acoplado se puede aproximar el comportamiento con el tratamiento teórico de Vogt y Di Cera.<sup>14, 26</sup> En estas simulaciones intentamos reproducir los patrones bifásicos de las  $k_{obs}$  más lentas observables. Logramos reproducir en conjunto los patrones de R rápidos y lentos utilizando un mecanismo acoplado de tres estados; resolviendo las matrices de ecuaciones diferenciales respecto al tiempo, de todas las especies involucradas en el mecanismo acoplado de tres estados, con el método publicado por Vogt y Di Cera (apéndice 2, simulación numérica con Mathematica).<sup>14, 26</sup>

Para encontrar las constantes que reprodujeran los patrones en alguno de los valores propios, se utilizaron algunas de las constantes analizadas de los mecanismos de relajación con las ecuaciones 2 y 3; pero también requirió escoger por prueba y error las constantes de velocidad de la ruta de ajuste inducido y del intermediario, que con los resultados no podemos estimar directamente.

El mecanismo de estados ligantes en cada estado cuaternario seguía siendo una incógnita hasta la publicación del trabajo de Paul y Weikl (figuras 4, 23 y 24). Los autores explican cómo obtener ecuaciones con solución analítica para los patrones bifásicos de las  $k_{obs}$  más lentas observables para los mecanismos ajuste inducido y selección conformacional de dos pasos; los patrones de velocidad contra concentración son muy similares a los que se obtienen experimentalmente.

Además Paul y Weikl plantean una forma de conocer el mecanismo asociado a la unión del ligante.<sup>23</sup> Para reconocer entre ambos mecanismos la forma de la curva de ajuste inducido produce el patrón de “v” simétrico, donde el ajuste inducido llega a un límite compartido por la  $k_{obs}$  en el origen y la  $k_{obs}$  a saturación de ligante. Y se vuelve más aparente al aumentar la concentración de proteína, como muestran Paul y Weikl con sus simulaciones.<sup>23</sup> Esta relación simétrica no se cumple en selección

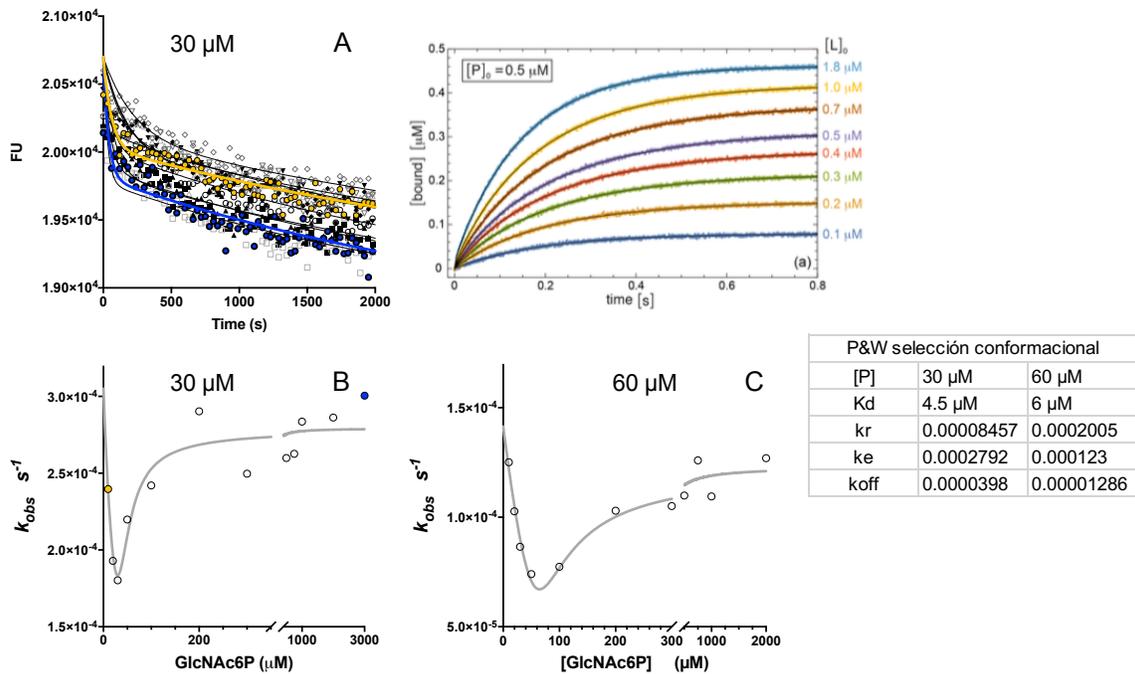
conformacional, las  $k_{obs}$  en el origen y a saturación pueden estar arriba o abajo uno del otro indistintamente (figura 4).

Los resultados del análisis de la cinética de relajación de alta resolución con fluorescencia en los estados T y R con este planteamiento matemático, indican que el mecanismo del paso limitante de la unión de activador alostérico al estado T es de ajuste inducido, mientras que el mecanismo observado para R es de selección conformacional (figuras 23 y 24). Los geles en T muestran el patrón simétrico en forma de  $v$ , mientras que los de R no son simétricos con el cambio de concentración de proteína.

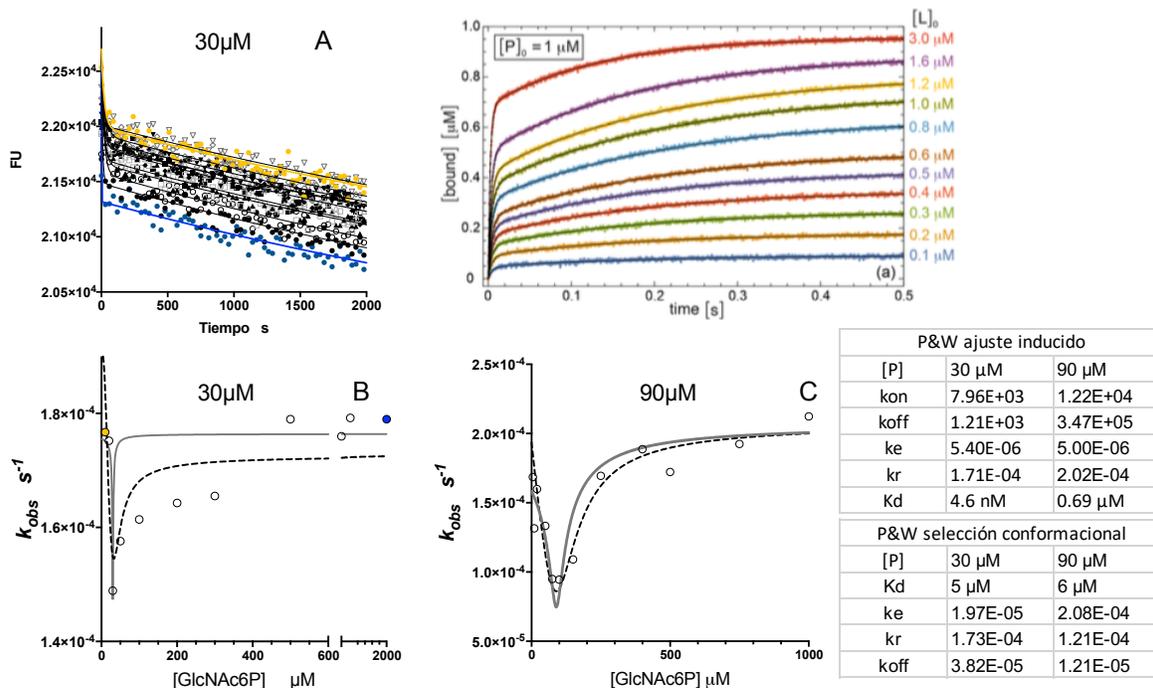
También, en los datos crudos de la relajación a distintas concentraciones de ligante, se llegan a observar patrones similares entre los datos experimentales y los simuladas en [23], lo que apoya la interpretación del mecanismo observado.

En los ajustes con las ecuaciones de Paul y Weikl (ecuaciones 4-8), se fijó como constante de disociación un valor alrededor de  $6 \mu\text{M}$ . A través de distintas técnicas se han obtenido constantes con valores similares como en los datos de catálisis de R (figura 18) y los de la  $k_R$  observada en el experimento de unión al equilibrio en solución (figura 6).

La constante de disociación baja para el activador alostérico también se ha observado con una mutante que bloquea la transición cuaternaria hacia T mediante la inserción de un “candado molecular” por derivatización con ácido-2,3-dibromopropiónico (DBPA) entre los tioles de las cisteínas colocadas por mutagénesis en las posiciones 206 y 165 (mutante L).<sup>48</sup> En esta construcción se bloquea la estructura de todo el ensamble en R cuaternario y r terciario y no se espera un cambio conformacional; en ella se observó una unión hiperbólica con una  $K_d = 5.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ <sup>48</sup>. La fluorescencia en esta mutante proviene de la Y254, esta señal es principalmente de unión y sigue la transición alostérica hacia al estado R.



**Figura 23.** (A) Relajación de R gels medidos en espectrofluorómetro de placas Polarstar. Datos experimentales curvas de relajación a distintas concentraciones de activador, ajustados a una función exponencial doble. En amarillo  $10 \mu\text{M}$  de ligante, que ha sido la concentración más baja explorada. En azul,  $3 \text{ mM}$  de activador, la concentración más alta explorada en este experimento. A la derecha de las relajaciones experimentales se muestran las relajaciones simuladas para un mecanismo de unión de selección conformacional, tomada de [23] (B y C) Gráfica de  $k_{\text{obs}}$  lentas en función de la concentración de activador a dos distintas concentraciones de proteína. Ajuste de los datos al sistema de ecuaciones de selección conformacional (ecuaciones 4-8)[23]. La  $K_d$  utilizada en los ajustes es fija alrededor de  $6 \mu\text{M}$ . Las constantes de las simulaciones se muestran en la tabla.

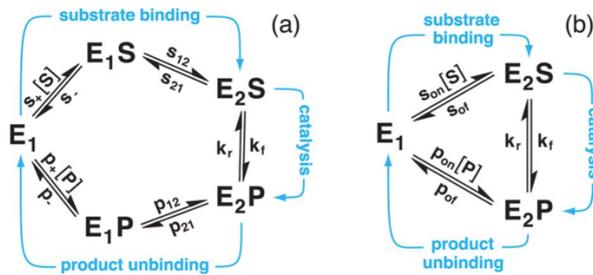


**Figura 24.** (A y B) Relajación de T geles medidos en espectrofluorómetro de placas Polarstar. (C) Medidos en espectrofluorómetro ISS con monolitos en láminas de cuarzo. (A) Datos experimentales curvas de relajación a distintas concentraciones de activador, ajustados a una función exponencial doble. En amarillo  $10\mu\text{M}$  de ligante, la concentración más baja explorada. En azul  $2\text{ mM}$  de activador, la concentración más alta explorada en este experimento. A la derecha de las relajaciones experimentales se muestran las relajaciones simuladas para un mecanismo de unión de ajuste inducido, tomada de [23] B) y C) Gráfica de  $k_{\text{obs}}$  lentas en función de la concentración de activador a dos distintas concentraciones de proteína. Líneas sólidas, ajuste de los datos al sistema de ecuaciones de ajuste inducido (ecuaciones 8 a 11). Líneas interrumpidas ajuste de los datos al sistema de ecuaciones de selección conformacional. La  $K_d$  utilizada en los ajustes de selección conformacional se fija alrededor de  $6\mu\text{M}$ . Las constantes de las simulaciones se muestran en la tabla.

El cambio del mecanismo ligante entre T y R puede explicar el cambio de  $k_{\text{cat}}$  entre geles en R y en T, además, explica el comportamiento cooperativo por el sustrato en solución. De acuerdo con Weikl y Paul, los mecanismos con la transición conformacional acoplada a la entrada de sustrato y salida de productos en el ciclo catalítico, cambian la cantidad de pasos de unión y conformerización.<sup>10</sup> Los estados ligantes visitados en el ciclo catalítico, pasan de 5 estados ligantes en ajuste inducido a 3 o 4 en selección conformacional (figura 25).

Este cambio de pasos en el ciclo de unión y salida de sustrato y producto podría explicar el aumento de  $k_{\text{cat}}$  al doble de T a R nanoencapsuladas. R es más eficiente que T con menos estados terciarios que visitar. Por otra parte, la presencia del activador alostérico restringe los estados a visitar. La interacción del ligante alostérico en este caso permite que la transición  $t \rightleftharpoons r$  ocurra con mayor libertad al impedir el puente salino en el sitio alostérico entre Lys160 y Glu148 que estabiliza a T, esta interacción conecta la ruta tapa-interfaz trimérica (figuras 16 y 19).

La ruta de acoplamiento entre las tapas de los sitios activos le da sentido a la selección conformacional por el sustrato y también le da sentido la activación de esta ruta de acoplamiento en la transición cuaternaria. El cambio posición del dominio C,N-terminal está relacionado a la transición cuaternaria, la interacción que existe en la interfaz trimérica entre la ruta de acoplamiento de la tapa y el dominio C,N-terminal puede cambiar la manera en que la interfaz trimérica comunica la dinámica de las tapas entre las subunidades vecinas, haciendo el cambio de mecanismo ligante a selección conformacional en R. En este punto de la estructura donde conectan las dos rutas que conocemos cambian el acoplamiento conformacional en EcGNPDA.



**Figura 25.** Ciclo catalítico acoplado a transiciones conformacionales. a) mecanismo de ajuste inducido, b) mecanismo de selección conformacional. Figura tomada de <sup>10</sup>

## Conclusiones

El mecanismo de unión del activador alostérico al estado T es de ajuste inducido, mientras que el mecanismo en R es de selección conformacional, esto se prueba en los comportamientos de cinética rápida analizados con el marco teórico de Paul y Weikl. Este resultado le da sentido mecánico al origen del sesgo conformacional definido por el estado cuaternario en el modelo TTS.

Los resultados de los experimentos de catálisis con la enzima restringida conformacionalmente en geles y en solución se pueden explicar en conjunto con el cambio de naturaleza de mecanismo ligante entre estados cuaternarios.

La cooperatividad negativa aparente por los ligantes en geles en T puede correlacionarse con el mecanismo de ajuste inducido.

La cooperatividad positiva observada en solución por el activador solo puede ser explicada mediante el cambio conformacional cuaternario, que libera el cambio conformacional terciario en el cambio de mecanismo de ajuste inducido en T a selección conformacional en R. Esto produce un aumento de la  $k_{cat}$  que puede ir ocurriendo en conjunto con la selección de estados r en R, lo que aparentemente produce un mecanismo en solución que se aprecia únicamente como un sistema de activación tipo K de selección conformacional y se ajusta al modelo de MWC.

Existen al menos dos rutas o mecanismos de acoplamiento homotrópico en EcGNPDA, una para el sitio activo y otra para el sitio alostérico. Ambas rutas resultan modificadas por el cambio cuaternario y la interacción del activador alostérico las mantiene desconectadas en estado R, la capacidad de establecer la conexión de la ruta de interacción tapa-interfaz trimérica, con el puente salino entre K160 y E148 de nuevo estabiliza T. La ruta del sustrato consiste en cambiar el acoplamiento dinámico entre las tapas del sitio activo, que cuando acoplan su dinámica estabilizan T y cuando se impide momentáneamente el acoplamiento entre ellas estabiliza el estado R.

La cooperatividad por la GlcNAc6P se origina en la diferencia de la estructura del sitio alostérico, la transición cuaternaria cambia directamente la estructura de la interfaz entre subunidades que forma el sitio. Este es un mecanismo más obvio para producir cooperatividad homotrópica, que depende del cambio de afinidad ocasionado directamente por el cambio de estructura del sitio y está relacionado directamente con la transición  $T \rightleftharpoons R$ .

El equilibrio de la desaminasa tiende fuertemente a T en el nivel cuaternario y también tiende a t con equilibrios conformacionales terciarios similares entre T y R. Aunque el sesgo conformacional del modelo TTS esperaría un cambio grande entre los equilibrios conformacionales de cada estado alostéricos. La estrategia en desaminasa es cambiar el mecanismo de ajuste inducido en T a selección conformacional en R para producir la cooperatividad.

## Métodos

### Expresión y purificación de la EcGNPDA silvestre y mutantes

La cepa de *E. coli* IBPC590 transformada con el plásmido pTZ18R que contiene el gen *nagB* silvestre o mutantes, se crece durante toda la noche a 30 °C en medio LB con ampicilina y se cosechan las células por centrifugación. El paquete celular se lava y se rompen las células por ultrasonificación. Se obtiene la fracción citosólica que contiene la EcGNPDA por centrifugación. Del extracto, se siguió el protocolo de purificación por afinidad para la EcGNPDA desarrollado y descrito por Calcagno M.L y col.<sup>57</sup>. Mediante este método se obtiene a la enzima pura en un solo paso de purificación. El método se basa en una matriz de afinidad por el sitio alostérico, con *N*-ε-aminocaproil glucosamina-6-fosfato inmovilizada en una matriz de agarosa entrecruzada. La EcGNPDA interactúa con la columna, la que se lava con varios volúmenes de columna con amortiguador de Tris-HCl 50mM, pH 7.8, hasta que la absorción a 280 nm se estabilice cerca del blanco. La enzima se eluye con el mismo amortiguador al que se le añadió GlcNAc6P 10 mM. Para almacenar la proteína purificada, se precipita con sulfato de amonio a 50 % de saturación. Antes de llevar a cabo cualquier experimento, la enzima conservada en sulfato de amonio se dializa contra el amortiguador de diálisis que contiene 0.4 U L<sup>-1</sup> de fosfatasa alcalina para hidrolizar la GlcNAc6P. En el caso de la mutante F, se añade en todos los pasos el agente reductor tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 0.1 mM, para mantener reducida a la cisteína en 165 y evitar que se formen puentes disulfuro entre subunidades. El TCEP también se añade en todos los amortiguadores para el trabajo con la mutante

## Concentración de proteína

La concentración de la EcGNPDA se determinó para cada nueva preparación, mediante la absorbancia en el ultravioleta a 278 nm y utilizando el coeficiente de absorptividad molar, que para la enzima silvestre en Tris-HCl 50 mM, pH 7.7, es  $\epsilon_{278} = 20.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Para obtener la concentración y el coeficiente de las mutantes, se utilizó el método de ácido bicinónico<sup>58</sup> usando como referencia la EcGNPDA silvestre. El coeficiente de absorptividad obtenido para la mutante F en Tris-HCl 50mM, pH 7.7 es  $\epsilon_{278} = 17.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , el de la mutante Y254W es  $\epsilon_{278} = 24 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y el de la mutante Y254F  $\epsilon_{278} = 21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

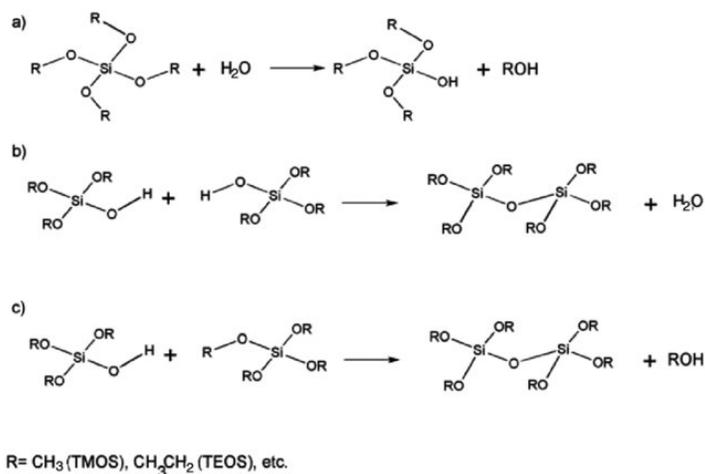
## Ensayos enzimáticos

La catálisis en sentido desaminante se mide a través de la Fru6P producida a diferentes concentraciones de sustrato (GlcN6P). La velocidad inicial se calculó con la Fru6P formada a tiempo fijo a 30 °C en Tris-HCl 50 mM pH 7.7, manteniéndose el avance de la reacción por debajo de 0.05 . En el caso de las enzimas nanoencapsuladas el amortiguador utilizado fue Tricina 50 mM pH 7.7; la concentración de Fru6P se cuantificó por el método del resorcinol de Roe, modificado<sup>57</sup>.

## Nanoencapsulación de la desaminasa en geles nanoporosos de ortosilicatos.

### Preparación de monolitos

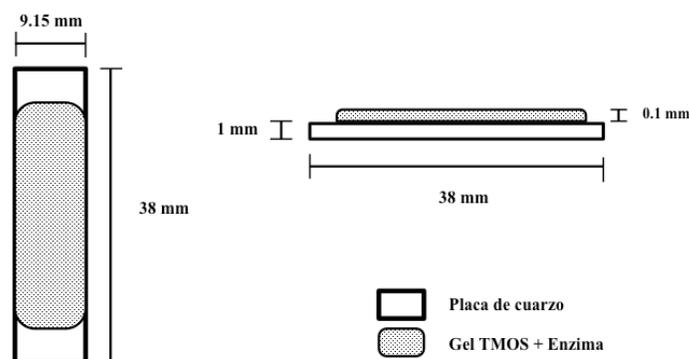
La nanoencapsulación de la EcGNPDA se obtiene de la polimerización del tetrametil-*o*-silicato (TMOS) en condiciones alcalinas (figura 26).



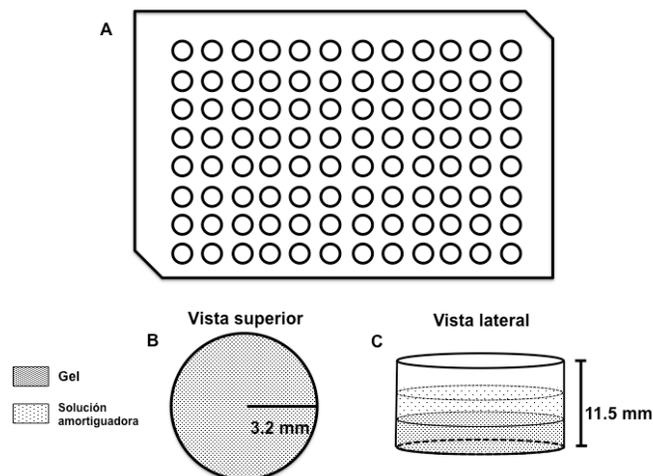
**Figura 26.** Reacción de polimerización de los ortosilicatos. a) reacción de hidrólisis del metoxilo, b) y c) reacciones de entrecruzamiento liberando agua y alcohol respectivamente. Figura tomada de<sup>59</sup>.

El gel se polimeriza en presencia de la proteína a una concentración final de EcGNPDA de hasta 20  $\mu\text{M}$ ; la polimerización ocurre mediante el cambio de pH al mezclar la proteína con el TMOS. El TMOS se mezcla con agua y ácido clorhídrico, se sónica en un baño frío durante 20 minutos. Después de la sonicación, se burbujea en el cuarto frío con N<sub>2</sub> húmedo por 30 minutos para sacar el metanol formado en la hidrólisis ácida del grupo metoxilo. El protocolo que se siguió está basado en el descrito por Bettati et al.<sup>44</sup>, con excepción de la preparación de enzima, la cual se dializó en 100 mM de tris-HCl pH 7.5 para asegurar la encapsulación del estado cuaternario. La mezcla de ortosilicatos de

TMOS hidrolizado se mezcla 1:1 con la EcGNPDA a encapsular. Al momento en que aumenta el pH de los ortosilicatos comienzan a polimerizarse alrededor de las proteínas. Esta etapa se realiza en una cámara húmeda. Luego de la polimerización, los geles se mantienen sumergidos en amortiguador de consolidación al menos por dos días. La forma T se encapsuló libre de ligantes y la forma R en presencia de GlcNAc6P 2 mM final. El mismo ligante se añade al amortiguador de consolidación para la forma R. Para la obtención de monolitos sobre láminas de cuarzo, se polimerizaron 120  $\mu\text{L}$  de gel sobre el soporte de cuarzo sintético, transparente al ultravioleta, este material se pidió especialmente a Hellma para que tuviesen la calidad óptica requerida. El gel con enzima nanoencapsulada presenta una porosidad y propiedades ópticas suficientes para la adecuada difusión de los ligantes <sup>44</sup>. Los soportes de cuarzo (figura 23), tienen las dimensiones adecuadas para caber dentro de las celdas para uso espectrofotométrico. La receta de nanoencapsulación es la misma para las diferentes modalidades de utilización de los geles, por ejemplo en los geles para placas de pozos, se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla en el fondo de una placa de 96 pozos con fondo transparente (GRENIER  $\mu\text{Clear}$ ) (figura 24).



**Figura 27.** Esquema del monolito sobre un soporte de cuarzo QS. Tomada de <sup>48</sup>

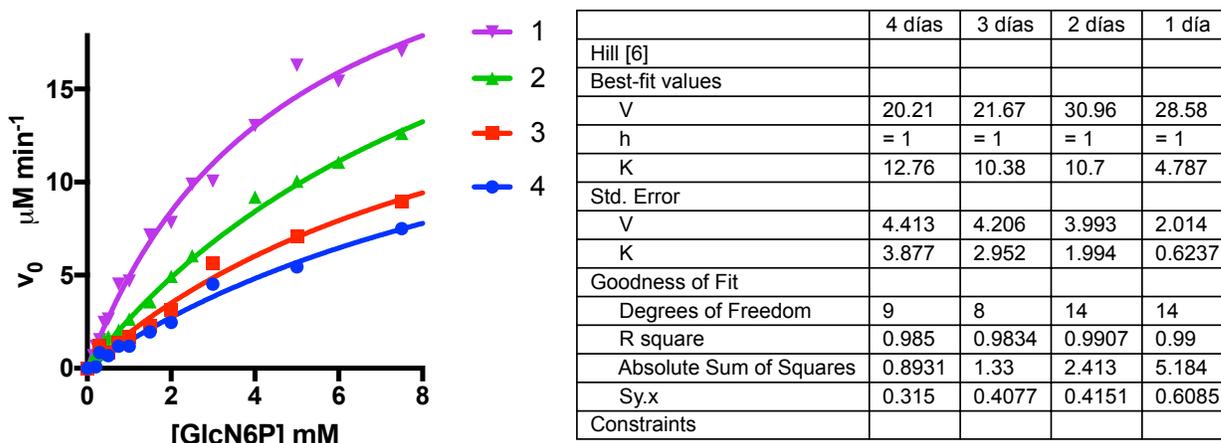


**Figura 28.** Placa de 96 pozos, esquema de los monolitos de 50  $\mu\text{L}$  en el fondo del pozo Tomada de <sup>48</sup>.

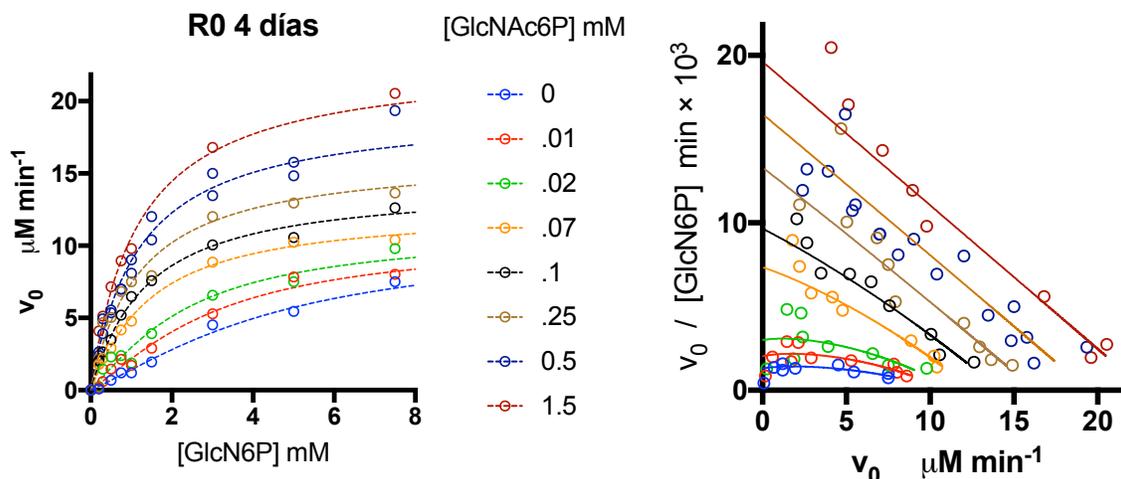
### Preparación de geles en suspensión para ensayos de cinética de catálisis

El gel se polimeriza con la EcGNPDA a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  final en el fondo de un tubo de ensayo; luego de su consolidación, el gel se disgrega por ultrasonificación suave, de manera de obtener una dispersión homogénea de gel. Se utiliza un procesador ultrasónico de 800W usando micropunta.

Se empleó un pulso de muy baja potencia (2% de amplitud) por 10 minutos, en un baño frío y cuidando que la muestra no se caliente. Posteriormente, la suspensión se dejó sedimentar para lavar el gel con amortiguador y retirar la proteína soluble que pudiera haber escapado del gel. La suspensión de proteína se diluye y se pipetea en los ensayos de catálisis en la misma forma como se trabaja con la proteína en solución. El amortiguador de trabajo con geles es Tricina 50 mM pH 7.7. Para el trabajo con la forma R, se sigue el mismo proceso, pero en presencia de GlcNAc6P. La estrategia experimental para estudiar la forma R libre de ligantes es permitir que la enzima se relaje a un estado terciario de baja afinidad sin que pierda la estructura cuaternaria, restringida por el gel. En cinética de catálisis es importante poder llegar al máximo de estado t en conformación R que sea posible, para poder apreciar bien sus características. Para lograr esto, se dializan los geles en R en suspensión dentro de una bolsa de diálisis, contra amortiguador que contiene fosfatasa alcalina, para asegurarnos de liberar eficientemente a la proteína del ligante. Luego de la diálisis, controlamos la relajación del estado conformacional a través de cinética de catálisis (figura 29). Encontramos, que el estado de mayor relajación, al que se puede llegar sin encontrar cambios en el mecanismo de activación alostérica, es el de tres días. Sin embargo, a partir de 2 días después de dializado, el estado R muestra prácticamente la misma afinidad por el sustrato que en los días siguientes, pero la velocidad sigue siendo tan alta como la de un día de diálisis (tabla en figura 29). A partir del cuarto día después de la diálisis aparentemente se comienza a perder la restricción cuaternaria, aparece cooperatividad positiva por el sustrato y el mecanismo alostérico cambia, se convierte en un sistema de activación tipo mixto (figura 30). En la sección de resultados se muestran los datos obtenidos de los geles de 3 días de relajación a distintas concentraciones de GlcNAc6P, en este estado de relajación se comporta como un sistema alostérico tipo K con alta afinidad por el activador. Llegamos al máximo estado de relajación hacia t posible tratando de evitar un cambio en el mecanismo alostérico de R, para poder observar la máxima activación de vuelta a  $R_A$



**Figura 29.** Relajación de  $R_A$  a  $R_0$  seguida por cinética de catálisis en ausencia de activador. Se justaron a un componente hiperbólico, observa como la  $K_m$  aumenta y la  $V_{max}$  disminuye a través de los días de incubación en el cuarto frío.



**Figura 30.** Catálisis de la forma R encapsulada, relajada por cuatro días después de dializar el activador. Sin activador alostérico aparece cooperatividad positiva por el sustrato que se muestra en el regráfico de Scatchard a la derecha. La activación alostérica se convierte en un sistema tipo mixto. Esto se refleja en el cambio de constante de disociación aparente a bajas concentraciones de activador y un aumento de  $V_{\max}$  altas concentraciones de activador. A comparación de la relajación de 3 días (figura 14) en donde la activación alostérica se sigue observando como un sistema  $K$  puro.

La concentración de proteína en la suspensión de gel, se determinó mediante la hidrólisis alcalina del gel en NaOH 2M. El coeficiente de extinción molar de la EcGNPDA a 2 M de NaOH es  $\epsilon_{280} = 6.36 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , que se calculó utilizando como patrón EcGNPDA de concentración conocida. Una muestra de la suspensión se lleva a 2 M de NaOH y se agita vigorosamente en vortex hasta obtener una solución. Esta muestra se mide en el espectrofotómetro y se calcula la concentración con el coeficiente de extinción molar dado.

### Espectros de dicroísmo circular

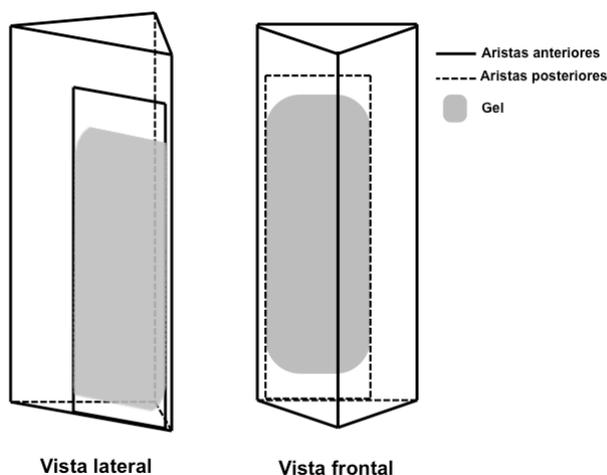
Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano, fueron tomados con un espectropolarímetro Jasco J-715 a temperatura controlada de 30 °C. Se utilizaron celdas de 5 mm dentro de las cuales se colocó el monolito con el soporte de cuarzo adherido a la ventana de la celda, en la dirección del haz de luz hacia el fotomultiplicador. El amortiguador utilizado en los experimentos de dicroísmo fue Tris-HCl 100 mM pH 7.7

### Ensayos de fluorescencia con la mutante F nanoencapsulada en monolitos

Para poder utilizar los monolitos con EcGNPDA en R libre de ligantes, los geles se dializaron en Tricina 50 mM pH 7.7, con dos cambios de amortiguador de 2 L cada uno. Los geles en monolito se colocaron dentro de una canastilla de plástico suspendida en un matraz con el mismo amortiguador a 4 °C durante toda la noche, con agitación ligera. Posterior a la diálisis los geles se dejaron sumergidos en Tricina 50 mM pH 7.7 durante los días de relajación a 4 °C.

Los espectros y ensayos de relajación por fluorescencia se hicieron en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL.). Para obtener el espectro correspondiente de emisión de fluorescencia, se colocó el monolito con el gel dentro de una celda prismática triangular (figura 31). La trayectoria del haz de luz pasa de la fuente de excitación por la ventana perpendicular de la celda

al haz, a través del amortiguador antes de impactar en el gel; de la misma forma, la emisión pasa por el amortiguador y la otra ventana perpendicular a la trayectoria del haz en la celda.



**Figura 31.** Esquema de la posición del monolito en una celda prismática triangular para mediciones de fluorescencia de la proteína nanoencapsulada. Figura tomada de <sup>48</sup>.

El amortiguador utilizado en los ensayos de fluorescencia es Tricina 50 mM pH 7.7, TCEP 10  $\mu$ M. El volumen total se calcula sumando el volumen del gel y el volumen del amortiguador en la celda. En nuestros experimentos se utiliza un volumen final de 1.5 mL. La muestra de proteína nanoencapsulada se excitó a 295 nm y se registró el máximo de emisión a 334 nm. Los espectros se registraron entre 300 y 400 nm. Las ranuras de paso de luz tanto de excitación como de emisión fueron de 0.5 mm. El número de iteraciones por medición fue de 10. La temperatura en la cámara de la celda se mantuvo a 30 °C.

### **Ensayos de fluorescencia con la mutante F nanoencapsulada en pozos**

Las placas de pozos con monolitos en estado R, se dializan para obtener el estado R libre de ligantes, el procedimiento es el mismo que con los monolitos. La placa de pozos se coloca en un soporte de plástico dentro de un vaso de precipitados grande. Después de la diálisis, se coloca amortiguador fresco en los pozos para el proceso de relajación, se incuban por dos días a 4 °C para evitar la relajación cuaternaria. Antes del ensayo se elimina el amortiguador de los pozos ya que se utiliza el amortiguador a 30 °C incubado dentro del lector de placas. La medición se llevó a cabo en un espectrofluorómetro de placas Omega Polarstar, utilizando un filtro de excitación a 295 nm y uno de emisión de 330 nm. Se utilizaron las fibras de excitación y emisión en el fondo del pozo de manera de medir directamente en el gel. Se muestra un barrido de la fluorescencia del gel en los pozos (figura 32), la fluorescencia es similar entre pozos, aunque no homogénea. Eso nos llevó a elegir la medida orbital en nuestro programa, de manera que se muestrea un promedio de campos en el pozo.

**Figura 32.** Representación de un barrido de la fluorescencia del gel con mutante F en 12 pozos. Se utilizó el Polarstar con filtro de excitación de 295 nm y de emisión de 330 nm. Figura tomada de <sup>48</sup>.

El programa de medición se describe a continuación:

Modo de barrido: Orbital

Diámetro de barrido: 3 mm

Ganancia: 1000

Número de ciclos: 240

Tiempo de ciclo: 30 s

Número de flashes por pozo: 13

Estos parámetros permiten medir con comodidad, dentro del marco de tiempo en el que ocurre la relajación de la mutante F en geles, alrededor de 12 concentraciones distintas de GlcNAc6P en un solo experimento. Los experimentos se llevaron a cabo en Tricina 50 mM pH 7.7, TCEP 10  $\mu$ M. El volumen final por pozo, incluyendo el volumen del gel, fue de 200  $\mu$ L. El aparato fue programado para inyectar los volúmenes necesarios de una solución de GlcNAc6P para llegar a la concentración deseada y comenzar las lecturas de fluorescencia simultáneamente.

### **Ajuste de datos y simulación de ecuaciones**

Los datos experimentales se ajustaron por regresión no lineal utilizando GraphPad Prism 6.0

La simulación numérica de las ecuaciones de los valores propios de velocidades de relajación de los mecanismos acoplados se realizaron con Wolfram Mathematica 11.

Apéndice 1. Artículo S. Zonszein Et al. PLoS one 2014.



# The Tertiary Origin of the Allosteric Activation of *E. coli* Glucosamine-6-Phosphate Deaminase Studied by Sol-Gel Nanoencapsulation of Its T Conformer

Sergio Zonszein, Laura I. Álvarez-Añorve, Roberto J. Vázquez-Núñez, Mario L. Calcagno\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico

## Abstract

The role of tertiary conformational changes associated to ligand binding was explored using the allosteric enzyme glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) deaminase from *Escherichia coli* (EcGNPDA) as an experimental model. This is an enzyme of amino sugar catabolism that deaminates GlcN6P, giving fructose 6-phosphate and ammonia, and is allosterically activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P). We resorted to the nanoencapsulation of this enzyme in wet silica sol-gels for studying the role of intrasubunit local mobility in its allosteric activation under the suppression of quaternary transition. The gel-trapped enzyme lost its characteristic homotropic cooperativity while keeping its catalytic properties and the allosteric activation by GlcNAc6P. The nanoencapsulation keeps the enzyme in the T quaternary conformation, making possible the study of its allosteric activation under a condition that is not possible to attain in a soluble phase. The involved local transition was slowed down by nanoencapsulation, thus easing the fluorometric analysis of its relaxation kinetics, which revealed an induced-fit mechanism. The absence of cooperativity produced allosterically activated transitory states displaying velocity against substrate concentration curves with apparent negative cooperativity, due to the simultaneous presence of subunits with different substrate affinities. Reaction kinetics experiments performed at different tertiary conformational relaxation times also reveal the sequential nature of the allosteric activation. We assumed as a minimal model the existence of two tertiary states, *t* and *r*, of low and high affinity, respectively, for the substrate and the activator. By fitting the velocity-substrate curves as a linear combination of two hyperbolic functions with  $K_t$  and  $K_r$  as  $K_M$  values, we obtained comparable values to those reported for the quaternary conformers in solution fitted to MWC model. These results are discussed in the background of the known crystallographic structures of T and R EcGNPDA conformers. These results are consistent with the postulates of the Tertiary Two-States (TTS) model.

**Citation:** Zonszein S, Álvarez-Añorve LI, Vázquez-Núñez RJ, 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. doi:10.1371/journal.pone.0096536

**Editor:** Juan Carlos Pizarro, Tulane University, United States of America

**Received:** December 23, 2013; **Accepted:** April 8, 2014; **Published:** May 2, 2014

**Copyright:** © 2014 Zonszein et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding for this research was provided by CONACyT, Mexico (grants 99857-Q and 116074) and financial support from the program PAPIIT-UNAM (grants IN206009 and IN213312). SZ also acknowledges a doctoral fellowship from CONACyT and RJVN a student fellowship from SNI-CONACyT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: calcagno@unam.mx

## Introduction

The concept of allostery, introduced by Monod et al. in 1963, embodies one of the fundamental principles of life [1]. Allosteric effects are a consequence of the thermodynamic coupling of a pair of binding sites in a protein molecule that are distant and have different functional properties. The functional coupling between binding sites is mediated by specific conformational changes in the protein molecule and were the object of a classic thermodynamic analysis by Wyman in 1948 with the name of linked functions [2]. Oligomeric proteins with identical thermodynamically-linked sites located in different subunits give rise to homotropic cooperativity, which frequently is incorporated into the concept of allostery. Indeed, both properties appear frequently associated and are considered as two aspects of the same phenomenon. Monod et al. in their landmark model presented a unified theory of cooperativity and heterotropic allosteric effects [3]. Their model conceived allosteric transitions as symmetric quaternary rearrangements of subunits between two extreme conformational states T and R, with different binding affinities (MWC model [3]). The postulates

of MWC model were supported along the subsequent years by many structural and physicochemical evidences, and several allosteric proteins were crystallized in either quaternary conformational state, foreseen by the model. In most cases, the comparison of the crystallographic structure of the extreme allosteric conformers, in spite of their limitations, afforded the first descriptions of the mechanism of allosteric transitions [4]. Later studies on hemoglobin and other well-known allosteric proteins demonstrated that the MWC model alone was not sufficient to explain the tertiary-quaternary coupling of human hemoglobin. The evidence that the tertiary conformational changes alone can produce heterotropic, that is, allosteric effects in hemoglobin contradict the original postulates of the MWC model [5]. From these and other experimental evidences, Henry et al. proposed a MWC-inspired theory to account for the role of tertiary allosteric transitions and its coupling to the quaternary transition in hemoglobin [6]. Their model, designated TTS for tertiary two states, considers that the oxygen affinity of each hemoglobin subunit is determined only by its tertiary conformational state, while cooperativity is of quaternary origin. The

tertiary-quaternary coupling is explained by the mutual biasing between the tertiary and quaternary conformational states, which undergo sequential and concerted transitions respectively.

The dissociation of heterotropic allostery and cooperativity has been observed under diverse experimental conditions, in other allosteric proteins as fructose 1,6-bisphosphatase by chemical modification [7] or aspartate transcarbamoylase, by site-directed mutagenesis [8]. Natural biodiversity offers a rich variety of allosteric mechanisms, thus stressing the importance of their study in different experimental models. The present research takes as a model the enzyme glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* (EcGNPDA, E.C. 3.5.99.6) [9–11], with the scope of characterizing the linkage between its subunit local mobility and its allosteric kinetics. This enzyme has been subject of many structural and physicochemical studies with emphasis in its allosteric properties. EcGNPDA isomerizes and deaminates glucosamine 6-phosphate (GlcN6P), forming fructose 6-phosphate and ammonia and it is allosterically activated by *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P). It is a homohexameric enzyme, displaying homotropic cooperativity with respect to GlcN6P and *K*-type allosteric activation by GlcNAc6P [11]. Our knowledge of EcGNPDA allosteric properties derives from the analysis of the crystallographic structures of its extreme conformational states, T (PDB 1FSF) and R (PDB1FS5) [12–14] and from physicochemical studies of the wild-type enzyme and some chemically or genetically modified forms [15–17]. In previous research on EcGNPDA we succeeded to suppress cooperativity while keeping allosteric activation by interfering with intersubunit contacts by chemical modification or mutagenesis [18,19]. Crystallographic studies by Rudiño *et al.* provided experimental support for the existence of tertiary structural sub-states of EcGNPDA R conformer. Some other studies revealed the existence of local intrasubunit changes accompanying the quaternary transition of EcGNPDA and the apparent uncoupling of allostery and cooperativity [20,21]. The lack of information about the time-course of these structural changes makes difficult the discussion of their role in EcGNPDA allosteric mechanism.

Nanoencapsulation of EcGNPDA in silica sol-gels improved the understanding on its allosteric mechanism, allowing us to characterize its transitional short-lived intermediates. Silica polymers formed surrounding the protein molecules, generate a wet nanostructured environment that restricts the protein conformational mobility. This approach has proven to be a valuable tool for the study of allosteric proteins, particularly human hemoglobin [22–24] and allosteric enzymes [25,26]. Under our experimental conditions, we succeeded to block the quaternary transition of gel-trapped EcGNPDA, its catalytic and allosteric functions were conserved and its intrasubunit mobility was considerably slowed down. This approach gave us experimental access to the otherwise undetectable conformational sub-states of the allosteric activation process by GlcNAc6P. We centered our study on the activation of the T state, which in the case of the soluble enzyme is the most populated conformation in absence of ligands. This experimental approach gave us access to the otherwise undetectable conformational sub-states of the allosteric activation process of this enzyme.

## Materials and Methods

### Biochemicals

Most biochemicals were purchased from Sigma-Aldrich S.A. de C.V. (Mexico) or were reagent-grade products. GlcNAc6P was synthesized according to the procedure by Leloir and Cardini [27]. All buffer solutions used had their pH adjusted at 20°C.

### Wild-type enzyme and site-directed mutants

EcGNPDA and its mutant forms were obtained by a single step purification procedure using allosteric-site affinity chromatography on a matrix of *N*-6-aminohexanoyl-glucosamine 6-phosphate agarose [19]. Specific elution was performed with 0.01 M sodium GlcNAc6P in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.8.

### Construction of a fluorescent allosteric reporter

A mutant form of EcGNPDA was designed to introduce a fluorescent reporter signal for monitoring the molecular conformational changes. On a previously constructed triple mutant form of EcGNPDA in which all the surface-exposed cysteine residues were replaced by serine (Cys118-Ser:Cys228-Ser:Cys239-Ser) [28], we introduced the additional replacements Asp165-Cys and Ser206-Trp. The site-directed mutation was carried out by oligonucleotide-directed mutagenesis using the QuickChange-II kit (Agilent Technologies, U.S.A.) following the instructions of the manufacturer. A pTZ18R*nagB* plasmid containing the mutant form of *nagB* gene [29] was used to transform the *E. coli* strain IBPC590  $\Delta$ *nag*, previous verification of the plasmid insert by DNA sequencing. Along all the purification procedure and the experimental work with this mutant, the thiol group of the introduced Cys165 was maintained in its reduced state by working in the presence of 10  $\mu$ M Tris(2-carboxyethyl)phosphine.

The kinetic and allosteric properties of this mutant (Mutant F) are not significantly different to those of the wild-type enzyme (Table 1). The rationale for the selection of these positions comes from the comparison of the crystallographic structures of EcGNPDA using computational energy minimizations and short molecular dynamic simulations of both quaternary conformers. This comparison shows a substantial shortening of the distance between the residues in positions 165 and 206 during the transition from T to R state [21]. The involved residues are located in two subunits without permanent interfacial contacts. On the basis of this observation, we replaced for a cysteine and a tryptophan the residues at the selected positions to form a fluorescence quenching pair. We observed the quenching of tryptophan emission at 334 nm in response to GlcNAc6P binding to the soluble enzyme form. The binding curve of the soluble mutant F resulting from fluorescence measurements, display homotropic cooperativity (not shown). Contrastingly, the fixed enzyme in the T quaternary conformation shows quenching of tryptophan fluorescence emission at 320 nm upon activator binding, producing hyperbolic saturation curves.

### Enzyme-doped gels

We encapsulated EcGNPDA by alkaline polymerization of tetramethyl-*o*-silicate in the presence of the enzyme, according to the procedure described by Bettati *et al.* [30], except that the protein dialysis buffer used was 0.1 M Tris-HCl at pH 7.5. The final enzyme concentration in the sol-gels was between 5 and 20  $\mu$ M. We produced thin gel monoliths of nearly 100  $\mu$ m-thick and with a total volume of 100  $\mu$ L, layered on quartz windows of 38×9.15×1 mm. The monoliths have good optical quality and adequate thickness and porosity for the rapid diffusion of ligands [30]. The absence of light scattering produces gels of crystal clear aspect, suggesting that their pores are smaller than 100 Å [31]. Thin gel monoliths were kept in 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 at 4°C (storage buffer) before use. The gels were ready for use 48 h after their preparation. Ligand-free EcGNPDA was used to produce T-gels; this enzyme is expected to be in an all-T state according to its known allosteric properties [16]. Gels containing the deaminase in the R state were initially prepared from gelation mixtures containing 2 mM GlcNAc6P and conserved in the

**Table 1.** Reference values for the wild-type enzyme [20] and for the mutant F in solution.

Enzyme	$K_t^a$ (mM)	$K_R^a$ (mM)	$k_{cat}^a$ (s <sup>-1</sup> )	$c^a$	$L^a$	$h^b$
Wild-Type	22.0±2.0	0.55±0.05	158±8	0.025±0.002	10 <sup>6</sup> ±1.9×10 <sup>4</sup>	2.9±0.1
Mutant F	7.86±0.59	0.44±0.01	107±1	0.056±0.004	10 <sup>5</sup> ±10 <sup>3</sup>	2.0±0.1

<sup>a</sup>Parameters obtained by fitting velocity against substrate concentration data to the MWC general equation [6].

<sup>b</sup>Obtained by fitting velocity data to Hill equation.

doi:10.1371/journal.pone.0096536.t001

storage buffer added with the same concentration of allosteric activator. This concentration is 70 times the  $K_{dis}$  value for the ligand [16]. Ligand-free R gels ( $R_0$ ) were prepared just before use, by overnight dialysis against 10<sup>4</sup> volumes of storage buffer to get rid of the activator. We used  $R_0$  gels in this research only for reference experiments. We used the following notation to represent the different conformational and binding states considered in this research. The quaternary fixed conformations T or R followed by a zero subscript represents the ligand-free enzyme, and the A subscript indicates saturation with GlcNAc6P (*i.e.*  $T_0$ ,  $T_A$ ,  $R_0$  and  $R_A$ ). The low and high-affinity tertiary states are indicated as  $t$  and  $r$ , respectively (as in  $T_0t$ ,  $R_Ar$ , etc.).

### Circular dichroism spectra

CD spectra in the aromatic absorption range were recorded with a Jasco J-715 spectropolarimeter using 5 mm light-path quartz cuvettes filled with 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.7 (30°C). The enzyme-doped gel monoliths were immersed with the quartz support adhered to photomultiplier wall of the cuvette. The temperature of the sample compartment was set at 30°C.

### Kinetics of the catalyzed reaction

The enzyme used in the kinetic experiments was prepared by disintegration of the enzyme-doped gels at low-power sonication, as described by Pioselli *et al.* [32]. The particle suspension was washed several times with storage buffer and decanted by gravity to discard the enzyme leaked from the gel during sonication. The protein concentration in the particulate suspension was measured after depolymerization of the gel in 1 M NaOH at room temperature followed by intense vortexing until getting a clear solution. The concentration of EcGNPDA in the initial suspension was obtained from its absorbance at 290 nm and a molar absorptivity of  $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . This value was experimentally determined from an EcGNPDA solution of known concentration dissolved in 1 M NaOH. GlcN6P deamination rate was measured at 30°C in 100 mM Tricine buffer, pH 7.8 (assay buffer). The amount of fructose 6-phosphate formed at a fixed time was measured by using a previously described procedure [11], always keeping the reaction progress below five percent of substrate conversion. The reaction was started by the addition of a vortexed suspension of micro-disaggregated gel to get a final enzyme concentration of 2 nM in the microparticulate suspension and added to the assay mixture in a shaking bath.

### Data analysis

Data fitting and graph plotting were processed with Prism 5.0 for MacOS X (GraphPad Software Inc., U.S.A.). Non-linear regression analyses were always checked by inspection of their residual plots. SD values given in tables and text are the standard deviation of the regressions.

### Fluorometric monitoring of conformational changes

We recorded the fluorescence emission spectra on a PC-1 spectrofluorometer, ISS (Champaign, IL, USA). The cuvettes were filled with the assay buffer and kept at 30±0.1°C. Mutant F doped monoliths were placed in a triangular prismatic quartz cuvette (Starna 4-SB-Q-10 cell), the monolith on the gel-supporting window was placed on the oblique wall of the cuvette, such as both excitation and emission beams pass through the solvent. The rate of tertiary transitions was determined by the time-course of tryptophan fluorescence quenching, measured by exciting at 295 nm and recording the emission at 320 nm. The relaxation process was started by the addition of variable concentrations of allosteric activator.

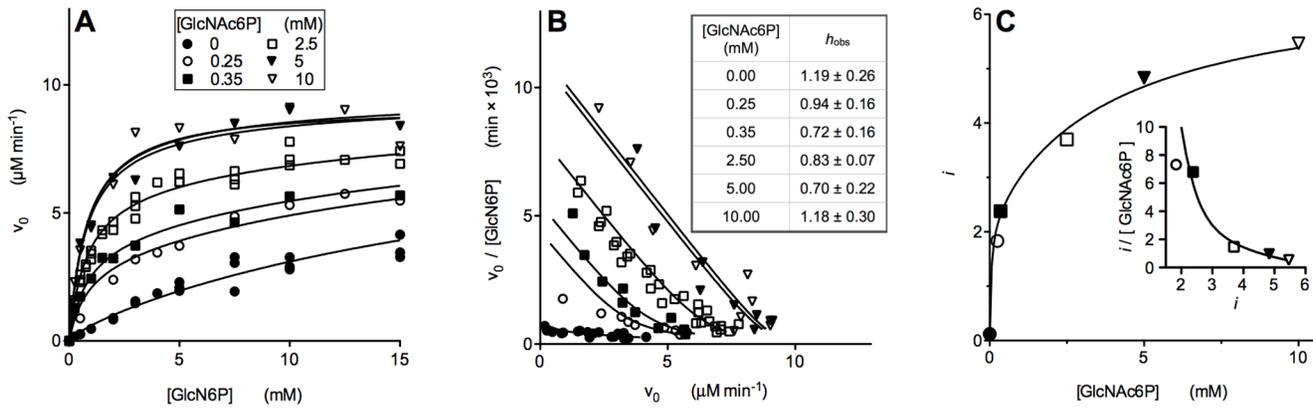
## Results and Discussion

### Kinetics of the reaction catalyzed by EcGNPDA nanoencapsulated in the T conformation

A general finding of all the kinetic experiments with EcGNPDA nanoencapsulated in T quaternary conformation is the absence of positive cooperativity for the substrate. The plot of initial velocities against substrate concentration for the encapsulated EcGNPDA in T state shows hyperbolic kinetics at zero ( $T_0$ ) and at saturating GlcNAc6P concentrations ( $T_A$ ) (Figure 1A). Apparent negative cooperativity for the substrate was found at intermediate concentrations of activator, evidenced by Hill coefficients lesser than one. This effect can be explained by the simultaneous presence of subunits of low and high substrate-affinity (Figure 1B). The observed  $t-r$  ratio depends on GlcNAc6P concentration and is not modified by the substrate. The latter effect is a consequence of the suppression of the homotropic cooperativity. The progress of the  $t-r$  transition depends on the time of contact of the enzyme with the allosteric activator, which was kept constant at 10 min, corresponding to the duration of our standard activity assay. This tertiary transition is slowed down by nanoencapsulation, as it will be shown in the following section (Figure 2). The velocity *versus* substrate curves shown in Figure 1 represent “kinetic snapshots” of the progress of the  $t-r$  transition as a function of the allosteric activator concentration, which is appreciated by the change in the tertiary heterogeneity of the enzyme. We analyzed this set of curves (Figure 1) by global non-linear regression with the following semi-empirical expression:

$$v_{obs} = \frac{1}{n} \left[ \frac{(n-i)V_t X}{K_t + X} + \frac{i(V_r X)}{K_r + X} \right] \quad (1)$$

This equation gives the sum of the reaction rates contributed by each tertiary conformer,  $v_{obs}$ , as a function of X, the ligand concentration. It derives from a minimal model assuming the existence of two tertiary states with different substrate affinities; the expression is the linear combination of two hyperbolic binding

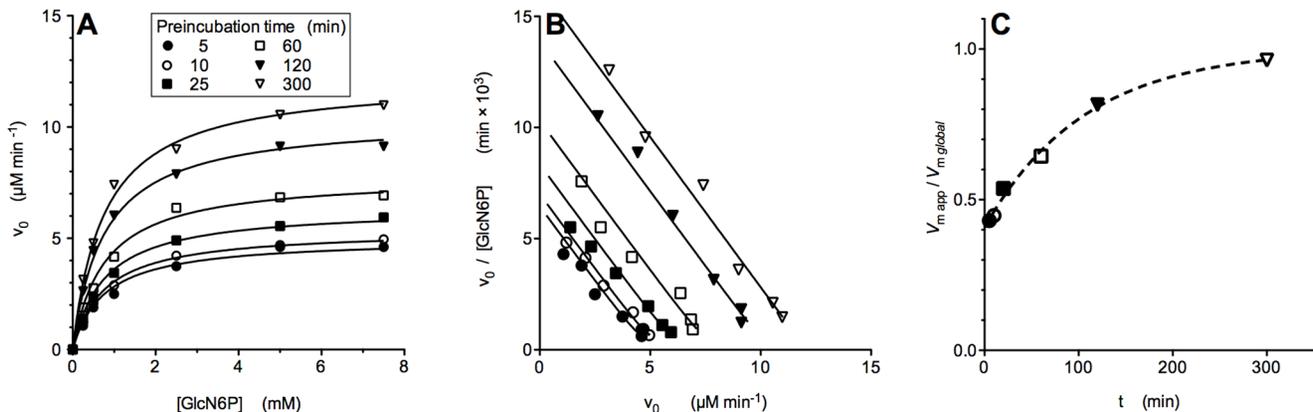


**Figure 1. Kinetics of the reaction catalyzed by EcGNPDA nanoencapsulated in the T conformation at variable GlcNAc6P concentration.** Curves of velocity against substrate concentration, obtained before the tertiary transition reached the conformational equilibrium. The presence of transient intermediates containing subunits with low or high affinity for the GlcN6P is apparent. Substrate concentration was varied over a wide concentration range to detect binding by both tertiary conformers. The enzyme concentration was 2 nM. (A) Velocity versus substrate plots taken at different allosteric activator concentrations. Data were fitted by global non-linear regression to equation 1. The symbols representing each activator concentration are equal in the three panels. (B) Scatchard transform of data in panel A. The plotted lines correspond to the simulated fitting using the parameters obtained from the global regression; negative cooperativity is apparent at intermediate GlcNAc6P concentrations. The Hill equation was used as a diagnostic tool for negative cooperativity and this panel shows the corresponding Hill coefficients. (C) Parameter  $i$  obtained from fitting data in panel A to equation 1, plotted against GlcNAc6P concentration. This parameter value describes the change in subunit tertiary composition with increasing activator concentration; it represents the number of subunits per molecule in the  $r$  state. Inset: Scatchard plot, showing the apparent negative cooperativity of GlcNAc6P binding. The existence of at least two different affinity states for the allosteric activator can be appreciated.

doi:10.1371/journal.pone.0096536.g001

steps. The  $K_M$  values for the subunits in their low and high-affinity are, respectively,  $K_i$  and  $K_r$ ,  $n$  is the number of subunits, the parameter  $i$  is the number of sites in the high-affinity tertiary state per oligomer and  $n-i$  is the corresponding number of subunits in the low-affinity state. Sidewise, the fraction of subunits in the high affinity state,  $i/n$ , is a tertiary equivalent to the function of state defined by Monod *et al.* for the quaternary states [3]. From the global non-linear regression of this experiment to equation 1, we obtained the values for the  $K_i$  and  $K_r$ . The fitted values for these

constants are in good agreement with the MWC substrate dissociation constants  $K_R$  and  $K_T$ , reported for the enzyme in solution (Tables 1 and 2). This observation indicates that nanoencapsulation does not significantly perturb the binding properties of EcGNPDA. The  $k_{cat}$  values were determined by using the  $V_i$  and  $V_r$  parameters. The  $k_{cat-T}$  value is similar to the  $k_{cat}$  of the soluble enzyme (Tables 1 and 2). This is the expected result for an enzyme that behaves as a perfect  $K$ -system in solution. However, the nanoencapsulated enzyme shows a  $k_{cat-r}$  greater than



**Figure 2. Time-course of the tertiary conformational relaxation of the nanoencapsulated T-conformer, analyzed through the catalytic activity of EcGNPDA.** (A) Plot of velocities against substrate concentrations at a fixed (0.3 mM) activator concentration. Substrate concentration was varied in an interval far below the  $K_t$  value for the enzyme in the T state (Table 2), to mainly reveal the activity of the high affinity subunits. Data were fitted to hyperbola. The enzyme concentration was 2 nM. The symbols representing each incubation time are equal in the three panels. (B) Scatchard plot of the same data. Note the absence of homotropic cooperativity and the time-dependent recruitment of subunits in a high affinity state. The plotted lines were obtained by simulating the corresponding fitted transform. (C) Time-course of the allosteric activation of the T conformer, appreciated as an exponential increase of the apparent  $V_{max}$ . Data were fitted to the first order equation yielding a  $k_{obs}$  at 0.3 mM GlcNAc6P of  $1.6 \times 10^{-4} \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Note that along the assay, the enzyme was already in contact with GlcNAc6P; for this reason the allosteric activation is in progress before starting the enzyme assay. Due to this experimental constraint, the observed span of fractional  $V_{max}$  values is lesser than one (Figure 2C), even when referred to the extrapolated value at zero time.

doi:10.1371/journal.pone.0096536.g002

**Table 2.** Kinetic constants for the deamination reaction of the nanoencapsulated T conformer of EcGNPDA.

$K_t$ (mM) <sup>a</sup>	$K_r$ (mM) <sup>a</sup>	$K_r$ (mM) <sup>b</sup>	$k_{cat-t}$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$k_{cat-r}$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
23.1 ± 3.6	0.98 ± 0.06	0.76 ± 0.02	185 ± 16 s <sup>-1</sup>	279 ± 27 s <sup>-1</sup>

<sup>a</sup>From experiments shown in Figure 1; parameters were obtained from global data fitting to equation 1.

<sup>b</sup>From experiment in Figure 2 that detects the catalytic activity of the high-affinity tertiary state. The  $K_r$  value is obtained from fitting to hyperbola.  
doi:10.1371/journal.pone.0096536.t002

$k_{cat-t}$ , thus revealing an implicit  $V$ -effect. The  $r$  subunits must be functionally different according to the quaternary state of the molecule. Accordingly, the gel-trapped  $T_{Ar}$  state results catalytically more efficient than the activator saturated enzyme in solution ( $R_{Ar}$ ). This is the first demonstration of the properties of this transient species,  $T_{Ar}$ , which was stabilized by nanoencapsulation.

The  $i$  parameter is a useful analytical tool to estimate the tertiary conformational landscape, giving a picture of the enrichment of the enzyme population in  $r$  state subunits (Figure 1C). The inset of this figure shows a Scatchard-like replot that demonstrates the apparent negative cooperativity for the allosteric effector. This finding suggests the existence of two tertiary conformers with different binding affinities for GlcNAc6P.

#### The $T_{0t} \rightarrow T_{Ar}$ transition of EcGNPDA analyzed through its catalytic activity. Targeting the activity of $r$ subunits

It is known that nanoencapsulation slows down tertiary relaxations in hemoglobin [24]. The time course of the tertiary conformational relaxation of EcGNPDA in  $T_{0t}$  conformer upon GlcNAc6P binding was directly explored by the kinetics of its catalyzed reaction. This experiment consists of a series of reaction rate measurements performed on samples previously incubated with a fixed concentration of GlcNAc6P for different times. The activator concentration was 0.3 mM, chosen to saturate the  $r$  state. Each curve obtained corresponds predominantly to the activity of the  $r$  subunits. We performed the reaction rate measurements by varying the substrate concentration ranging from 0 to 7.5 mM. The set of curves of velocity against substrate concentration in Figure 2A, illustrates the time dependence of the tertiary  $t-r$  transition involved in the allosteric activation of EcGNPDA. The observed kinetics is largely hyperbolic, with a globally fitted  $K_M$  value of  $0.76 \pm 0.02$  mM and increasing apparent  $V_{max}$  values. This  $V$ -effect evidences the sequential recruitment of  $t$  subunits towards the  $r$  state. The experiment starts with a molecular population rich in the ligand-free, low-affinity state,  $T_{0t}$ . Its contribution to the measured reaction rates is minor and negligible in mostly all of the data set. Taking into consideration the obtained  $K_t$  and  $K_r$  values from the previous experiment (Table 2), we can exclude data points with the largest error due to the presence of  $t$  conformers, without a significant impact on the apparent  $V_{max}$  values fitted. The variation of these apparent values as a function of time, reports the tertiary conformational relaxation; velocity increases as the population gets enriched in  $r$  conformers, which are mostly the dominant species at the substrate concentration range explored. We can analyze this enrichment in  $r$  subunits, which follows apparent first-order kinetics with a  $k_{obs}$  of  $1.6 \times 10^{-4} \pm 0.2 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup> (Figure 2C). A detailed kinetic analysis of this conformational relaxation by means of a direct fluorometric method is presented in the following section.

#### Fluorometric study of the relaxation kinetics of the nanoencapsulated T conformer of EcGNPDA

Wild-type EcGNPDA lacks of an adequate endogenous spectral signal for the kinetic study of its conformational transitions. For this purpose, we designed a multiple mutant form of EcGNPDA described in the methodological section (mutant F), whose intrinsic fluorescence is quenched by GlcNAc6P binding. The relaxation kinetics of the ligand-free enzyme encapsulated in the T state was determined at different GlcNAc6P concentrations, and the resulting  $k_{obs}$  were plotted against the ligand concentration. The plot of the calculated  $k_{obs}$  as a function of GlcNAc6P concentration is hyperbolic with a positive ordinate at the origin (Figure 3). This result is consistent with the following two-step mechanism, with a first rapid binding step followed by a slower conformational transition (Figure 4). The bimolecular step is expected to be the faster one; the unimolecular step, the rate-limiting step, involves a slower conformational change, further slowed down by encapsulation. This step is certainly the origin of Trp206 fluorescence quenching, given the geometry of the involved residues in the hexamer. This analysis is consistent with an induced-fit mechanism triggered by GlcNAc6P binding. The corresponding function relating  $k_{obs}$  with activator concentration, derived from the mechanism in the scheme shown in Figure 4, is [33]:

$$k_{obs} = k_{-2} + \frac{k_2[A]}{K_1 + [A]} \quad (2)$$

Where  $[A]$  is GlcNAc6P concentration,  $K_1$  is the dissociation constant for the ligand. The fitted parameters to this equation are shown Table 3. The overall apparent dissociation constant for this process,  $K'_{dis}$ , is given by the following expression [33]:

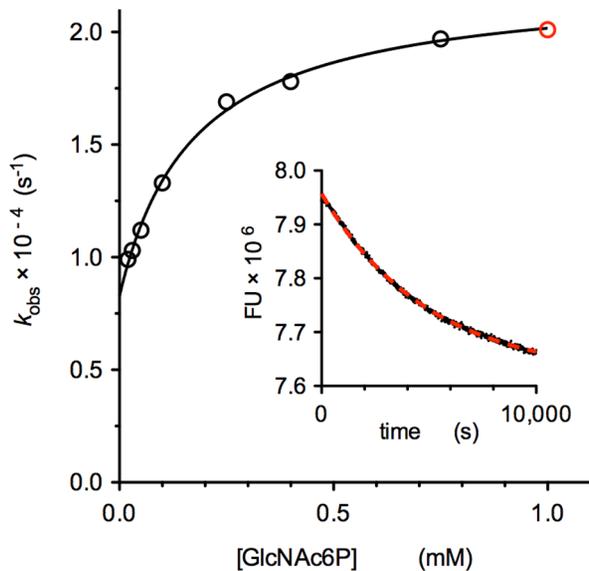
$$K'_{dis} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_1(k_2 + k_{-2})} = \frac{K_1}{1 + K_2} \quad (3)$$

Where  $K_2 = k_{-2}/k_2$

The binding properties of mutant F were verified in solution, showing a close resemblance to the activator binding curve of the wild type enzyme (not shown). Also, the apparent first-order rate constant ( $k_{obs}$ ) resulting from the present relaxation kinetics with mutant F (inset of Figure 3), is similar to the calculated  $k_{obs}$  from data in Figure 2C. These observations support the reliability of relaxation experiments using this mutant.

#### The tertiary origin of allosteric activation and the abolition of quaternary transition demonstrated by CD spectrometry

Nanoencapsulated EcGNPDA has its quaternary transition abolished, as indicated by the loss of homotropic cooperativity. In additional support of this conclusion, we measured the CD



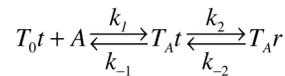
**Figure 3. Relaxation kinetics of the nanoencapsulated F mutant in T conformation: effect of GlcNAc6P concentration.** The fluorescence decay curves recorded at different activator concentrations were fitted to a single exponential function and the obtained  $k_{\text{obs}}$  values were replotted as a function of the allosteric activator concentration. Data were fitted to equation 2. The resulting rate constants are shown in Table 3. The inset shows an example of one of the recorded relaxation curves fitted to the first-order equation (dashed red line). This example corresponds to the highest GlcNAc6P concentration tested (1 mM) (red symbol). doi:10.1371/journal.pone.0096536.g003

spectral changes associated to GlcNAc6P binding, as a diagnostic tool for the quaternary state.

The T-R transition of soluble EcGNPDA produces a well-characterized ellipticity change at 274 nm, which has been recognized as a specific reporter signal for the allosteric transition [34,35]. We took advantage of this property for monitoring the quaternary state of the nanoencapsulated enzyme. We recorded the CD spectral changes in the aromatic absorption range produced by GlcNAc6P binding by using ligand-free monoliths in either quaternary conformation.

Figure 5A shows the near-UV CD spectra, obtained with T or R-state nanoencapsulated enzyme, both as ligand-free and GlcNAc6P-saturated. The previously identified spectral change associated with allosteric activation in solution is absent in either ligand-free quaternary conformers. Upon the addition of a saturating concentration of the allosteric activator, the monoliths doped with  $T_0$  enzyme did not present the ellipticity change at 274 nm. Actually, the ellipticity of the T form at this wavelength remains stable for at least 80 min (Figure 5B), in spite that by this time the enzyme becomes allosterically activated (Figure 2). Only the enzyme in the R state when in presence of the activator, displays the characteristic spectral change of the enzyme-GlcNAc6P complex in solution (Figure 5C). Figure 5B shows the time course of this spectral change, recorded after the addition of a saturating concentration of the activator to the nanoencapsulated  $R_0$  form. The differential CD spectrum between the free and the activator-bound forms in solution [17] shows a similar profile to the differential spectrum of the nanoencapsulated forms,  $R_A$  against  $T_0$ , verifying that the nanoencapsulated enzyme yields equivalent results as the enzyme in solution (Figure 5D).

The CD spectral change at 274 nm originates in the interactions built by the hydroxyl phenolic oxygen of Tyr254



**Figure 4. Proposed two-step mechanism.** The scheme depicts the mechanism with a fast step of activator binding, followed by a slow tertiary transition. doi:10.1371/journal.pone.0096536.g004

with the neighboring polypeptide chain of the vicinal subunit [19,34]. Tyr254 was already recognized as the origin of this CD reporter signal, because the site-directed Tyr254-Phe mutant does not present this negative CD peak change [19]. These results, taken together, confirm the tertiary origin of the allosteric activation and its independence on the quaternary background of the molecule. This spectral signal detects the occupation state of the allosteric site exclusively in the R quaternary background. The absence of some critical intersubunit contact displacements is reflected on the differential CD spectra given by  $T_{Ar}$  and  $R_{Ar}$  complexes (Figure 5C). Only the tertiary  $r$ -state in an R quaternary background can build these interfacial contacts on the allosteric site, including those involving Tyr254 phenolic hydroxyl group (Figure 6). This property helps to assert the quaternary state in which the enzyme is trapped and demonstrates that the allosteric activation of the nanoencapsulated T conformer occurs independently of the quaternary change and does not involve modifications of the interfacial subunit contacts.

### Structural implications of the dissociation of allosteric activation and cooperativity in the nanoencapsulated EcGNPDA

Previous crystallographic and physicochemical studies indicated the existence of conformational sub-states of the R conformer of EcGNPDA, [14,21] however, its T state remained unexplored from this point of view, mainly due to the short-lived condition of the involved intermediates. Nanoencapsulation of the quaternary-locked conformers of the enzyme resulted particularly suitable for the study of the T state. We have found that GlcNAc6P activates the gel-trapped enzyme with similar catalytic parameters, such as those reported for the enzyme in aqueous phase (Tables 1 and 2). This implies that the enzyme is capable of building all the required interactions with bound GlcNAc6P in order to stabilize the occupied subunit in the high affinity tertiary state. The activation by GlcNAc6P of the subunits in a T background is similar to the activation of the soluble enzyme (Tables 1 and 2). However, the allosteric site presents drastic structural differences when comparing the crystallographic structures of both allosteric conformers. The allosteric site is formed in a cleft between neighboring subunits around the three-fold axis of symmetry of the hexamer (Figure 6). Both sides of the allosteric site in the R conformer have binding contacts with the activator molecule, while the allosteric site of the ligand-free T state appears drastically modified. Our results indicate that under a T quaternary conformation, probably not too different to that shown in Figure 6A, individual subunits are able to undergo a tertiary transition in the presence of GlcNAc6P and build a high-affinity binding site for the substrate. Face A of the allosteric site (Figure 6) is contiguous to the active site and contains most of the GlcNAc6P binding contacts. This is most likely the only face involved in the activator binding in the T state. The other face, containing the N and C-terminal segments of the molecule (face NC in Figure 6), shows two intersubunit interactions that are modified by the quaternary transition and whose role in promoting cooperativity has been demonstrated. [18,19]. These interactions involve two key groups on face NC,

**Table 3.** Relaxation kinetics parameters of the nanoencapsulated ligand-free T conformer of mutant F, upon binding of GlcNAc6P at variable concentrations.

$k_2^a$	$k_{-2}^a$	$K_1^a$	$K_{dis}^b$
$8.6 \times 10^{-5} \pm 0.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$1.30 \times 10^{-4} \pm 0.05 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$19.3 \times 10^{-5} \pm 7.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	$7.7 \times 10^{-5} \pm 2.8 \times 10^{-5} \text{ M}$

<sup>a</sup>Parameters obtained by fitting data in figure 3 to equation 2.

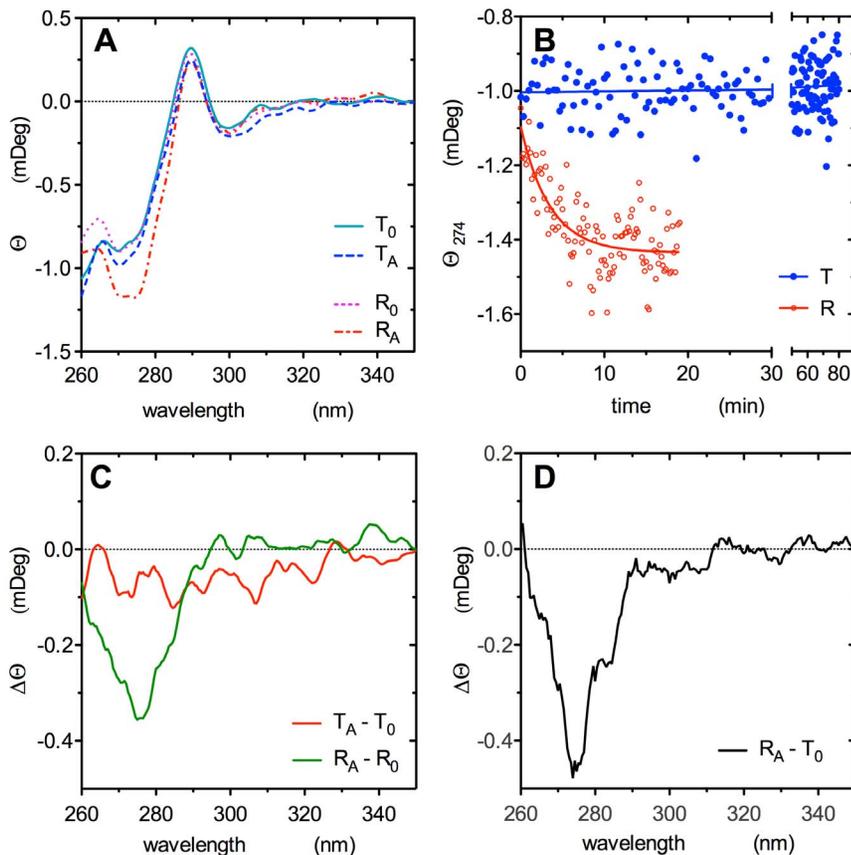
<sup>b</sup>Calculated from equation 3.

doi:10.1371/journal.pone.0096536.t003

both forming contacts with face A. The phenolic hydroxyl group of Tyr254 that forms a direct intersubunit interaction and the N-terminal amino group (face NC) interacting with face A through the phosphate bridge formed by the 6-phospho group of bound GlcNAc6P. The interruption of these contacts was brought about by site-directed mutagenesis or specific chemical modification of N-terminal amino group, respectively. It is worth to remark that these changing contacts of Tyr254 are the origin of CD spectral changes associated with the T-R transition. Both modifications produced velocity *versus* substrate patterns at different GlcNAc6P

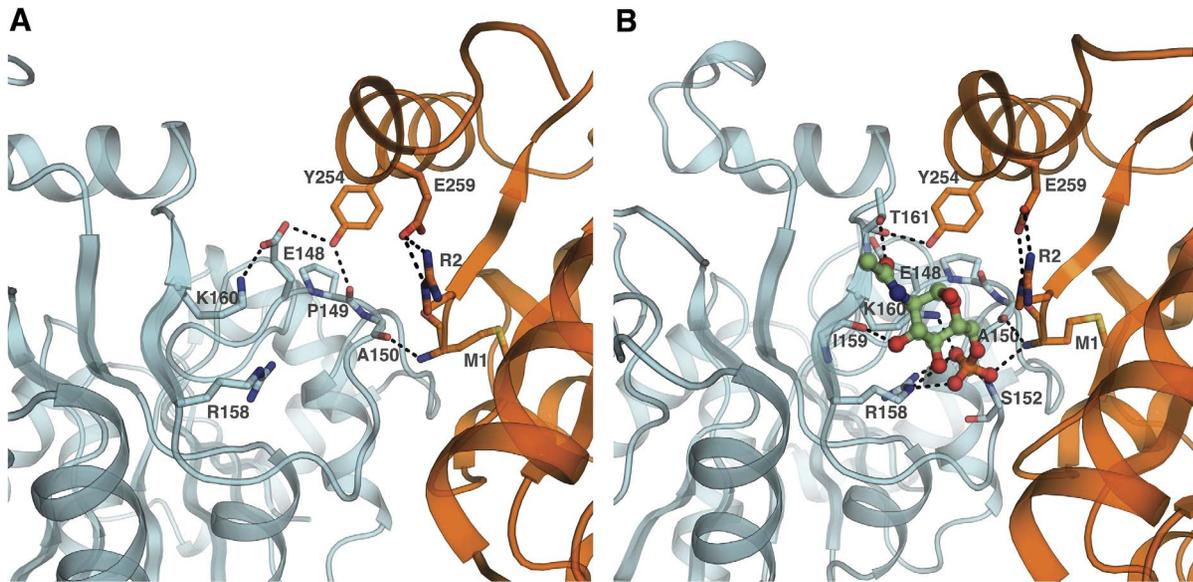
concentrations that resemble those of the allosteric activation of the trapped T conformer.

On the facing side of the allosteric site, some intrasubunit changes involving the active and allosteric sites have been described. Even if we do not know the structural details of the *t-r* transition, some changes observed in the crystallographic structures can be considered as possible components of the intrasubunit conformerization. A striking example is the rotation of the Glu148 side chain that interacts with the catalytic His143 in the R structure and moves in the T state, forming a salt-link with Lys160, on the allosteric site of the same face A [13]. While



**Figure 5. Circular Dichroism spectra of GNPDA-doped gels in the aromatic absorption range.** (A) continuous line, CD spectrum of a monolith doped with ligand-free enzyme in T conformer; dashed line, spectrum of the same T gel equilibrated with 1 mM GlcNAc6P; dotted line, CD spectrum of a monolith doped with ligand-free enzyme in R conformer; dotted-dashed line, spectrum of the same R gel equilibrated with 1 mM GlcNAc6P. (B) Time course of CD change at 274 nm. The ligand-free enzyme nanoencapsulated in either quaternary conformer was added with 1 mM GlcNAc6P: (●), T form; (○), R form. The decay curve given by the R conformer was fitted to a simple exponential function. (C) Differential CD spectrum between the activator-saturated conformers and its correspondent ligand-free forms, showing the ellipticity change of the nanoencapsulated enzyme produced by GlcNAc6P binding. Red line: T<sub>A</sub>-T<sub>0</sub>; green line, R<sub>A</sub> - R<sub>0</sub>. (D) CD spectral difference between the activator-saturated R doped gel and the T<sub>0</sub> gel. These forms of the enzyme are equivalent to the extreme states observed in solution (T<sub>0</sub> and R<sub>A</sub>); this differential spectrum matches with the corresponding spectral changes reported in solution [34].

doi:10.1371/journal.pone.0096536.g005



**Figure 6. EcGNPDA allosteric site represented at each quaternary conformation.** (A) The intersubunit cleft in the T state (PDB 1FSF) and (B) in the R state (PDB 1F55) [14]. Face A is colored in blue and face NC in orange; GlcNAc6P carbons are in green. The allosteric site in both quaternary conformations was oriented with respect to face C to emphasize its changes in relation to face A. The figure shows the cleft between faces A and NC where GlcNAc6P binding site is located, this space narrows on quaternary transition from T to R state; its displacement is blocked in the T gel. In spite of this apparent disruption of the GlcNAc6P binding site, the nanoencapsulated T state enzyme still binds the activator. The shown interactions of this ligand to face A in the R state must be available also in the T conformation. The GlcNAc6P interaction in the face A of the T state can trigger a tertiary activation restricted to its own subunit. The interfacial contacts disrupted in T state must play a critical role in the propagation of cooperativity to the whole hexamer. Images were prepared using PyMOL [37].  
doi:10.1371/journal.pone.0096536.g006

tertiary transition under a T background only modifies GlcNAc6P binding properties of face A, the interfacial interaction appearing in the R state seems to be responsible for coupling the tertiary transitions with the quaternary rearrangement of the whole hexamer.

### Concluding Remarks

We characterized the allosteric activation of the nanoencapsulated T conformer of EcGNPDA under conditions of total suppression of the quaternary transition. Activation by GlcNAc6P is elicited by its binding to face A of each subunit (Figure 6), which undergoes a conformational change. These changes can be interpreted as a transition between two extreme tertiary states  $t$  and  $r$ , respectively, of low and high affinities for its ligands, GlcN6P and GlcNAc6P. Our analyses of GlcNAc6P binding revealed the sequential nature of this conformational change that modifies the binding properties of the active site located in the same subunit. We provided kinetic evidence for the existence of tertiary mixed forms at EcGNPDA T conformers. Our results pointed out the role of the intersubunit contacts between faces A and NC at the allosteric site, in the coupling mechanism of tertiary events to the quaternary T-R transition, which trigger homotropic cooperativity in the free enzyme in solution. The present studies on the T conformer of EcGNPDA shed some light on its coupling

mechanism and explain the easiness of turning  $K$ -type activation into  $V$ -type one by modification of intersubunit contacts. This tertiary-quaternary linkage was firstly described for hemoglobin [23]. It is remarkable that two allosteric proteins without a close evolutionary relationship, such as mammalian hemoglobin and EcGNPDA are so similar in the mechanism linking allosteric effects and cooperativity. The coherence of our results with the postulates of the Tertiary Two-States (TTS) model proposed for hemoglobin [36], is appealing.

### Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Rosario Muñoz-Clares for her critical comments and many fruitful discussions. We are grateful to Prof. Dr. Andrea Mozzarelli for helpful and encouraging discussions and Dr. Barbara Pioselli for helping us in setting up nanoencapsulation conditions for EcGNPDA. We are indebted to Perla Ovseiovich from *Paralelo 19* for help on the striking image design.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SZ MLC. Performed the experiments: SZ LIAA RJVN. Analyzed the data: SZ MLC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLC. Wrote the paper: SZ MLC.

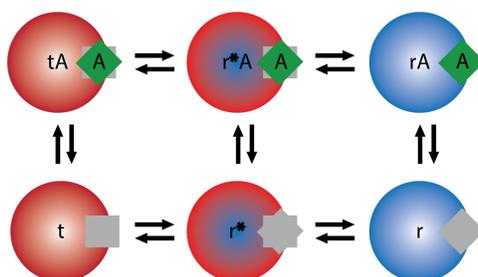
### References

1. Monod J, Changeux JP, Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 6: 306–329.
2. Wyman J Jr (1948) Heme Proteins. *Adv Prot Chem* 4: 407–531.
3. Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12: 88–118.
4. Perutz MF (1989) Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q Rev Biophys* 22: 139–237.
5. Mozzarelli A, Rivetti C, Rossi GL, Henry ER, Eaton WA (1991) Crystals of haemoglobin with the T quaternary structure bind oxygen noncooperatively with no Bohr effect. *Nature* 351: 416–419.
6. Henry ER, Bettati S, Hofrichter J, Eaton WA (2002) A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin. *Biophys Chem* 98: 149–164.

7. Ludwig HC, Herrera R, Reyes AM, Hubert E, Slebe JC (1999) Suppression of kinetic AMP cooperativity of fructose-1, 6-bisphosphatase by carbamoylation of lysine 50. *J Protein Chem* 18: 533–545.
8. Stieglitz K, Stec B, Baker DP, Kantrowitz ER (2004) Monitoring the transition from the T to the R state in *E. coli* aspartate transcarbamoylase by X-ray crystallography: crystal structures of the E50A mutant enzyme in four distinct allosteric states. *J Mol Biol* 341: 853–868.
9. Leloir LF, Cardini CE (1956) Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim Biophys Acta*: 33–42.
10. Midelfort CF, Rose IA (1977) Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* 16: 1590–1596.
11. Calcagno M, Campos PJ, Mulliert G, Suástegui J (1984) Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 787: 165–173.
12. Oliva G, Fontes MR, Garratt RC, Altamirano MM, Calcagno ML, et al. (1995) Structure and catalytic mechanism of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* 3: 1323–1332.
13. Horjales E, Altamirano MM, Calcagno ML, Garratt RC, Oliva G (1999) The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure* 7: 527–537.
14. Rudiño-Piñera E, Morales-Arrieta S, Rojas-Trejo SP, Horjales E (2002) Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 10–20.
15. Cisneros DA, Montero-Morán GM, Lara-González S, Calcagno ML (2004) Inversion of the allosteric response of *Escherichia coli* glucosamine-6-P deaminase to *N*-acetylglucosamine 6-P, by single amino acid replacements. *Arch Biochem Biophys* 421: 77–84.
16. Bustos-Jaimes I, Calcagno ML (2001) Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 394: 156–160.
17. Bustos-Jaimes I, Sosa-Peinado A, Rudiño-Piñera E, Horjales E, Calcagno ML (2002) On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase. *J Mol Biol* 319: 183–189.
18. Lara-González S, Dixon HB, Mendoza-Hernández G, Altamirano MM, Calcagno ML (2000) On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 301: 219–227.
19. Montero-Morán GM, Horjales E, Calcagno ML, Altamirano MM (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.
20. Bustos-Jaimes I, Ramírez-Costa M, De Anda-Aguilar L, Hinojosa-Ocaña P, Calcagno ML (2005) Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* 44: 1127–1135.
21. Sosa-Peinado A, González-Andrade M (2005) Site-directed fluorescence labeling reveals differences on the R-conformer of glucosamine 6-phosphate deaminase of *Escherichia coli* induced by active or allosteric site ligands at steady state. *Biochemistry* 44: 15083–15092.
22. Shibayama N, Saigo S (1995) Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels. *J Mol Biol* 251: 203–209.
23. Bruno S, Bonaccio M, Bettati S, Rivetti C, Viappiani C, et al. (2001) High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin. *Protein Sci* 10: 2401–2407.
24. Viappiani C, Bettati S, Bruno S, Ronda L, Abbruzzetti S, et al. (2004) New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14414–14419.
25. McIninch JK, Kantrowitz ER (2001) Use of silicate sol-gels to trap the R and T quaternary conformational states of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1547: 320–328.
26. West JM, Kantrowitz ER (2003) Trapping specific quaternary states of the allosteric enzyme aspartate transcarbamoylase in silica matrix sol-gels. *J Am Chem Soc* 125: 9924–9925.
27. Leloir LF, Cardini CE (1962) Glucosamine-6-phosphate Deaminase from Pig Kidney. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods Enzymol*. New York: Academic Press. pp. 418–422.
28. Altamirano MM, Plumbridge JA, Calcagno ML (1992) Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their functional role by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31: 1153–1158.
29. Altamirano MM, Plumbridge JA, Hernández-Arana A, Calcagno M (1991) Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1076: 266–272.
30. Bettati S CB, Viappiani C, Mozzarelli A (2004) Protein-doped nanoporous silica gels. In: Nalwa HS, editor. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. CA, USA: American Scientific Publishers. pp. 81–103.
31. Ellerby LM, Clinton RN, Nishida F, Yamanaka SA, Dunn B, et al. (1992) Encapsulation of Proteins in Transparent Porous Silicate Glasses Prepared by the Sol-Gel Method. *Science* 255: 1113–1115.
32. Pioselli B, Bettati S, Mozzarelli A (2005) Confinement and crowding effects on tryptophan synthase alpha2 beta2 complex. *FEBS letters* 579: 2197–2202.
33. Hiromi K (1979) *Kinetic of fast enzyme reactions: Theory and practice*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto: Halsted press (John Wiley & Sons).
34. Altamirano MM, Hernández-Arana A, Tello-Solís S, Calcagno ML (1994) Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 220: 409–413.
35. Fasman GD (1996) *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*: Springer.
36. Eaton WA, Henry ER, Hofrichter J, Bettati S, Viappiani C, et al. (2007) Evolution of allosteric models for hemoglobin. *IUBMB Life* 59: 586–599.
37. Schrodinger LLC (2010) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*.

## Apéndice 2. Simulación del comportamiento de $k_{obs}$ con ecuaciones para un sistema acoplado de tres estados conformacionales.

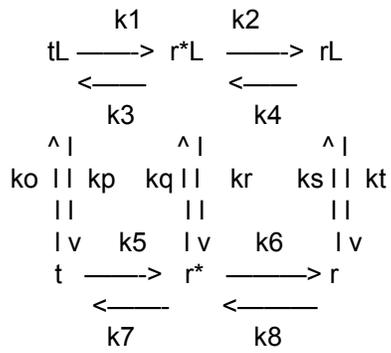
Logramos reproducir el patrón de velocidad de relajación contra concentración de activador alostérico observado experimentalmente, a través de simulaciones numéricas utilizando Wolfram Mathematica 11. Los mecanismos conformacionales de dos especies de dos pasos tienen una solución analítica mientras que el mecanismo acoplados de dos especies y otras complicaciones solo pueden ser simulados numéricamente planteando las matrices de ecuaciones con el método de Vogt *Et al.* <sup>14,26</sup>



Esquema del mecanismo acoplado de tres estados conformacionales. Se muestran las 6 especies que conforman los tres estados conformacionales con su estado ligante. Las rutas de ajuste inducido y selección conformacional están acopladas en el mecanismo.

A continuación, se muestran las simulaciones obtenidas con Mathematica. Los comportamientos observados en el cuarto y quinto valor propio son similares a los que se obtienen experimentalmente.

■ Modelo:



■ ODEs

- $dt/dt = tA - kp + r^*k_7 - t(koL + k_5)$
- $dtL/dt = tkoL + r^*Ak_3 - tA(kp + k_1)$
- $dr^*L/dt = tAk_1 + rAk_4 + r^*kqL - r^*A(k_3 + k_2 + kr)$
- $drA/dt = r^*Ak_2 + rksL - rA(k_4 + kt)$
- $dr/dt = rAkt + r^*k_6 - r(ksL + k_8)$
- $dr^*/dt = tk_5 + r^*Akr + rk_8 - r^*(k_7 + kqL + k_6)$

■ Matriz de velocidad

$k_1 = 0.000272$   
 $k_2 = 0.00009219$   
 $k_3 = 0.00006793$   
 $k_4 = 0.0001787$   
 $k_5 = 0.00003743$   
 $k_6 = 0.0001259$   
 $k_7 = 0.00024$   
 $k_8 = 0.0002666$   
 $k_o = 0.001018$   
 $k_p = 0.00015$   
 $k_q = 0.1018$   
 $k_r = 0.00382$   
 $k_s = 0.0075$   
 $k_t = 0.0007378$

0.000272

0.00009219

0.00006793

0.0001787

0.00003743

0.0001259

0.00024

0.0002666

0.001018

0.00015

0.1018

0.00382

0.0075

0.0007378

$A = \{ \{ -((k_o * L) + k_5), k_p, 0, 0, 0, k_7 \}, \{ k_o * L, -(k_p + k_1), k_3, 0, 0, 0 \},$   
 $\{ 0, k_1, -(k_2 + k_3 + k_r), k_4, 0, k_q * L \}, \{ 0, 0, k_2, -(k_4 + k_t), k_s * L, 0 \},$   
 $\{ 0, 0, 0, k_t, -((k_s * L) + k_8), k_6 \}, \{ k_5, 0, k_r, 0, k_8, -(k_7 + (k_q * L) + k_6) \} \}$   
 $\{ \{ -0.00003743 - 0.001018 L, 0.00015, 0, 0, 0, 0.00024 \},$   
 $\{ 0.001018 L, -0.000422, 0.00006793, 0, 0, 0 \},$   
 $\{ 0, 0.000272, -0.00398012, 0.0001787, 0, 0.1018 L \},$   
 $\{ 0, 0, 0.00009219, -0.0009165, 0.0075 L, 0 \},$   
 $\{ 0, 0, 0, 0.0007378, -0.0002666 - 0.0075 L, 0.0001259 \},$   
 $\{ 0.00003743, 0, 0.00382, 0, 0.0002666, -0.0003659 - 0.1018 L \} \}$

■ Experimental data

```
S = {{0.01, 0.0001897850}, {0.02, 0.0001623570},
      {0.03, 0.0001413280}, {0.05, 0.0001199340}, {0.1, 0.0001043610},
      {0.2, 0.0001046720}, {0.3, 0.0000919964}, {0.5, 0.0000816291},
      {0.75, 0.0000891298}, {1, 0.0000681160}, {2, 0.0000787055}}
```

```
{{-k5 - ko L, kp, 0, 0, 0, k7}, {ko L, -k1 - kp, k3, 0, 0, 0},
  {0, k1, -k2 - k3 - kr, k4, 0, kq L}, {0, 0, k2, -k4 - kt, ks L, 0},
  {0, 0, 0, kt, -k8 - ks L, k6}, {k5, 0, kr, 0, k8, -k6 - k7 - kq L}}
```

```
MatrixForm[{{-k5 - ko L, kp, 0, 0, 0, k7}, {ko L, -k1 - kp, k3, 0, 0, 0},
             {0, k1, -k2 - k3 - kr, k4, 0, kq L}, {0, 0, k2, -k4 - kt, ks L, 0},
             {0, 0, 0, kt, -k8 - ks L, k6}, {k5, 0, kr, 0, k8, -k6 - k7 - kq L}}]
```

**B = -Eigenvalues[A]**

```
{-Root[8.36539 × 10-31 + 1.85842 × 10-28 L + 4.9558 × 10-27 L2 + 3.86552 × 10-26 L3 +
(1.53402 × 10-10 + 2.79449 × 10-9 L + 2.58975 × 10-8 L2 + 8.58212 × 10-8 L3) #1 +
(1.88111 × 10-6 + 0.0000441731 L + 0.000297774 L2 + 0.00061082 L3) #12 +
(0.00738326 + 0.187309 L + 1.04662 L2 + 1. L3) #13 + (11.9924 + 291.796 L + 1125.47 L2)
#14 + (7704.86 + 141935. L) #15 + 1.2866 × 106 #16 &, 1],
-Root[8.36539 × 10-31 + 1.85842 × 10-28 L + 4.9558 × 10-27 L2 + 3.86552 × 10-26 L3 +
(1.53402 × 10-10 + 2.79449 × 10-9 L + 2.58975 × 10-8 L2 + 8.58212 × 10-8 L3) #1 +
(1.88111 × 10-6 + 0.0000441731 L + 0.000297774 L2 + 0.00061082 L3) #12 +
(0.00738326 + 0.187309 L + 1.04662 L2 + 1. L3) #13 + (11.9924 + 291.796 L + 1125.47 L2)
#14 + (7704.86 + 141935. L) #15 + 1.2866 × 106 #16 &, 2],
-Root[8.36539 × 10-31 + 1.85842 × 10-28 L + 4.9558 × 10-27 L2 + 3.86552 × 10-26 L3 +
(1.53402 × 10-10 + 2.79449 × 10-9 L + 2.58975 × 10-8 L2 + 8.58212 × 10-8 L3) #1 +
(1.88111 × 10-6 + 0.0000441731 L + 0.000297774 L2 + 0.00061082 L3) #12 +
(0.00738326 + 0.187309 L + 1.04662 L2 + 1. L3) #13 + (11.9924 + 291.796 L + 1125.47 L2)
#14 + (7704.86 + 141935. L) #15 + 1.2866 × 106 #16 &, 3],
-Root[8.36539 × 10-31 + 1.85842 × 10-28 L + 4.9558 × 10-27 L2 + 3.86552 × 10-26 L3 +
(1.53402 × 10-10 + 2.79449 × 10-9 L + 2.58975 × 10-8 L2 + 8.58212 × 10-8 L3) #1 +
(1.88111 × 10-6 + 0.0000441731 L + 0.000297774 L2 + 0.00061082 L3) #12 +
(0.00738326 + 0.187309 L + 1.04662 L2 + 1. L3) #13 + (11.9924 + 291.796 L + 1125.47 L2)
#14 + (7704.86 + 141935. L) #15 + 1.2866 × 106 #16 &, 4],
-Root[8.36539 × 10-31 + 1.85842 × 10-28 L + 4.9558 × 10-27 L2 + 3.86552 × 10-26 L3 +
(1.53402 × 10-10 + 2.79449 × 10-9 L + 2.58975 × 10-8 L2 + 8.58212 × 10-8 L3) #1 +
(1.88111 × 10-6 + 0.0000441731 L + 0.000297774 L2 + 0.00061082 L3) #12 +
(0.00738326 + 0.187309 L + 1.04662 L2 + 1. L3) #13 + (11.9924 + 291.796 L + 1125.47 L2)
#14 + (7704.86 + 141935. L) #15 + 1.2866 × 106 #16 &, 5],
-Root[8.36539 × 10-31 + 1.85842 × 10-28 L + 4.9558 × 10-27 L2 + 3.86552 × 10-26 L3 +
(1.53402 × 10-10 + 2.79449 × 10-9 L + 2.58975 × 10-8 L2 + 8.58212 × 10-8 L3) #1 +
(1.88111 × 10-6 + 0.0000441731 L + 0.000297774 L2 + 0.00061082 L3) #12 +
(0.00738326 + 0.187309 L + 1.04662 L2 + 1. L3) #13 + (11.9924 + 291.796 L + 1125.47 L2)
#14 + (7704.86 + 141935. L) #15 + 1.2866 × 106 #16 &, 6]}
```

Show[Plot[B[[1]], {L, 0, 1}], Frame → True]

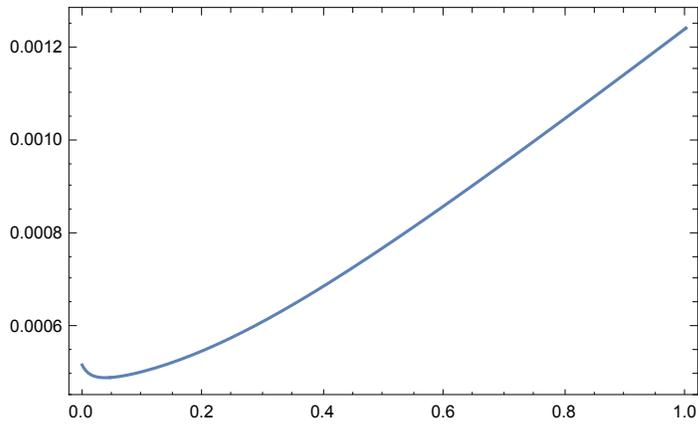
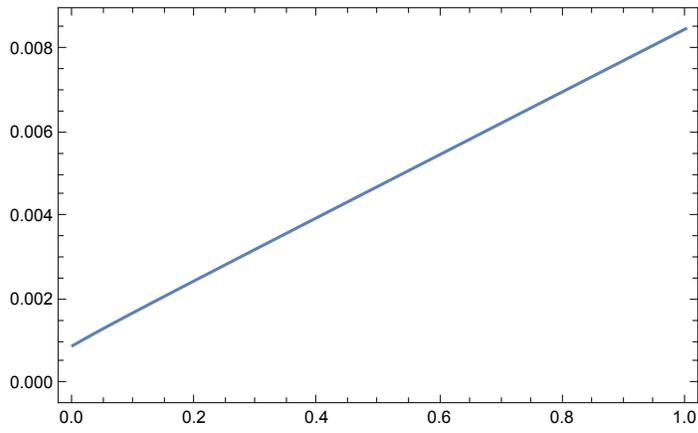
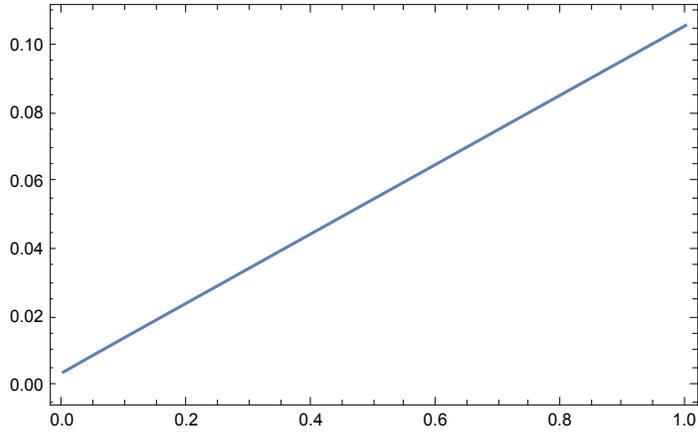
Show[Plot[B[[2]], {L, 0, 1}], Frame → True]

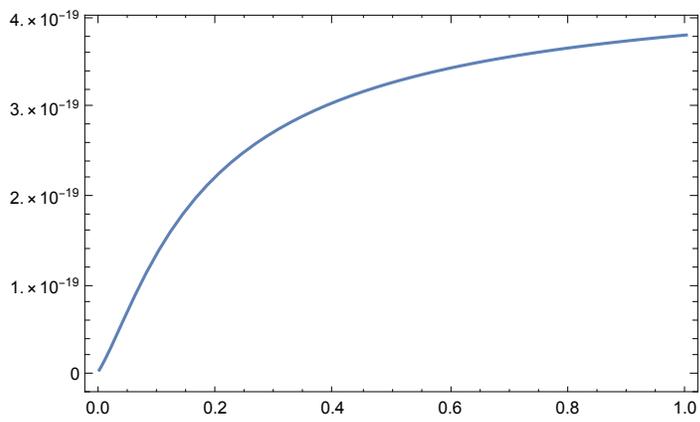
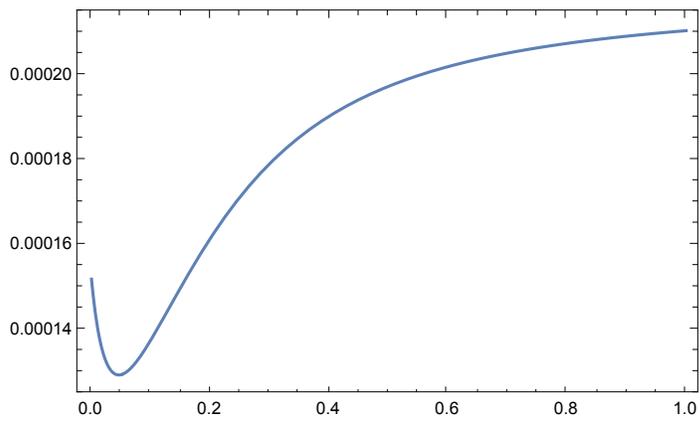
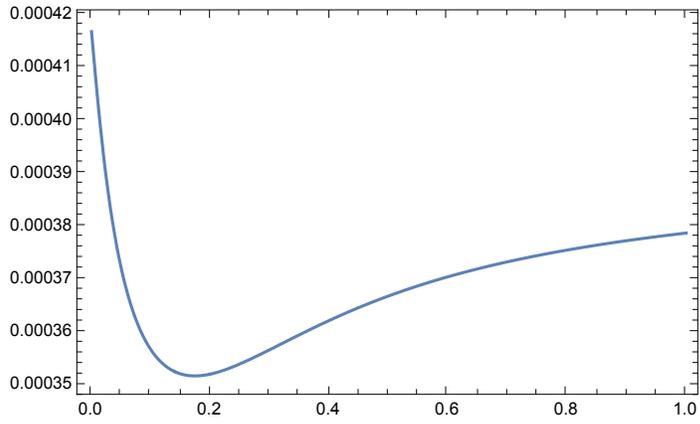
Show[Plot[B[[3]], {L, 0, 1}], Frame → True]

Show[Plot[B[[4]], {L, 0, 1}], Frame → True]

Show[Plot[B[[5]], {L, 0, 1}], Frame → True]

Show[Plot[B[[6]], {L, 0, 1}], Frame → True]





## Referencias

- [1] Mizraji, E. (1999) *El segundo secreto de la vida: la evolución biológica, la cibernética y las moléculas: crónica de un encuentro*, Ediciones Trilce, Montevideo.
- [2] Monod, J., Changeux, J. P., and Jacob, F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems, *J. Mol. Biol.* 6, 306-329.
- [3] Jacob, F., and Monod, J. (1961) On the regulation of gene activity, In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp 193-211, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [4] Changeux, J. P., and Edelstein, S. J. (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction, *Science* 308, 1424-1428.
- [5] Hervé, G. (1989) *Alliosteric Enzymes*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- [6] Hilser, V. J. (2010) An ensemble view of allostery, *Science* 327, 653-654.
- [7] Hilser, V. J., Wrabl, J. O., and Motlagh, H. N. (2012) Structural and energetic basis of allostery, *Annual review of biophysics* 41, 585-609.
- [8] Wyman, J., and Gill, S. J. (1990) *Binding and linkage : functional chemistry of biological macromolecules*, University Science Books, Mill Valley, Cali.
- [9] Koshland, D. E., Jr., Nemethy, G., and Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry* 5, 365-385.
- [10] Weikl, T. R., and Paul, F. (2014) Conformational selection in protein binding and function, *Protein science : a publication of the Protein Society* 23, 1508-1518.
- [11] Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model, *Journal of Molecular Biology* 12, 88-118.
- [12] Nussinov, R., and Tsai, C.-J. (2015) Allostery without a conformational change? Revisiting the paradigm, *Current Opinion in Structural Biology* 30, 17-24.
- [13] Zhuravlev, P. I., and Papoian, G. A. (2010) Protein functional landscapes, dynamics, allostery: a tortuous path towards a universal theoretical framework, *Quart. Rev. Biophys.* 43, 295-332.
- [14] Vogt, A. D., Pozzi, N., Chen, Z., and Di Cera, E. (2014) Essential role of conformational selection in ligand binding, *Biophysical Chemistry* 186, 13-21.
- [15] Cornish-Bowden, A. (2014) Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes, *The FEBS journal* 281, 621-632.
- [16] Segel, I. H. (1975) *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*, Wiley, New York.
- [17] Szabo, A., and Karplus, M. (1972) A mathematical model for structure-function relations in hemoglobin, *Journal of molecular biology* 72, 163-197.
- [18] Mozzarelli, A., Rivetti, C., Rossi, G. L., Henry, E. R., and Eaton, W. A. (1991) Crystals of haemoglobin with the T quaternary structure bind oxygen noncooperatively with no Bohr effect, *Nature* 351, 416-419.
- [19] Eaton, W. A., Henry, E. R., Hofrichter, J., Bettati, S., Viappiani, C., and Mozzarelli, A. (2007) Evolution of allosteric models for hemoglobin, *IUBMB Life* 59, 586-599.
- [20] Henry, E. R., Jones, C. M., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1997) Can a two-state MWC allosteric model explain hemoglobin kinetics?, *Biochemistry* 36, 6511-6528.
- [21] Henry, E. R., Bettati, S., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (2002) A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin, *Biophys Chem* 98, 149-164.
- [22] Viappiani, C., Bettati, S., Bruno, S., Ronda, L., Abbruzzetti, S., Mozzarelli, A., and Eaton, W. A. (2004) New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14414-14419.
- [23] Paul, F., and Weikl, T. R. (2016) How to Distinguish Conformational Selection and Induced Fit Based on Chemical Relaxation Rates, *PLOS Computational Biology* 12, e1005067.

- [24] Hiromi., K. (1979) Kinetic of fast enzyme reactions: Theory and practice, Halsted press (John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto), New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- [25] Bernasconi, C. F. (1976) *Relaxation kinetics*, Academic Press, New York.
- [26] Vogt, A. D., and Di Cera, E. (2012) Conformational Selection or Induced Fit? A Critical Appraisal of the Kinetic Mechanism, *Biochemistry* 51, 5894-5902.
- [27] Vogt, A. D., and Di Cera, E. (2013) Conformational Selection Is a Dominant Mechanism of Ligand Binding, *Biochemistry* 52, 5723-5729.
- [28] Chakraborty, P., and Di Cera, E. (2017) Induced fit is a special case of conformational selection, *Biochemistry* 56, 2853-2859.
- [29] Plumbridge, J. A. (1990) Induction of the nag regulon of Escherichia coli by N-acetylglucosamine and glucosamine: role of the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in expression of the regulon, *J Bacteriol* 172, 2728-2735.
- [30] Plumbridge, J. (2001) DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of nagE, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in Escherichia coli, *Nucleic Acids Res* 29, 506-514.
- [31] Álvarez-Añorve, L. I., Gaugué, I., Link, H., Marcos-Viquez, J., Díaz-Jiménez, D. M., Zonszein, S., Bustos-Jaimes, I., Schmitz-Afonso, I., Calcagno, M. L., and Plumbridge, J. (2016) Allosteric activation of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase (NagB) in vivo justified by intracellular amino sugar metabolite concentrations, *J. Bact.* 198, 1610-1620.
- [32] Alvarez-Anorve, L. I., Alonzo, D. A., Mora-Lugo, R., Lara-Gonzalez, S., Bustos-Jaimes, I., Plumbridge, J., and Calcagno, M. L. (2011) Allosteric kinetics of the isoform 1 of human glucosamine-6-phosphate deaminase, *Biochimica et biophysica acta* 1814, 1846-1853.
- [33] Lara-Gonzalez, S., Dixon, H. B., Mendoza-Hernandez, G., Altamirano, M. M., and Calcagno, M. L. (2000) On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli, *J Mol Biol* 301, 219-227.
- [34] Montero-Moran, G. M., Horjales, E., Calcagno, M. L., and 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.
- [35] Cisneros, D. A., Montero-Moran, G. M., Lara-Gonzalez, S., and 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.
- [36] Lara-González, S. (2011) Desencadenamiento y propagación de la de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, In *Facultad de Química*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [37] Ronda, L., Bruno, S., Faggiano, S., Bettati, S., and Mozzarelli, A. (2008) Oxygen binding to heme proteins in solution, encapsulated in silica gels, and in the crystalline state, *Methods Enzymol* 437, 311-328.
- [38] Viappiani, C., Bettati, S., Bruno, S., Ronda, L., Abbruzzetti, S., Mozzarelli, A., and Eaton, W. A. (2004) New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels, *Proc Natl Acad Sci* 101, 14414-14419.
- [39] McIninch, J. K., and Kantrowitz, E. R. (2001) Use of silicate sol-gels to trap the R and T quaternary conformational states of pig kidney fructose-1, 6-bisphosphatase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1547, 320-328.
- [40] West, J. M., and Kantrowitz, E. R. (2003) Trapping Specific Quaternary States of the Allosteric Enzyme Aspartate Transcarbamoylase in Silica Matrix Sol- Gels, *Journal of the American Chemical Society* 125, 9924-9925.

- [41] Ronda, L., Bruno, S., Campanini, B., Mozzarelli, A., Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Cupane, A., Levantino, M., and Bettati, S. (2015) Immobilization of Proteins in Silica Gel: Biochemical and Biophysical Properties, *Current Organic Chemistry* 19, 1653-1668.
- [42] Shibayama, N., and Saigo, S. (2001) Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin, *FEBS Lett* 492, 50-53.
- [43] Shibayama, N., and Saigo, S. (1995) Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels, *J. Mol. Biol.* 251, 203-209.
- [44] Bettati, S., and Mozzarelli, A. (1997) T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate and chloride, *J. Biol. Chem.* 272, 32050.
- [45] McIninch, J. K., and Kantrowitz, E. R. (2001) Use of silicate sol-gels to trap the R and T quaternary conformational states of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase, *Biochim Biophys Acta* 1547, 320-328.
- [46] Mozzarelli, A. a. B., S., and (2001) Functional properties of immobilized proteins, (Nalwa, H. S., Ed.), pp 55-97, Gordon and Breach Science Publishers, Tokio,.
- [47] Sosa-Peinado, A., and Gonzalez-Andrade, M. (2005) Site-directed fluorescence labeling reveals differences on the R-conformer of glucosamine 6-phosphate deaminase of Escherichia coli induced by active or allosteric site ligands at steady state, *Biochemistry* 44, 15083-15092.
- [48] Vázquez-Núñez, R. J. (2015) El mecanismo de activación alostérica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de escherichia coli en conformación R., In *Posgrado en ciencias bioquímicas*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [49] Zonszein, S., Álvarez-Añorve, L. I., Vázquez-Núñez, R. J., and Calcagno, M. L. (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.
- [50] Altamirano, M. M., Hernandez-Arana, A., Tello-Solis, S., and Calcagno, M. L. (1994) Spectrochemical evidence for the presence of a tyrosine residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from Escherichia coli, *Eur J Biochem* 220, 409-413.
- [51] Roe, J. H., Epstein, J. H., and Goldstein, N. P. (1949) A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine, *J. Biol. Chem* 178, 845.
- [52] Cottone, G., Giuffrida, S., Bettati, S., Bruno, S., Campanini, B., Marchetti, M., Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Cupane, A., and Mozzarelli, A. (2019) More than a Confinement: "Soft" and "Hard" Enzyme Entrapment Modulates Biological Catalyst Function, *Catalysts* 9, 1024.
- [53] Bustos-Jaimes, I., Sosa-Peinado, A., Rudino-Pinera, E., Horjales, E., and 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, *J Mol Biol* 319, 183-189.
- [54] Montero-Moran, G. M., Lara-Gonzalez, S., Alvarez-Anorve, L. I., Plumbridge, J. A., and Calcagno, M. L. (2001) On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of Escherichia coli glucosamine 6-phosphate deaminase, *Biochemistry* 40, 10187-10196.
- [55] Rudino-Pinera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo, S. P., and Horjales, E. (2002) Structural flexibility, an essential component of the allosteric activation in Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 10-20.
- [56] Bustos-Jaimes, I., and Calcagno, M. L. (2001) Allosteric transition and substrate binding are entropy-driven in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 156-160.
- [57] Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G., and Suastegui, J. (1984) Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*, *Biochimica et biophysica acta* 787, 165-173.

- [58] Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* *150*, 76-85.
- [59] Ronda, L., Stefano, B., Barbara, C., Andrea, M., Stefania, A., Cristiano, V., Antonio, C., Matteo, L., and Stefano, B. (2015) Immobilization of Proteins in Silica Gel: Biochemical and Biophysical Properties, *Curr. Org. Chem.* *19*, 1653-1668.