



03072

y
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIOS CRISTALOGRAFICOS DEL
COMPLEJO GLUCOSAMINA 6-
FOSFATO DESAMINASA DE *E. coli* CON
SU ACTIVADOR ALOSTERIC (N-
ACETIL GLUCOSAMINA 6-FOSFATO)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:

Q.I. SANDRA MORALES ARRIETA

DIRIGIDA POR: DR. EDUARDO HORJALES R.

0273090

CUERNAVACA, MOR., NOVIEMBRE DE ~~1999~~.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



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.

JURADO REVISOR

DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA-CANALES.

DR. EDUARDO HORJALES R.

DRA. ADELA RODRIGUEZ ROMERO.

DRA. GLORIA SAAB RINCON.

DR. JOEL OSUNA QUINTERO.

AGRADECIMIENTOS

A mis *padres*, por apoyarme todo el tiempo.

A *Perla* por compartir día a día las cosas buenas y malas de la vida.

A *René*, mi todo.

A *Mary Cruz* porque a pesar del tiempo aún sigues siendo mi mejor amiga.

A *Homero* por su invaluable amistad.

A *Julia*, por estar aquí apoyándonos en todo.

A los unidosos (*Paul, Eugenio y Jorge*) por su gran amistad y permitir la culminación de este trabajo, ahh ya compren otra compu !!!

A mis compañeros de laboratorio: *Enrique, Gaby, Rodrigo, Bárbara, Eduardo, Sonia, Chayo, Lulú* que de alguna manera contribuyeron a la realización de este proyecto.

A *Irma y Mónica* gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas y recuerden que "la vida no vale nada".

Al *Fily*, al *Pancho* y al *Fer* por hacer algunos días mas amenos.

A mis compañeros de generación con los que inicié este difícil camino de la ciencia.

A Dios y a la vida, por coincidir...

Al **Instituto de Biotecnología** por permitirme realizar mis estudios de posgrado así como también por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo el proyecto de investigación.

A mi comité tutorial **Dr. Eduardo Horjales, Dra. Alejandra Bravo** y **Dr. Humberto Flores**, que durante el transcurso de la maestría enriquecieron mi formación académica y de investigación.

Al comité revisor **Dr. Agustín López Munguía, Dr. Eduardo Horjales, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Joel Osuna Quintero**, que con sus fructíferos comentarios enriquecieron este manuscrito.

Al **M en B Enrique Rudiño Piñera** por su asesoría en la parte computacional así como también por sus comentarios y sugerencias que contribuyeron enormemente para la realización de este proyecto. Al **Bíol. Rodrigo Arreola** por su ayuda computacional.

Al **M en B René Hernández Vargas** por sus críticas e ideas para la realización de éste manuscrito.

Al **Dr. Mario Calcagno** por proporcionarnos la enzima purificada.

Al **CONACyT** por la beca-crédito que me otorgaron para la realización de los estudios de maestría (No. de registro 117001), así como también al complemento de beca proporcionado por **DGAPA**.

INDICE GENERAL

	Número de página
Introducción	1
Generalidades	4
Enzimas alostéricas	5
Determinación de estructura de proteínas	7
RMN	8
Cristalografía de rayos X	9
Cristalización	11
Antecedentes	15
Características	16
Purificación de la enzima	17
Estructura tridimensional	18
Mecanismo catalítico a través de un modelo cristalográfico	23
Objetivos	28
Parte experimental	30
Cristalización	31
Determinación de la estructura cristalográfica	36
Resultados y discusión	39
Parte I - Cristalización	40
Parte II - Resolución de las estructuras	43
Resolución de la primera estructura	45
Resolución de la segunda estructura	46
Resolución de la tercera estructura	52
Parte III - Sobreposición de estructuras	56
Parte IV - Comparación gráfica de los factores de temperatura B.	61
Conclusiones	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PIE DE FIGURA	PAGINA
1	Curvas de velocidad de dos enzimas diferentes que tienen coincidentalmente la misma velocidad a una $[S]=9$, a) curva hiperbólica y b) curva sigmoideal.	6
2	El modelo secuencial nos muestra que la unión a sustrato de estado T (baja afinidad), induce cambios conformacionales en subunidades no ligadas, este cambio les da afinidades de unión a ligando entre estados de baja y alta afinidad (estado R).	7
3	Modelo de simetría en donde se observa el efecto heterotrópico producido cuando sustratos y activadores, se unen al estado R e inhibidores se unen preferentemente al estado T.	8
4	Compuestos utilizados como activador alostérico (N-acetilglucosamina 6-fosfato) y el inhibidor competitivo (2-deoxi-2 amino D-glucitol 6-fosfato).	19
5	Diagrama de topología de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de <i>E. coli</i>	21
6	Hexámero de Glucosamina 6-fosfato desaminasa de <i>E. coli</i> visto desde el eje de orden 3.	22
7	Mecanismo catalítico para GlcN6P desaminasa.	26
8	Cristal de Glucosamina 6-fosfato desaminasa de <i>E. coli</i> (ensayo no. 2), crecido en acetato de sodio 2.1 M en hepes 100 mM pH 6.3 sin activador.	42
9	Complejo cristalino enzima-activador a muy bajas concentraciones, crecido en tartrato de sodio y potasio 0.75 M en hepes 200 mM pH 7 activador 50 μ M.	43
10	Mapas de densidad electrónica a 1 sigma del complejo enzima-activador mostrando los sitios activo (a) y alostérico (b), ocupados.	47
11	Sitio activo vacío del complejo Glucosamina 6-fosfato desaminasa con activador presente en trazas, en la parte central podemos observar fructosa 6-fosfato que se colocó para mostrar que en el sitio activo, efectivamente no hay densidad electrónica en el mapa que nos indique la presencia de ligantes.	51

12	Sitio alostérico ocupado por GlcNAc6P en cristal de forma R a pH 6.3.	52
13	Molécula de ácido tartárico encontrada en el sitio activo del monómero 1 a 1 sigma. En la parte central de la figura podemos observar una molécula de fructosa 6-fosfato (azul) que nos muestra que en ese sitio no hay densidad electrónica para una molécula activador pero si para una molécula de ácido tartárico.	57
14	Sitio alostérico con una molécula de activador en el monómero 1 de Dae0.	58
15	Sitio activo vacío encontrado en el monómero 2 de Glc6P desaminasa de <i>E. coli</i> con 50 μ M de activador. Se colocó fructosa 6-fosfato para mostrar la ausencia de densidad electrónica para una molécula de activador.	59
16	Sitio alostérico ocupado por una molécula de activador en el monómero 2 de Dae0, a 1 σ .	60
17	Sobreposición de los carbonos α de Dae0 y Frur con un RMSD de 0.23 Å excepto en las asas vecinas (residuos 73-83, 109-117, 144-146), tapa del sitio activo (residuos 162-185) y el C-terminal (residuos 264-266). Azul indica menor movilidad, verde mayor movilidad.	61
18	Comparación de los factores de temperatura de los residuos 1-161.	64
19	Comparación de los factores de temperatura de los residuos 162-185.	65
20	Comparación de los factores de temperatura de los residuos 186-266.	66

En los últimos años, el interés primordial del laboratorio de cristalografía de proteínas en una de sus líneas de investigación ha sido el estudio de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa, obtenida de diversas fuentes, como *E. coli*, *Candida albicans* y de humano. Esta enzima es un buen modelo de estudio para enzimas reguladas alostéricamente, ya que tiene un papel central en el balance de la síntesis de aminoazúcares, así como su utilización debido a sus propiedades alostéricas.

Hasta la fecha, se ha reportado en la literatura la estructura cristalográfica del confórmero en estado R y del confórmero en estado T. La determinación de la estructura de los confórmeros, nos proporcionó las bases para entender un poco más sobre su modo de acción y la naturaleza de los cambios conformacionales que regulan su función.

El estado R tiene alta afinidad por el sustrato y activador mientras que el estado T presenta baja o nula afinidad por el sustrato. En este contexto, la transición alostérica entre dichos estados (R y T) puede ser explicada a través de cambios conformacionales entre los confórmeros, pero el uso de datos de difracción a alta resolución (los cuales validan el uso de factores de temperatura B) permite observar los componentes vibracionales entre las formas R y T, principalmente en la tapa del sitio activo (residuos 162-185).

A través del método de difusión de vapor, obtuvimos cristales del complejo Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli* con su activador alostérico (N-acetil glucosamina 6-fosfato) en cantidades traza. Mediante difracción de rayos X se resolvió la estructura cristalográfica, y los datos obtenidos nos mostraron el sitio activo vacío y el sitio alostérico ocupado por una molécula de activador.

La sobreposición de los carbonos α de esta estructura con un confórmero R que tiene el sitio activo y el alostérico ocupados por fructosa 6-fosfato, mostró un RMSD de 0.230 Å considerando 215 átomos. Este resultado nos indica que ambas estructuras tienen un RMSD menor al error experimental (0.25 Å) considerándose geoméricamente iguales con excepción de los residuos 74-83, 109-117, 144-146, 160-185 y 264-266

los cuales presentan una diferencia entre las posiciones de los carbonos α equivalentes mayores a 0.5 Å .

Se realizó la comparación gráfica de los factores de temperatura de tres estructuras:

- 1.- confórmero T con los sitios activo y alostérico vacíos,
- 2.- confórmero R con los sitios activo y alostérico ocupados y
- 3.- confórmero R con el sitio activo vacío y el alostérico ocupado.

Esta comparación nos mostró un comportamiento uniforme entre ellas, excepto en los residuos 71-82, 110-113, 143-148, 161-184 y 251-266, los cuales corresponden a las mismas zonas con mayor diferencia en RMSD; estas diferencias estructurales son debidas a una mayor vibración atómica de estas regiones las cuales estan relacionadas a la tapa del sitio activo (residuos 162-185), asas vecinas y el carboxilo terminal (251-266).

Las principales diferencias entre las estructuras del confórmero R con el sitio activo y alostérico ocupados, y el confórmero R con el sitio activo vacío y el alostérico ocupado está en la distribución de los factores de temperatura, poniendo en evidencia que la ocupación del sitio activo produce una disminución de los factores de temperatura de la tapa del sitio activo y asas vecinas. Por lo tanto, en nuestra estructura existe una componente vibracional en la tapa del sitio activo que esta asociada a la ocupación del sitio activo por el activador.

ENZIMAS ALOSTERICAS

De acuerdo con la propuesta de Jacob y Monod (Monod & Jacob, 1961) consideramos como un grupo separado a las enzimas cuya actividad catalítica depende de la presencia de ligantes, los cuales a pesar de no unirse a los sitios catalíticos controlan la actividad catalítica. Estas enzimas se determinan alostéricas.

Numerosos estudios han demostrado que éstas enzimas tienen sitios reguladores específicos, localizados lejos de los sitios catalíticos, donde se unen específicamente a los ligantes, modificando la actividad catalítica.

La regulación de la actividad de tales proteínas puede ser descrita como un equilibrio de dos diferentes estados conformacionales. Primero, un estado con baja o nula afinidad por el sustrato, el cual corresponde al estado T y segundo, un estado R el cual tiene alta afinidad por el sustrato. Por lo que la transición de un conformero a otro, involucra cambios conformacionales a nivel de estructura cuaternaria, los cuales promueven modificaciones locales en la estructura terciaria de las unidades monoméricas, alterando las propiedades de unión a ligando. (Horjales *et al.*, 1999).

Si los cambios en la transformación alostérica están dados por la unión de ligantes en el sitio activo se considerará como un efecto homotrópico, mientras que si esto ocurre desde el sitio alostérico será un efecto heterotrópico. Estos efectos son llamados positivos o negativos dependiendo si el modulador incrementa o decrece la afinidad de unión del ligando funcional de la proteína (Segel I. H., 1993).

Las propiedades cinéticas de las enzimas alostéricas no pueden explicarse con el modelo de Michaelis-Menten.

Considerando que la unión de una molécula de sustrato induce cambios estructurales o electrónicos que resultan en afinidades alteradas para los sitios vacíos del oligómero, la curva de velocidad no sigue la cinética de Michaelis-Menten y de esta forma la enzima será considerada

como alostérica; generalmente las enzimas alostéricas presentan curvas de velocidad sigmoidales (Figura 1) y no hiperbólicas como las de Michaelis- Menten (Segel I. H., 1993).

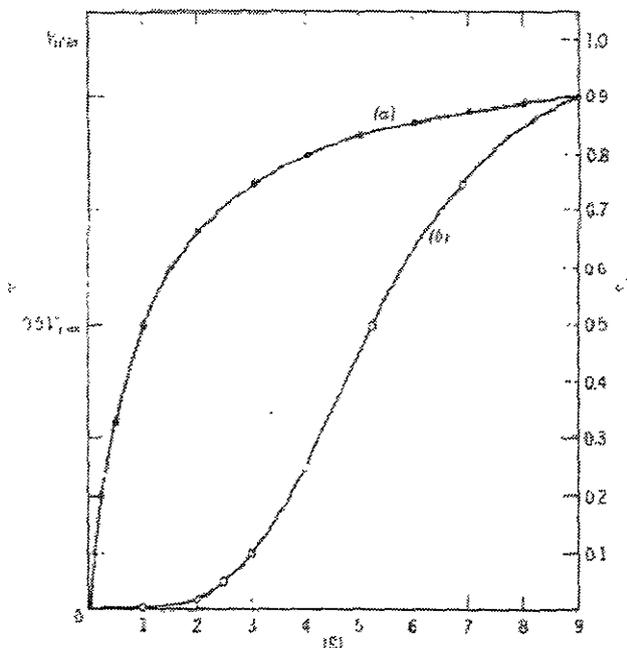


Figura 1.-Curvas de velocidad de dos enzimas diferentes que coincidentalmente tienen la misma velocidad a una $[S]= 9$, a) curva hiperbólica y b) curva sigmoidal, (Segel I. H., 1993).

En términos generales se han descrito dos modelos para las enzimas alostéricas, el modelo de interacción secuencial (Koshland *et al.*, 1966) y el modelo de simetría concertado (Monod *et al.*, 1965).

El primer modelo nos dice que la unión del ligante induce un cambio conformacional en una subunidad; las interacciones cooperativas surgen a través de la influencia que éstos cambios conformacionales tienen en las subunidades vecinas (Voet, D. & Voet, J., 1995) (Figura 2).

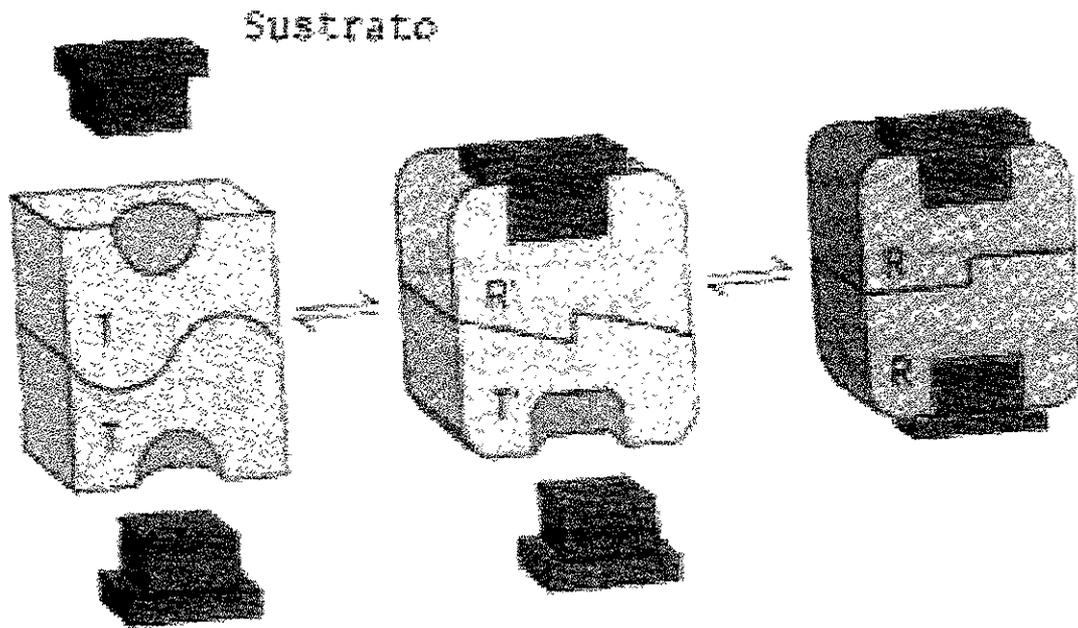


Figura 2.- El modelo secuencial nos muestra que la unión a sustrato de estado T (baja afinidad), induce cambios conformacionales en subunidades no ligadas, este cambio les da afinidades de unión a ligando entre estados de baja y alta afinidad (estado R).

El modelo de simetría concertado asume que la enzima preexiste como una mezcla en equilibrio de oligómeros de alta afinidad y de baja actividad (Figura 3). Los ligandos, incluyendo el sustrato mismo actúa desplazando el equilibrio en favor de un estado o de otro. Durante la transición, la conformación de todas las subunidades de un oligómero cambian al mismo tiempo y el oligómero conserva su simetría (Segel I. H., 1993).

DETERMINACION DE ESTRUCTURA DE PROTEINAS.

Existen varias técnicas para determinar estructura tridimensional de proteínas, dentro de las cuales podemos mencionar diferentes tipos como la difracción de electrones, difracción de neutrones y difracción en cristales bidimensionales. Pero las más importantes han sido la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cristalografía de rayos-X.

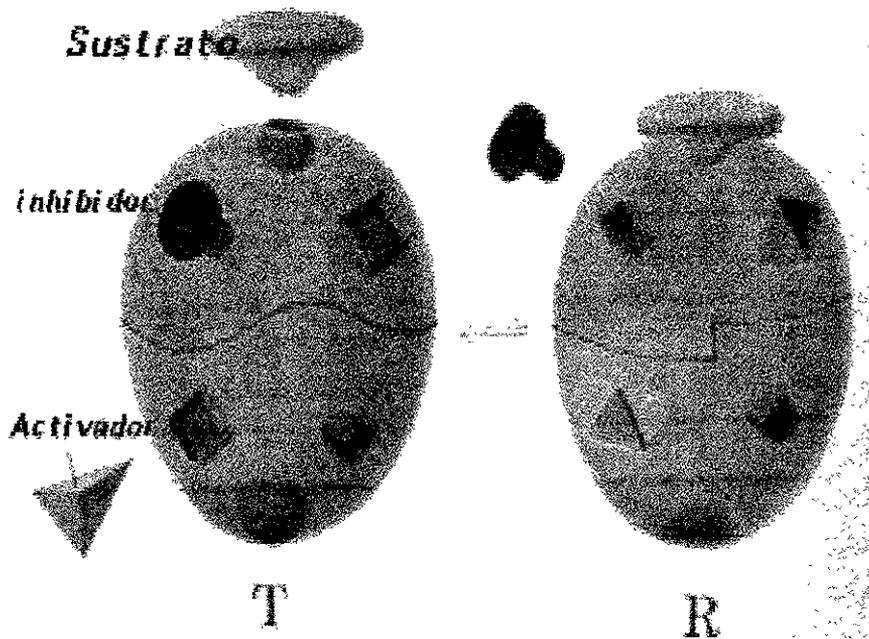


Figura 3.- Modelo de simetría en donde se observa el efecto heterotrópico producido cuando sustratos y activadores, se unen al estado R e inhibidores se unen preferentemente al estado T.

RMN

La resonancia magnética nuclear nos proporciona información de las distancias entre los átomos en una molécula, para que de ésta forma se derive el modelo tridimensional de la proteína. Esta técnica se lleva a cabo detectando núcleos atómicos que poseen momentos magnéticos intrínsecos diferentes de cero, aún en estados no excitados ($spin = 1/2$). Las moléculas de proteína son colocadas en un campo magnético fuerte para que, de esta forma, el momento magnético de los átomos sea alineado con el campo magnético. Este alineamiento puede ser cambiado a un estado excitado aplicando pulsos de radio frecuencia y cuando los núcleos de la proteína vuelven a su estado de equilibrio, emiten radiación que puede ser medida. Esta radiación es diferente para cada átomo, a menos que sean

químicamente equivalentes y tengan el mismo ambiente molecular (Branden & Tooze, 1991).

Esta técnica es más utilizada para la determinación de estructura de moléculas pequeñas. Aunque su participación en el campo de las proteínas ha ido en aumento, presenta algunas desventajas con respecto a la cristalografía, dentro de las cuales podemos mencionar:

- * Se obtienen una baja cantidad de datos.
- * No cuenta con métodos de validación que nos indiquen la calidad del resultado del proceso realizado para obtener el modelo.
- * No es aplicable a proteínas cuyo peso molecular es mayor de 60,000.

CRISTALOGRAFIA DE RAYOS-X

Esta técnica requiere de un cristal bien ordenado, es decir, un arreglo repetitivo y regular de muchas moléculas idénticas que al dirigir un haz de rayos X sobre el mismo, se obtenga un patrón de difracción del cual, la estructura de una molécula individual puede ser recuperada.

La cristalografía se basa en que un haz de rayos-X es dirigido hacia el cristal para que posteriormente se produzcan los rayos difractados. El haz incidente causa daños tanto a la proteína como al solvente, produciéndose radicales libres que a su vez perjudican a otras moléculas en el cristal (Branden, & Tooze 1991). Se genera mas calor, si la difracción se realiza en un sincrotrón por lo que se recomienda enfriar el cristal para alargar su vida media, impidiendo la destrucción por calentamiento, así como también retardando la reacción de radicales libres con la proteína.

Un sincrotrón está constituido por un acelerador lineal, un anillo inyector, un anillo-almacén y el haz. El acelerador lineal es responsable de generar electrones que son acelerados por campos eléctricos. Debido a razones de costo y simplicidad la mayoría de los sincrotrones almacenan electrones, algunos otros usan positrones. Una vez en el anillo de almacenaje, las partículas son conducidas por una ruta circular usando campos magnéticos generados por bobinas eléctricas o magnetos. De hecho

el anillo de almacén pareciera ser un polígono, las esquinas de éste son los magnetos que determinan la ruta del haz mientras en las orillas pueden ser insertados instrumentos especializados. (Mitchell *et al.*, 1999).

Los electrones en un sincrotrón son acelerados a una pequeña velocidad por el efecto de un campo eléctrico, debido a la diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo unos pocos centímetros en frente de éste. Después de esta primera aceleración los electrones entran a una gran tubería de cobre la cual constituye el acelerador mismo. Esta tubería del acelerador es bombeada para producir un buen vacío para asegurar que no hay nada dentro de ella que desvíe el viaje de los electrones en el acelerador. Esta tubería contiene discos de 3.6 cm con un pequeño agujero en el centro con un diámetro de 2 cm, el haz viaja a través del agujero. El disco produce en la tubería una especie de caja de resonancia. Al final del acelerador hay magnetos grandes para producir un campo magnético perpendicular a la dirección del haz. Un electrón moviéndose en un campo eléctrico está sujeto a una fuerza que es perpendicular a su movimiento y por lo tanto podrá ser desviado.

Este es el principio esencial de la fuente de radiación sincrotrón, los cuales son capaces de producir haces de rayos X algunos cientos de veces mas intensos que un generador de ánodo rotatorio y con diferentes longitudes de onda. Debido a que esta fuente de radiación es mucho más intensa, se ha podido disminuir enormemente los tiempos de colección de datos. El uso de longitudes de onda más cortas prolonga el tiempo de vida del cristal a temperatura ambiente.

Una vez que ya se llevó a cabo la medición, las reflexiones son grabadas en un detector electrónico, que posteriormente las procesa directamente en forma digitalizada en una computadora. Existen también detectores de área que usan un film electrónico (Branden, 1991).

Para determinar la estructura de una proteína cuando no se conoce una estructura similar, es necesario comparar un grupo de datos de difracción de cristales nativos de proteína con otro que contenga metales pesados. Este método de reemplazo isomorfo ha sido muy importante para el análisis de cristales de proteína y consiste en la introducción de un número limitado de átomos pesados por macromolécula, que reemplazan

átomos endógenos sin alterar significativamente la red cristalina. Al adicionar electrones en algunos puntos de la molécula causa cambios en las intensidades de los puntos de difracción producidos por los rayos X. Tales cambios son útiles para calcular las fases las cuales nos permitirán resolver la estructura (Duncan E. M., 1993).

Si existe la estructura tridimensional reportada en la literatura, de una proteína relacionada a la proteína de estudio, se puede usar la técnica de reemplazo molecular. Con ésta podemos obtener fases aproximadas de la estructura desconocida a partir de las fases de la estructura conocida.

El concepto original del método de reemplazo molecular constó de tres procesos:

- 1) La determinación de la orientación relativa (“rotación”) de estructuras idénticas en el mismo o en diferentes cristales.
- 2) Uso de la información obtenida en la rotación para determinar la posición de los operadores locales no cristalográficos relativos a los elementos simétricos cristalográficos (“traslación”).
- 3) Determinación de la fase usando operadores no cristalográficos derivados de la rotación y de la traslación (Rossman M. G., 1989).

Pero antes de pensar en cómo resolver una estructura, es necesario tener la pieza principal dentro de lo que podemos llamar un gran rompecabezas, “un cristal” el cual debe estar perfectamente bien ordenado internamente. Lo cual implica varios pasos para llegar a obtenerlo.

CRISTALIZACION

Existen varios métodos para cristalizar proteínas mediante los cuales, a partir de una solución conteniendo la macromolécula se llega a un estado de supersaturación, para formar cristales (Ducruix & Giegé R., 1992).

La característica principal de un cristal para llevar a cabo un experimento de difracción, es su estructura interna tridimensional periódica y ordenada. La cristalización de moléculas que se encuentran en solución es un proceso de equilibrio reversible en donde los parámetros cinéticos y termodinámicos dependen de las propiedades físicoquímicas de los solventes y solutos que están involucrados en el fenómeno (McPherson A. 1982).

Bajo ciertas condiciones (todas ellas de supersaturación) el sistema es llevado hacia un estado de equilibrio en el cual el soluto es dividido entre una fase sólida y otra soluble. Con esto, las moléculas individuales pierden libertad traslacional y rotacional por lo tanto perdiendo entropía el sistema, reduciendo la energía potencial y llevándose a cabo el proceso de ordenamiento (Segel I. H., 1993).

Muchas macromoléculas biológicas existen predominantemente en sistemas acuosos, un mínimo de energía está presente cuando se encuentran completamente solvatadas. Cuando se encuentran en sistemas con soluciones saturadas donde el agua es insuficiente para mantenerlas hidratadas, las moléculas tienden a agregarse como un precipitado amorfo o posiblemente puedan llegar a cristalizar (McPherson, 1982). Un precipitado amorfo tiene una energía mínima local y frecuentemente se forma cuando la agregación se da demasiado rápido. Sin embargo, si el estado cristalino tiene una energía aún menor y la barrera de energía es pequeña, con un tiempo suficiente, los cristales pueden crecer a partir del material amorfo.

Las técnicas más utilizadas para el proceso de cristalización son el equilibrio en fase de vapor y la diálisis. El método utilizado para éste trabajo fue el de difusión de vapor, el cual puede ser por: gota colgante o pendiente, gota apoyada o por gota sandwich. El principio general se basa en que la gota es equilibrada contra una solución-reserva que contiene una solución de agente cristalizante a más alta concentración que la gota. El equilibrio procede por difusión de las especies volátiles (agua o solventes orgánicos) hasta que la presión de vapor en la gota de la proteína es igual a la del reservorio o depósito, obligando así a la proteína a cristalizar (Ducruix and Giegé, 1992).

Los parámetros y agentes precipitantes más comúnmente utilizados, que influyen en el proceso de cristalización son:

pH

El valor del pH repercute directamente en la solubilidad, la cual tiene su mínimo alrededor del punto isoeléctrico de la proteína.

CONCENTRACION DE SAL

La fuerza iónica puede tener efectos contrarios en la solubilidad de la proteína, es decir, la solubilidad decrece exponencialmente con el incremento de la fuerza iónica, fenómeno conocido como *salting out*, pero también tiene un mínimo a baja fuerza iónica (efecto *salting in*).

DISOLVENTES ORGANICOS

Disolventes tales como acetona y etanol disminuyen la solubilidad al reducir la constante dieléctrica del medio. Su adición a una solución de proteína acuosa incrementa las fuerzas de atracción entre cargas opuestas promoviendo la agregación y precipitación.

POLIETILEN GLICOL

Estos son agentes precipitantes con pesos moleculares que van de 200 hasta 20 000 o más. Algunas de las ventajas que tienen es que no son tóxicos, no son inflamables y no desnaturalizan las proteínas como sucede con los disolventes orgánicos (Giacovazzo, C., 1994). Estos agentes precipitantes compiten con la proteína por el agua disminuyendo así la solubilidad de la proteína.

Algunos otros factores pueden intervenir en la cristalización: concentración de proteína, temperatura, presencia de cationes y la pureza de la proteína, siendo éste último fundamental para el proceso de cristalización.

Una vez que los ensayos de cristalización son realizados, es posible encontrar durante el monitoreo: **precipitado** el cual es un material amorfo que no presenta polarización de la luz, las **fibras** que son formaciones alargadas que presentan orden en una sola dimensión y logran polarizar la luz, los **cuasicristales** que son formaciones

tridimensionales sólidas formadas por arreglos de una gran cantidad de cristales que polarizan la luz en forma característica, los **microcristales** que son cristales muy pequeños de dimensiones menores a 0.001 mm^3 y que presentan polarización uniforme de la luz en todo su volumen y por último **cristales** que son formaciones sólidas geoméricamente regulares de dimensiones mayores a 0.001 mm^3 y que presentan polarización uniforme de la luz en todo su volúmen (Ducruix & Giegé R. 1992).

Las macromoléculas deben de estar conformacionalmente puras, es decir, no deben existir varios arreglos tridimensionales de átomos no superponibles que pudieran interconvertirse sin romper enlaces covalentes (Creighton, T. E., 1993). De esta manera tendríamos mas probabilidades que al cristalizar se obtengan cristales que proporcionen buenos patrones a alta difracción.

CARACTERISTICAS

Los aminoazúcares D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) son componentes primarios de la pared celular y de la membrana externa en bacterias como es el caso de *E. coli*. Cuando los aminoazúcares están ausentes en el medio ambiente, la bacteria debe sintetizar D-glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) a partir de D-fructosa 6-fosfato (Fru6P) y L-glutamina usando la enzima glucosamina sintasa codificada por el gen *gms*. Las enzimas necesarias para la toma y degradación de aminoazúcares están codificadas por los genes del operon *nagE* y *nagBACD* (Rogers *et al.*, 1988; Plumbridge, 1989, Vogler & Lengeler, 1989).

Las enzimas involucradas en estos procesos anabólicos y catabólicos necesitan ser reguladas y esta regulación se lleva a cabo en dos formas: primero, a nivel de inducción transcripcional de los genes degradativos durante el crecimiento en presencia de aminoazúcares (White, 1968; Plumbridge, 1990) y represión del gen biosintético (Plumbridge *et al.*, 1993) y; segundo a nivel de actividad de las enzimas degradativas. La enzima importante para que se lleve a cabo esa regulación es la glucosamina 6-fosfato desaminasa, codificada por el gen *nagB*; la cual lleva a cabo la isomerización y desaminación reversible de GlcN6P a Fructosa 6-fosfato (Fru6-P) y amonio (Calcagno *et al.*, 1984), una reacción funcionalmente opuesta al paso metabólico catalizado por la glucosamina sintasa.

La glucosamina 6-fosfato desaminasa está sujeta a activación alostérica por N-acetil-D-glucosamina 6-fosfato (GlcNac6P), el cual juega un papel importante en el metabolismo de aminoazúcares. Este activador es el producto del transporte del GlcNac dentro de la bacteria y el sustrato de la primera enzima del catabolismo del GlcNac, la GlcNac6P desacetilasa, codificada por el gen *A*. GlcNac6P desempeña dos funciones reguladoras: una como activador alostérico de la desaminasa y otra como efector del represor del operon codificado en *nagC*, (Plumbridge, 1991).

La respuesta alostérica de GlcN6P desaminasa al GlcNac6P intracelular, produce un aumento en la actividad enzimática por efecto del aumento de afinidad por su sustrato GlcN6P, llamándosele efecto K.

La GlcN6P desaminasa está clasificada dentro de las enzimas aldocetosas isomerasas (Hodge J. E., 1955). Estas reacciones bioquímicas involucran un desplazamiento intramolecular de un átomo de hidrógeno así como cambia la localización de un doble enlace. En estos procesos, un protón es removido de un átomo de carbono y adicionado en otro (Voet & Voet, 1995).

La enzima es activa en forma de un hexámero, con un tamaño o masa molecular cercano a 178 KDa, compuesto de 6 subunidades idénticas de 29.7 KDa cada una y constituida de 266 residuos. El hexámero tiene un punto isoeléctrico en 6.0-6.1 (Calcagno *et al.*, 1984). Contiene 6 sitios alostéricos localizados en las hendiduras entre las subunidades, las cuales están arregladas como un dímero de trímeros. Los 6 sitios activos aparecen como hendiduras en cada subunidad (Oliva *et al.*, 1995).

De acuerdo con lo reportado, esta enzima es un sistema K puro (Comb & Rossman, 1958; Calcagno *et al.*, 1984), en donde el activador cambia la afinidad de la enzima por el sustrato pero sin afectar la V_{max} de la reacción. Para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato es suficiente la presencia del efector, pero también puede ocurrir en sentido opuesto, es decir, que el sustrato modifique la afinidad por el efector (Monod, J., 1965). En los sistemas K puros, todo esto sucede, pero sin modificar las propiedades catalíticas al cambiar del estado R a T manteniéndose la K_{cat} igual.

PURIFICACION DE LA ENZIMA

En 1984 fue reportado por Calcagno *et al.*, la purificación así como la caracterización molecular de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa, pero en 1991 éste método se modificó durante la determinación de la estructura secundaria por secuencia de aminoácidos y espectroscopía de dicroísmo circular.

La enzima fue obtenida de una cepa de *E. coli* K12, crecida en medio de Luria conteniendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) en un fermentador de 14 L y colectadas durante su fase de crecimiento exponencial. El extracto después de la centrifugación de las células sonicadas, fue fraccionado con

sulfato de amonio (40-55% de saturación) a pH 7.9, a una temperatura de 4°C. El precipitado fue disuelto en amortiguador de fosfato de potasio 0.2 M pH 7.5, obteniéndose una concentración final de proteína de 5-20 mg/ml. La solución fue directamente aplicada a una columna con una matriz de afinidad de N- ϵ -amino-n-caproil-D-glucosamina-6-fosfato agarosa (1 ml de gel por cada 10 mg de proteína pura esperada). La columna fue lavada con el mismo amortiguador y la proteína fue eluída con 6 volúmenes de un gradiente de concentración lineal de 0 a 5 mM de GlcNAc6P preparada en la misma solución fosfato.

La enzima eluye como un pico de actividad y de proteína único y electroforéticamente homogénea. La solución de desaminasa fue precipitada en sulfato de amonio (55% de saturación) y conservada a 4°C hasta la realización de los ensayos de cristalización.

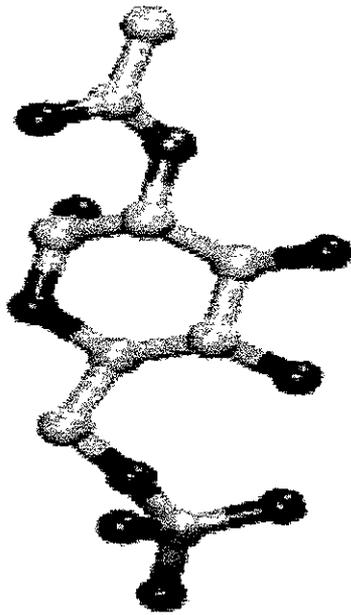
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

Con respecto a la estructura cristalográfica de GlcN6P desaminasa de *E. coli* en su conformero R (Oliva *et al.*, 1995) se resolvieron tres diferentes complejos:

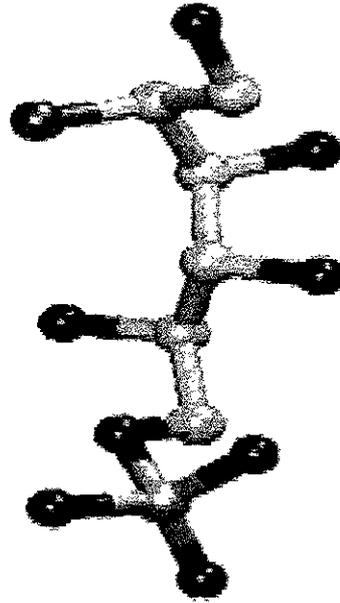
Uno de ellos está formado por la proteína unida a dos fosfatos inorgánicos por monómero los cuales permanecían unidos a los sitios activo y alostérico.

Los otros dos fueron los complejos enzima con su activador alostérico (GlcNac6P) y enzima con el inhibidor competitivo. En el complejo enzima-activador se encontró en el sitio alostérico activador y fosfato inorgánico en el sitio activo mientras que en el complejo enzima-inhibidor se identificó fosfato inorgánico en el sitio alostérico y el inhibidor en el sitio activo.

Recientemente, se reportó en la literatura la estructura cristalográfica de GlcN6P desaminasa de *E. coli* en su conformero T (Horjales *et al.*, 1999) encontrándose tanto el sitio activo como el alostérico vacíos.



Activador



Inhibidor

Figura 4.- Compuestos utilizados como activador alostérico (N-acetil glucosamina 6-fosfato) y el inhibidor competitivo (2-deoxi-2 amino D-glucitol 6-fosfato).

En 1995 Oliva *et al.*, reportaron que el monómero de la GlcN6P desaminasa es una estructura típica α/β abierta formada por 7 hebras β paralelas que constituyen una hoja β central rodeada de 8 hélices α y una hélice de doble vuelta 3_{10} (Figura 5). Una segunda hoja β antiparalela de 3 hebras aparece como continuación de la hebra β C por su C-terminal; las hélices fueron numeradas de 1-8 y las hebras de A-G.

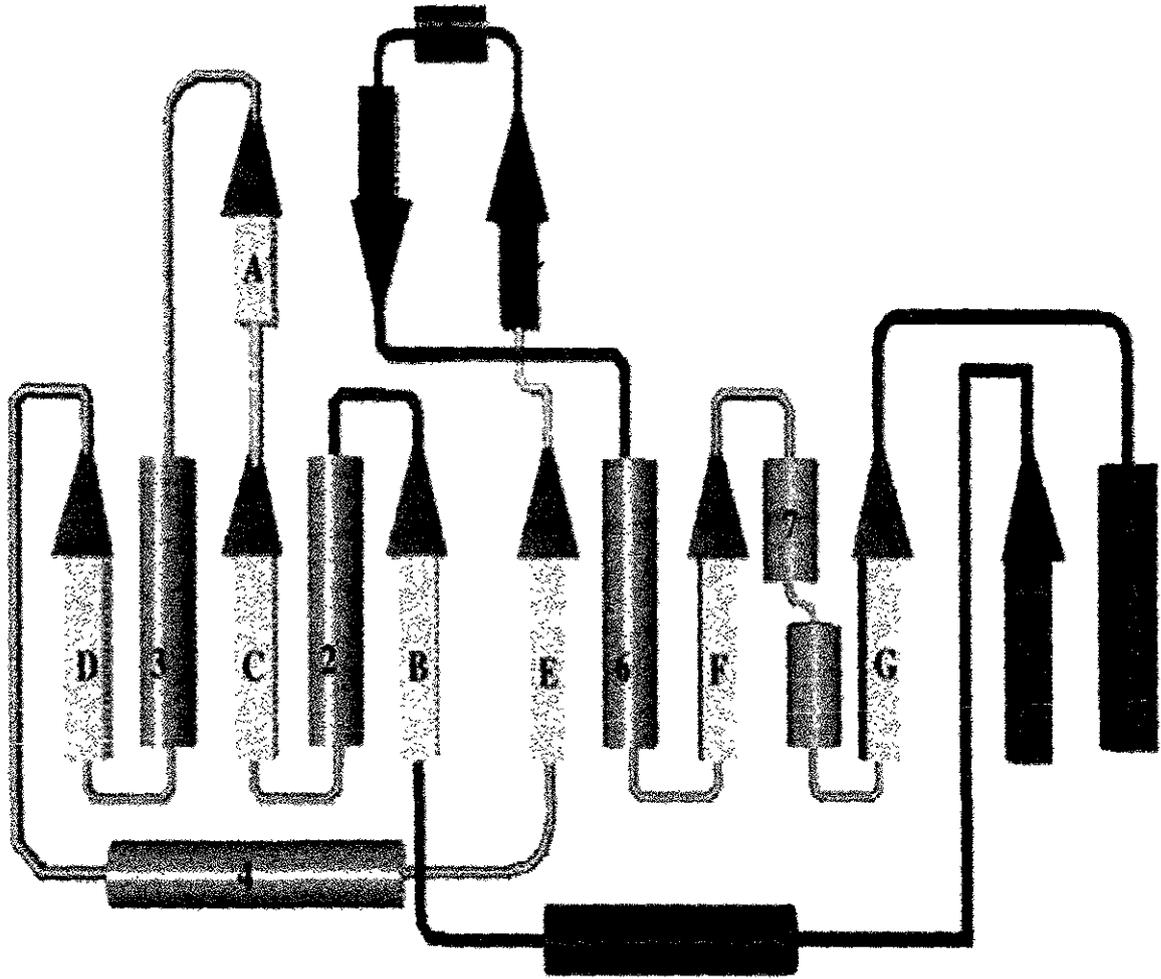
En general la topología del monómero de esta enzima se parece a un dominio de unión a NAD (Nicotinamida adenin dinucleótido) modificado que presenta tres segmentos adicionales: el N-terminal hasta al residuo 35, el C-terminal (residuos 243-266) y de los aminoácidos 141-188 (ver figura 5). Un dominio de unión a NAD es una hoja β abierta de 6 hebras paralelas

conformación y está formada por dos partes iguales formadas por dos motivos estructurales β - α - β cada uno. A cada una de las partes iguales se les denomina motivo de unión a mononucleótido, debido a que cada mitad une a uno de los nucleótidos del NAD; también se les conoce como plegamiento de tipo Rossmann, (Rossmann *et al.*, 1974).

Dentro de las modificaciones que presenta esta enzima, el N-terminal participa en la formación del sitio alostérico del hexámero, el segundo segmento formado de los residuos 141-188 contiene una asa involucrada en el mecanismo catalítico y también un motivo formado por la hebra B', hélice 5 y la hebra C'. Las hebras B' y C' forman parte de la hoja β antiparalela. Los residuos 158 y 160 en la hebra B' son parte del sitio alostérico de la enzima, mientras en la hélice 5 la Arg 172 es uno de los residuos de unión a sustrato. El último segmento, el C-terminal, contiene 2 estructuras adicionales: la asa 243-250 involucrada en contactos entre subunidades y la hélice 8. Cada mononucleótido del NAD está formado por una ribosa, un fosfato y una base nitrogenada. Por otro lado el plegamiento de la GlcN6P desaminasa es diferente porque sólo liga un azúcar fosfatado.

Dos iones fosfato por monómero fueron identificados en el primer complejo de la primera estructura resuelta, uno de ellos está unido por un puente salino a Lys208 y Arg172 y también conectado por puentes de hidrógeno al asa formada por los residuos 40-44; el segundo fosfato está unido por un puente de hidrógeno al nitrógeno de la cadena principal del residuo 152 y al O γ de la Ser 151, pero a su vez también se encuentra unido en la interface entre dos monómeros y está unido a través de puentes salinos a la Arg158, Lys 160 y al grupo amino N-terminal del monómero vecino.

Como se mencionó anteriormente el hexámero está arreglado como un dímero de trímeros con un eje cristalográfico de orden 3 y tres ejes de orden 2 perpendiculares al eje de orden 3, obteniéndose como resultado una simetría interna 32 como puede observarse en la figura 6.



- /● Región similar al plegamiento de tipo Rossmann.
- Inserción N-Terminal.
- Inserción C-Terminal.
- Región de trimerización.
- Motivo estructural insertado en el sitio activo.

Figura 5.- Diagrama de topología de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*.



Figura 6.- Hexámero de Glucosamina 6 fosfato desaminasa de *E. coli* visto desde el eje de orden 3.

Con respecto al complejo de la enzima con los fosfatos inorgánicos, éstos fueron encontrados tanto en el sitio activo como en el alostérico. En cuanto a la enzima con el inhibidor, la estructura muestra el inhibidor cuyo fosfato se encontró en uno de los sitios de unión a fosfato en el sitio activo así como también presentó un ión fosfato en el sitio alostérico. El inhibidor aparece en una conformación extendida con el átomo de oxígeno

ligado al C5 dirigiéndose hacia al Nε2 de la His143, ésta última se encuentra en contacto cercano con el Asp141 y el Glu 148, los cuales son residuos importantes para la apertura del anillo en el mecanismo catalítico.

De acuerdo con los datos estructurales, esta enzima posee un motivo hélice-asa entre los residuos 162 y 185 que se conoce como tapa del sitio activo, iniciando en el sitio alostérico. Este motivo tiene una participación relevante en la transformación alostérica, ya que nos permite explicar si los cambios en el sitio alostérico repercuten a través de la tapa del sitio activo.

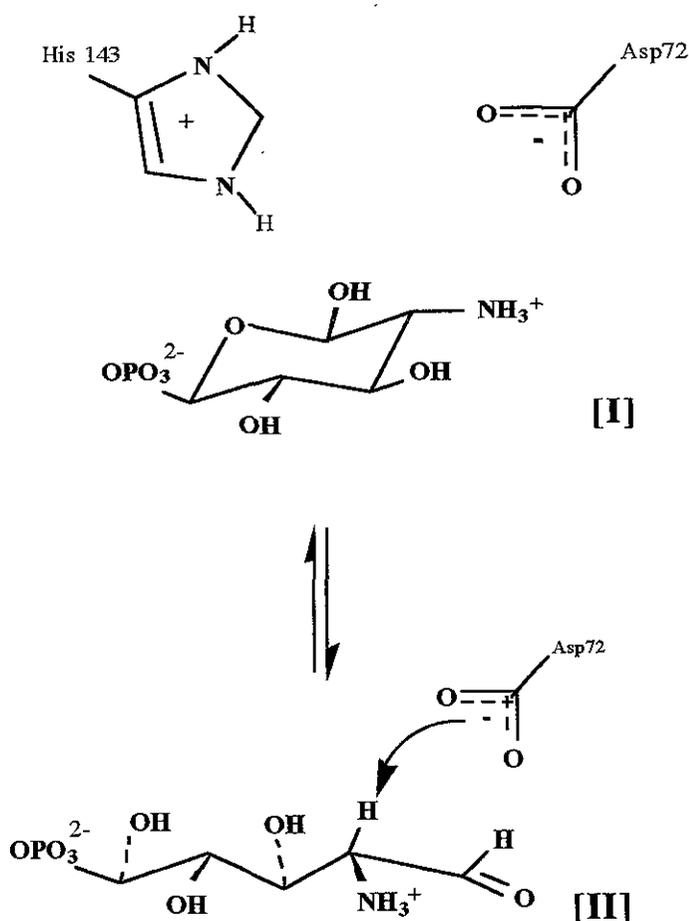
En la literatura se encuentra reportado el conformero R el cual presenta el sitio activo y el sitio alostérico ocupados (Oliva *et al.*, 1995) así como la estructura del conformero T, cuya estructura nos muestra los sitios activo y alostérico vacíos (Horjales *et al.*, 1999).

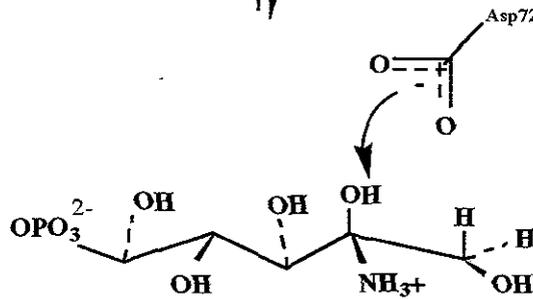
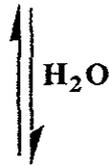
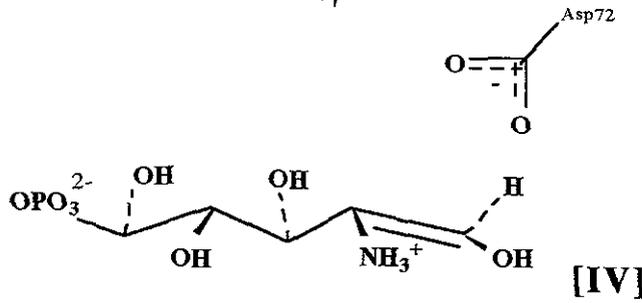
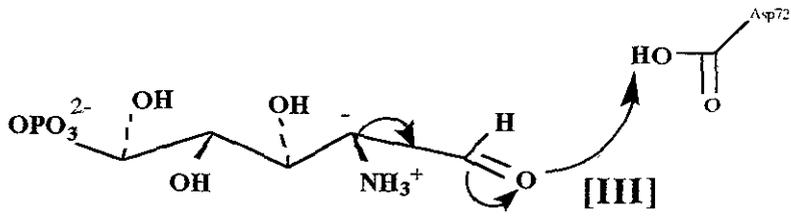
Uno de nuestros objetivos es encontrar las condiciones de cristalización del complejo enzima-activador variando la concentración alrededor de su Km (2.2 mM ± 0.4 mM), todo esto con el fin de encontrar mediante cristalografía de rayos X, alguno de los sitios desocupados para tener una base estructural que nos indique si existe algún cambio de movilidad en la tapa, provocado por la unión del activador.

MECANISMO CATALITICO PROPUESTO A TRAVES DE UN MODELO CRISTALOGRAFICO

Este planteamiento proviene del modelo cristalográfico de un complejo enzima-inhibidor (Oliva *et al.*, 1995). A partir de éste se propuso un modelo con el sustrato cerrado. La His 143 se encuentra en una posición cercana al Asp141 y al Glu148 que se encuentran en contacto con su nitrógeno δ1, siendo relevante dentro de la catálisis en el paso de apertura del anillo. Una vez que el anillo del sustrato es abierto, el Asp72 cataliza la enolización del amino azúcar removiendo el hidrógeno del carbono 2 del sustrato a través de un intermediario cis-enol amonio. Posteriormente el protón abstraído es adicionado al oxígeno 1 para formar el enol-amonio. Existen dos posibles vías, la primera podría ser que el protón del grupo

amonio es transferido al carboxilato del Asp72, formándose así la cis-enol-amina que posteriormente abstrae el protón del Asp72 hacia la posición del carbono 1 del intermediario el cual se rearregla para formar fructosimina 6-fosfato, formándose un intermediario carbinol amonio al reaccionar con el agua. En la segunda opción interviene una molécula de agua que ataca al enlace π del carbono 1- carbono 2 del cis-enol amonio. El paso final consiste en que el intermediario formado es descompuesto en fructosa 6-fosfato y amonio; en este último paso un protón es transferido al carboxilato del Asp72 (paso VI a VII).





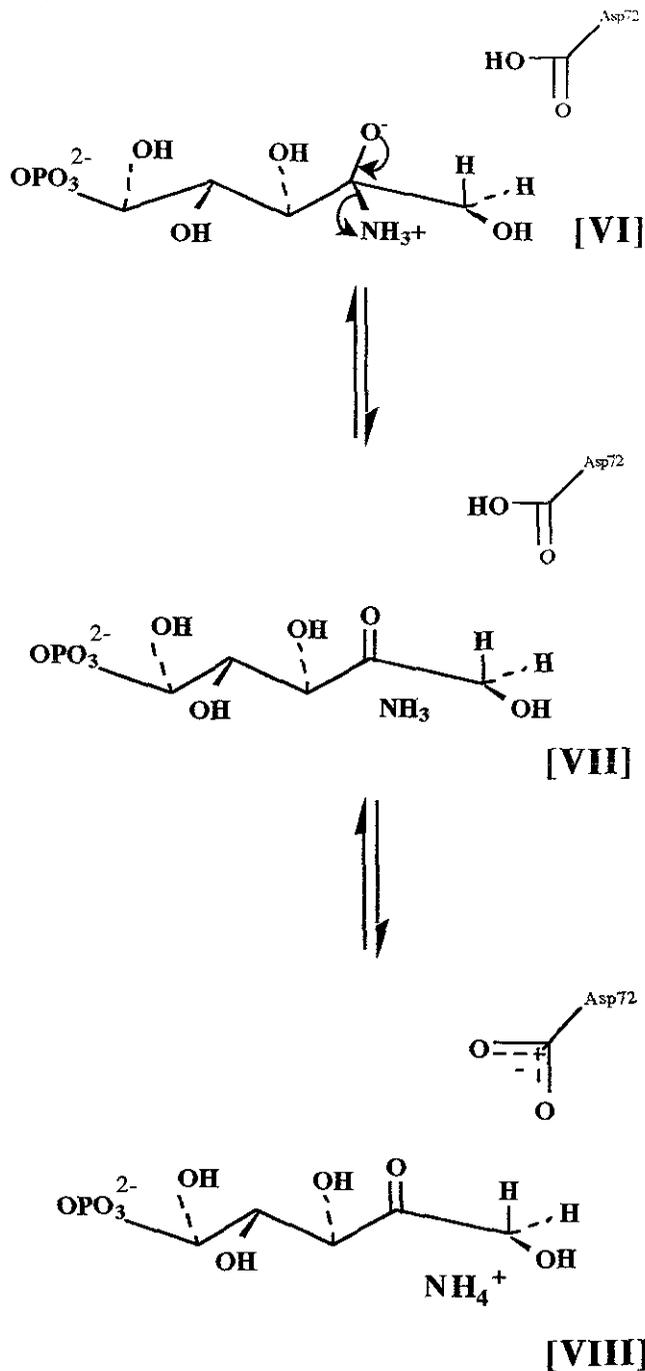


Figura 7.- Mecanismo catalítico para GlcN6P desaminasa. El mecanismo procede de acuerdo con los siguientes pasos. 1- El anillo del sustrato es abierto catalíticamente. 2- El sustrato está unido a su grupo amonio (intermediario II). La enzima unida a GlcN6P

(intermediario III). 3-Formándose un intermediario cis-enol-amonio. El protón del Asp72 es cedido al oxígeno del C1 (intermediario IV). 4- Una molécula de agua reacciona en una de las dos vías descritas en el texto para formar el intermediario V. 5- El intermediario anterior pierde el protón del hidroxilo en el C2, el cual es recuperado por el Asp72 (intermediario VI). En una forma concertada, el grupo amonio es perdido como amoniaco (intermediario VII). Oliva *et al* proponen que el Asp72 dona este protón para generar el amonio (intermediario VIII).

Por otro lado, toda esta información nos resulta de gran utilidad debido a que nos ayudará a encontrar las condiciones de cristalización de la enzima Glucosamina 6-fosfato desaminasa con su activador alostérico, pero de tal forma que podamos mostrar mediante difracción de rayos X, al menos un sitio ya sea el activo o el alostérico vacío. Una vez que lo logremos, se realizará una comparación de las conformaciones y de los factores de temperatura de varias estructuras resueltas en el laboratorio, los cuales nos lleven a elucidar si existe una componente vibracional involucrada en la transformación alostérica.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si existen diferencias en la movilidad atómica entre los diferentes conformeros alostéricos de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Cristalizar Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli* con su activador alostérico en concentraciones cercanas a su K_m .
- 2.- Resolver la estructura tridimensional del complejo Glucosamina 6 fosfato desaminasa con su activador alostérico N-acetil-glucosamina 6 fosfato.
- 3.- Analizar estructuralmente si existen cambios conformacionales o de movilidad que se encuentren ligados a una posible componente vibracional.

La enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E.coli* nos fue proporcionada por el Dr. Mario Calcagno de la Facultad de Medicina-UNAM. Esta se obtiene de una cepa de *E.coli*, la cual es posteriormente purificada (ver antecedentes).

CRISTALIZACION

La enzima GlcN6P-desaminasa completamente purificada se nos proporcionó precipitada en sulfato de amonio y para su cristalización fue sometida a una diálisis durante toda la noche con amortiguador Hepes 10 mM + EDTA 1 mM pH 7. Esta diálisis se llevó a cabo en una microcelda la cual, es una cámara cilíndrica de acrílico pequeña de 200 μ l que se encuentra abierta en uno de sus extremos por donde es colocada la proteína. El extremo abierto se cubrió con una membrana de diálisis cuyos poros permiten el paso de proteínas de peso molecular entre 10 000 a 12 000, misma que se sujetó con un anillo de plástico flexible con un diámetro un poco menor que la microcelda; tanto la membrana como la microcelda fueron equilibradas con el amortiguador de diálisis durante 15 minutos. Posteriormente se le colocó un flotador y se sumergió dentro de un vaso de precipitado con el amortiguador, la diálisis se hizo a 4 °C con agitación constante realizándose 4 cambios de 40 ml siendo los 3 primeros cada 3 horas y el último toda la noche.

Una vez concluida la diálisis se determinó espectrofotométricamente la cantidad de proteína ($E_{278} = 20 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), para iniciar con el proceso de cristalización.

Los ensayos de cristalización se realizaron por medio de la técnica de gota colgante, la cual consistió en colocar una gota (de tamaño variable) con la proteína pura acompañada con la misma cantidad en volumen de la solución del pozo formada por amortiguador, agente precipitante y aditivos. Estos ensayos se realizaron en cajas Limbro de 24 pozos (mismas que se utilizan para cultivo de tejidos).

Con el fin de encontrar un cristal el cual presentara el sitio activo o el sitio alostérico libre de activador, realizamos varios experimentos en

los cuales variamos algunos parámetros de cristalización que nos ayudaran a conseguir ese cristal, tales como pH, temperatura, concentración de ligante, etc.

ENSAYO 1

Efecto de agente cristalizante y concentraciones.

La concentración alcanzada después de la diálisis (la cual se realizó con Tris-HCl 10 mM pH 8) fue de 11.3 mg/ml, siendo las gotas de un volumen de 8 μ l (5 μ l de proteína + 3 μ l de la solución del pozo). Se le colocó activador a la solución de proteína, obteniéndose una concentración final de 5 mM. Las condiciones de cristalización probadas fueron:

Tartrato de Sodio y Potasio 0.65 M en Hepes 200mM pH 7	Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M en Hepes 200mM pH 7	-----
Citrato de Sodio 0.7 M en Hepes 200 mM pH 7	Citrato de Sodio 0.8 M en Hepes 200 mM pH 7	-----
Citrato de Sodio 0.5 M en Tris-HCl 200 mM pH 8	Citrato de Sodio 0.6 M en Tris-HCl 200 mM pH 8	Citrato de Sodio 0.55 M en Tris-HCl 200 mM pH 8

Esta caja con las gotas armadas fue incubada a una temperatura de 4°C.

ENSAYO 2

Efecto de concentración de acetato de sodio a diferentes pHs en ausencia de activador.

La concentración de proteína utilizada fue de 10 mg/ml, ésta vez la diálisis se llevó a cabo con Hepes 10 mM + EDTA 1 mM y tanto las gotas como la solución del pozo no se le adicionó ningún tipo de ligante; el tamaño de la gota fue de 6 μ l (3 μ l de proteína + 3 μ l de la solución del pozo) mientras que el pozo contenía 1 ml. La temperatura de incubación de

las gotas fue de 18°C y las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

pH				
6.3	Acetato de Na 2.1 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.3 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.5 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.6 M en Hepes100mM
7.0	Acetato de Na 2.1 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.3 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.5 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.6 M en Hepes100mM
8.0	Acetato de Na 2.1 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.3 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.5 M en Hepes100mM	Acetato de Na 2.6 M en Hepes100mM

ENSAYO 3

Cristalización en presencia de activador con tartrato de sodio y potasio.

Se realizó la diálisis con Hepes 10 mM + EDTA 1 mM pH 7 con 3 cambios de 30 ml obteniéndose una concentración de proteína de 18 mg/ml. El tamaño de la gota fue de 10 μ l (5 μ l + 5 μ l) y el pozo fue de 1 ml. El activador fue colocado en la gota y en el pozo; se armaron 4 gotas de cada una de las condiciones diferentes.

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
100 μ M

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
500 μ M

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
1 mM.

La temperatura de incubación de éstas gotas fue de 18°C.

ENSAYO 4

Efecto de concentración de activador.

La proteína se dializó con Hepes 10 mM + EDTA 1 mM pH 7 obteniéndose una concentración de 25.57 mg/ml, se armaron gotas de 8 μ l (4 μ l de la solución de proteína + 4 μ l de la solución del pozo) y el tamaño del pozo fue de 1 ml, se colocó activador en el pozo y en la gota a diferentes concentraciones por cuadruplicado como lo podemos ver en la tabla siguiente:

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
50 μ M.

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
10 μ M.

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
1 μ M.

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
0.1 μ M.

Tartrato de Sodio y Potasio 0.75 M
en Hepes 200 mM pH 7, activador -
0.02 μ M.

La temperatura a la que fueron incubados fue de 18°C.

ENSAYO 5

Concentraciones variables de activador en presencia de acetato de sodio.

La diálisis se llevó a cabo con Hepes 10 mM + EDTA 1 mM pH 7, la

concentración resultante fue de 18.78 mg/ml y las gotas fueron de un volumen de 6 μ l (3 μ l de la solución de proteína + 3 μ l de la solución del pozo) mientras que el volumen del pozo fue de 1 ml. El activador fue colocado a muy bajas concentraciones tanto en el pozo como en la gota, los cristales fueron incubados a 18°C, cada una de las condiciones probadas fueron triplicadas:

Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.0, activador 200 μ M	Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.0, activador 50 μ M
Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.0, activador 5 μ M	Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.0, activador 0.5 μ M
Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.0, activador 0.0 μ M	

ENSAYO 6

Varias concentraciones de activador en presencia de acetato de sodio a pH 7.5.

Con las mismas condiciones utilizadas en el experimento anterior, se realizó un ensayo muy parecido, pero variando el pH de 7.0 a 7.5.

Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.5, activador 200 μ M	Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.5, activador 50 μ M
Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.5, activador 5 μ M	Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.5, activador 0.5 μ M
Acetato de sodio 2.6 M en Hepes 200 mM pH 7.5, activador 0.0 μ M	

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue la obtención de un cristal del complejo Glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli* a bajas concentraciones de activador, involucrando procesos a distintas condiciones en los cuales variamos pH, temperatura, concentración de activador, etc.

Para fines puramente metódicos el trabajo fue dividido en tres secciones consistentes en:

Parte I.- Cristalización.

Parte II.- Resolución de estructuras.

Parte III.- Sobreposición de estructuras.

Parte IV.- Comparación gráfica de los factores de temperatura B.

A continuación se discute los resultados obtenidos en cada una de ellas.

PARTE I -CRISTALIZACION-

Los resultados logrados en cuanto a cristales se refiere para éste trabajo, fueron alcanzados a través del método de difusión de vapor por la técnica de gota colgante.

En el **ensayo 1** en la gota que contenía tartrato de sodio y potasio 0.65 M en hepes 200 mM pH 7 activador 5 mM, se obtuvieron algunos cristales de proteína pertenecientes a un típico estado R con dimensiones de 0.2 mm, mientras que en la gota A2 donde se aumentó un poco la concentración de sal de 0.65 M a 0.75 M resultaron cristales en forma R de tamaño de 0.35 mm. En las pruebas realizadas con citrato de sodio 0.7 M en hepes 200 mM pH 7 se obtuvieron cristales de 0.30 mm, el aumento en la concentración de citrato de sodio al 0.8 M da lugar a la formación policristales. Los peores resultados se obtuvieron con citrato de sodio a diferentes concentraciones 0.5, 0.6 y 0.55 M en tris-HCl 200 mM pH 8, en donde no se obtuvo nada, excepto con la concentración de 0.6 M en que se obtuvieron cuasicristales.

Uno de los cristales obtenidos en la gota A2 fue llevado al Laboratorio Nacional de Luz sincrotrón en Campinas, Brasil para realizar los experimentos de difracción de rayos X. Estos resultados se describirán en la siguiente sección.

Con lo que respecta al **ensayo 2** en las condiciones de acetato de sodio 2.1 y 2.6 M en hepes 100 mM pH 6.3 sin ningún tipo de ligantes, se lograron obtener cristales de dimensiones de 0.22 mm X 0.27 mm y de 0.22 mm X 0.3 mm respectivamente. En las gotas A3 y A4 en donde la concentración de acetato de sodio fue 2.3 y 2.5 M respectivamente, también se formaron cristales pero un poco mas pequeños y fueron utilizados para algunas pruebas de crioprotección, en las gotas restantes no se obtuvieron resultados relevantes.

Los cristales formados en la gota A1 y A4 fueron llevados al detector de área del Laboratorio universitario de estructura de proteínas/UNAM, México D.F.; en donde sólo el cristal de la gota A1 fue medido (figura 8), los datos estructurales conseguidos se presentan mas adelante.

En el **ensayo 3** se lograron obtener cristales óptimos para difracción en todas las condiciones las cuales variaban en la concentración del activador 100 μ M, 500 μ M y 1mM, de donde se seleccionaron los cristales de las gotas A5 y B6, las cuales tenían activador 100 μ M y 500 μ M respectivamente, éstos cristales fueron llevados al sincrotrón de Stanford.

En el **ensayo no. 4** se obtuvieron dos formas cristalinas, una de ellas, en forma de cúmulos policristalinos, observados en la figura 9 parte A, los cuales no difractaron. La otra forma fueron monocristales sensibles como los que se pueden observar en la figura 9 parte B, los cuales fueron irradiados y difractaron a 1.7 Å en el laboratorio de radiación sincrotrón de Stanford. Las condiciones de cristalización fueron tartrato de sodio y potasio 0.75 M en hepes 200 mM pH 7 activador 50 μ M, los datos cristalográficos son reportados mas adelante.



Figura 8.- Cristal de Glucosamina 6 fosfato desaminasa de *E.coli* (ensayo no. 2), crecido en Acetato de sodio 2.1 M en Hepes 100 mM pH 6.3 sin activador.

En el experimento 5 que se realizó con acetato de sodio 2.6 M en hepes 200 mM pH 7 teniendo como variante la concentración del activador (200, 50, 5 y 0.5 μ M), se obtuvieron cristales muy sensibles en la mayoría de las condiciones, pero en la gota A5 que contenía 50 μ M de activador fue posible obtener un pequeño cristal el cual se llevó al sincrotrón de Brasil pero no resistió el viaje por lo que no fue posible la difracción.

El ensayo 6 que se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el experimento 5, excepto que el pH fue de 7.5, no se logró obtener nada a 18°C durante algunas semanas, por lo que decidimos modificar la temperatura a 4°C y con este cambio conseguimos cristales en forma R.

El último ensayo no. 7 realizado con acetato de sodio 2.6 M en hepes 100 mM con activador 5 mM variando el pH, se obtuvieron algunos cristales a pH 7 y microcristales a pH 8. De los cristales a pH 7 se seleccionó uno de ellos de la gota A1 el cual fue difractado en el sincrotrón de Stanford a 1.9 Å y actualmente se encuentra en proceso de afinamiento de la estructura.

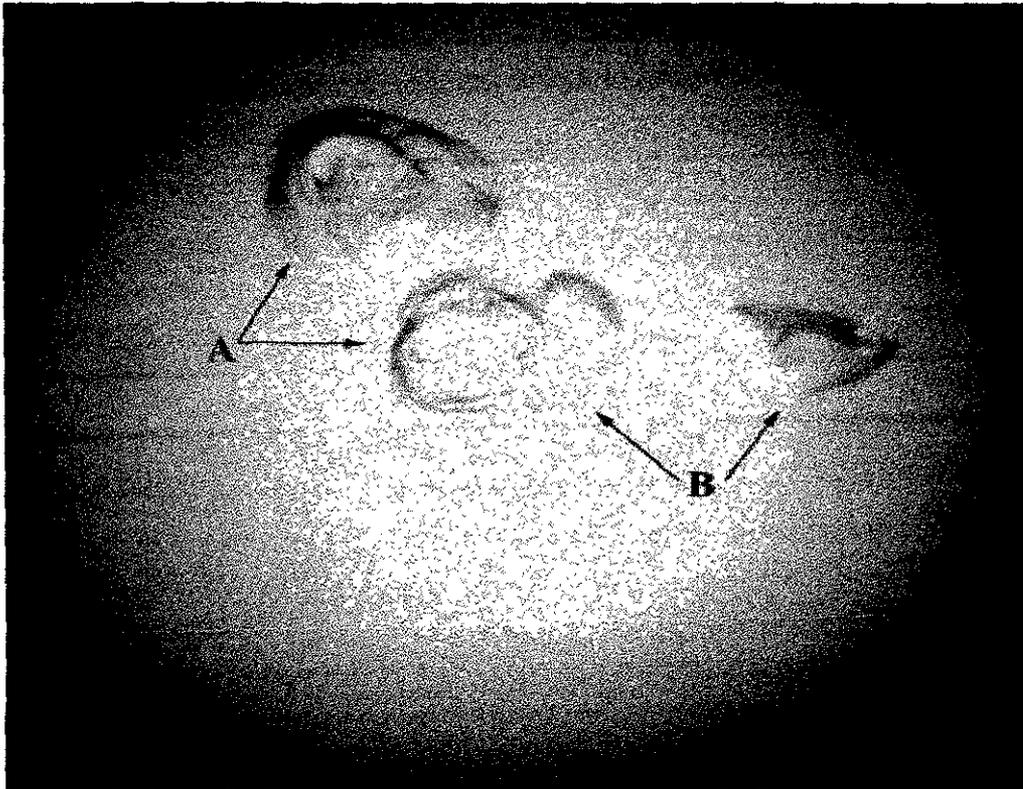


Figura 9.- Complejo cristalino enzima-activador a muy bajas concentraciones, crecido en tartrato de sodio y potasio 0.75 M en hepes 200 mM pH 7 activador 50 μ M.

PARTE II -RESOLUCION DE ESTRUCTURAS-

Los primeros datos que fueron trabajados, provenían del sincrotrón de Brasil y correspondían al complejo Glucosamina 6-fosfato desaminasa con activador 5 mM. En total se consiguieron 31 patrones de difracción con 1° de oscilación para el primer conjunto de datos (patrón de difracción no. 1) y para el resto fue de 1.5°.

El patrón de difracción no. 12 se cortó debido a una caída del haz de electrones lo cual es una situación muy común entre éste tipo de equipos, mismo que se reestableció en el patrón de difracción no.13.

El procesamiento de las imágenes de difracción para obtener las intensidades de cada reflexión se realizó con los programas XDISP y DENZO, en donde obtuvimos que el cristal pertenece a un sistema trigonal con grupo espacial R32 con parámetros de celda $a=b=125.58$ $c=222.34$, siendo la unidad asimétrica un dímero. Posteriormente fueron analizados estadísticamente con CCP4, siendo ésta parte del proceso importante debido a que aquí, se analizaron los datos que podrían ser desechados ya que en su conjunto podrían aumentar estadísticamente los errores. Podemos observar que se obtuvieron un número alto de reflexiones únicas, es decir, contábamos con un número de datos suficientes que nos permitirían generar el dímero completo. Los resultados son resumidos en la siguiente tabla:

RESOLUCION	40.5-2.40 Å
REFLEXIONES UNICAS	26622
Rsym	0.128

LIMITE DE RESOLUCION	Rfac
7.50	0.040
6.16	0.050
5.35	0.054
4.79	0.058
4.38	0.060
4.06	0.066
3.80	0.074
3.58	0.087
3.40	0.101
3.24	0.121
3.11	0.157
2.59	0.212
2.88	0.224
2.78	0.302

2.69	0.329
2.61	0.351
2.54	0.433
2.47	0.480
2.41	0.522

88% DE LOS DATOS TOTALES A 2.4 Å DE RESOLUCION.

MULTIPLICIDAD	3
DIMENSIONES DE LA CELDA	125.58 125.58 222.34 90 90 120
GRUPO ESPACIAL	R32
RESOLUCION	(20-2.4 Å)

En la última faja de resolución podemos observar que los datos son malos a 2.4 Å, no obstante continuamos a esa resolución debido a que contabamos con el 88% de los datos necesarios y una multiplicidad de 3.

RESOLUCION DE LA PRIMERA ESTRUCTURA.

El proceso de afinamiento se realiza con el programa XPLOR a través de la técnica de reemplazo molecular en la cual se propone, que dos moléculas muy similares generan patrones de difracción que difieren principalmente debido a la orientación y posición de las moléculas en la celda unitaria del cristal. Esto permite definir una operación general involucrando rotación y traslación, encontrando los puntos equivalentes de densidad electrónica en cada molécula. En este caso disponemos de las coordenadas de glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E coli* (entrada Protein Data Bank: 1DEA). Para ésta estructura no se realizaron rotaciones ni traslaciones debido a que pertenece al mismo grupo espacial.

AFINAMIENTO

Lo primero que se realizó fue un afinamiento como CUERPO RIGIDO, en donde el modelo de la proteína es dividido en uno o mas grupos rígidos. En este primer proceso logramos obtener un R de 0.266%, el cual es un

resultado muy aceptable e indicando que con un sólo paso logramos embonar casi perfectamente bien en nuestra estructura de estudio, con el fin de agilizar el proceso solo realizamos muy pocos pasos de afinamiento a 2.4 Å, para posteriormente observar un mapa de densidad que nos mostrara si alguno de los sitios estaba vacío.

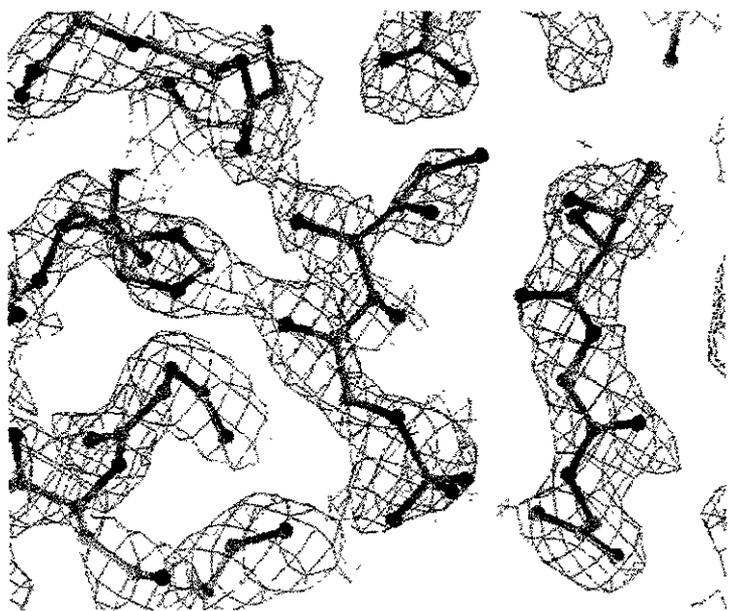
Después de este primer paso de afinamiento construimos un mapa de densidad electrónica utilizando el programa XPLOR y visualizándolo con "O" a una resolución de 2.4 Å, se identificó que tanto el sitio activo como el sitio alostérico se encontraban ocupados, lo cual lo podemos observar en la figura 10.

Debido a que ésta estructura podía presentar los dos sitios ocupados y que la resolución de 2.4 Å no permitiría buenos afinamientos de los factores de temperatura B, continuamos con la resolución de otras estructuras para encontrar una en que uno de los sitios se encontrara vacío.

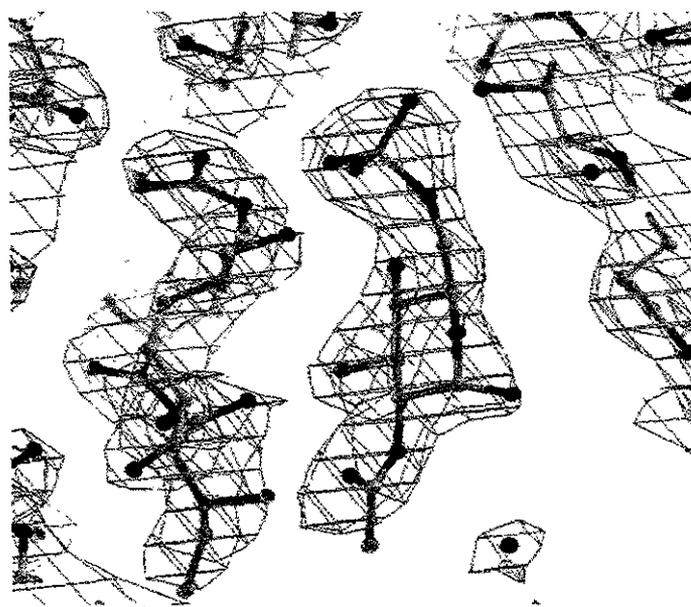
RESOLUCION DE LA SEGUNDA ESTRUCTURA.

La segunda estructura que se resolvió fue del cristal obtenido con glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli* en ausencia de ligantes y obtenido de amortiguador acetato de sodio 1.8 M, 100 mM hepes pH 6.3 proveniente del ensayo 2. Resultaba sospechoso que este cristal fuera R sugiriendo la presencia de ligantes a pesar de no haber sido incluido en el medio de cristalización.

La medición se llevó a cabo en el detector de área en el laboratorio de estructura de proteínas en el Instituto de Química-UNAM. Esta se llevó a cabo a temperatura ambiente (18 °C), teniendo como resultado un conjunto de datos con 13 patrones de difracción con oscilaciones de 2° cada uno. En seguida se muestran los resultados después de la integración con DENZO y CCP4.



a)



b)

Figura 10.- Mapas de densidad electrónica a 1 sigma del complejo enzima-activador mostrando los sitios activo (a) y alostérico (b), ocupados.

RESOLUCION	80- 2.8 Å
REFLEXIONES UNICAS	16089
Rsym	0.090

LIMITE DE RESOLUCION	Rfac
7.94	0.020
6.78	0.035
6.02	0.050
5.46	0.043
5.04	0.040
4.70	0.043
4.42	0.050
4.19	0.050
3.99	0.054
3.81	0.074
3.66	0.084
3.52	0.104
3.40	0.130
3.29	0.138
3.19	0.165
3.10	0.207
3.02	0.250
2.94	0.286
2.87	0.351
2.80	0.385

94.8 % DE DATOS TOTALES A 2.8 Å DE RESOLUCION

MULTIPLICIDAD	1.3
DIMENSIONES DE LA CELDA	126.16 126.16 223.73 90 90 120
GRUPO ESPACIAL	R32
RESOLUCION	10-2.8 Å

AFINAMIENTO

Al cabo de la integración pudimos percatarnos que el número de

reflexiones era de 16089. Debido a que si queremos tener datos confiables es necesario contar con un número de reflexiones de al menos 2 veces el número de valores a determinar por átomo en el experimento. El dímero está formado por 4184 átomos multiplicados por 4 (valores a determinar por átomo x, y, z, y v) obtenemos 16736 que al multiplicarse por 2 resulta que necesitamos 33472 reflexiones. El número de reflexiones para éste caso son muy pocas debido a la baja resolución de la difracción del cristal, por lo que tuvimos que recurrir a las simetrías no cristalográficas, es decir, a partir del monómero que tenemos se aplica una matriz que genera la unidad asimétrica completa. Eso divide entre 2 el número de parámetros y en consecuencia se acerca al criterio planteado.

En la siguiente tabla se describe el proceso de afinamiento utilizado para la determinación de la estructura.

Proceso	Número de pasos	Resolución (Å)	R _{free} inicial	R _{inicial}	R _{free} final	R _{final}
Minimización (Positional)	30	10-2.8	0.347	0.317	0.344	0.301
Afinamiento de factores B	30	8-2.8	0.345	0.302	0.313	0.266
Minimización (Positional)	30	10-2.8	0.322	0.294	0.311	0.27
Adición de activador						
Afinamiento de factores B	6	10-2.8	0.301	0.265	0.279	0.244
Búsqueda de moléculas de agua, total encontradas 44.						
Afinamiento de factores B	15	10-2.8	0.261	0.286	0.235	0.267
Minimización (Positional)	30	10-2.8	0.241	0.237	0.234	0.271
Afinamiento de factores B	25	10-2.8	0.270	0.232	0.262	0.222

Lo que se visualizó a través de "O" en el mapa de densidad electrónica fue algo inesperado, porque a pesar de haber realizado la cristalización en ausencia de cualquier tipo de ligante, se encontró una molécula de activador en el sitio alostérico y el sitio activo se encontraba vacío, resultado que hasta el momento no se tiene reportado en la literatura y todo parecía indicar que con esta estructura podríamos realizar las comparaciones ver Figura 11 y 12.

La pregunta a resolverse era ¿De dónde provenía ese activador si no se le había colocado durante el ensayo?, la respuesta fue que provenía del último paso de purificación y se presentó debido a una diálisis no muy exhaustiva, antes de iniciar el proceso de cristalización.

Por otro lado, tomando en cuenta que la cristalización se llevó a cabo a pH 6.3 nos lleva a pensar que a pHs bajos pudiera existir un cambio drástico de afinidad por el activador generando un alto número de estados R, aunque es necesario un estudio mucho más a fondo para poder llegar a afirmar esto.

Inicialmente se compararon los factores de temperatura con 1DEA (dos sitios ocupados por fosfatos), 1HOT (fosfato en el sitio activo y activador en el alostérico) y R con activador presente en trazas. Con la comparación anterior nos percatamos que teníamos variables con las estructuras como: temperatura de colecta, resolución y sobre todo que la estructura de R con trazas de activador fue refinada con simetrías no cristalográficas.

El inconveniente de usar simetrías no cristalográficas radica en que al tener un solo monómero debido a las pocas reflexiones obtenidas, no podemos deducir si éste es el primero o el segundo monómero o un promedio de los dos, por lo que esta estructura fue descartada a pesar de que tenía un sitio vacío y uno ocupado. En los cristales con grupo espacial R32, el monómero 1 posee diferentes contactos con las unidades vecinas presentando, el monómero 2 menos contactos cristalográficos. Esto puede alterar la movilidad de diferentes regiones de cada monómero.

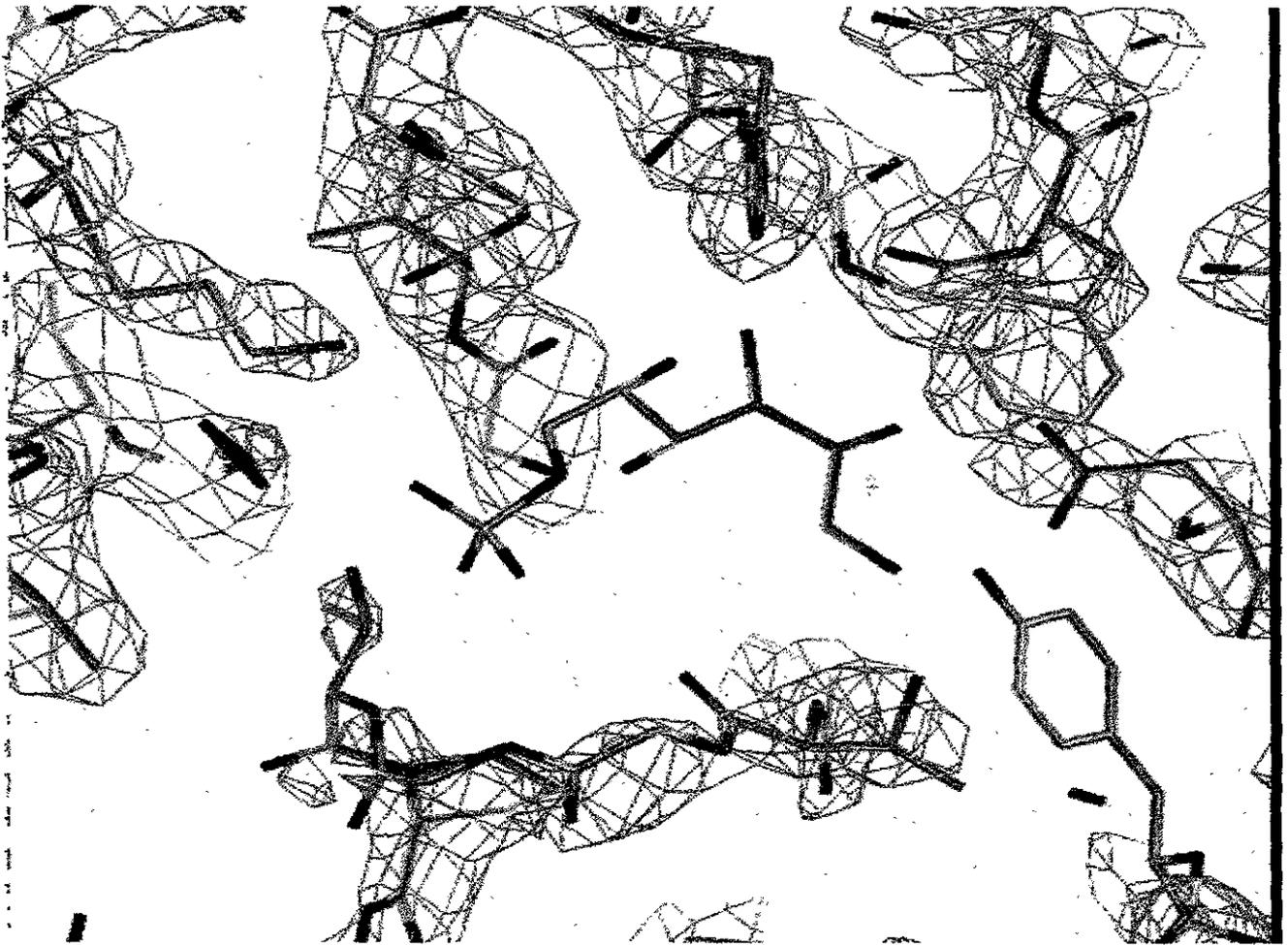


Figura 11.- Sitio activo vacío del complejo Glucosamina 6-fosfato deaminasa de *E.coli* con activador presente en trazas, en la parte central podemos observar fructosa 6-fosfato que se colocó para mostrar que en el sitio activo, efectivamente no hay densidad electrónica en el mapa que nos indique la presencia de ligantes.

El paso siguiente fue resolver una tercera estructura que contara con reflexiones suficientes como para obtener la unidad asimétrica completa y que la difracción no fuera tan baja, para que de esta forma se pudieran utilizar los valores de los factores de temperatura B en la comparación

gráfica.

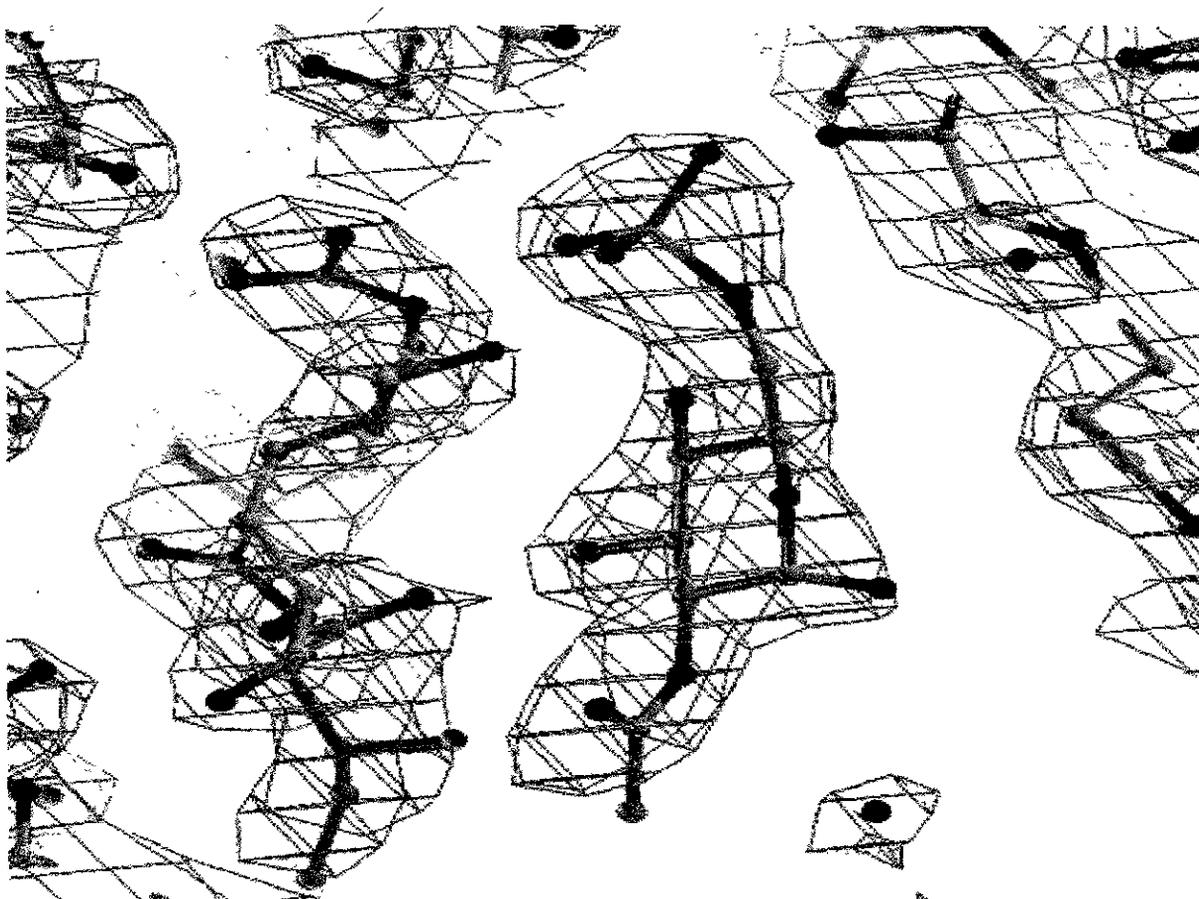


Figura 12.- Sitio alostérico ocupado por GlcNAc6P en cristal de forma R a pH 6.3.

RESOLUCION DE LA TERCERA ESTRUCTURA

La tercera estructura resuelta (DAE0) fue del cristal proveniente del ensayo 4, el cual se formó en tartrato de sodio y potasio 0.75 M en hepes 200 mM pH 7 activador 50 μ M y la enzima utilizada fue dializada exhaustivamente durante 40 horas. Realizamos todo un monitoreo en

cuanto a condiciones de cristalización para tratar de reproducir el cristal anterior en donde fue encontrado el sitio activo vacío y el sitio alostérico ocupado. El cristal fue medido en el sincrotrón de Stanford a una temperatura de -160 °C, utilizando 35 % de trealosa como solución criopreservadora. Esta solución es necesaria para proteger al cristal del cambio brusco de temperatura, posible ruptura, así como también del congelamiento del cristal. El medio criopreservador tiene la función de formar un material vidrioso (amorfo) al solidificarse bruscamente.

Se obtuvieron un grupo de datos de 60 patrones de difracción, con 1° de oscilación; los datos fueron integrados con DENZO y CCP4.

RESOLUCION	76.69-1.728 Å
REFLEXIONES UNICAS	65814
Rsym	0.083

LIMITE DE RESOLUCION	Rfac
7.74	0.060
5.47	0.056
4.47	0.062
3.87	0.065
3.46	0.066
3.16	0.065
2.93	0.070
2.74	0.073
2.58	0.079
2.45	0.086
2.33	0.092
2.23	0.102
2.15	0.108
2.07	0.123
2.00	0.139
1.93	0.157
1.88	0.181
1.82	0.220
1.77	0.260
1.73	0.284

95.6 % DE DATOS TOTALES A 1.74 Å DE RESOLUCION

MULTIPLICIDAD 3.5
DIMENSIONES DE LA CELDA 124.228 124.228 222.724
90.00 90.00 120.00
GRUPO ESPACIAL R32

El contar con 65814 reflexiones para ésta estructura permite reproducir al dímero completo así como también alcanzar una resolución alta (1.73 Å) y un buen afinamiento de los factores de temperatura, B.

AFINAMIENTO

El proceso de afinamiento se llevó a cabo de acuerdo con los siguientes pasos.

Proceso	Número de pasos	Resolución (Å)	R _{free} inicial	R _{inicial}	R _{free} final	R _{final}
minimización de cuerpo rígido	20	1.8	0.316	0.318	0.305	0.301
minimización de cuerpo rígido	20	1.8	0.3231	0.3202	0.3110	0.3080
templado (annealing)	200	1.8	0.3102	0.3081	0.3088	0.2891
Adición del activador.						
minimización (minimize)	15	1.8	0.3011	0.2817	0.3001	0.2803
afinamiento de factores B	10	1.8	0.3001	0.2803	0.2977	0.2755

A través de un mapa de densidad observamos con más detalle que en uno de los dos sitios activos se encontraba una molécula de tartrato, la cual provenía del medio de cristalización.

Como paso siguiente se le colocó ácido tartárico y continuamos con el proceso de afinamiento:

Proceso	Número de pasos	Resolución (Å)	R _{free} inicial	R _{inicial}	R _{free} final	R _{final}
minimización (minimize)	10	1.8	0.2981	0.2757	0.2979	0.2755
afinamiento de factores B	10	1.8	0.2979	0.2755	0.2974	0.2749
Búsqueda de moléculas de agua, total encontradas 315.						

Se realizó un ajuste manual con "O" a través de un mapa de fo-fc y de 2fo-fc, encontrándose dobles conformaciones y quitándose algunas moléculas de agua (3).

Proceso	Número de pasos	Resolución (Å)	R _{free} inicial	R _{inicial}	R _{free} final	R _{final}
minimización (minimize)	25	1.8	0.2625	0.2407	0.2597	0.2376
Afinamiento de factores B	20	1.8	0.2598	0.2377	0.2588	0.2359
Búsqueda de moléculas de agua, obteniéndose un total de 811.						
minimización (minimize)	25	1.74	0.2533	0.2235	0.2508	0.2202
Afinamiento de factores B	20	1.74	0.2510	0.2202	0.2502	0.2198
Búsqueda de moléculas de agua a 1.74 Å, encontrándose en total 915.						

A través de "O" se realizó nuevamente un ajuste manual y los pasos del afinamiento finales fueron:

Proceso	Número de pasos	Resolución (Å)	R _{free} inicial	R _{inicial}	R _{free} final	R _{final}
minimización (minimize)	20	1.74	0.2479	0.2165	0.2475	0.2156
Afinamiento de factores B	15	1.74	0.2477	0.2159	0.2476	0.2155

A través de un mapa de "O" encontramos en el sitio activo del monómero 1 una molécula de tartrato y activador en el sitio alostérico, (figuras 13 y 14), mientras que en el monómero 2 obtuvimos las condiciones ideales para nuestro trabajo, es decir, el sitio activo vacío y activador en el sitio alostérico (figuras 15 y 16).

SOBREPOSICION DE ESTRUCTURAS.

Al realizar una sobreposición de los carbonos α del segundo monómero de un conformero R con el sitio activo y el sitio alostérico ocupados por fructosa 6-fosfato, con Dae0, conformero con el sitio activo vacío y sitio alostérico ocupado, se observó un RMSD de 0.23 Å considerando 215 átomos (figura 17). Este resultado nos indica que estas dos estructuras tienen un RMSD menor al error experimental (0.25 Å gráfica de Luzzati) considerándose geoméricamente iguales excepto en los residuos 74-83, 109-117, 144-146, 160-185 y 264-266 los cuales presentan una diferencia entre la sobreposiciones de los carbonos α mayores a 0.5 Å.

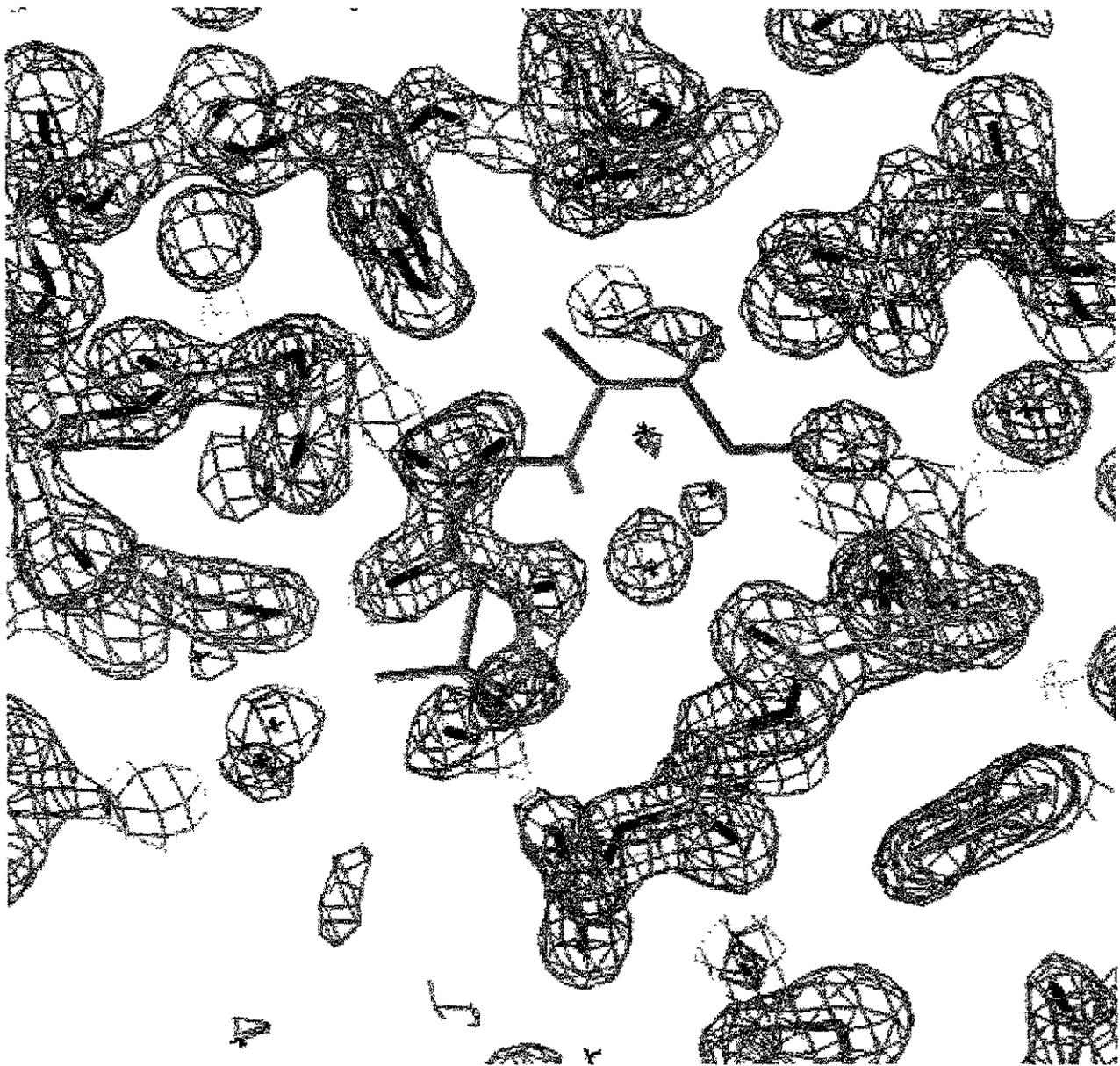


Figura 13.- Molécula de ácido tartárico encontrada en el sitio activo del monómero 1 a 1 sigma. En la parte central de la figura podemos observar una molécula de fructosa 6-fosfato (azul) que nos muestra que en ese sitio no hay densidad electrónica para una molécula de activador pero si para una molécula de ácido tartárico.

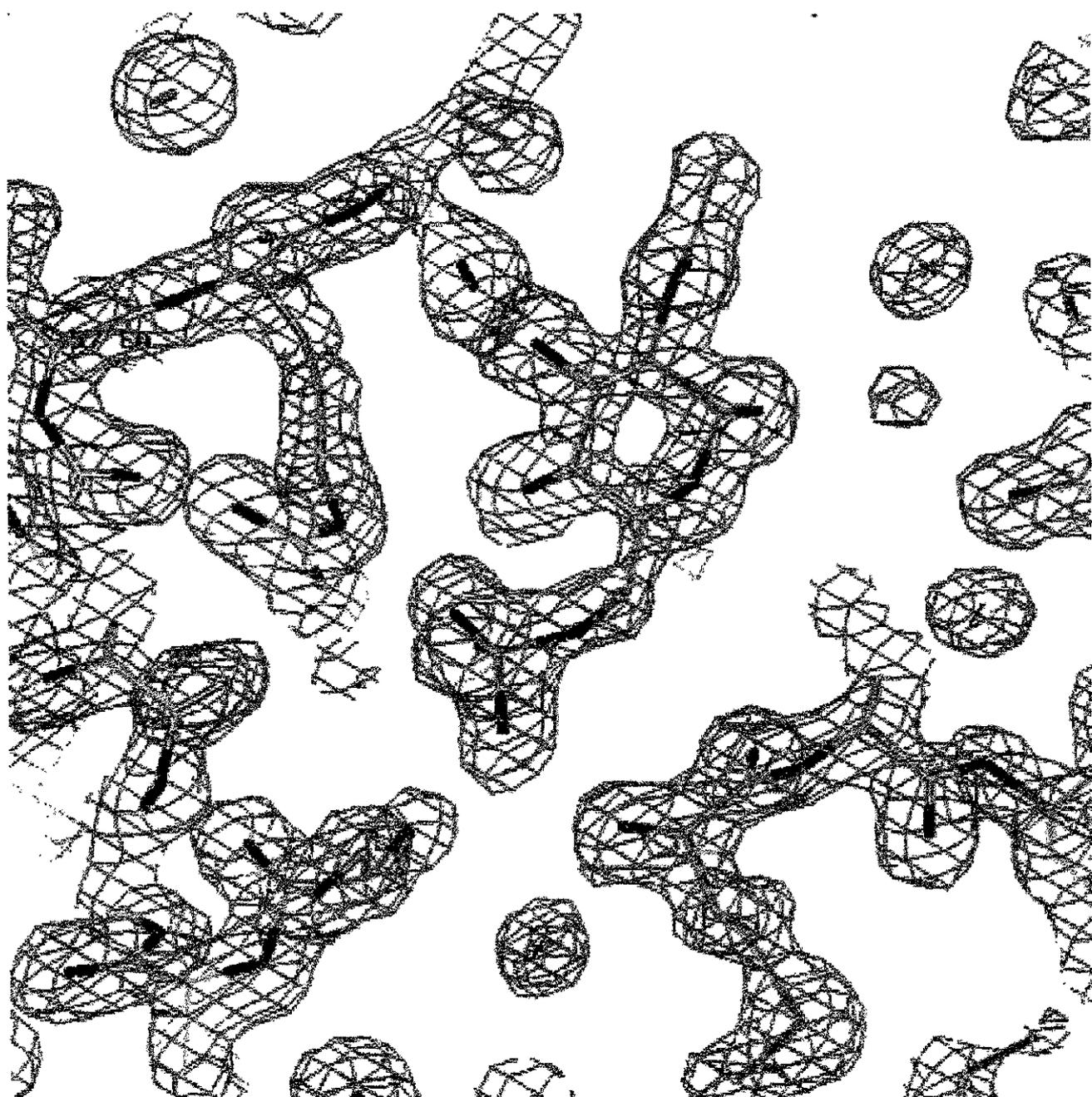


Figura 14.- Sitio alostérico con una molécula de activador en el monómero 1 de Dae0.

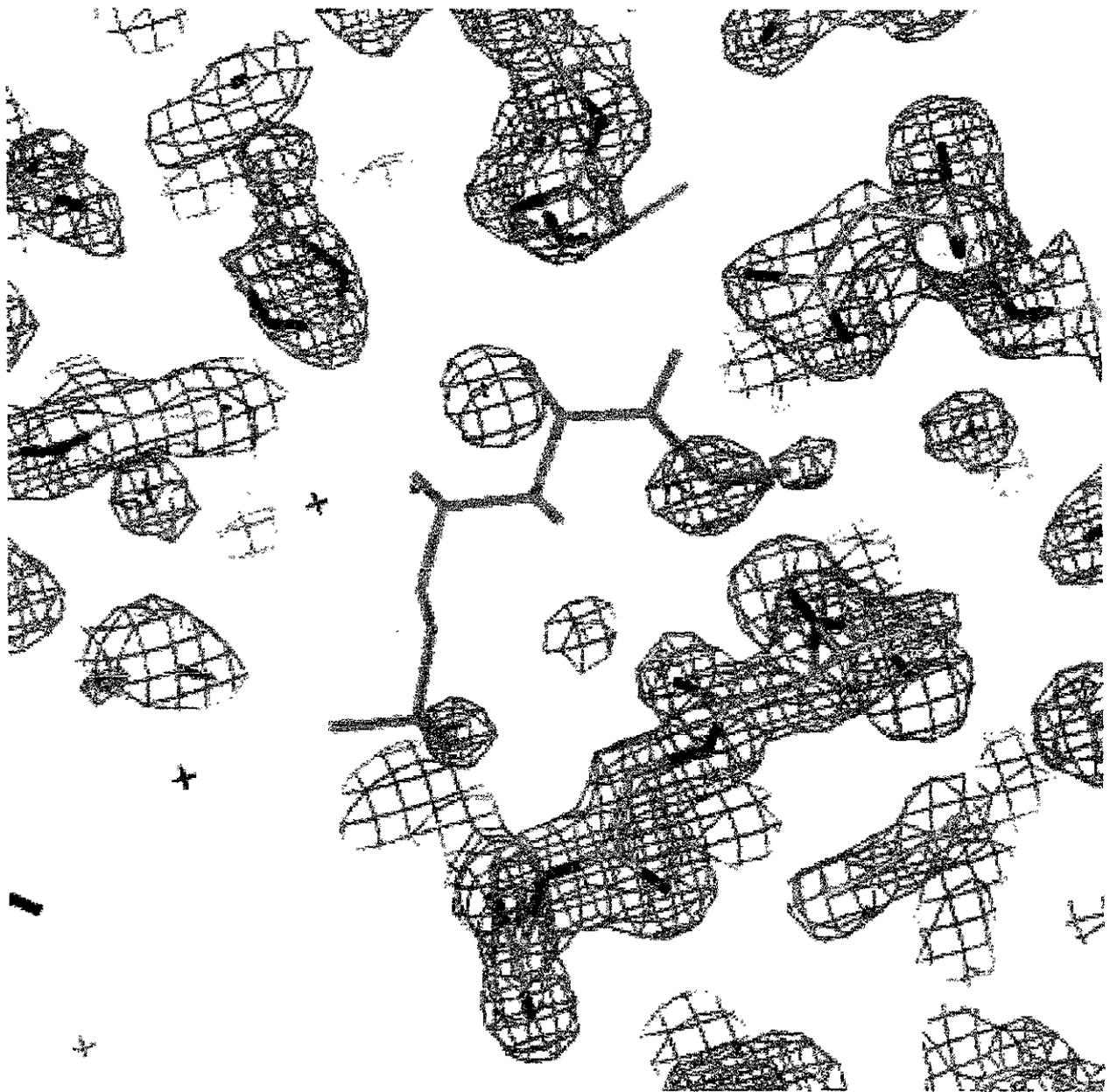


Figura 15.- Sitio activo vacío encontrado en el monómero 2 de Glc6P desaminasa con 50 μM de activador. Se colocó fructosa 6-fosfato para mostrar la ausencia de densidad electrónica para una molécula de activador.

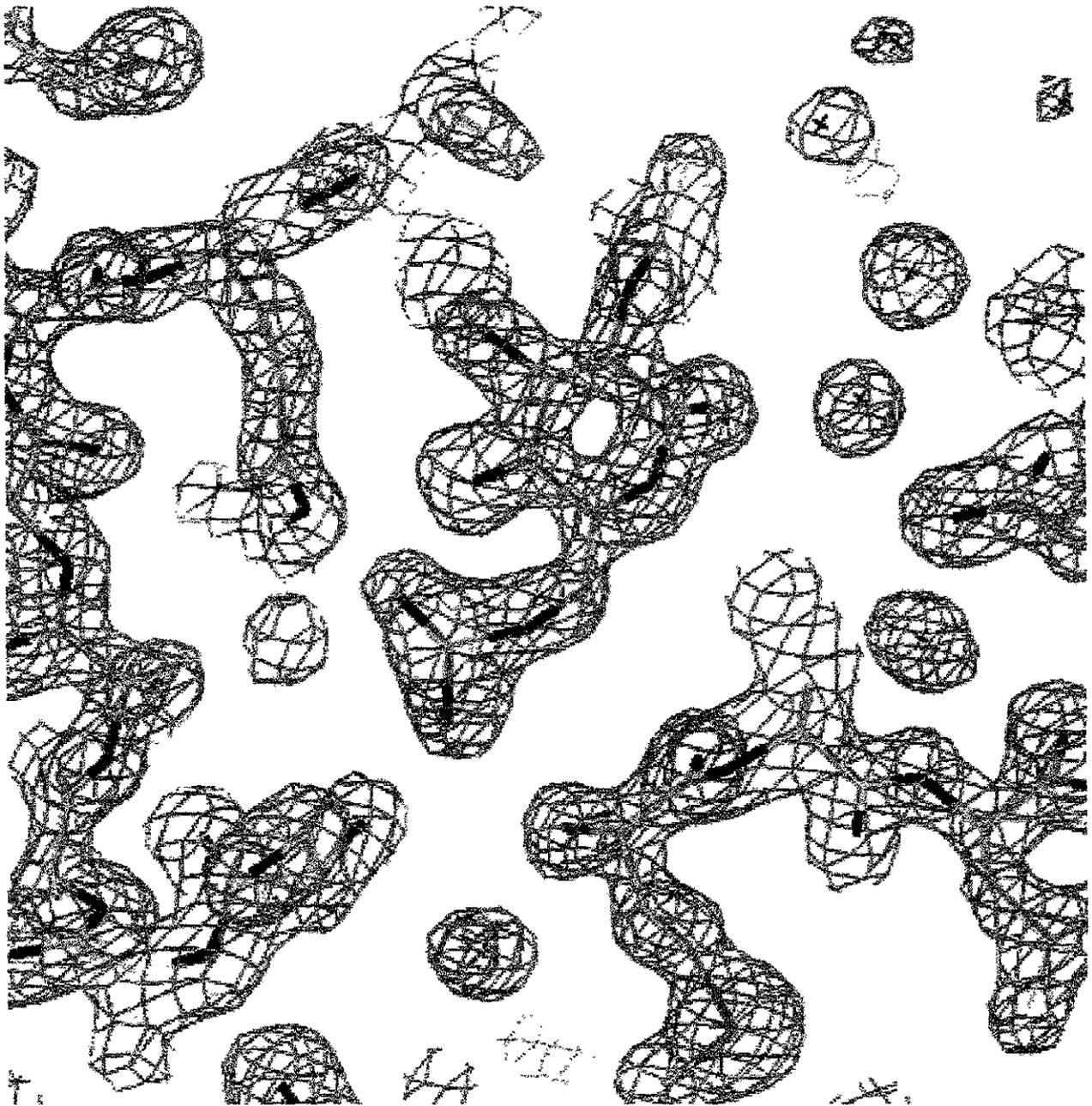


Figura 16.- Sitio alostérico ocupado por una molécula de activador en el monómero 2 de Dae0, a 1σ .

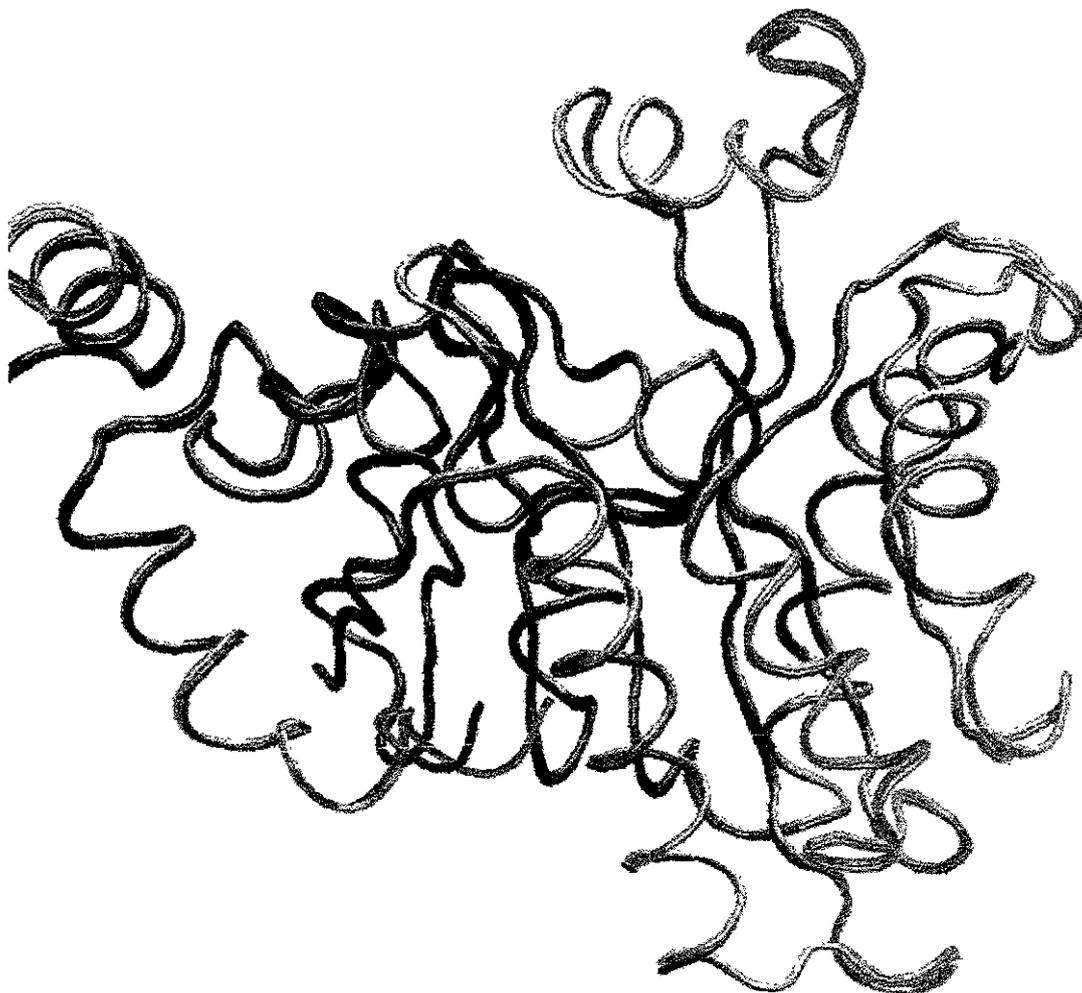


Figura 17.- Sobreposición de los carbonos α de Dae0 y Frur con un RMSD de 0.23 Å excepto en las asas vecina (residuos 73-83, 109-117, 144-146), tapa del sitio activo (residuos 160-185) y el C-terminal (residuos 264-266). Azul menor movilidad, verde mayor movilidad.

COMPARACION GRAFICA DE LOS FACTORES DE TEMPERATURA B.

La comparación gráfica de los factores de temperatura B de las diferentes estructuras, se llevó a cabo con el segundo monómero de la unidad asimétrica, debido a que el primer monómero presenta contactos cristalinos con el hexámero vecino así como para éste último caso el

primer monómero presenta una molécula de ácido tartárico, en el sitio activo.

Estructura	Sitio activo y alostérico	Unidad asimétrica	Resolución (Å)	Dimensión del cristal	Temperatura de colecta (°C)
Dae0	vacío-ocupado	Dímero	1.74	0.2mm X 0.15mm	-160
FruR	ocupado-ocupado	Dímero	2.15	0.4 mm	-160
T	vacío-vacío	Monómero	2.3	0.4 mm	-160

Teniendo como base los factores de temperatura de las tapas del sitio activo ya reportados para el conformero R, las cuales se encuentran por debajo de 50 Å² mientras que para el conformero T están alrededor de 100 Å². podemos considerar que la tapa del estado R es muy fija y la del estado T es mas móvil (Oliva *et al*, 1995 y Horjales *et al*, 1999).

Cuando comparamos gráficamente los factores de temperatura de los residuos (1-161) antes de la tapa del sitio activo de las tres estructuras (Figura 18), es posible observar que los factores de temperatura del conformero T son mayores que los de las estructuras R (tanto de la que tiene los dos sitios ocupados como la que tiene un sitio vacío y uno ocupado). Estos valores altos nos indican mayor movilidad. En contraste, tenemos que FruR (conformero R con los dos sitios ocupados) resultó ser la mas fija así como también Dae0 (conformero R que presenta sitio activo vacío y sitio alostérico ocupado), con factores de temperatura por debajo de 45 Å².

Esta comparación nos mostró un comportamiento uniforme entre ellas excepto para los residuos 71-82, 110-113 y 143-148. Estos últimos correspondiendo a las mismas zonas con mayor diferencia en RMSD; atribuyéndose éstas diferencias tanto estructurales como en los factores de temperatura a una mayor vibración las cuales están relacionadas con la tapa del sitio activo.

Los cambios más importantes los pudimos observar en la gráfica de la figura 19, en la cual se muestran los factores de temperatura correspondientes a la tapa del sitio activo de Dae0, indicándonos que ésta tapa es más móvil con respecto a un estado R que tiene los dos sitios ocupados (Fru_r). En esta parte de la estructura se ve claramente la diferencia que existe entre Dae0 (línea azul) y Fru_r (línea magenta) en donde los factores van desde los muy cercanos a 100 Å² para el primer caso y por debajo de 50 Å² para el segundo caso; lo que nos lleva a concluir que las diferencias que existen se deben a la presencia de un sitio vacío pero que a su vez está directamente relacionada a una ligadura de fosfato. Cabe mencionar que esta diferencia también es observada en la sobreposición de los carbonos α .

En la figura 20, en la cual graficamos los factores de temperatura de los residuos 186-266 podemos observar valores ligeramente más altos para el confórmero T que para Dae0 y Fru_r. Sin embargo, Dae0 presenta un C-terminal más fijo con respecto a las dos estructuras.

La vibración de la tapa del sitio activo (160-185) provoca a su vez la movilidad de los residuos 71-82 y del 110-113, lo que lleva a una interacción entre asas vecinas en donde ocurre una estabilización de la asa formada por los residuos 110-113 y la movilidad de los residuos 71-82. Esto último siendo una hipótesis que requiere un estudio más a fondo que involucre un análisis de conformaciones múltiples superpuestas para Dae0 y que este proceso se encuentra en desarrollo. Por otro lado la asa formada por los residuos 143-148, se encuentra asociada directamente con la tapa del sitio activo por lo que era de esperarse que su movilidad se viera afectada. Con respecto al cambio de los factores de temperatura observados en la figura 18 de los residuos 28-33, que se ubican en una asa lejana a la tapa del sitio activo no se encuentra una correlación con este trabajo.

Figura 10.- Comparación de los factores de temperatura de los residuos 1-161.

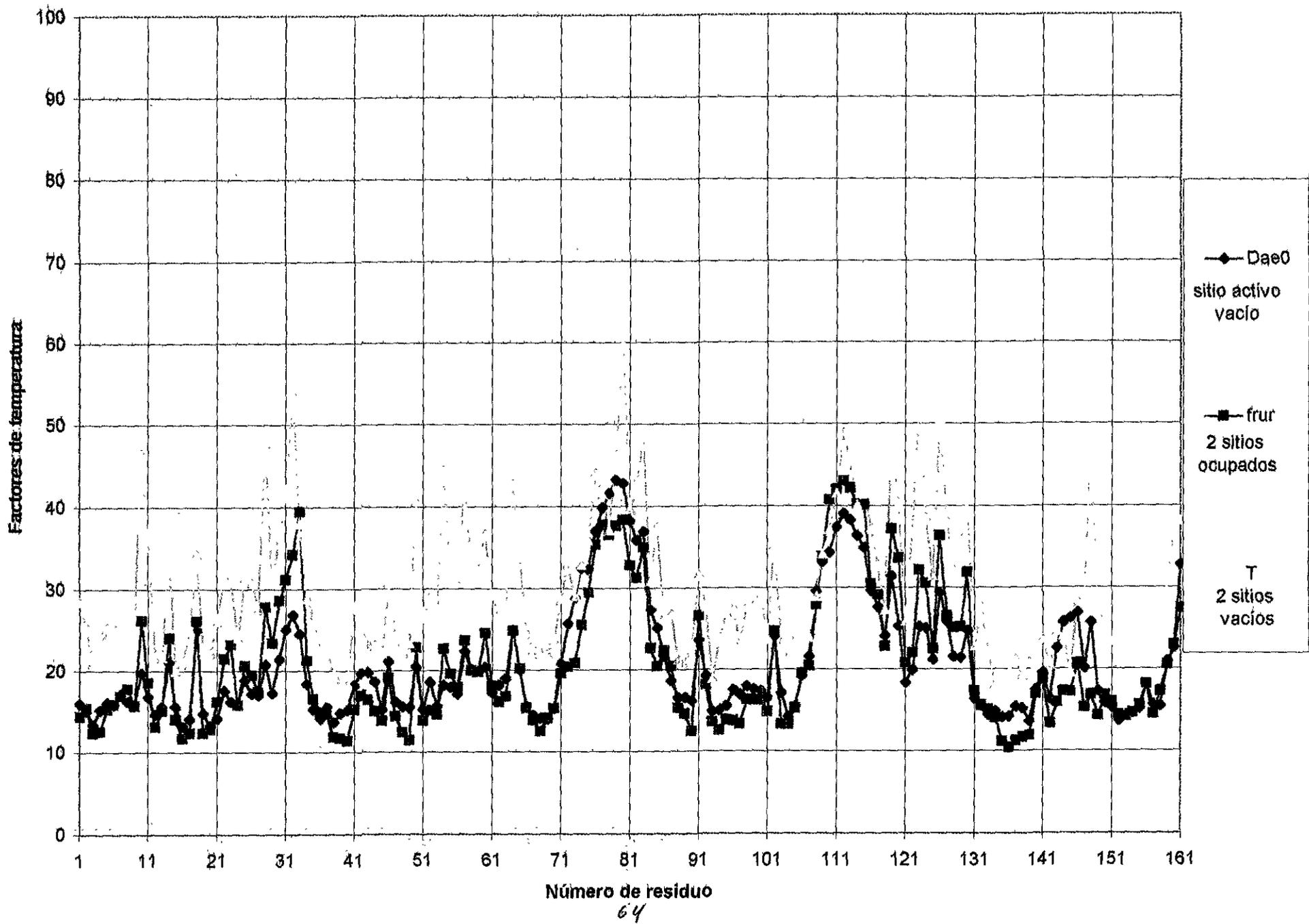


Figura 10. 19.- Comparación de los factores de temperatura de los residuos 162-185.

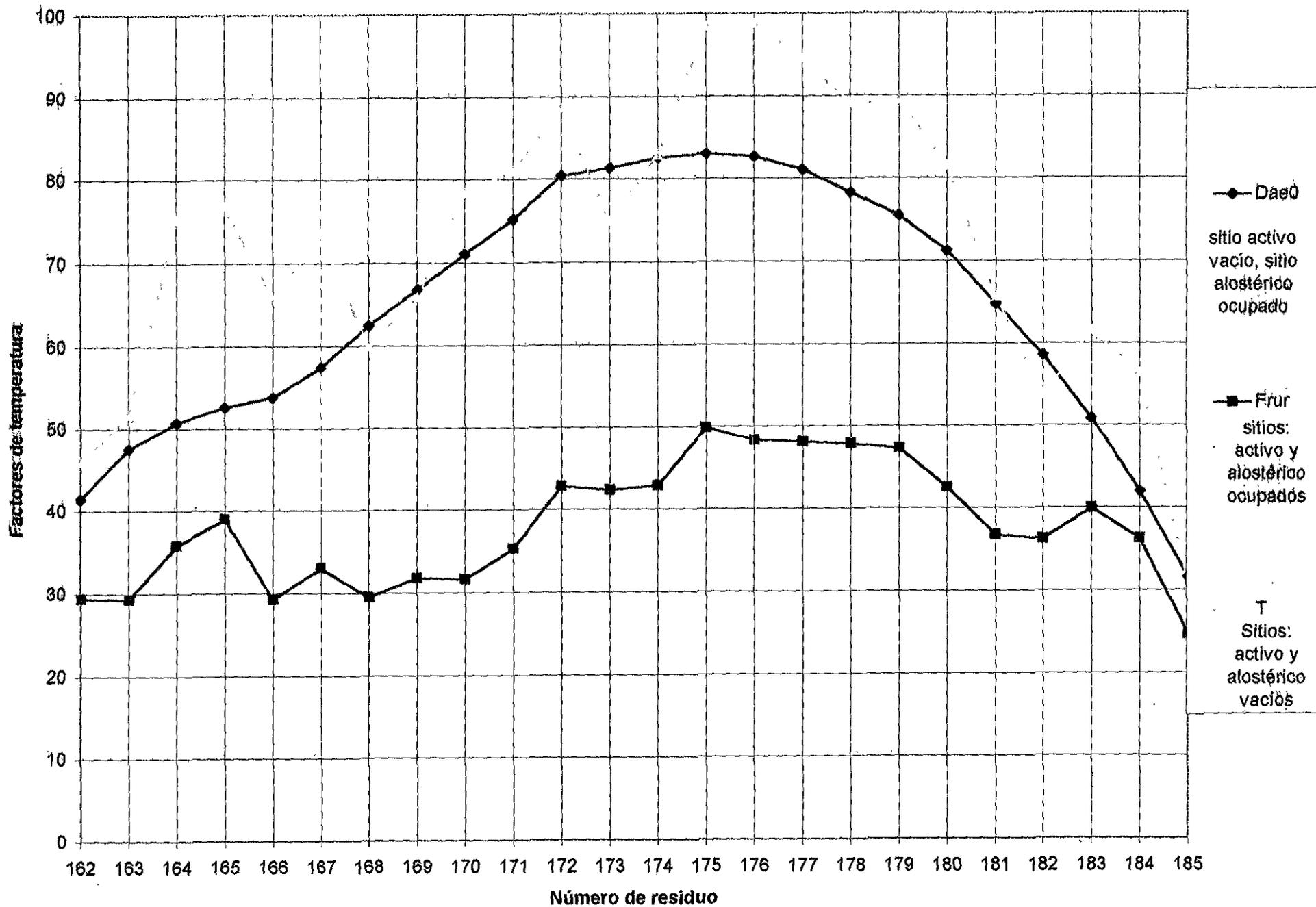
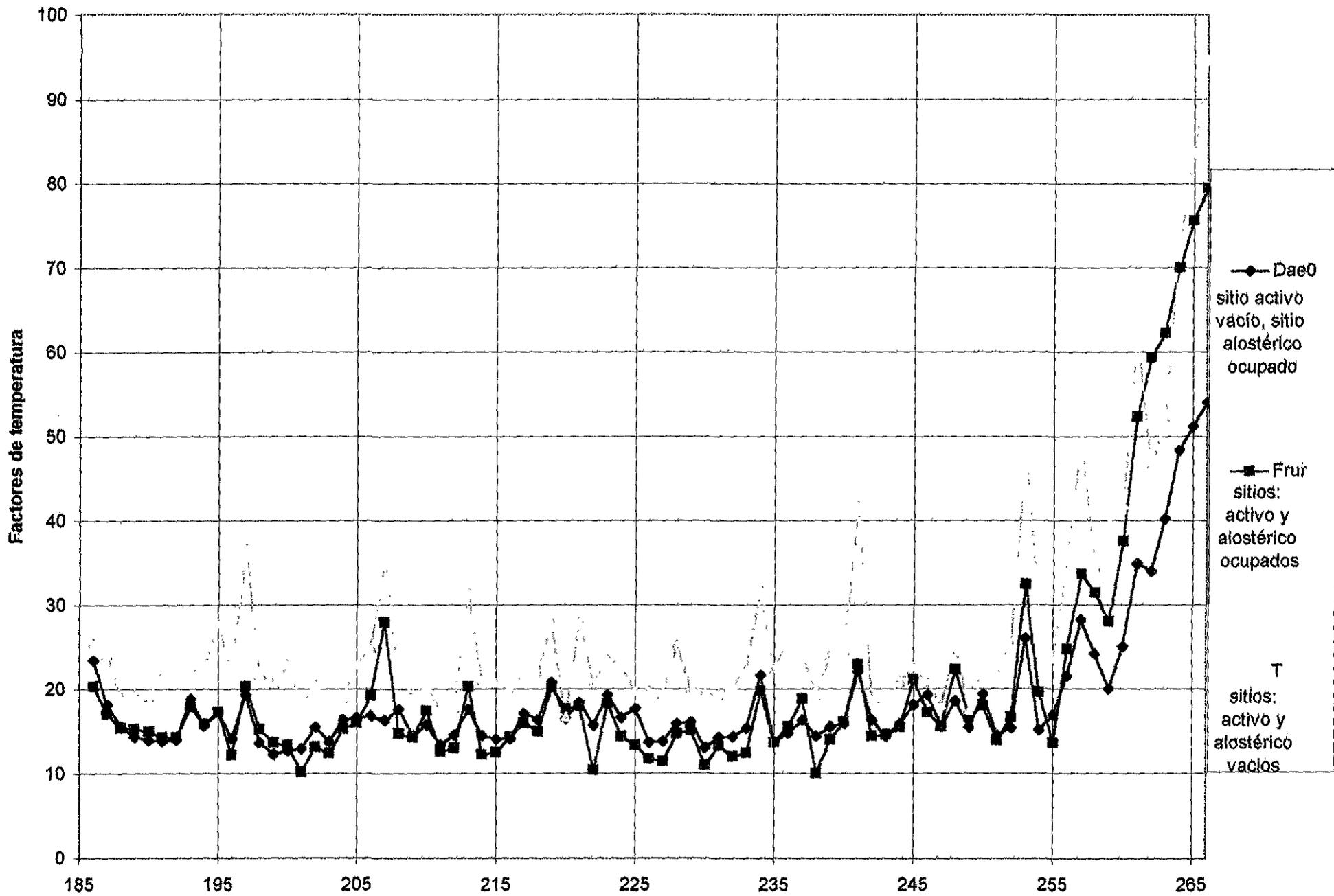


Figura no. 20.- Comparación de los factores de temperatura de los residuos 186-266.



Número de residuo

- 1.- ES POSIBLE CRISTALIZAR UN COMPLEJO DE GLUCOSAMINA 6-FOSFATO DESAMINASA CON ACTIVADOR A MUY BAJA CONCENTRACION, QUE PRESENTA EL SITIO ACTIVO VACIO Y EL SITIO ALOSTERICO OCUPADO.
- 2.- SE IDENTIFICO MEDIANTE LA RESOLUCION DE ESTRUCTURAS UN SITIO ACTIVO VACIO Y UN SITIO ALOSTERICO OCUPADO POR UNA MOLECULA DE ACTIVADOR, EL CUAL NO SE ENCUENTRA REPORTADO EN LA LITERATURA.
- 3.- NO SE PRESENTAN CAMBIOS ESTRUCTURALES SIGNIFICATIVOS ENTRE LAS ESTRUCTURAS (RMSD = 0.23 Å), QUE TIENEN 1 SITIO OCUPADO Y DOS SITIOS OCUPADOS, EXCEPTO EN LOS RESIDUOS 74-83, 109-117, 144-146, 160-185 Y 264-266.
- 4.- TODAS LAS COMPARACIONES SE REALIZARON CON EL MONOMERO 2 DEBIDO A QUE EL MONOMERO 1, PRESENTA CONTACTOS CRISTALINOS CON EL HEXAMERO VECINO ASI COMO TAMBIEN PORQUE SE ENCONTRO UNA MOLECULA DE ACIDO TARTARICO EN EL SITIO ACTIVO DE DICHO MONOMERO.
- 5.- DE ACUERDO CON LAS GRAFICAS DE LOS FACTORES DE TEMPERATURA ES POSIBLE OBSERVAR UN COMPORTAMIENTO UNIFORME ENTRE LAS TRES ESTRUCTURAS, EXCEPTO EN LOS RESIDUOS 28-33, 71-82, 110-113,

143-148, 161-184 Y 264-266. TODOS ESTOS CAMBIOS EXCLUYENDO LOS RESIDUOS 28-33 Y 264-266, SON INTERPRETABLES COMO RESULTADO DE UNA DISMINUCION DE LA MOVILIDAD DE LA TAPA DEL SITIO ACTIVO, ASOCIADO A LA UNION DEL ACTIVADOR. RESULTANDO SER UN PRIMER INDICIO DE UN CAMBIO DE MOVILIDAD DE LA TAPA DEL SITIO ACTIVO QUE NO ESTA ASOCIADA A LOS CONFORMEROS R o T, SINO A LA PRESENCIA DEL SUSTRATO EN EL SITIO ACTIVO.

ACRONIMOS

GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GlcN6P desaminasa	Glucosamina 6-fosfato desaminasa
Fru6P	Fructosa 6-fosfato
GlcNAc6P	N-Acetil-glucosamina 6-fosfato
Vmax	Velocidad máxima
Km	Constante de Michaelis
NAD	Dinucleótido de niacina y adenina
LNLS	Laboratorio nacional de luz sincrotrón
CCP4	Programa colaborativo computacional 4
PDB	Protein Data Bank
RMN	Resonancia magnética nuclear
CNS	Crystallography & NMR System

- 1.- Horjales, E., Altamirano, M.M., Calcagno, L.M., Garratt, R.C., and Oliva, G. The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure* May 1999, 17 (5), 527-537.
- 2.- Segel, I. H., *Enzymes kinetics, Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, a wiley-interscience publication (1993).
- 3.- Voet D. and Voet J. G., *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons, Inc. (1995).
- 4.- Branden C. and Tooze J., *Introduction to protein structure*, Garland Publishing, Inc. (1991).
- 5.- McPherson A. *Preparation and analysis of protein crystals*. Krieger publishing company, Malabar Florida, (1982).
- 6.- Mitchell E., Kuhn P. and Garman E., Demystifying the synchrotron trip: a first time user's guide. *Structure* May 1999, 7: R111-121.
- 7.- Duncan E. M., *Practical protein crystallography*, Academic Press, Inc., (1993).
- 8.- Rossmann M. G., The molecular replacement method, *Acta Cryst.* (1990) A46, 73-82.
- 9.- Ducruix A. & Giegé R., *Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach*, at Oxford university press, (1992).
- 10.- Giacovazzo, C. ed. *Fundamentals of Crystallography*, International Union Crystallography, Oxford Science Publications.
- 11.- Creighton T. E., *Proteins, Structures and molecular properties*, second edition, 1993, W. H. Freeman and company, 1993.

- 12.- Morrison R. T. y Boyd R. N., Química Orgánica, Fondo educativo interamericano, 1976.
- 13.- Leloir, L. F. & Cardini, C. E. (1956). Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 33-42.
- 14.- Comb, D. G. & Rossman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* 232, 807-827.
- 15.- Calcagno, M., Campos, P. J., Mulliert, G. & Suástegui, J. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine 6-phosphate isomerasa-deaminasa from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys. Acta* 787, 16-173.
- 16.- Rogers, M. L., Ohgi, T., Plumbridge, J. A. & Söll, D. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* nagE and nagB genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system and for glucosamine 6-phosphate deaminase. *Gene* 62, 197-207.
- 17.- Plumbridge, J. A. (1989). Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon. *Mol. Microbiol.* 3, 506-515.
- 18.- Vogler, A. P. & Lengeler, J. W. (1989). Analysis of the regulon from *Escherichia coli* k12 and *Klebsiella pneumoniae* and of its regulation. *Mol. Gen. Genet.* 219, 97-105.
- 19.- Hodge J. E (1955). Amadori arrangement. *Advan. Carbohyde. Chem.* 10. 169-205.
- 20.- Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J. P. (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 88 -118.
- 21.- Jones, T. A., Zou J. Y., Cowan S.W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improve methods for building protein models in electron density maps and locating errors in these models. *Acta Crystallogr. A.* 47: 110-119.

- 22.- Brünger A. T. (1992). XPLOR Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR., Yale University Press.
- 23.- Collaborative Computational Project, Number 4, (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. A* 47, 110-119.
- 24.- Otwinowski, Z. & Minor W. (1996). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. (Carter, C. & Sweet, R.M., eds), pp 307-325, Academic Press, Boston MA.
- 25.- Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing (Sawyer L., Isaacs, N. & Bailey S., eds), pp. 56-62, SERC Daresbury Laboratory, Warrington.
- 26.- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Gros, P., Nilges, M., Read, R. J., Crystallography & NMR System, 1997-1998, Yale University, *Acta Cryst.* (1998) D54, 905-921.
- 27.- Oliva G., Fontes M. RM, Garratt R. C, Altamirano, M.M., Calcagno M. L., Horjales E. *Structure*. Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. 1995, 3: 1323-1332.
- 28.-Lehninger, Albert, Biochemistry, second edition, 1978, worth publishers, inc.