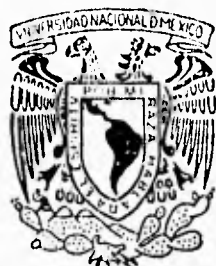


107
2 ej^o



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DISECCION DE UNA ENZIMA POR
INGENIERIA DE PROTEINAS**

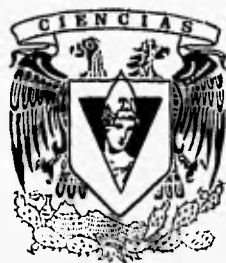
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

SAMUEL LARA GONZALEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIVISION DE CIENCIAS
1996
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Disección de una enzima por ingeniería de Proteínas

realizado por Samuel Lara González.

con número de cuenta 8623845-0, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Myriam M. Altamirano Bustamante

Propietario M. en C. Laila Gutierrez Kobeh

Propietario Biol. Rosalinda Tapia López

Suplente Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

Suplente M. en C. Ma. Guadalupe Maldonado-Mercado

M. Altamirano
L. Gutierrez
R. Tapia
C. Castillo
M. Maldonado

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

Agradecimientos:

A todos aquellos que me brindan su amistad y compañía, a ustedes dedico este trabajo y con el mi estima.

Con cariño agradezco a mi mamá Ma. Magdalena González y a mi padre Patricio Lara, ambos son ejemplo, motivación y viva experiencia para mí. Con ustedes de mi parte un abrazo y la seguridad de que siempre ahí estaré.

A don carácter Toño, a aquel que siempre tiene un pero en la boca Marcos y a Ulises quien sabe muy bien como ponernos de cabeza. Gracias por estos años de convivencia.

A quienes me han aconsejado y apoyado, con quienes he convivido y con quienes he tenido el placer de compartir un juego, una pelota, mi niñez. Mis familiares, mis abuelos Rafa, Josué y Lolita; mis tíos Joel, Ernesto, Lulú, Marta, Martita, Esther y Efraín, mis primos Luis, Víctor, Edith, Violeta, Moy, Moni, Ciau, Maru, Martín, Alejandro y Daniel.

A los amigos compañeros del mismo barco: Una gran amistad y alguien en quien poder confiar Leticia, amigo de trabajo y fiestas Agustín, de mucha decisión Claudia, demasiado insistente Katia y Rafael, con quienes el trabajo se volvió diversión.

A mis amigos del laboratorio sels: El Dr. Calcagno, Laura, Lupita, Roberto y muy especialmente a Myriam quien siempre me ha apoyado y aconsejado.

A Gabriela M. M. M. quien conocí hace mucho y con quien cada día puedo descubrir y compartir la risa, el silencio, la angustia, el enojo y todas y cada una de las pequeñas y grandes cosas que la vida me puede dar.

Por último para todos ustedes y los entendidos
.....mi copa esta rebosando.

Samuel Lara González.

RESUMEN.

El estudio de la estructura de fragmentos de proteínas y su comparación con el plegamiento nativo de la proteína natural completa es una herramienta importante para analizar el efecto estabilizador de las interacciones terciarias en los diferentes segmentos de la estructura secundaria en una molécula. La aún insuficiente comprensión de estas interacciones hace que la predicción de las estructuras secundarias a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína no puedan sobrepasar un límite que varía entre el 60 y 70% de exactitud. La investigación en este campo ha utilizado proteínas pequeñas y monoméricas, como son las ribonucleasas o las lisozimas. En esta investigación estamos utilizando un modelo experimental enteramente diferente: la expresión de fragmentos o segmentos de la cadena polipeptídica de una proteína compleja: la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Esta enzima es un oligómero formado por seis subunidades iguales de 29.7 kDa, organizada como un trímero de dímeros. Es una proteína alostérica y la estructura tridimensional de sus conformaciones R y T ha sido resuelta recientemente por métodos cristalográficos. Con base a un estudio previo de predicción de estructura secundaria, se diseñó una mutante para cortar la cadena en dos segmentos: 1-160 y 163-266, de 18.5 y 11.2 kDa respectivamente. La mutante se construyó insertando los correspondientes codones de final e inicio en la posición escogida. Los fragmentos se expresaron en el plásmido *pTZ18R* y se purificaron por filtración molecular en HPLC e inmunoabsorción. Los fragmentos tienen actividad enzimática residual y su purificación se siguió por un ensayo inmunoenzimático en filtros (ELIFA). Los datos de electroforesis en gradiente de poro de acrilamida en condiciones nativas y en HPLC de filtración molecular muestran que los fragmentos de 18.5 y 11.2 kDa interactúan formando oligómeros de diferentes pesos moleculares: 180, 90, 60, 30 kDa. En condiciones desnaturizantes y reductoras existe predominantemente el fragmento de 18.5 kDa y una banda tenue de 11.2 kDa. Los estudios espectrofotométricos de absorción y diroscopia circular de los diferentes oligómeros nos permiten concluir que ambos fragmentos se pueden considerar como unidades de plegamiento, cuyos oligómeros mantienen la capacidad de ligar al activador alostérico.

INDICE

1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCION.	4
2.1 Aminoazúcares.	4
2.2 Características de la enzima GlcN6P desaminasa.	6
2.3 Constantes fisicoquímicas de la GlcN6P desaminasa	10
2.4 Ingeniería de Proteínas.	11
2.5 Plegamiento de Proteínas.	13
3. OBJETIVOS.	18
4. MATERIAL Y METODOS.	19
4.1 Producción de biomasa.	19
4.1.1 Construcción de la cepa mutante.	19
4.1.2 Escalamiento en fermentador de tres litros.	19
4.2 Purificación.	22
4.2.1 Producción y purificación de anticuerpos policlonales.	22
4.2.2 Construcción de la matriz de inmunofinidad.	23
4.2.3 Purificación de los fragmentos.	23
4.3 Caracterización y análisis de los fragmentos polipeptídicos.	25
4.3.1 Caracterización de fracciones no-purificadas.	25
4.3.2 Caracterización de los fragmentos purificados.	26
5. RESULTADOS.	28
5.1 Purificación.	28
5.2 Caracterización de fracciones no-purificadas.	29
5.2.1 Electroforesis en gradiente de poro.	29
5.2.2 Filtración molecular en HPLC.	29
5.2.3 Isoelectroenfoque.	36
5.3 Caracterización de los fragmentos purificados.	36
5.3.1 Filtración molecular en HPLC.	36

5.3.2 Dicroísmo Circular.	41
5.3.3 Parámetros cinéticos.	41
6. DISCUSION.	44
7. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS.	48
8. APENDICE.	53
8.1 Preparación de placas LB ampicilina.	53
8.2 Inmuno replicas tipo Western.	53
8.3 ELISA (ensayo inmunoenzimatico en filtros).	55
8.4 Electroforesis.	56
8.5 Tinción de Plata para detectar proteínas en geles de poliacrilamida	59
8.6 Geles de gradiente de poro.	60
8.7 Isoelectroenfoque.	62
8.8 Activación de Agarosa con CNBr	64
9. ABREVIACIONES	66
10. BIBLIOGRAFIA.	67

INTRODUCCION.

2.1 Aminoazúcares.

Los aminoazúcares son monosacáridos en donde uno o más grupos OH se encuentran reemplazados por grupos amino que pueden o no estar acetilados. La D-Glucosamina (GlcN) y D-galactosamina son componentes de diferentes polisacáridos de importancia biológica. Los aminoazúcares derivados como el ácido *N*-acetilmurámico que se compone de una *N*-acetil-D-glucosamina unido a un D-acido láctico, es un componente predominante en las paredes celulares bacterianas.

Los aminoazúcares D-glucosamina (GlcN) y *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) son componentes esenciales de los peptidoglicanos de paredes celulares y lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Cuando estos se encuentran en el medio ambiente son tomados y utilizados en la síntesis de lípidos y la pared celular⁽¹⁾. En ausencia de aminoazúcares en el medio ambiente la bacteria debe sintetizar la glucosamina-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato y glutamina vía la enzima glucosamina-6-fosfato sintasa (E.C. 2.6.1.16). Esta enzima se encuentra codificada en el gen *glmS* a 84 min en el mapa cromosómico de *Escherichia coli*⁽²⁾.

Los aminoazúcares también son fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria, particularmente la GlcNAc produce tasas de crecimiento similares a las producidas por la glucosa. El catabolismo de los aminoazúcares en *Escherichia coli* depende de un grupo de enzimas codificadas en el regulón divergente *nagE-nagBACD* (fig.1), localizado a 15.5 min en el mapa cromosómico, el cual ha sido caracterizado recientemente^(3,4,5). Las proteínas codificadas en los genes *nagA* y *nagB* son la *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato desacetilasa (E.C. 3.5.1.25) y la glucosamina-6-fosfato desaminasa (E.C. 5.3.1.10) respectivamente, ambas son necesarias para el metabolismo de la *N*-acetil-D-glucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P) a fructosa-6-fosfato (Fru6P) y amonio. En presencia de glucosamina (GlcN6P) sólo es necesario el gen *nagB*, pero se requieren de ambos genes en presencia de GlcNAc6P. El gen *nagB* se encuentra regulado a

nivel de la transcripción por una proteína represora codificada por el gen *nagC* que se une a la región intergénica *nagE-nagB*. Para inducir el regulón, la GlcNAc o la GlcN deben entrar a la célula⁽⁶⁾.

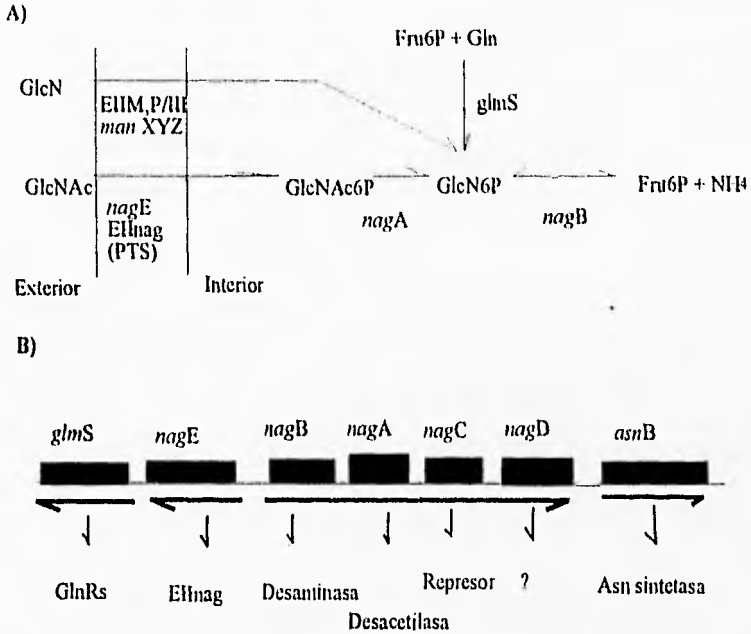


Fig 1. A) Esquema del metabolismo de la GlcN y la GlcNAc. Se indican los intermediarios y los genes que codifican a las enzimas que participan en la biosíntesis y degradación (tomado de Plumbridge⁽³⁷⁾). B) Esquema del regulón *nagE-nagBACD* y las enzimas que codifica. (tomado de Plumbridge⁽³⁸⁾).

2.2 Características de la enzima GlcN6P desaminasa.

La glucosamina 6 fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa) cataliza la reacción de isomerización desaminación de la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) en Fructosa 6-fosfato (Fru6P) y amonio, en ambos sentidos. La enzima es un homopolímero hexamérico compuesto de subunidades idénticas de 266 residuos y 29.7 kDa. La GlcN6P desaminasa presenta cooperatividad homotrópica positiva respecto al sustrato GlcN6P en el sentido desaminante, y Fru6P en el biosintético. Este comportamiento se puede explicar con el modelo alostérico concertado de Monod para el caso de unión no exclusiva de sustrato. El activador alostérico de la GlcNAc6P, es un ligando de unión exclusiva cuyo efecto es incrementar la afinidad aparente por GlcN6P (o Fru6P en la reacción reversa). A concentraciones saturantes de GlcNAc6P, la GlcN6P desaminasa describe una cinética hiperbólica clásica. Este tipo de activación alostérica se conoce como un sistema K-puro^(7,8,9).

En 1991, Altamirano y col. propusieron una estructura secundaria de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* K12, basada en datos de espectrofotometría de Dicroísmo Circular (DC) y análisis teóricos de la secuencia de la estructura primaria de la proteína. A partir del análisis de DC se calculó un 34% de α -hélice, 9% de hoja- β paralela, 11% de hoja- β antiparalela, 15% de giros y 35% de estructura no repetitiva (fig 2). El cálculo de porcentaje de estructura a partir de seis métodos de predicción diferentes fue de: 37% de α -hélice, 22% de hoja- β , 22% de giros y 23% de estructura no repetitiva (fig 3). La predicción de estructura calculada muestra un alto grado de alternancia entre las estructuras α y β (fig 4); el 64% de las hélices son anfipáticas y el 90% de las hojas- β son hidrofóbicas. Todos estos datos permiten concluir que la desaminasa de *E. coli* pertenece a la familia α/β ⁽¹⁰⁾.

Si bien actualmente conocemos la estructura tridimensional de la desaminasa de *E. coli* obtenida por cristalografía de rayos X, a una resolución de 2.1 Å⁽¹¹⁾, durante el desarrollo del proyecto únicamente contábamos con la información fisicoquímica y el análisis teórico de la secuencia.

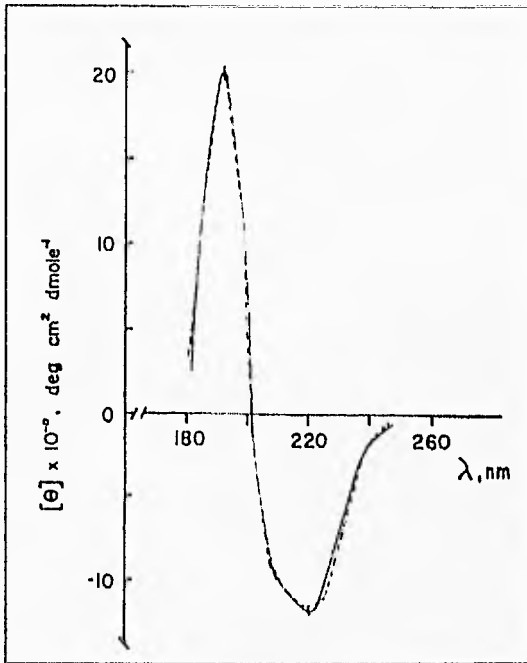


Fig 2.- Espectro de DC en el UV lejano para la enzima GlcN6P desaminasa silvestre. (tomado de la referencia⁽¹⁰⁾).

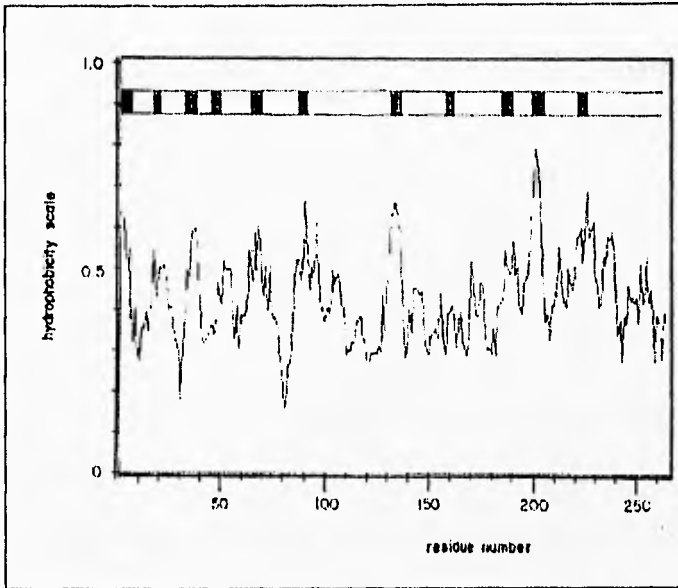


Fig 3.- Perfil de hidrofobicidad para la GlcN6P desaminasa silvestre. (tomado de la referencia ⁽¹⁰⁾).

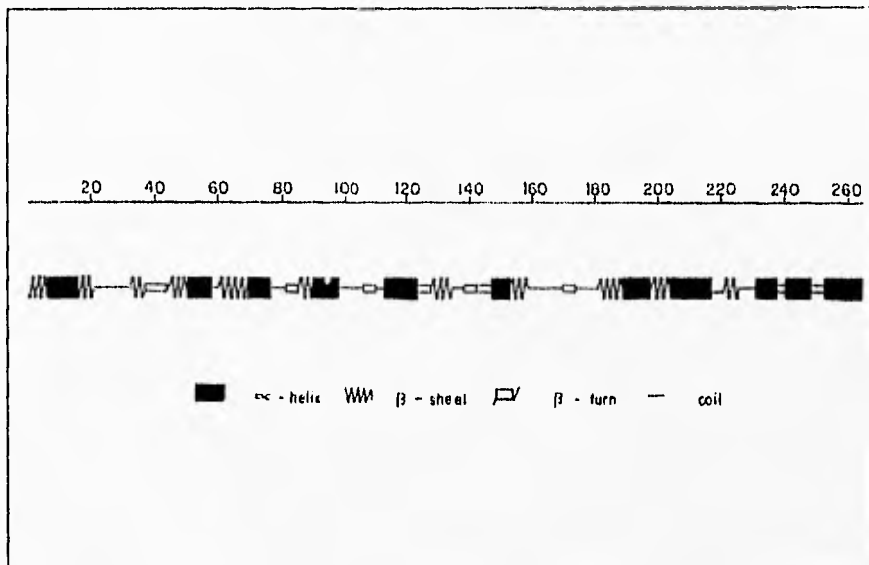


Fig 4.- Diagrama en el que se muestra la disposición de estructuras repetitivas en la enzima silvestre (tomado de referencia⁽¹⁰⁾).

Desde un punto de vista mecanístico, la GlcN6P desaminasa pertenece al grupo de las enzimas isomerasas ceto-aldólicas. Un mecanismo para la reacción de isomerización desaminación de GlcN6P en Fru6P y amonio que cataliza la GlcN6P desaminasa se propuso por Midelfort y Rose⁽¹²⁾. Estos autores demostraron que la enzima tiene la misma especificidad estereoquímica y anomérica que las otras (2R)- aldo isomerasas, incluyendo la transferencia intramolecular de un protón de la cara 1-re de la cis-enolamina desde el carbono 2 al oxígeno carbonílico en posición C1.

2.3 Constantes fisicoquímicas de la GlcN6P desaminasa:

Peso molecular=179,870

peso por subunidad=29,780

Coefficiente de sedim.=9.0 S

pH isoelectrico=6.1

Vol. parcial específico=0.737cm³/g

$\epsilon_{278}(\text{pH } 8)=20 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

k_{cat} (sentido desaminante)=1800 s⁻¹

k_{cat} (sentido sintético)=400 s⁻¹

(por molécula)

(por molécula)

K_m GlcN6P =2mM

$h_{\text{max}}= 3$

2.4 Ingeniería de Proteínas.

Actualmente el estudio de las proteínas está llegando al área de diseño molecular. El problema de construir una proteína para que interactúe con un ligando parece ser equivalente al diseño de una molécula pequeña para que sea reconocida por una proteína conocida. La diferencia se basa en que nuestro conocimiento acerca de cómo las macromoléculas determinan las funciones es aún incompleto, así como no se conoce con certeza como la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional de una proteína dada.

La ingeniería de proteínas se puede definir como el diseño y la construcción de nuevas proteínas, por lo general con la manipulación de sus genes⁽¹³⁾; esto abarca desde grandes proyectos de ingeniería molecular así como modificaciones puntuales realizadas por mutagénesis dirigida. Esta última permite el reemplazo, supresión o adición de un residuo de aminoácido en la secuencia de la proteína natural o la realización de modificaciones mayores. La mutagénesis se utiliza para analizar paso a paso los sitios catalíticos y ligantes, así como para establecer el papel de las cadenas laterales de aminoácidos en el plegamiento de las proteínas. Actualmente la mutagénesis dirigida es un procedimiento bien implementado, basado en técnicas establecidas y confiables; y es la continuación lógica del trabajo del investigador que ha clonado el gen de una proteína en particular.

El término de ingeniería de proteínas se refiere a la modificación de proteínas naturales por manipulación de sus genes y el término de diseño de proteínas se usa para mencionar la construcción de proteínas de novo. Para llegar a la construcción de mutantes sitio específicas, primero hay que determinar la importancia potencial de cada aminoácido sobre la función de la proteína. Esto se puede alcanzar con cierto tipo de experimentos como por ejemplo aquellos de modificación química o en el mejor de los casos tener el modelo cristalográfico de la proteína en cuestión.

La mutagénesis dirigida se realiza por lo general mediante la técnica conocida como mutagénesis por oligonucleótido, desarrollada inicialmente por Hutchinson y colaboradores, en la que un oligonucleótido sintético se emplea como mutágeno altamente específico⁽¹⁴⁾. La técnica es simple y elegante y puede emplearse para insertar, suprimir o sustituir residuos de aminoácidos en una proteína. Se parte de una cadena sencilla de DNA que contiene el gen que se va a mutar y de un oligonucleótido sintético, generalmente de 15 a 30 bases, construido de modo que sea complementario a la región donde nos interesa introducir una mutación. Esta complementariedad no es perfecta, ya que no la habrá en la región de los nucleótidos que corresponden al cambio. La cadena sencilla de DNA se inserta en el DNA del fago M13; éste y el oligonucleótido mutagénico previamente fosforilados, se mezclan e incuban a 65°C para producir su hibridación. La imperfección en el apareamiento de las bases no impide que el oligonucleótido se hibride con la copia de la cadena sencilla de DNA que contiene el gen. En seguida el oligonucleótido se prolonga con una DNA polimerasa, (fragmento Klenow, que tiene suprimida la función correctora) permitiendo la síntesis in vitro de una cadena de DNA complementario; se requiere de una DNA ligasa para unir la cadena naciente al extremo del oligonucleótido mutagénico. Esta molécula de DNA heterodúplex puede expresar tanto el gen de la enzima silvestre como el de la mutante, cuando se insertan en un vector de expresión adecuado (un plásmido) y los genes se expresan en células bacterianas transformadas.

La presencia de una enzima mutante puede distinguirse por medio de diferentes técnicas de selección, de acuerdo a sus características particulares. En muchos casos la forma de reconocer las colonias que expresan la mutación, es secuenciando la región mutada de DNA; posteriormente se aísla la progenie que expresa la mutante y la mutación se comprueba por secuenciación del gen completo. De esta forma es posible insertar, cambiar o quitar uno o más aminoácidos en una secuencia. Cualquier secuencia deseada puede construirse mediante la repetición de ciclos como el descrito.

La siguiente etapa y quizás la más interesante es estudiar la proteína modificada, comparando sus características con las que se conocen de la enzima natural no modificada a la que se conoce como forma silvestre. Para que el estudio de la proteína modificada se pueda realizar se requiere tenerla pura y en una buena cantidad, para ello se recurre generalmente a su sobreexpresión en bacterias.

2.5 Plegamiento de Proteínas.

Las proteínas globulares tienen la propiedad de adquirir una estructura espacial específica de manera autónoma basada en la información contenida en su secuencia de aminoácidos. Para adquirir su estado nativo, la cadena polipeptídica generalmente no requiere de factores extrínsecos; sin embargo recientemente se han obtenido resultados experimentales que apoyan la idea de Anfinsen⁽⁴¹⁾ de que la etapa limitante en el plegamiento de las proteínas puede estar catalizada por enzimas. Se han encontrado evidencias que indican claramente la existencia de tres tipos de eventos tardíos importantes en la organización de las proteínas: la formación de puentes disulfuro, la isomerización de la prolina y eventos de asociación; que son catalizados por proteínas específicas respectivamente: la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPI) y las chaperoninas⁽¹⁵⁾.

El mecanismo de plegamiento en vivo se desconoce y la forma en la que se le ha venido estudiando es a través de estudios de desnaturalización/plegamiento in vitro. Estos estudios de reconstitución tienen dos objetivos, primero la renaturalización de fragmentos inactivos y segundo el más importante la elucidación del código de plegamiento. Se sabe que el código genético reflejado en la secuencia de aminoácidos encierra la información para llegar de una estructura 1D a una 3D, sin embargo, aún estamos lejos de poder predecir esta estructura 3D⁽¹⁵⁾.

Para entender como se da el proceso de plegamiento en una proteína se le puede dividir en diferentes enfoques: 1) por que vía o proceso cinético una proteína puede adquirir su estructura tridimensional, 2) cuales son las bases físicas que proporcionan estabilidad a la conformación plegada, y 3) como es que la secuencia de aminoácidos determina una conformación plegada y no otra.

Los distintos estados conformacionales de una proteína suelen diferir sólo en los ángulos de rotación del armazón de aminoácidos en relación con los grupos laterales, no así con los enlaces disulfuro.

Los estados de plegamiento caracterizables en una proteína son aquellos que están en equilibrio, así se puede hablar de una conformación plegada nativa (N), un estado no plegado (U) y una conformación intermedia entre éstos (CI). La conformación nativa se conoce ampliamente gracias a los estudios de estructura con cristalografía de rayos X, y "n.m.r." así se conocen más de 100 motivos estructurales tridimensionales diferentes, y se sabe también que la flexibilidad en una proteína es mayor en la superficie donde algunas asas y grupos laterales pueden tener una conformación alternativa. El estado no plegado de una proteína en presencia de agentes desnaturizantes es un polipéptido lineal con interacciones al azar, lo cual no sucede cuando la desnaturización de la proteína se logra con cambios en temperatura o pH. La conformación o estado intermedio corresponde a una molécula colapsada con estructura secundaria parecida a la nativa y con un interior acuoso que también se le conoce como "molten globule"⁽¹⁶⁾.

La energía libre de estabilización de las proteínas globulares en solución acuosa se ha encontrado que es muy pequeña, valores calculados son de 50 +/- 15 kJ/mol, menos de 1/10 kJ por residuo. De manera que la estabilidad está basada sólo en algunos puentes de hidrógeno, pares iónicos o fuerzas hidrofóbicas.

El balance intrincado de fuerzas de estabilización y desestabilización explican la capacidad de que cierta secuencia de aminoácidos forme una estructura 3D estable. La naturaleza ha seleccionado ciertas conformaciones biológicamente activas que son sólo un poco más estables que los estados no-plegados de las proteínas.

El plegamiento de una proteína sigue una vía secuencial, donde pequeños fragmentos de estructura secundaria se combinan para formar superestructuras secundarias que a su vez se combinan para formar intermediarios de apariencia nativa o estados colapsados "molten globule". El "molten globule" in vitro es un intermediario común en todas las vías de plegamiento que característicamente tiene una estructura secundaria similar a la del estado nativo con residuos aromáticos muy flexibles, posee regiones expuestas hidrofóbicas que promueven la formación de agregados⁽¹⁵⁾.

La descripción completa de la vía de plegamiento de una proteína implica la caracterización del estado desnaturalizado y el estado nativo, conjuntamente con todos los intermediarios implicados⁽¹⁵⁾.

En una proteína de un sólo dominio en el equilibrio la transición es de dos estados N y U, con sólo el estado completamente plegado y el no-plegado en donde el estado intermediario es un subestado de la conformación U. Las proteínas multidominio se pliegan en etapas dependientes o independientes del plegamiento de cada dominio.

Por ejemplo la lisozima, una proteína monomérica de 129 residuos y una de las proteínas mejor caracterizada presenta cuatro α -hélices que junto con el extremo amino y carboxilo terminal forman un dominio, el segundo dominio está conformado por cuatro hojas- β y una gran asa, ambos dominios están conectados por dos hélices 3_{10} una en cada dominio y una pequeña región de una doble hoja- β antiparalela. En este caso se ha demostrado que el dominio formado por las cuatro α -hélices se forma primero e independientemente del segundo dominio⁽⁴³⁾.

Una forma de comprender como se alcanza el estado N es conociendo las bases físicas de su estabilidad. El estado conformacional plegado es ligeramente más estable que el estado no-plegado, consecuentemente la proteína plegada se puede desplegar espontáneamente. La termodinámica de los estados de transición ha sido bien caracterizada por Privalov⁽⁴⁵⁾. La entalpía ΔH y la entropía ΔS del desplegamiento son dependientes de la temperatura, esto conlleva a que exista una temperatura óptima para

el estado plegado. Las interacciones hidrofóbicas contribuyen fuertemente a la estabilidad del estado N. Las interacciones de tipo puente de hidrógeno, electrostáticas e interacciones de van der Waals no contribuyen a la estabilidad por que estas interacciones se pueden dar entre el estado U y el solvente. Se puede concluir que las interacciones en el estado plegado son energéticamente favorables en energía libre como entalpía.

El que solo existan dos estados conformacionales N y U es indicativo de que el plegamiento es un proceso cooperativo. Esto se puede deducir ya que las conformaciones intermediarias no son detectables, la estabilidad de las interacciones en la molécula plegada N son mayores que cualquier otra conformación, y el desdoblamiento con agentes desnaturizantes se da en una pequeña escala de concentración de los últimos. Las dos posibles razones de que exista cooperatividad en el plegamiento son: la presencia de interacciones desfavorables en los estados parcialmente plegados y la cooperatividad entrópica del estado plegado, que varía de acuerdo al número de interacciones y contribuciones individuales dentro de la molécula.

Se piensa que el plegamiento es rápido por que este se da por un mecanismo o vía definida de manera que nunca se forman todas las conformaciones posibles al azar. En aquellas proteínas que después de desplegarse no se vuelven a plegar, se dice que en el estado maduro la proteína ha perdido una parte de su estructura necesaria para dirigir el plegamiento. Para determinar el mecanismo o vía de plegamiento es necesario identificar a los intermediarios, sin embargo estos son termodinámicamente inestables⁽¹⁶⁾.

Los diferentes estados del plegamiento se pueden estudiar con diferentes métodos. Los intermediarios estables se pueden estudiar por métodos espectroscópicos, no así los estados intermediarios de transición que deben ser inferidos por cinética. Los estudios cinéticos se pueden dividir en dos de acuerdo a la escala de tiempo empleada: los mayores y los menores a 1 ms, así el "stopped-flow" pertenece al grupo de 1 ms o mayor, y los métodos de relajación("relaxation") como el cambio de temperatura o presión corresponden a los menores de 1 ms.

Los primeros estudios cinéticos se basaron en buscar pruebas globales de cambios en la estructura monitoreando todo el proceso de plegamiento o formación de dominios, por ejemplo monitoreando el cambio de fluorescencia de los triptofanos. Métodos más sofisticados incluyen discoisismo circular, para monitorear la formación de estructura secundaria. Para estudios más detallados se han usado en combinación n.m.r. y "quenched flow" con intercambio de H/D para monitorear la formación de estructura secundaria en posiciones específicas en algunas proteínas. La ingeniería de proteínas es otro método para obtener información detallada del análisis del plegamiento. La estrategia que se sigue se puede dividir en dos partes, primero para medir la energía de las interacciones no covalentes, y segundo para probar la vía de plegamiento; en la primera se miden los cambios en la estabilidad causados por una mutación para crear una base de datos de termodinámica empírica, y en la segunda se hacen medidas cinéticas de los estados no plegados y plegados para medir los cambios de energía de activación para todos los intermediarios de la enzima mutante¹⁷⁾.

OBJETIVOS.

Purificar la mutante *nag26* de la enzima Glucosamina 6 fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Esta enzima modificada contiene una doble mutación para cortar la cadena polipeptídica en dos fragmentos: 1-160 y 163-266, de 18.5 y 11.2 kDa respectivamente. La mutante se construyó insertando los correspondientes codones de termino e inicio en la posición elegida.

Estudiar el plegamiento de los fragmentos purificados, y analizar su capacidad de reconstituir la proteína nativa.

MATERIAL Y METODOS.

4.1 Producción de biomasa.

4.1.1 Construcción de la cepa mutante.

En colaboración con la Dra. Jacqueline Plumbridge del "instituto de Biologie Physico-chimique" de Paris Francia, se construyo el plásmido pTZ18R Δ nag con el cual se transformó una cepa de *E. coli* K12, IBPC 590⁽²²⁾. El plásmido construido contiene una doble mutación y proporciona resistencia a ampicilina. Como resultado de la doble mutación la cepa transformada sobreexpresa en dos fragmentos a la enzima silvestre: uno del residuo 1-160 y otro del 163-266, cuyas masas moleculares son de 18.5 y 11.2 kDa respectivamente. La elección del sitio de doble mutación se realizó en base a los análisis teóricos aplicados a la estructura primaria de la enzima: escala de hidrofobicidad de Miyazawa y Jernigen(1985), probabilidad de superficie de Emini(1985), índice de antigenicidad de Parker et al.(1985), flexibilidad de Karplus(1985), predicción de lmites de dominios, escala de accesibilidad al solvente de Boger et al.(1986), y escala de hidrofiliidad de Hopp y Woods(1981). La característica más importante de esta cepa es que sobreexpresa de manera constitutiva la proteína clonada en el plásmido.

4.1.2 Escalamiento en fermentador de tres litros.

La cepa sobreproductora se cultivó en medio sólido de Luria (LB) con una concentración de ampicilina de 500 μ g/ml (apéndice 8.1). La sobreexpresión de ambos fragmentos se verificó con geles de acilamida en condiciones desnaturalizantes SDS al 20% (apéndice 8.4), detectándose los fragmentos por una técnica inmunológica llamada "inmunoréplica tipo Western" (apéndice 8.2).

Una vez que se obtuvo una placa con una muy buena sobreexpresión de los fragmentos (Fig 5), se cultivó a la bacteria por escalamiento a un fermentador de tres litros; para ello primero se resebró la placa sobreexpresante 12 a 24 hrs antes del escalamiento, e igualmente se volvió a verificar la sobreexpresión por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes⁽⁴⁴⁾.

El segundo paso consistió en crecer a la bacteria en matraces de 500 ml conteniendo 200 ml de medio líquido de Luria (LB) 2.5% y 500 µg/ml de ampicilina (preinóculos), previamente esterilizados; para ello en condiciones de esterilidad se tomó una porción del medio sólido de la placa LB-ampicilina con un palillo y se introdujo éste dentro del matraz preparando cuatro matraces. Estos preinóculos se llevaron entonces a temperatura constante de 37° C, en agitación constante durante 4 hrs en un agitador orbital.

Al término de las 4 hrs se tomaron los preinóculos y se colocaron en hielo para su manejo y transporte al fermentador de tres litros el cual previamente se había esterilizado conteniendo dos y medio litros de medio de cultivo líquido LB-amp (2.5% LB, ampicilina 500 µg/ml final). Se verificó la sobreexpresión y se sembraron dos o tres de los mejores preinóculos. Se creció la bacteria durante 4 hrs a 37° centígrados en agitación, aplicandose un refuerzo de ampicilina a las 2 hrs. Posteriormente se cosechó dejando de 200 a 400 ml como preinóculo dentro del fermentador para volver a crecer la bacteria con medio líquido estéril (2.5% LB, ampicilina 500 µg/ml final); pero en cambio ahora se cultivó a 30° centígrados con baja agitación y durante toda la noche (8 a 10 hrs) para después cosechar.

La cosecha se realizó directamente en tubos de centrifuga de 500 ml a 7,000 rpm. durante 15 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó dos o tres veces con cloruro de potasio 0.15M hasta quitarle los componentes capsulares que confieren gran viscosidad al sobrenadante. La bacteria lavada se guardó en congelación a -50° Centígrados.

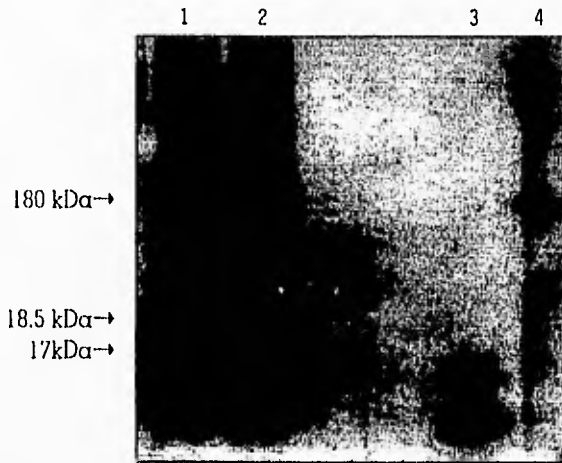


Fig 5. Gel de poliacrilamida al 20% en condiciones desnaturalizantes SDS. Se observa la sobreexpresión del fragmento de 18.5 kDa en los carriles 1 y 2. En el carril 3 MWSDS17 como marcador de peso molecular, al igual que en el carril 4 la enzima silvestre.

4.2 Purificación.

4.2.1 Producción y purificación de anticuerpos policlonales.

En el proceso de purificación se utilizó cromatografía de inmunoafinidad para ello fue necesario producir anticuerpos policlonales contra la enzima silvestre, estos se obtuvieron en nuestro laboratorio con conejos inmunizados con enzima silvestre purificada por cromatografía de afinidad alostérica.

Una vez extraído el suero de los conejos inmunizados, se purificaron las inmunoglobulinas (IgG) por intercambio iónico utilizando DEAE-Sephacel (SIGMA)⁽³⁶⁾. La columna se equilibró con 40 mM de Tris-fosfato pH 8.4 y bajo estas condiciones se inyectó el suero. Una vez lavada la columna con la misma solución, se empleó un gradiente cóncavo de pH y fuerza iónica para la elución de las IgG, el gradiente varió de 40 mM de Tris-fosfato pH 8.4 a 500mM de Tris-fosfato pH 3.4 y la elución se siguió a 280 nm donde las IgG aparecieron en las dos primeras fracciones junto con la albúmina del suero.

Para eliminar la albúmina, las fracciones con IgG se sometieron a una cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Sepharosa azul CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals). La columna de 1.6 X 8 cm. se equilibró con 40 mM de Tris-HCl pH 7.7. Se colectó el eluido que en este caso contenía nuestras IgG puras, el título de los anticuerpos policlonales purificados contra la enzima silvestre en el extracto de IgG fue de 1:5000 este se obtuvo mediante de inmunoréplicas tipo "western" con la enzima silvestre a diferentes diluciones de los anticuerpos.

4.2.2 Construcción de la matriz de inmunoafinidad.

Se trabajó con el extracto crudo de IgG purificadas con el que se construyó una matriz de inmunoafinidad. Se activó gel de agarosa (Sepharosa CL-4B, SIGMA) por el método de activación con CNBr y titulación con NaOH (apéndice 8.8). Los anticuerpos se ligaron a la matriz en agitación durante toda la noche, al día siguiente se lavó la matriz para eliminar los anticuerpos que no se unieron y se equilibró con 100 mM de Tris-HCl pH 7.4 para poder usarla.

4.2.3 Purificación de los fragmentos.

Se tomó la biomasa guardada a -50° centígrados y se resuspendió en 20 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7.4, sonicándose en frío, cuatro veces a intervalos de dos minutos. El sonificado se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 15 min, colectándose el sobrenadante y eliminando el precipitado. Se calculó la concentración de proteína del extracto crudo por el método de Bradford⁽⁴²⁾ y este se aplicó directamente a la matriz de inmunoafinidad en un recipiente cerrado que contenía la matriz y 40 ml de tris-HCl 100mM pH 7.4, la proteína se pegó en agitación a 5° Centígrados por 4 hrs.

Posteriormente se empacó la matriz en una columna de cristal para cromatografía líquida de 1.6 x 7 cm y se lavó con 500 ml de tris 100 mM pH 7.4. Entonces se despegó la proteína con 100 mM de glicina pH 2 y se colectaron 800 μ l por tubo en un colector automático (Waters fraction collector, Millipore). Con el fin de reducir el tiempo de exposición de los fragmentos a condiciones de pH tan bajos como el utilizado para la elución, se colocó previamente a cada uno de los tubos utilizados para la colecta 50 μ l de tris 2 M pH 8.6.

La detección de la proteína en las fracciones colectadas se realizó primero por el método de Bradford y después por un ensayo inmunoenzimático en filtros conocido como ELIFA (también llamado "immunodot") (apéndice 8.3).

Las fracciones que contenían la proteína se dializaron contra 40 mM de Tris-HCl pH 7.4 dos veces durante 2 horas. Posteriormente se concentraron, primero por centrifugación usando filtros de microcentrifuga Ultrafree-MC (SIGMA) que retienen las proteínas con una masa igual o mayor a 5 kDa y después por diálisis contra glicerol con el fin de poderla guardar a temperatura de congelación.

El siguiente paso fue inyectar nuestra proteína a una columna de intercambio iónico y esto se hizo por cromatografía líquida de alta presión HPLC. La matriz que se utilizó fue DEAE-Sephacel Protein Pak (Waters). Se inyectaron 500 μ l y el pegado de la proteína se hizo con 40 mM de Tris-HCl pH 7.4 y flujo de 0.3 ml/min. La elución se hizo con un gradiente lineal de 40 mM de Tris-HCl pH 7.4, a 200 mM de Tris-HCl pH 7.4 en 5 min y de 0 a 400 mM de KCl en 60 min. La elución se monitoreo tomando lecturas de absorbancia en un rango de 200 a 300 nm, y especialmente a 280 nm, se tomaron lecturas cada 4.8 seg. utilizando un detector Waters de arreglo de diodos modelo 991. Con las lecturas de absorbancia y tiempo tomados se procedió a detectar la proteína por inmunodot, concentrando y guardando en congelación como se mencionó anteriormente.

Las fracciones enriquecidas con los fragmentos se inyectaron a una columna de filtración molecular, nuevamente en un cromatógrafo de HPLC. Se utilizó una columna ProteinPak 300SW de Waters, cuyo intervalo de fraccionamiento abarca desde los 10 hasta los 300 kDa. Primero se elaboró una curva de calibración utilizando diferentes marcadores de peso molecular, en este caso se usaron los siguientes marcadores: mioglobina 17 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, hemoglobina 60 kDa, transferrina 77kDa, amilasa 100kDa, alcohol deshidrogenasa 150 kDa y enzima silvestre 180 kDa, bajo las siguientes condiciones: flujo de 0.3 ml/min con tris 40 mM. Se inyectaron 20 μ l de muestra a la columna y se analizaron por cromatografía bajo las mismas condiciones usadas para la calibración. Las fracciones que contenían la enzima ya pura se detectaron por "inmunodot" y electroforesis desnaturizante SDS.

4.3 Caracterización y análisis de los fragmentos polipeptídicos.

El estudio de ambos polipéptidos se realizó tanto en extractos crudos como en fracciones puras. Los extractos crudos se obtuvieron utilizando el sobrenadante posterior a la centrifugación a 12,000 r.p.m. del sonicado de la biomasa guardada a -50° Centígrados. Las fracciones puras se obtuvieron como resultado de la ruta de purificación. Los primeros experimentos fueron encaminados a conocer en que estado se encontraban los fragmentos y para ello primero se analizaron fracciones sin purificar y posteriormente se trabajó con fracciones purificadas.

4.3.1 Caracterización de fracciones no-purificadas.

Con el objetivo de determinar el peso molecular propio de nuestros fragmentos en condiciones nativas, se prepararon geles de acrilamida de gradiente de poro de 4 al 30% de concentración, que se corrieron bajo condiciones ya establecidas (apéndice 8.6). Se utilizaron diferentes marcadores para determinar el peso de los fragmentos: mioglobina 17 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, transferrina 77 kDa, amilasa 100 kDa, alcohol deshidrogenasa 150 kDa y enzima silvestre 180 kDa, que se distribuyeron en 4 carriles y se corrieron simultáneamente 6 carriles de extracto crudo. Después de corrido el gel se tomaron los tres últimos carriles en los cuales uno tenía enzima silvestre y dos el extracto crudo y a ellos se les practicó una inmunorréplica; se tomó aparte otro carril más y se corrió una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes en un gel de acrilamida al 20% con SDS, el que una vez corrido se le realizó una inmunorréplica. Los seis carriles restantes se tiñeron con plata para poder obtener luego la curva de calibración (apéndice 8.5).

Para determinar el punto isoelectrico de los fragmentos en condiciones nativas se prepararon y corrieron geles de isoelectroenfoque (apendice 8.7) con muestras de extractos crudos, aqui tambien se utilizaron una serie de calibradores para poder determinar el punto isoelectrico de los fragmentos: Amilogucosidasa pl 3.6, inhibidor de tripsina pl 4.6, β -lactoglobulina A pl 5.1, anhidrasa carbonica II pl 5.9, anhidrasa carbonica I pl 6.6, mioglobina pl 6.8 y 7.2, lectina pl 8.2, 8.6, y 8.8, tripsinogeno pl 9.3; e igualmente se realizo una inmunoreplica tipo "western" para detectar los fragmentos con anticuerpos especificos.

4.3.2 Caracterización de los fragmentos purificados.

Con los fragmentos ya purificados se realizaron las siguientes aproximaciones. Primero se realizaron estudios cineticos para saber si los fragmentos presentaban algun tipo de actividad, los ensayos se realizaron en el sentido de formacion de Fru6P en una mezcla final de reaccion de 200 μ l con: 100 mM de Tris-HCl pH 7.7; 25 mM de EDTA pH 7.7; concentracion de sustrato variable; concentracion de enzima de 30 a 145 nM; con y sin 5 mM de GlcNAc6P. El tiempo de reaccion fue de 40 minutos a 30 $^{\circ}$ C. La reaccion se inicio con la adiccion de 10 μ l de enzima y finalizo con la adiccion de 2 ml de HCl 10 N. La concentracion de Fru6P formada se determino por el metodo de resorcinol de Roe⁽³⁹⁾ como es descrito por Davis y Gander⁽⁴⁰⁾ leyendo absorbancia a 512 nm.

Tambien se repitieron los analisis con filtracion molecular en HPLC con la columna Proteinpak300SW para confirmar la existencia de los oligomeros de diferentes pesos moleculares.

Posteriormente los fragmentos ya purificados que estaban concentrados en glicerol se dializaron con un amortiguador de fosfatos 40 mM pH 7.7 para realizar estudios de dicroismo circular (DC). Se hicieron dos tipos de experimentos de DC, primero en ultravioleta lejano de 180 a 260 nm para determinar el porcentaje de estructura secundaria, esto se hizo primero con los fragmentos dializados y despues con una concentracion 5mM

del activador alostérico la N-acetil-glucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). De la misma manera se tomaron lecturas de DC en el ultravioleta cercano, en el intervalo de 260 a 310 nm llamada la zona aromática. Esto se hizo con la finalidad de investigar la capacidad de los fragmentos para unir la GlcNAc6P. Para ello primero se realizó una línea de base con el amortiguador, luego otra línea de base del amortiguador y con la concentración final de activador alostérico 5mM y finalmente se realizó el espectro con los fragmentos para después poder calcular el espectro diferencial de absorptividad. Esto se logró restando la línea de base del amortiguador a la del amortiguador con el activador alostérico y la resultante se le resto al espectro de la muestra que contenía los fragmentos.

RESULTADOS.

5.1 Purificación.

De acuerdo con los datos experimentales que obtuvimos se pudo diseñar la siguiente ruta de purificación para los fragmentos: (Fig 6).

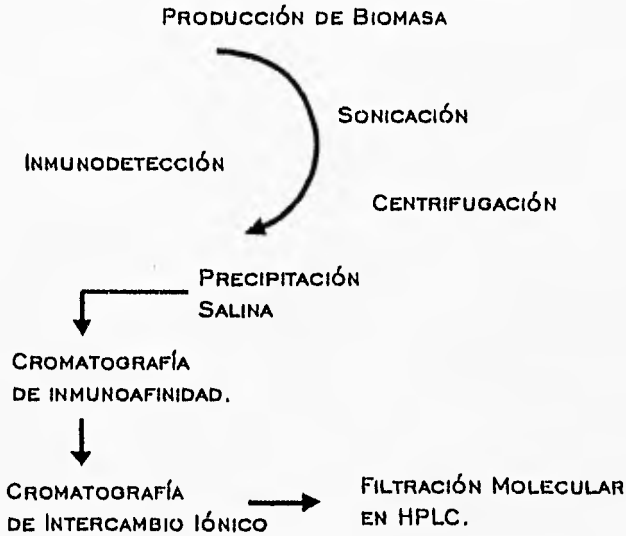


Fig 6. Diagrama que muestra cada una de las etapas que comprenden la ruta de purificación utilizada para la enzima nag26.

5.2 Caracterización de fracciones no-purificadas.

La sobreexpresión de los fragmentos de 18.5 y 11.2 kDa a partir de la cepa mutante 590 fue buena y se muestra en la figura 7. Para verificar que las proteínas que se sobreexpresaron eran nuestros fragmentos estos se identificaron por inmunoespecificidad elaborando una inmuno réplica tipo western figura 8.

5.2.1 Electroforesis en gradiente de poro.

Con los experimentos de electroforesis realizados en condiciones nativas con un extracto crudo se encontró que los fragmentos en condiciones nativas (no desnaturalizantes) se encuentran asociados en oligómeros de diferentes pesos moleculares: 180, 90, 60, y 30 kDa como se puede observar en la figura 9. Estos oligómeros también fueron identificados mediante una inmuno réplica tipo western, confirmando la existencia de los diferentes pesos moleculares figura 10. Para determinar el peso molecular de los diferentes oligómeros se elaboró una curva de calibración utilizando los diferentes marcadores de peso molecular: mioglobina 17 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, transferrina 77 kDa, amilasa 100 kDa, alcohol deshidrogenasa 150 kDa y enzima silvestre 180 kDa.

5.2.2 Filtración molecular en HPLC.

Los datos anteriores se confirmaron cuando llevamos un crudo a cromatografía líquida de alta presión en HPLC, utilizando la columna de filtración molecular Proteinpak300SW donde corroboramos la existencia de oligómeros con una masa de 180, 90, 60, y 30 kDa. En la figura 11 se puede observar el perfil de elución a 280 nm y en la figura 12 se muestra el ensayo inmunológico por el cual se detectaron aquellas fracciones de la elución que contenían a los oligómeros.

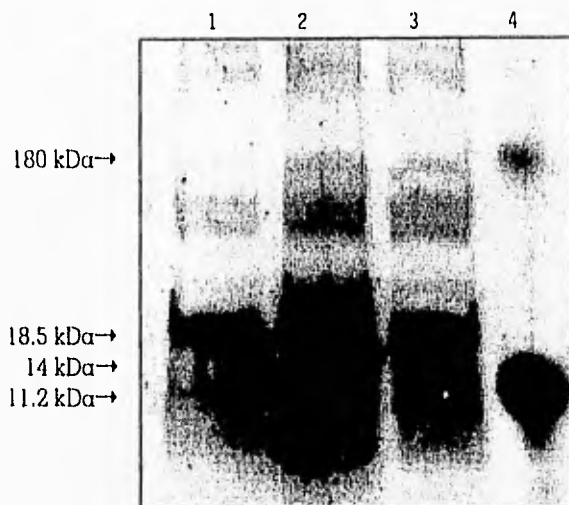


Fig 7. Gel de poliacrilamida al 20% en condiciones desnaturalizantes, se observan en los primeros carriles 1, 2 y 3 la sobreexpresión de los fragmentos de 18.5 y 11.2 kDa. En el carril 4 arriba la enzima silvestre y abajo mioglobina como marcadores de peso molecular.

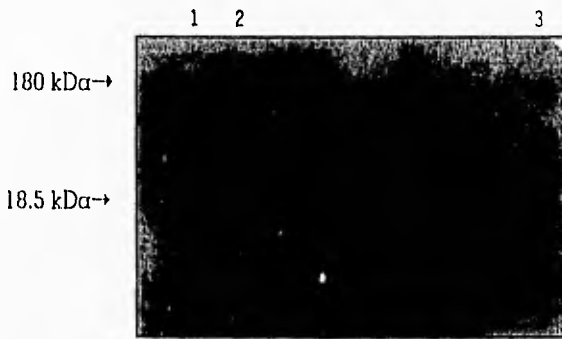


Fig 8. Inmunoréplica del gel de poliacrilamida 20% SDS. En en carril 3 se muestra a la enzima silvestre, en los carriles 1 y 2 se muestra el fragmento de 18.5 kDa.

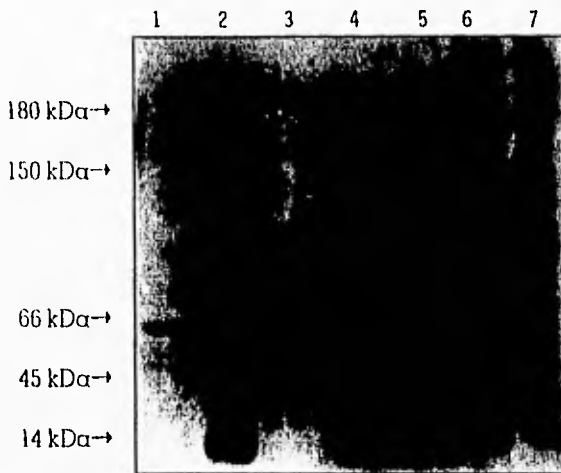


Fig 9. Gel de gradiente de poro (poliacrilamida) 4-30% en condiciones no-desnaturalizantes. En los carriles 6 y 7 dos extractos crudos, en los demás carriles marcadores de peso molecular: carril 1, 66 kDa; carril 2, 14 y 70 kDa; carril 3, 45 kDa; carril 4, 150 y 180 kDa y carril 5, 45 kDa.

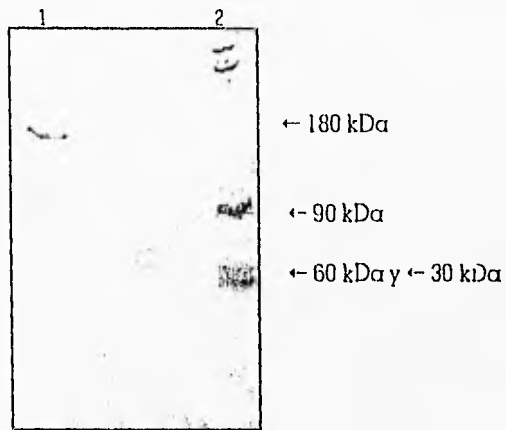


Fig 10. Inmunoreplica del gel de gradiente de poro en condiciones no-desnaturalizantes que muestra los diferentes oligómeros en los que se reasocian ambos fragmentos: en el carril 1 la enzima silvestre; en el carril 2 los oligómeros de: 30, 60, 90 y 180(no se observa) kDa.

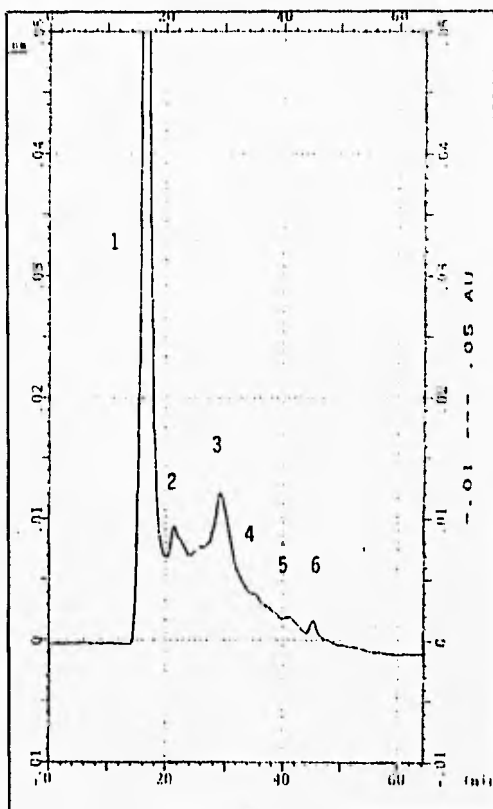


Fig 11. Perfil de elución a 280 nm tomado de la columna de filtración molecular Proteinpak300SW. En este caso se trata de un crudo, y se muestran: 1) a los 19 min el frente, 2) a los 22 min la fracción de 180 kDa, 3) a los 30 min la fracción de 90 kDa, 4) a los 34 min la fracción de 60 kDa, 5) a los 42 min la fracción de 30 kDa y 6) a los 45 min la fracción de 18 kDa.

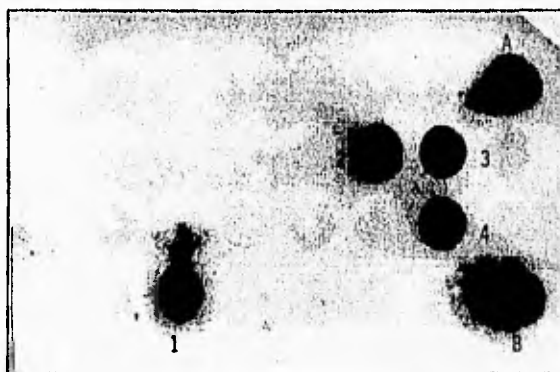


Fig 12. Inmunodot de las fracciones colectadas durante la elución de la columna de filtración molecular Proteinpak300SW: se muestra en A y B la enzima silvestre como control; en 1 la fracción de 180 kDa, al centro en 2 la fracción de 90 kDa, en 3 la fracción de 60 kDa y en 4 la fracción de 30 kDa.

5.2.3 Isoelectroenfoque.

A partir del gel de isoelectroenfoque se obtuvieron diferentes puntos isoeléctricos para los oligómeros: 8.8, 6.9, 5.7, 4.7, en la figura 13 se muestra la curva de calibración elaborada a partir de los marcadores de pI: Amilogucosidasa pI 3.6, inhibidor de tripsina pI 4.6, β -lactoglobulina A pI 5.1, anhidrasa carbónica II pI 5.9, anhidrasa carbónica I pI 6.6, mioglobina pI 6.8 y 7.2, lectina pI 8.2, 8.6, y 8.8, y tripsinógeno pI 9.3.

5.3 Caracterización de los fragmentos purificados.

Como resultado de la metodología aplicada se logró purificar ambos fragmentos de 18.5 y 11.2 kDa, mostrándose ambos en la figura 14.

5.3.1 Filtración molecular en HPLC.

El análisis de los fragmentos por filtración molecular en HPLC muestra que en condiciones no desnaturizantes estos se encuentran asociados en oligómeros de 180, 90, 60 y 30 kDa como ya se había encontrado en el análisis del crudo, en la figura 15 se muestra el perfil de elución a 280 nm de ambos fragmentos puros inyectados a la columna de filtración molecular Proteinpak300SW bajo las condiciones estandarizadas.

Las fracciones colectadas a partir de la elución de la columna de filtración molecular Proteinpak300SW se identificaron mediante un inmunodot confirmándose la existencia de los oligómeros mencionados, figura 16.

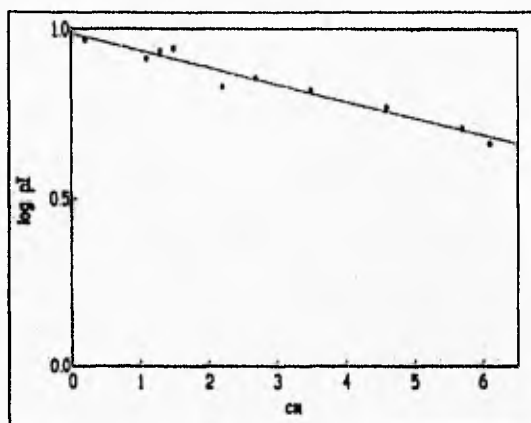


Fig 13. Curva de calibración para el gel de isoelectroenfoque utilizada para determinar el pI de los oligómeros formados por los fragmentos, para elaborarla se emplearon diez diferentes marcadores de pI.

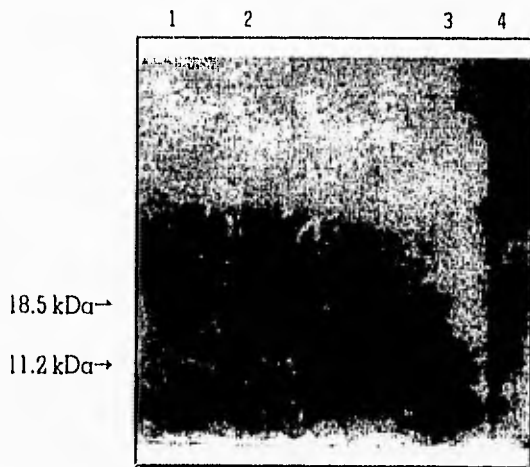


Fig 14. Gel de poliacrilamida 20% en condiciones desnaturalizantes SDS. Se observan de izquierda a derecha en los carriles 1 y 2 fracciones con ambos fragmentos purificados, en el carril 3 MWSDS17 como marcador de peso molecular y en el carril 4 la enzima silvestre.

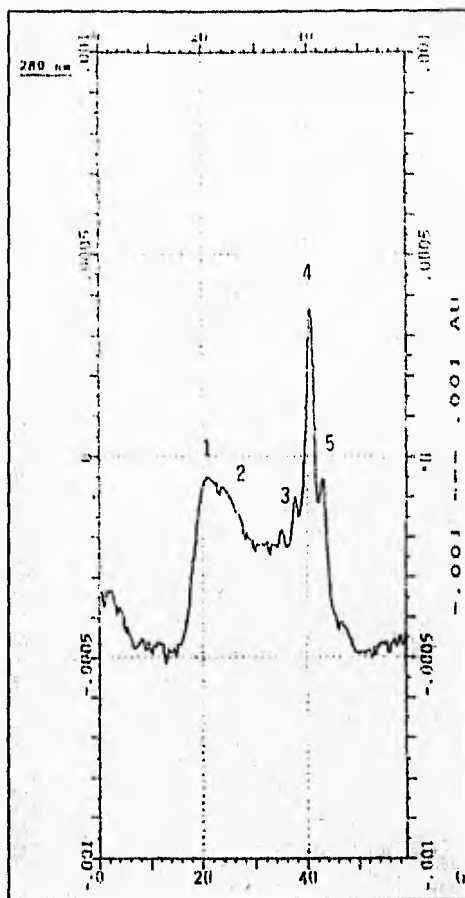


Fig 15. Perfil de elución a 280 nm de la columna de filtración molecular Proteinpak300SW, en este caso se muestra a los oligómeros formados a partir de los fragmentos ya purificados: 1) a los 22 min la fracción de 180, 2) a los 28 min la fracción de 90, 3) a los 36 min la fracción de 60 kDa, 4) a los 40 min la fracción de 30 y 5) a los 45 min la fracción de 18 kDa.

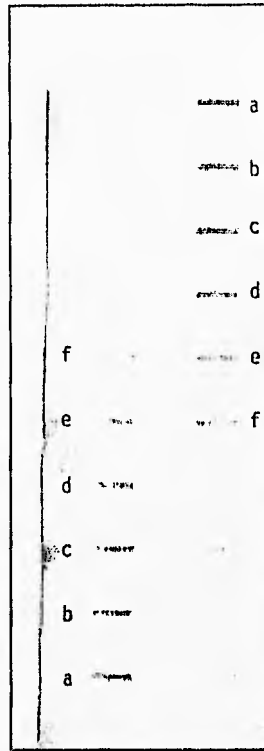


Fig 16. Inmunodot de las fracciones de elución de la columna de filtración molecular Proteinpak300SW, en las columnas 1 y 2 se muestran: a) la enzima silvestre, b) fracción de 180, c) fracción de 90, d) fracción de 60, e) fracción de 30 y f) fracción de 18 kDa.

5.3.2 Dicroísmo Circular.

Los experimentos realizados en el espectropolarímetro de dicroísmo circular demuestran que los oligómeros por sí solos dan señal en el ultravioleta lejano en presencia y ausencia del activador alostérico confirmando la existencia de estructura secundaria, figura 17. Además los oligómeros son capaces de reconocer y ligar al activador alostérico de la enzima silvestre la GlcNAc6P, provocando una respuesta que se observa como un cambio conformacional de la estructura de la enzima mutante, figura 18.

5.3.3 Parámetros cinéticos.

Los valores para el K_m y la K_{cat} encontrados, en ausencia y presencia de activador alostérico fueron los siguientes:

GlcNAc6P (mM)	$K_{m \text{ aparente}}$ (mM)	K_{cat} por sitio s^{-1}
sin	8.6	0.1519
5	1.5	0.3067

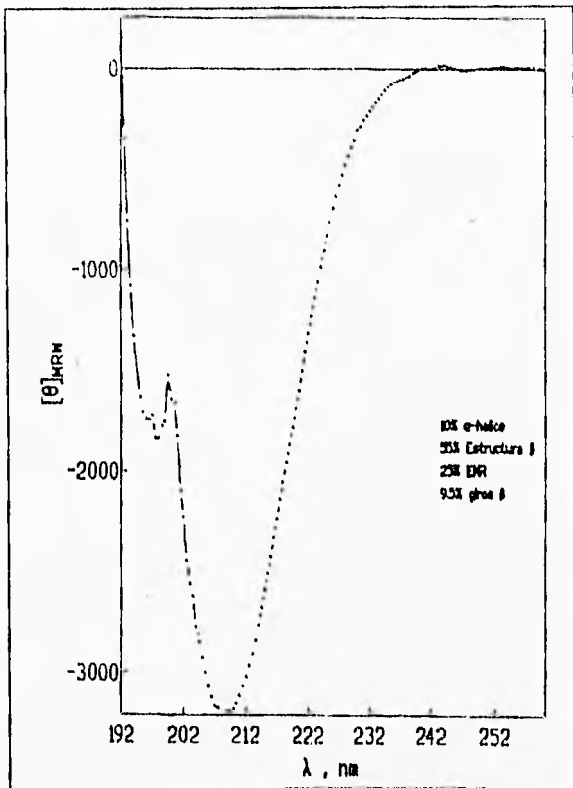


Fig 17. Espectro de Dicroísmo Circular de la enzima Nag 26 en presencia de 5 mM de GlcNac6P. La concentración de la enzima fue de 0.325 μ M en amortiguador de fosfatos 40 mM pH 7.7. Se analizó el UV lejano en el intervalo de 190 a 250 nm., a temperatura ambiente.

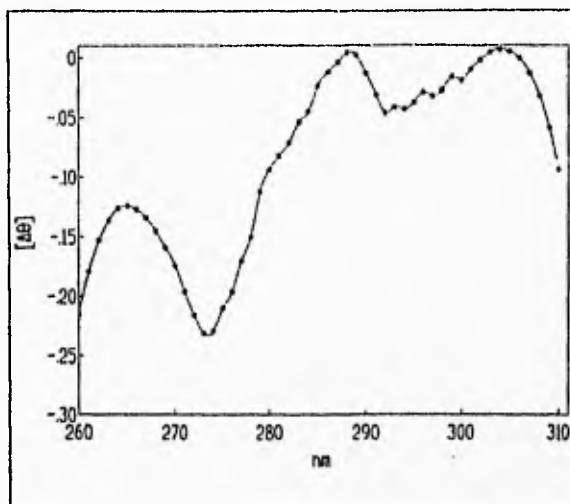


Fig 18. Espectro diferencial de Dicroísmo circular de los oligomeros formados por los fragmentos purificados con y sin 5 mM de GlcNAc6P. Se analizó el intervalo del espectro en UV cercano de 260-310 nm. La concentración de los fragmentos de la enzima fue $0.325\mu\text{M}$ en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.7.

DISCUSION.

Uno de los grandes retos de la Biología moderna consiste en entender los mecanismos involucrados en la función de una proteína, para poder a través de este conocimiento diseñar macromoléculas con nuevas actividades biológicas, para lo cual resulta indispensable conocer como es que las proteínas se pliegan para adquirir su estructura tridimensional. Las estrategias empleadas para tratar de explicar este problema, han sido muy variadas, una de las más utilizadas, es la disección de las proteínas en fragmentos pequeños, que permitan analizar sus estructuras individualmente y en forma combinada para lograr un plegamiento por complementación. Esta estrategia se basa en el hecho de que las proteínas se pliegan rápidamente como para pensar que la conformación final sea obra de un proceso al azar; una posibilidad es que algunos de los elementos de la estructura secundaria se formen rápidamente y que a su vez inducen el plegamiento cooperativo del resto de la proteína⁽¹⁶⁾. La tendencia de los fragmentos para formar estructuras similares a las que se adoptan en la proteína completa, son evidencias experimentales que apoyan la idea de que las interacciones locales juegan un papel fundamental en las etapas tempranas del proceso de plegamiento en las proteínas^(19,33,35). En este sentido se han desarrollado diferentes enfoques para el estudio de la formación de estructuras similares a las de la proteína nativa partiendo de sus fragmentos polipeptídicos: uno de los más empleados en el pasado ha sido la proteólisis limitada o incompleta⁽²⁰⁾ o la síntesis química de péptidos⁽²¹⁾. A partir del desarrollo de la ingeniería genética, esta es la mejor opción para la producción de fragmentos polipeptídicos, porque permite seleccionar los sitios de corte, independientemente de que se localicen o no en zonas muy flexibles o expuestas que es un requisito para la proteólisis enzimática por métodos químicos. Este último enfoque es el que ha generado la creación de una nueva área de frontera en la bioquímica moderna, la ingeniería de proteínas, la cual comprende un enfoque multidisciplinario para enfrentar el problema: utilizando la biología molecular, el análisis teórico de secuencias, la fisicoquímica de proteínas y la cristalografía, que se correlacionan y retroalimentan mutuamente.

En esta tesis se han presentado los resultados de la primera fase del proyecto: Disección de una enzima por ingeniería de proteínas. La estrategia experimental se definió en cuatro etapas:

I.- Análisis teórico de la secuencia primaria de la desaminasa para seleccionar los sitios de corte y el diseño de las mutantes sitio específicas.

II.- Construcción y expresión de mutantes sitio específicas.

III.- Expresión y purificación de los fragmentos.

IV.- Estudios fisicoquímicos en solución.

I.- Análisis teórico de la secuencia de aminoácidos de la desaminasa.

La estructura primaria de la enzima glucosamina 6 fosfato desaminasa de *E. coli* fue cuidadosamente analizada, empleando diferentes métodos predictivos, basados en escalas fisicoquímicas tales como: escala de hidrofobicidad de Miyazawa y Jernigen(1985), probabilidad de superficie de Emini(1985), índice de antigenicidad de Parker et al.(1985), flexibilidad de Karplus(1985), predicción de límites de dominios, escala de accesibilidad al solvente de Boger et al.(1986), y escala de hidrofiliidad de Hopp y Woods(1981). El resultado del análisis de las escalas fisicoquímicas se correlacionó con los obtenidos para la predicción de estructura secundaria. La estructura secundaria predicha para la proteína es la típica α/β , con alternancia de hélices- α y hojas- β , sin embargo, existe un fragmento de 20 aminoácidos (158-178) en el que se predicen sólo estructuras no repetitivas o giros y luego sigue la perfecta alternancia, este fragmento a su vez presenta los índices más altos de flexibilidad, probabilidad de superficie, antigenicidad y se predice como los límites de un dominio estructural.

II.- Construcción de una doble mutante en la posición 160 de la estructura primaria de la desaminasa.

Se construyó una doble mutante por introducción simultánea de un codón de terminación (posición 160 ACT a TAA) y un codón de inicio en la posición 163 TGA a ATG.

El cambio de los aminoácidos en estas posiciones se realizó por mutagénesis dirigida usando el método de Kunkel descrito por Sambrook y col⁽²²⁾.

El gen nagB fue clonado en el vector pTZ18R (Pharmacia) y se obtuvo el fagémido pTZ18R(nagB). La cadena sencilla de DNA que contenía los residuos de uridina para la mutagénesis fue preparada usando el método descrito por Sambrook y col⁽²²⁾. Se diseñó un oligonucleótido de 46 bases con las mutaciones deseadas: CTCGTATCAAACCCTGTAATCAATGCACTCGCGTCGCAAACCTCTCG.

Los fagémidos que contenían la doble mutación fueron identificados por secuenciación de DNA; todo el gen nagB fue secuenciado para verificar la ausencia de mutaciones secundarias. La cadena sencilla de DNA del fagémido pTZ18R(nagB) que contenía la doble mutación fue utilizada para transformar bacterias de *E. coli* cepa Δ nag IBPC590 que tiene interrumpido el regulón de los aminoazúcares, para garantizar la ausencia de enzima silvestre.

III.- Expresión y purificación de los fragmentos.

Como se ha descrito en la sección de material y métodos se utilizaron diferentes estrategias para obtener fracciones puras de la proteína. Sin embargo, debido a la interacción entre los fragmentos y la formación de diferentes oligómeros, no fue posible obtener por separado los fragmentos de 18 y 11 kDa que era nuestro propósito inicial para después realizar todos los experimentos de complementación. Cabe destacar que si bien esto fue un primer obstáculo, las evidencias experimentales de la existencia de complementación son muy claras: los diferentes oligómeros obtenidos en condiciones

nativas dan exactamente el mismo patrón en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y en presencia de reductor: dos fragmentos de 18 y 11 kDa. La existencia de ambos fragmentos significa que en condiciones nativas se reconocen estructuralmente y pueden asociarse.

IV.-Estudios fisicoquímicos en solución.

Los experimentos de dicroísmo circular con la proteína pura (en este caso la mezcla de diferentes oligómeros) demuestran que la autoasociación de los fragmentos da como resultado un plegamiento similar al de la enzima silvestre, aún cuando el espectro no es exactamente idéntico en la forma, el porcentaje de estructura secundaria en presencia del activador alostérico es parecido a los obtenidos para la enzima silvestre: 10% de hélice- α , 55% de estructura- β , 9.5% de giros y 25% de estructura no repetitiva en la mutante nag26; en la enzima silvestre 34% de α -hélice, 9% de hoja- β paralela, 11% de hoja- β antiparalela, 15% de giros y 35% de estructura no repetitiva. Uno de los resultados más interesantes es la demostración de la interacción de los oligómeros con el activador alostérico y el efecto de la GlcNAc6P en la estabilización de los complejos. En la figura 19 se puede observar el cambio del espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano en presencia del activador alostérico. Llama la atención la definición del espectro y la adquisición de una forma muy similar a las obtenidas para la enzima silvestre. Esto revela que la asociación de los fragmentos rearma la cavidad del sitio alostérico y este es capaz de unir al activador. Por otra parte los experimentos realizados en el ultravioleta cercano muestran una señal intensa en el rango de 275-290 nm que disminuye cuando aumenta la concentración del activador; este mismo efecto corresponde al obtenido para la enzima silvestre.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS.

La disección de una proteína en dos o más fragmentos de su cadena polipeptídica es una estrategia muy poderosa para estudiar el papel de los dominios o subdominios en el proceso de plegamiento de las proteínas⁽²³⁾. Sin embargo, como las "unidades de plegamiento" pueden no ser identificadas, sin ambigüedad por simple inspección de la estructura tridimensional⁽²⁴⁾, el empleo de proteínas cortadas específicamente por métodos químicos o mutagénesis dirigida, sigue siendo una herramienta muy importante para probar la capacidad de los fragmentos resultantes para adoptar una conformación nativa de manera autónoma. Si los fragmentos pueden plegarse por sí mismos en una estructura tridimensional comparable con la estructura nativa, este comportamiento autónomo los identifica como unidades de plegamiento^(25,26).

El análisis de nuestros resultados nos permite demostrar que tenemos unidades de plegamiento autónomo; esto se demuestra por la formación de oligómeros de diferentes pesos moleculares, que adoptan un plegamiento por sí mismos.

En este momento resulta muy interesante y formativo, hacer un análisis combinatorio de los diferentes datos experimentales, originados por diferentes metodologías, que se complementan y enriquecen mutuamente: a) el análisis teórico de secuencia, b) los estudios bioquímicos y fisicoquímicos en solución, y c) los datos cristalográficos obtenidos recientemente.

A lo largo de la tesis se han desarrollado ampliamente los dos primeros incisos, así que en esta parte haré un resumen de los datos cristalográficos, para estar en condiciones de hacer un análisis global de todos los resultados obtenidos.

El plegamiento del monómero de la enzima glucosamina-6 fosfato desaminasa muestra una estructura alfa-beta abierta, con una hoja plegada beta central paralela de siete cadenas, que tiene topología 4x, 1x, 1x, -3x, -1x, -1x, rodeada de ocho hélices alfa y una hélice 3-10 de dos vueltas. La topología de este monómero se parece a un dominio de NAD de deshidrogenasa, con tres adiciones: en el extremo N-terminal una cadena beta, residuos 1 al 35; en el extremo carboxilo terminal, los residuos 243-266 y el segmento entre el aminoácido 141 y 188, este último segmento contiene una asa con aminoácidos que participan en el mecanismo catalítico y también un motivo estructural formado por la beta B', la hélice 5 y la beta C'; las dos hojas beta forman parte de la lámina beta antiparalela. Los residuos 158 y 160 localizados en la hoja B' son parte del sitio alostérico de la enzima, mientras que en la hélice 5 la arginina 172 es uno de los sitios ligantes del sustrato. Esta estructura forma una "lid"(tapa) capaz de ocluir el sitio activo y aislar el sustrato o los intermediarios de la reacción del contacto con el disolvente⁽¹¹⁾, figura 19.

Si recapitulamos y volvemos sobre el análisis teórico de la secuencia, nuestros resultados nos habían llevado a concluir: la estructura secundaria predicha para la desaminasa, es la típica para una proteína alfa/beta, con alternancia de hélices alfa y hojas beta, sin embargo, existe un fragmento de 20 aminoácidos (158-178), en el que se predicen solo estructuras no repetitivas o giros, y luego sigue la perfecta alternancia, este fragmento a su vez presenta los índices más altos de flexibilidad, probabilidad de superficie, antigenicidad y se predice como los límites de un dominio estructural.

Esto es muy relevante, por que pudimos localizar una zona clave para la función y la estructura de la desaminasa. El segmento predicho (158- 178) en el cual decidimos introducir la doble mutación para separar dos posibles dominios o unidades de plegamiento, corresponde a uno de los agregados (141-188) a la estructura típica de los dominios NAD. Esto correlaciona además de manera casi perfecta con los datos bioquímicos y fisicoquímicos, la formación de diferentes conformeros que en condiciones nativas tienen pesos moleculares que corresponden a la interacción de los dos fragmentos estructurales, que a su vez en geles desnaturizantes y en condiciones reductoras, dan

un patrón correspondiente a los dos fragmentos de 18 y 11 kDa. Todo esto apoyado con los datos de difracción circular, que son evidencias del acoplamiento entre los fragmentos y puntualizan el papel del activador alostérico en la dinámica del reconocimiento estructural.

Una pregunta que surge después de este análisis es: ¿ El acoplamiento de los fragmentos produce oligómeros con actividad catalítica ?. Por los datos de la cristalografía⁽¹¹⁾ resulta evidente que el fragmento de 11kDa contiene una parte del asa catalítica, que cierra el sitio activo. Se realizaron experimentos cinéticos en presencia y ausencia del activador alostérico, que permiten reconocer una actividad residual de los diferentes oligómeros. Un dato relevante es el incremento de la actividad en presencia del modulador alostérico, lo que significa, que si bien se perdieron en el corte algunos de los aminoácidos involucrados directamente en el pegue, la estructura del sitio alostérico se conserva en la complementación de los fragmentos.

Cabe destacar que en este trabajo se desarrollaron múltiples metodologías, que no habían sido implementadas previamente en nuestro grupo, y tal vez uno de los frutos-más importantes de esta tesis es la adquisición en el camino de un repertorio metodológico y teórico, que ahora me permite enfrentar los problemas experimentales que se me presentan con una actitud multidisciplinaria y con una gran posibilidad de estrategias.

Asimismo la relevancia de este trabajo es que se logra demostrar la plasticidad de la estructura y la existencia de unidades de plegamiento en la desaminasa. Existen muchos reportes en la literatura de estudios de complementación de fragmentos polipeptídicos, sin embargo la mayoría de ellos se han realizado en proteínas pequeñas, monoméricas o dimericas; esta tesis constituye la primera evidencia experimental en el caso de una proteína hexamérica y con regulación alostérica. Estamos conscientes de que esto es la etapa inicial de un proyecto muy ambicioso y precisamente por eso, me gustaría terminar haciendo un análisis de los experimentos que serían esenciales para continuar este proyecto.

En primer lugar sería muy útil expresar por separado los fragmento de 11 y 18 kDa. Estudiar sus propiedades fisicoquímicas, sus estados de agregación , y la interacción con los ligandos homotrópicos y heterotrópicos. Realizar los estudios de complementación , su cinética de pegue y las propiedades fisicoquímicas del o los complejos formados. Finalmente usar estos fragmentos para estudios de plegamiento y estabilidad de la desaminasa. Toda la experiencia y la metodología desarrollada, permitirán un avance rápido y seguro en la realización de los experimentos.

APENDICE.

8.1 Preparación de placas LB ampicilina.

Medio de cultivo sólido (stock): Bactotripton 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 1g, bactoagar 15 g, Na₂HPO₄ 1 g.

Del medio de cultivo stock se prepara un medio al 4 % en agua, el cual se esteriliza, el volumen depende del número de placas a preparar; al término, antes de que este enfrie se añade la suficiente ampicilina para alcanzar una concentración de 500 µg/ml, entonces se vierte el medio en condiciones de esterilidad dentro de las cajas de Petri, hasta alcanzar un grosor de 0.5 a 1 cm. Se dejan reposar para que gelifiquen. Por último se llevan a 37 grados centígrados durante 12 hrs para verificar que permanecen estériles y se guardan en refrigeración.

8.2 Inmuno replicas tipo Western.

Amortiguadores:

Transferencia
25 mM tris 3g/l
192 mM glicina 14.4 g/l
20% metanol 200 ml/l
0.1% SDS 1 g/l

BCIP
30 mg en 4 ml de DMF

NBT
60 mg en 2.8 ml de DMF y 1.2 ml
de agua

TBS
20 mM tris-HCl pH 7.5 2.4 g/l
0.5 M NaCl 29.2 g/l

TTBS
20 mM tris-HCl pH 7.5 2.4 g/l
0.5 M NaCl
0.05% Tween-20 0.5 ml/l

metodología:

- correr un gel de poliacrilamida en condiciones nativas o desnaturalizantes.
- sacarlo con guantes y cortarlo en las tiras necesarias
- incubar los pedazos de geles en el amortiguador de transferencia de 30 min a una hora
- cortar el papel de nitrocelulosa o inmobilón del tamaño del gel
- mojar el papel de nitrocelulosa 30 seg. con metanol, hacer un cambio por agua y equilibrar 15 min, hacer un cambio en amortiguador de transferencia por 10 min.
- colocar en la rejilla una esponja mojada con el amortiguador de transferencia, encima de 1 a 3 papeles filtro mojados, los trozos del gel sobre el papel filtro y encima los trozos de nitrocelulosa, quitar las burbujas con un tubo de ensayo (se pasa como rodillo) poner papel filtro y una esponja previamente mojados en amortiguador de transferencia, cerrar la rejilla y colocarla en la cámara de transferencia con amortiguador hasta donde se encuentra la señal de llenado^(31,32).
- transferir a 80 mA durante 5 hrs, en agitación.
- sacar los pedazos de papel y lavarlos con TBS 5min. dos veces agitándolos.
- bloquear con 3 % de gelatina (leche) durante 5 hrs o toda la noche en agitación.
- lavar dos veces con TTBS 5 min.
- colocar el primer anticuerpo 1:5000 en una solución de gelatina(leche) 1%, 4 hrs.
- lavar dos veces con TTBS por 5 min.
- adicionar el segundo anticuerpo 1:3000 en una solución de gelatina(leche) 1%, 4hrs.
- lavar dos veces con TTBS
- decantar y agregar de 20-30 ml de una solución NaHCO_3 , 0.1M, MgCl_2 , 1 mM pH 9.8
- agregar de 200-300 μl de BCIP.
- agregar 200-300 μl de NBT.
- esperar a que aparezcan las bandas.
- lavar dos veces con agua destilada.
- guardarlos en obscuridad y en refrigerador, o secarlos.

8.3 ELIFA (ensayo inmunoenzimático en filtros).

Los amortiguadores utilizados y la dilución de los anticuerpos son los mismos que los utilizados para las inmunorélicas tipo western.

La metodología consiste en:

-Cortar tres hojas de papel filtro del tamaño marcado en la base de la cámara, preparar la membrana de nitrocelulosa, cortarla del tamaño deseado según el número de muestras a utilizar, llevarla a metanol por 30 seg, luego decantar y llevar a agua por 10 min, decantar y llevar a amortiguador de transferencia 5 min. La membrana de nitrocelulosa no debe de tocarse con los dedos, para su manipulación deben usarse guantes.

-levantar la tapa superior de la cámara, y colocar las tres hojas de papel filtro previamente remojadas en amortiguador de transferencia, encima colocar la membrana de nitrocelulosa y por último colocar la tapa de la cámara y cerrar apretando bien los tornillos.

-conectar la cámara PR600 Slot Blot (HSI) a la bomba de vacío y hacer vacío⁽²⁷⁾.

-hacer dos lavados con amortiguador de transferencia a cada poso con al rededor de 50 μ l, se puede aplicar cada muestra con la ayuda de un multidispensador, hay que considerar esperar el tiempo suficiente para que seque la muestra después de colocarla antes de volver a colocar otra. Tener mucho cuidado de no tocar la membrana de nitrocelulosa en este y en los siguientes pasos con la punta del multidispensador o pipeta.

-aplicar las muestras directamente a los posos de la cámara. Se pueden aplicar de 20 a 100 μ l

-lavar dos veces con TBS (50 μ l).

-bloquear con leche al 3% (30 μ l).

-sacar la membrana de la cámara y colocarla dentro de un recipiente limpio con tapa y de preferencia de color oscuro 5-10 min, el cual debe contener TTBS, hacer dos cambios, en agitación.

-decantar y colocar el primer anticuerpo 1:5000 en una solución de 1% de leche, en agitación y tapado durante 1 hr.

-decantar y lavar dos veces con TTBS.

-decantar y agregar el segundo anticuerpo 1:3000 en una solución de leche 1% en agitación y lapado durante 1 hr.

-decantar y lavar dos veces con TTBS.

-decantar y agregar 30 ml de una solución NaHCO_3 , 0.1M, MgCl_2 , 1mM pH 9.8

-agregar de 200-300 μl de BCIP.

-agregar 200-300 μl de NBT.

-esperar a que aparezcan las bandas.

-lavar dos veces con agua destilada.

-guardarlos en obscuridad y en refrigerador, o secarlos.

8.4 Electroforesis.

Condiciones desnaturalizantes.

En separaciones con SDS, la migración de las proteínas esta determinada por el peso molecular y no por la carga eléctrica intrínseca de la proteína. El duodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas rodeando las uniones no covalentes; de manera que confiere una carga neta negativa proporcional a la longitud del polipéptido.

Este sistema se usa principalmente para determinar los pesos moleculares de un polipéptido o proteína en cuestión; esto se logra corriendo el gel con proteínas estándares de peso molecular conocido junto con la proteína a caracterizar. Existe una relación lineal entre el logaritmo base 10 del peso molecular y la distancia que migra la proteína en el gel. Hoy día son dos los sistemas SDS más usados, el de Weber y Osborn (1969), es un sistema continuo; y el de Laemmli (1970), que es un sistema modificado del de Ornstein (1964) y Davis(1964), que es un sistema discontinuo. Este último es el de mayor uso, y consiste en el uso de un gel concentrador al que le precede un gel separador, lográndose una resolución excelente⁽²⁸⁾.

Separación electroforética de polipéptidos de bajo peso molecular⁽⁴⁴⁾.

Este sistema utiliza un tamaño de poro uniforme del 18 al 20% con un entrecruzamiento del 0.5% (200:1, acrilamida:bis).

Gel empacador, mezcla para cuatro geles (0.75 mm de grosor):

Soluciones	Concentración final	Cantidad (ml)
Acrilamida	10%T 4.8%C	1.68
39.4%T4.8%C _{bs}		
Agua destilada	-	2.5
Glicerol (99.9%)	10% (v/v)	0.7
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH6.8	0.125M	1.7
Duodecil sulfato de Sodio 10%	0.1% (w/v)	0.067
Persulfato de Amonio 10%	0.03% (w/v)	0.020
TEMED	0.24% (v/v)	0.016

Gel separador, mezcla para 4 geles (0.75 mm de grosor):

Solución	Concentración final	Cantidad (ml)
Acrilamida 37.7%T 0.5% C_{60}	20%T 0.5%C	11.3
Agua destilada	-	2.8
Glicerol 99.9%	10% (v/v)	2.1
Amortiguador Tris-HCl 3M pH9.3	0.75M	5.3
Duodecil sulfato de Sodio 10%	0.1% (w/v)	0.212
Persulfato de Amonio 10%	0.028% (w/v)	0.060
TEMED	0.14%	0.030

Amortiguador para la cámara:

Componente	Concentración final	Cantidad
Glicina	0.38M	142.7 g
Trizma base	-	25.66 g
Trizma-HCL	0.05M	6.14 g
SDS 10%	0.1%	50 ml
Agua destilada	-	llevar a 5 litros

Amortiguador para la muestra (1:1)

Componente	Concentración final	Cantidad
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.0625M	1.25 ml
SDS 10%	1%	1 ml
Glicerol	15%	1.5 ml
Ditiotreitol	15mM	23 mg
Agua destilada	-	6.05 ml

8.5 Tinción de Plata para detectar proteínas en geles de poliacrilamida.

Todos los pasos se llevan a cabo en agitación media, las soluciones y lavados se hacen con agua ultrapurificada.

1.-Poner el gel en ácido Tricloroacético al 20 % por 2 hrs.

2.-lavar el gel con agua y ponerlo en una solución de 50 % metanol 2 hrs (microondas 2 min max. potencia 10 min potencia 2), luego hacer dos lavados 2 hrs cada uno (o en microondas 2 min. max. potencia, 10 min. potencia 2).

3.-Decantar el agua y adicionar suficiente solución de plata amoniacal para que el gel flote libremente. Para preparar 100 ml de la solución adicione: 1.4 ml de NH_4OH a 21 ml de NaOH al 0.36 % en agitación fuerte adicione lentamente 4 ml de AgNO_3 al 19.4 % y afore con agua a 100 ml. Teñir por un tiempo no mayor de 15 min. La plata puede precipitarse como AgCl por acidificación con HCl para reciclarse.

4.-Remueva el gel de la solución de plata amoniacal y póngalo a lavar 2 veces en agua 5 min.

5.-Para visualizar las proteínas transfiera el gel a una solución fresca de ácido cítrico 0.005% y formaldehído 0.019 %. Tener cuidado con la inercia de la reacción, lavar el gel con agua por 5 min.

6.-Solución stop, para evitar un fondo oscuro con concentraciones de acrilamida mayores al 10 %, 45 % metanol, 10 % ac. acético por 30 min⁽³⁰⁾.

8.6 Geles de gradiente de poro.

Amortiguador de tris-borato:

tris 0.07 M, ac. bórico 0.08 M, EDTA 2.5 mM, a pH 8.5

Preparar también un poco de amortiguador tri-borato de doble concentración.

Etanol 20% coloreado con azul de bromofenol.

Sacarosa 20% coloreada con rojo de metilo.

Acrilamida concentrada

60%

acrilamida 57.6 g

metilen bis A. 2.4 g

agua hasta 100 ml

Acrilamida

8%

acrilamida 7.68 g

metilen bis A. 0.32 g

agua hasta 100 ml

Para prepara 4 goles:

Cámara de dilución	Cámara de reposición
solución al 4%	30%
acrilamida 8% 4ml	acrilamida 60% 4 ml
amortiguador 2X 3.9 ml	amortiguador 2X 3.9 ml
persulfato de amonio 10mg/ml 102 µl	persulfato de amonio 80 µl
TEMED 14 µl-colocar en la cámara	TEMED 9 µl-colocar en la cámara.

Procedimiento:

-se lavan las placas de teflon y los vidrios, se secan con metanol y se arman con los separadores de 0.75 cm. y dientes, se colocan dentro de la cámara gelificadora, separados con placas de plástico.

-se conecta la cámara de dilución a la cámara gelificadora con una manguera y una bomba peristáltica.

-en la cámara de dilución se coloca el metanol al 20% y se bombea a la cámara gelificadora hasta el nivel en que toca la base de las placas de teflon. Se detiene el flujo.

-se elimina el resto del metanol al 20% y se coloca la acrilamida al 8%, y la que esta al 30% se coloca en la cámara de reposición en agitación, es muy importante verificar que no existan burbujas en la manguera ni en ninguna de las dos cámaras.

-se adiciona el TEMED y se da un flujo lento para el llenado de la cámara de gelificación. Al momento que se termina la acrilamida en la cámara de dilución se adiciona la sacarosa al 20% teniendo cuidado de no introducir burbujas. En el momento que la fase de acrilamida llena las placas, se detiene el flujo. Se deja gelificar.

-Antes de usar un gel se precorre a 30 mA durante 1 hr. Se colocan muestras concentradas en glicerol o si no lo están se adiciona sacarosa a la muestra para darle densidad.

-el gel se puede teñir con plata, con azul de coomasie o transferir a una membrana de nitrocelulosa.

8.7 Isoelectroenfoque.

Este es un método en el cual las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico en un gradiente de pH, por lo que las proteínas migran al pH donde su carga neta es 0.

El enfoque se da en dos etapas: primero, se forma el gradiente de pH, en un gel no restrictivo que polimeriza conteniendo una mezcla de compuestos anfotéricos altamente móviles, llamados anfolitos; para formar el gradiente este gel se precorre con el fin de que los anfolitos se acomoden por sí mismos de acuerdo a su propio punto isoeléctrico, los más ácidos migran al ánodo y los más básicos migran hacia el cátodo. En la segunda etapa, la proteína se coloca en el gel para iniciar su migración, si tienen carga neta negativa migran al ánodo y al cátodo si es positiva, deteniéndose en un punto en el cual el gradiente de pH es igual a su pI .

Una forma de saber cual es el gradiente de pH, es corriendo proteínas estándares con pI 's conocidos. De manera que se puede construir una curva del gradiente de pH conociendo la posición de las proteínas estándares en el gel⁽⁴⁴⁾.

Mezcla para cuatro geles de 0.75 cm de espesor:

	Condiciones Nativas	Condiciones desnaturalizantes
Agua destilada	7.87 ml	3.1 ml
Glicerol	1.2 ml	1.2 ml
Triton X-100 30% (v/v)	-	0.8 ml
Urea (ultrapura)	-	5.76 g
Acrilamida 30%T,2.7%C _{ba}	2.2 ml	2.2 ml
Anfolitos 3.5/10	0.72 ml	90 µl
TEMED	23 µl	16 µl
Persulfato de Amonio 10%	50 µl	46 µl

Amortiguador para la muestra (1:1):

	Condiciones nativas	Condiciones desnaturalizantes
Agua destilada	395 μ l	150 μ l
Glicerol	75 μ l	75 μ l
Anfolitos 3.5/10	30 μ l	5 μ l
46	-	25 μ l
Triton X-100	-	33 μ l
Urea	-	0.24 g
Ditiotreitol	-	8 mg

8.8 Activación de Agarosa con CNBr:

-Etapa de activación:

Se añaden 20 g de agarosa lavada a 20 ml de agua destilada en un recipiente de 100 ml, la mezcla debe estar en agitación (agitador magnético) y en contacto en un termómetro (0-100°C) y un potenciómetro.

Se debe de agitar despacio y disminuir la temperatura a 10-15°C añadiendo hielo molido y ajustar el pH 10.8 con la adición de 1-2 gotas de NaOH 4.0 M.

Se inicia el proceso de activación con la adición de CNBr y manteniendo el pH a 10.8 por titulación manual con NaOH 4.0 M. El CNBr (100 mg/g de peso de gel) debe agregarse en estado sólido o en acetonitrilo (1g/ml).

La temperatura de la reacción se debe de mantener entre 18-20°C. El término de la reacción se aproxima cuando el tiempo de adición de NaOH se prolonga.

Después de que se termina la activación, se enfría rápidamente el gel con hielo molido, se filtra la suspensión en un matraz de 1 litro que debe contener NaOH 3-4M y se succiona con vacío, esto con el fin de eliminar el CNBr que no reacciona.

Se lava el gel con agua destilada(1 litro) y el amortiguador que se usara en la etapa de acoplamiento(1 litro).

-Etapa de acoplamiento.

El pH al que se debe de hacer el acoplamiento debe de estar por arriba del pK_a del ligando pero debe ser menor a 10. y se realiza en agitación durante toda la noche añadiendo el ligando al gel en amortiguador⁽³⁴⁾.

ABREVIACIONES.

μg	microgramo
3D.....	tridimensional
AgNO_3	nitrato de plata
BCIP.....	5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato
CNBr.....	bromuro de cianogeno
DC.....	Dicroismo Circular
DEAE.....	dietilaminoetil
DMF.....	dimetil formamida
EDTA.....	etilendiamina-acidotetraacetic o
ELISA.....	ensayo inmunoenzimático en filtros
Fru6P.....	fructosa 6-fosfato
GlcN.....	D-Glucosamina
GlcN6P desaminasa.....	glucosamina 6 fosfato desaminasa
GlcN6P.....	glucosamina 6-fosfato
GlcNAc.....	N-acetil-D-glucosamina
GlcNAc6P.....	N-acetil-D-glucosamina 6-fosfato
h_{max}	número de Hill
HPLC.....	Cromatografía líquida de alta presión
IgG.....	inmunoglobulina
k_{cat}	constante catalítica
kDa.....	kilodaltones
K_m	constante de Michaelis
mA.....	miliamper
ms.....	milisegundo
n.m.r.....	resonancia magnética nuclear
NBT.....	nitro blue tetrazolium
nm.....	nanometros
PDI.....	proteína disulfuro isomerasa
pl.....	punto isoeléctrico
PPI.....	peptidil-prolil cis-trans isomerasa
r.p.m.....	revoluciones por minuto
SDS.....	duodecil sulfato de sodio
TEMED.....	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris HCl.....	trizma base acidificado con HCl
UV.....	ultravioleta

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Dobrogosz, W. J. (1968). N-acetylglucosamine assimilation in *Escherichia coli* and its relation to catabolite repression. *J. Bacteriol.* **95**: 585-591.
- 2.-Walker, J. E., Gay, N. J., Saraste, M. y A. N. Eberle. (1984). DNA sequence around the *Escherichia coli* unc operon. Completion of the sequence of a 17 kilobase segment containing asnA, oriC, unc, glmS and phoS. *Biochem. J.* **224**: 799-815.
- 3.-Rogers, M. J., Ohgi, T. Plumbridge, J. y D. Soil. (1988). Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* nagE and nagB genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphotransferasa system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene.* **62**: 197-207.
- 4.-Plumbridge, J. A. (1989). Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon. *Mol. Microbiol.* **23**: 505-515.
- 5.-Vogler, A. P. y J. W. Lengeler. (1989). Analysis of the nag regulon from *Escherichia coli* K12 and *Klebsiella pneumoniae* and of its regulation.. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 97-105.
- 6.-Plumbridge, J.A. (1990). Introduction 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**: 2728-273.
- 7.-Segel I. H. (1975). Enzime Kinetics. *Wiley & Sons*. New York.
- 8.-Calcagno, M., Campos. P. J., Mulliert. G. y J. Saustegui. (1984). Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerasa (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **787**: 165-173.
- 9.-Altamirano, M. M., Mulliert, G. y M. Calcagno. (1987). Sulfhydryl groups of glucosamine 6-phosphate isomerasa deaminase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**: 95-100.
- 10.-Altamirano. M. M., Plumbridge A. J., Hernández-Arana A. y M. Calcagno. (1991). Secondary structure of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase from amino acid sequence and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1076**: 266-272.
- 11.-Horjales y col, articulo en preparación.
- 12.-Mildelfort F. C., y Rose A. I.(1977). *Biochemistry*, **16**: 1590-1596.
- 13.-Fersht, A. y Winter, G. (1992). Protein engineering. *Trends in Biochemical Sci.* **17**: 292-294.

- 14.-Hutchinson, C. A. , Phillips, S. A., Edgell, M. H., Gillam, S, Jahnke, P. y M. Smith. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**: 6551-6556.
- 15.-Jaenicke R. (1991). Protein Folding: Local Structures, Domains, Subunits, and Assemblies. *Biochemistry.* **30**: 3147-3161.
- 16.-Creighton, T. E. (1990). *Biochem. J.* **270**: 1-16.
- 17.-Fersht. R. A. (1993). Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase. *FEBS letters.* **325**: 1,2,5-16.
- 18.-Kim, S. P. y Baldwin, L. R. (1990). Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 631-660.
- 19.-Sancho, J., Neira, J. L., y Fersht, A. R. (1992). An N-Terminal Fragment of Barnase has Residual Helical Structure Similar to that in a Refolding Intermediate. *J. Mol. Biol.* **224**: 747-752.
- 20.-Wetlaufer. (1981). *Adv.Prot.Chem.* **34**: 61-92.
- 21.-Oas, T. G. y Kim, S. P. (1988). A peptide model of a protein folding intermediate. *Nature.* **336**: 42-48.
- 22.-Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning, 2dn, ed. Col Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 23.-Taniuchi, H., Parr, G. R. y M. A. Juillerat. (1986). Complementation in folding and Fragment Exchange. *Methods Enzymol.* **131**: 185-217.
- 24.-Baldwin, L. R. (1986). How does protein folding get started?. *Trends Biochem Sci.* **14**: 291-294.
- 25.-Eder J. y K. Kirschner. (1992). Stable Substructures of Eightfold $\beta\alpha$ -Barrel Proteins: Fragment Complementation of Phosphoribosylanthranilate Isomerase. *Biochemistry.* **31**: 3617-3625.
- 26.-Bertolaet, L. B. y Knowles, R. J. (1995). Complementation of Fragments of Triosephosphate Isomerase Defined by Exon Boundaries. *Biochemistry.* **34**: 5736-5743.
- 27.-Bio-Rad Inmun-Blot GoAt Anti- Rabbit (GAR) Holseradish Peroxidase (HRP).
- 28.-Scopes, K. R. (1987). Protein Purification, Principles and Practice. Springer-Verlag. New York.7-10,43,77-78,91.

- 29.-Olivier, R.W.A. (1991). HPLC of macromolecules, a practical approach. IRL PRESS. New York.
- 30.-Oakley, R. B. et al.(1980). *Anal Biochem.* **105**: 361-363.
- 31.-Hawakes, R. et al. *Anal.* (1982) *Biochem.* **119**: 142-147.
- 32.-Towbin, H. et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS.* **76**: 4350-4354.
- 33.-Sancho J. y Fersch, A. R. (1992). Dissection of an Enzyme by Protein Engineering. The N and C-Terminal Fragments of Barnasa Form a Native-like Complex with Restored Enzymic Activity. *J. Mol. Biol.* **224**: 741-747.
- 34.-Axén, R., Porath, J., y S. Ernback. (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature.* **214**: 1302-1304.
- 35.-Waltho, P. J., Feher, A. V., Merutka, G., Dyson, J. H., y P. E. Wright. (1993). Peptide Models of Protein Folding Initiation Sites. 1. Secondary Structure Formation by Peptides Corresponding to the G- and H-Helices of Myoglobin. *Biochemistry.* **32**: 6337-6347.
- 36.-Pharmacia Fine Chemicals AB. DEAE-Sephacel Beaded cellulose ion exchanger. Suiza.
- 37.-Plumbridge, J. A., Cochet, O., Souza, J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L. , y B. Badet. (1993). Coordinated Regulation of Amino Sugar-Synthesizing and -Degrading Enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**: 4951-4956.
- 38.-Plumbridge, J. A. (1992). A dominant mutation in the gene for the Nag repressor of *Escherichia coli* that renders the *nag* regulon uninducible. *Journal of General Microbiology.* **138**: 1011-1017.
- 39.-Roe, J. H. (1934). *J. Biol. Chem.* **107**:15-22.

40.-Davis, J. S. y Gander, J. E. (1967). *Anal. Biochem.* **19**: 72-79.

41.-Anfinsen, C. B. y Scheraga, H. A. (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Advan. Protein Chem.* **29**: 205-300.

42.-Bradford, M. M., (1976). *Anal Biochem.* **72**: 248-254

43.-Dobson C. M. y Radford, S. E. (1994). Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *TIBS.* **19**: 31-37.

44.-Hoefer Scientific Instruments. 1990-1991. Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises.

45.-Privalov, P. L. (1988). in Protein Structure and Protein Engineering (Huber, R. & Winnacker, E. L. Eds.) Colloquium Mosbach, **39**: 6-15