



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS DE ASOCIACIÓN EN LA DESNATURALIZACIÓN DE LA GLUCOSAMINA-6-FOSFATO DESAMINASA DE *Escherichia coli*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
LUIS MIGUEL BLANCAS MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HUGO NAJERA PEÑA

ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. IDALIA FLORES GÓMEZ



MÉXICO, D.F.

2004



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.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Caracterización de los Estados de Asociación en la
Desnaturalización de la Glucosamina-6-Fosfato
Desaminasa de *Escherichia coli*.

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Luis Miguel Blancas Mejía

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Hugo Nájera Peña

ASESOR:

Q.F.B Idalia Flores Gómez

México D.F. 2003

Abreviaturas.....	3
Introducción.....	4
1. Fundamepntación.....	6
1.1. Plegamiento de proteínas.....	6
1.2. Estudios de plegamiento in vitro.....	8
1.3. Agentes desnaturalizantes.....	11
1.4. La glucosamina-6-fosfato desaminasa de Escherichia coli.....	12
1.5 Técnicas para seguir las transiciones estructurales durante el despliegamiento de las proteínas.....	17
1.5.1 Fluorescencia.....	18
1.5.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	19
1.5.3 Dicroísmo circular.....	20
2. Planteamiento del problema.....	22
3. Objetivo.....	23
4. Hipótesis.....	23
5. Materiales y métodos.....	24
5.1. Materiales.....	24
5.2. Metodos.....	24
5.2.1. Sobreexpresión y purificación.....	24
5.2.2. Experimentos de desnaturalización.....	25
Cinética enzimática.....	25
5.2.3. Fluorescencia.....	26
5.2.3.1. Obtención del tiempo de Equilibrio.....	26
5.2.3.2. Desnaturalización al tiempo de equilibrio.....	26
5.4. Cromatografía de exclusión molecular.....	27
5.4.1. Calibración de la columna Superdex 200.....	28
5.5. Dicroísmo circular.....	29
5.6. Tratamiento de los datos.....	29
6. Resultados.....	30
6.1. Fluorescencia intrínseca.....	30
6.2. Cromatografía de exclusión molecular.....	33
6.2.1. Calibración de la columna.....	33
6.2.2. Propiedades hidrodinámicas de la GlcN6P desaminasa de E. coli.	34
6.2.3. Radio de Stokes.....	37
6.3. Dicroísmo Circular.....	40
6.4. Actividad catalítica.....	41
6.5. Comparación y análisis de todas las técnicas.....	42
7. Discusión.....	46
8. Conclusiones.....	48
9. Perspectivas.....	49
10. Anexos.....	51

10.1. Regulación alostérica.....	51
10.1.1. Modelo MWC o modelo simétrico.	52
10.1.2. Interacciones cooperativas.....	56
10.1.3. El modelo secuencial simple de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF). 	57
10.2. Clasificación de las técnicas usadas en el seguimiento de transiciones estructurales.....	59
11. Referencias.	62

Abreviaturas.

α	señal de la fracción mol aparente
CME	centro de masa espectral
DC	dicroísmo circular
EDTA	etilen diamino tetracético, ácido
Fru6P	D-fructosa-6-fosfato
GlcN6P	D-glucosamina-6-fosfato
GlcNAc6P	N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato
GuHCl	cloruro de guanidinio
k_{cat}	constante catalítica
Kda	kilodaltons
λ	longitud de onda
λ_{max}	longitud de onda máxima
Rs	radio de Stokes
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
V_o	Velocidad inicial
V_e	volumen de elución
W	triptofano
W224Y	glucosamina-6-fosfato desaminasa de <i>E. coli</i> , con sustitución del triptofano 224 por una tirosina
Y	tirosina

Introducción.

La glucosamina-6-fosfato desaminasa (GlcN6P desaminasa, EC 3.5.99.6) de *Escherichia coli* es un buen modelo para el estudio de las bases estructurales de la regulación alostérica en las enzimas. Esta enzima cataliza la isomerización y desaminación de la glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) formando fructosa-6-fosfato (Fru6P) y amonio siguiendo un mecanismo de equilibrio rápido al azar (1-3), la GlcN6P desaminasa es una proteína homohexámerica constituida por monómeros de 266 aminoácidos (29.7 kDa), presenta un eje de simetría de orden 3 y tres de orden 2, por lo que se puede describir como un dímero de trímeros o un trímero de dímeros (4). Ha sido ampliamente estudiada tanto en los aspectos estructurales como en los cinéticos; uno de los enfoques más relevantes en desarrollo es el estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa mediante la construcción de mutantes que tienen como consecuencia: alteraciones en la unión de sustratos (5), la supresión del sitio alostérico (6), cambios en el sistema de activación enzimática (7-11) o la reducción drástica de la catálisis sin afectar significativamente la unión de los sustratos y/o los inhibidores competitivos (10). El uso de proteínas mutadas tiene la limitación de generar oligómeros en los que todas las subunidades son portadoras de la o las mismas mutaciones, recientemente se ha utilizado la técnica de construcción de heterooligómeros entre subunidades silvestres y mutadas, lo cual se presenta como una herramienta valiosa para el estudio de la comunicación entre subunidades en proteínas alostéricas. Debido a que la GlcN6P desaminasa posee una estructura de dímero de trímeros o trímero de dímeros, con dos tipos de caras de contacto entre subunidades vecinas (tres intercaras en los tres ejes

dobles y seis en el eje triple, tres en cada trímero) plantea el problema de explicar la propagación de la transición cuaternaria concertada, que cinéticamente parece propagarse de igual manera en ambas interfases; lo cual podría lograrse utilizando esta estrategia de construcción de heterooligómeros.

Para la construcción de dichos heterooligómeros es necesario realizar el estudio de desplegamiento y replegamiento de la enzima utilizando agentes caotrópicos como la urea y el cloruro de guanidinio, caracterizar estos patrones mediante técnicas cinéticas, espectrométricas y cromatográficas.

1. Fundamentación.

1.1. Plegamiento de proteínas.

Las proteínas se sintetizan mediante el proceso de traducción del mRNA en los ribosomas, formándose la cadena polipeptídica la cual adquiere una estructura tridimensional biológicamente activa (estructura nativa). A este proceso se le conoce como plegamiento **(11)**.

Existe información extensa y detallada sobre el plegamiento de proteínas monoméricas **(11)**; sin embargo la mayoría de las enzimas son de carácter oligomérico. Las proteínas monoméricas sólo requieren del plegamiento intramolecular, esto es, de las interacciones de autoorganización hacia el estado nativo. Mientras que para las proteínas oligoméricas también se requiere el reconocimiento y la asociación intermolecular. En la mayoría de los sistemas oligoméricos o multiméricos, las reacciones de asociación están relacionadas con elementos funcionales en las vías metabólicas, aparición de la actividad o de la regulación alostérica; por lo que es importante conocer todos los procesos implicados para obtener una estructura biológicamente activa.

Se ha observado que las proteínas se pliegan con o sin intermediarios. También hay evidencia de vías de plegamiento simples o múltiples, pero aún no se resuelve el mecanismo general por el cual las proteínas adquieren su estructura nativa.

En base al trabajo de Levinthal **(12)**, se planteó que si el proceso de plegamiento a partir de una proteína desplegada se hiciera al azar, pasando por las distintas conformaciones que puede adoptar, se requerirían millones de años para obtener la proteína en su conformación nativa **(13)**. A esta observación se le

conoce como la paradoja de Levinthal, además plantea que sólo algunas de las conformaciones son relevantes para el plegamiento (**12, 14**). Con base en lo anterior, se ha propuesto la existencia de estados intermedios transitorios que dirigen la ruta de plegamiento (**15**).

Se han propuesto tres mecanismos para explicar las rutas preferenciales de plegamiento: 1) El modelo del armazón ("Framework") que propone que los elementos de estructura secundaria nativa se forman independientemente a la estructura terciaria, difundirían hasta colisionar en la conformación adecuada, se adhieren y dan origen a la estructura terciaria. 2) El modelo de nucleación postula que algunos residuos vecinos en la secuencia forman la estructura secundaria nativa que actúa como núcleo a partir de la cual la estructura nativa se propaga y como consecuencia se forma la estructura secundaria. 3) El modelo del colapso hidrofóbico supone que la proteína se colapsa rápidamente alrededor de las cadenas laterales hidrofóbicas, el intermedio formado se rearregla en un espacio conformacional restringido. En este modelo (Fig.1) el plegamiento estaría dirigido por interacciones terciarias semejantes a las de la nativa (**11,14, 16, 17**).

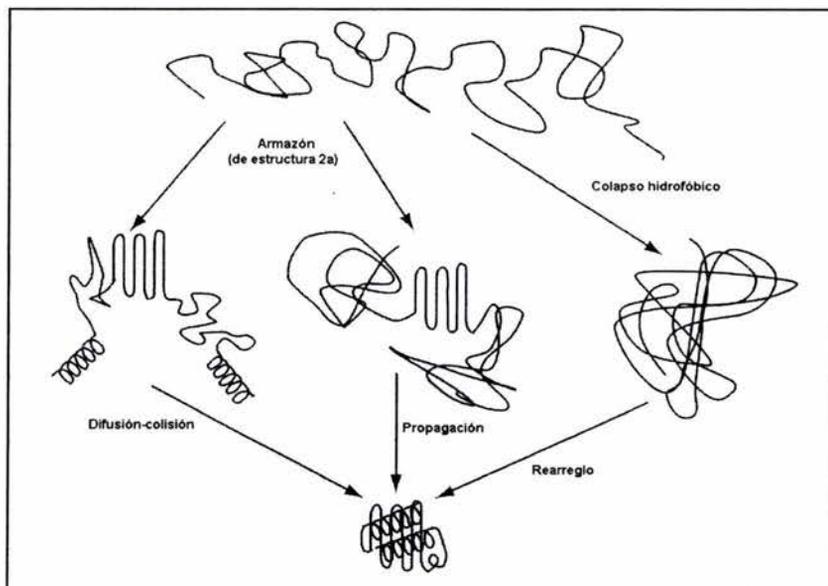


Fig. 1 Los tres mecanismos clásicos para el plegamiento de proteínas (Fersht, 1999)

1.2. Estudios de plegamiento *in vitro*.

El estudio de las distintas etapas por las que cursa el fenómeno de desplegamiento se ha desarrollado mediante estudios cinéticos y termodinámicos *in vitro*. Se ha discutido ampliamente la validez de la comparación de estos estudios comparándolos con los procesos de plegamiento *in vivo*, ya que los estudios *in vitro* parten de una cadena completamente desplegada, mientras que el plegamiento *in vivo* involucra la formación de la cadena simultáneamente a su plegamiento (16), además de que es facilitado por varias proteínas que evitan la agregación irreversible y que favorecen interacciones adecuadas (chaperonas, peptidil isomerasas) (18).

Para que el estudio sea válido se deben cumplir dos condiciones fundamentales: a) La cinética de replegamiento debe ser igual al intervalo de tiempo que *in vivo* y b) la proteína replegada debe ser indistinguible de la proteína

nativa, esto es, el proceso de desplegamiento-replegamiento debe ser reversible **(16)**.

Así la desnaturalización de una proteína se define como el deterioro cooperativo y generalizado en las interacciones no covalentes (interacciones débiles) y en los enlaces disulfuro, sin modificar los enlaces peptídicos. Estas interacciones pueden romperse con agentes tales como la urea y el cloruro de guanidinio, los cuales son agentes caotrópicos cuyo mecanismo de acción es poco conocido, pero que ha demostrado su alta efectividad. Aparentemente modifican las propiedades del solvente aumentando la solubilidad de los residuos no polares de las proteínas debilitando las interacciones hidrofóbicas, obteniendo un conjunto de conformeros de energía similar, fácilmente interconvertibles entre sí y menos estables que el estado nativo **(19)**.

Cuando se realizan esta clase de estudios una de las primeras y principales preguntas que se debe responder es si la transición entre el estado nativo y el desnaturalizado, inducido por cualquier agente desnaturalizante es descrito por un modelo de dos estados $N \rightleftharpoons U$ (donde N es el estado nativo y U es el estado desnaturalizado), o por un modelo de múltiples estados $N \rightleftharpoons I_1 \rightleftharpoons I_2 \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons U$ donde I es un intermediario presente en el equilibrio. La elección del modelo apropiado es muy importante ya que provee un contexto para trazar las interpretaciones moleculares.

Una prueba ampliamente usada para determinar si la desnaturalización sigue un modelo de dos estados o de múltiples estados **(20)**, se basa en el seguimiento del desplegamiento de la proteína por más de dos técnicas analíticas independientes. Si cada diferente serie de datos no provee un seguimiento

idéntico del progreso de la transición (eliminando las diferencias en las técnicas, mediante el cálculo de la fracción nativa aparente) el proceso es de múltiples estados (Fig. 2).

El argumento contrario, que el seguimiento del desplegamiento sea idéntico, indica que el proceso es de dos estados no es del todo cierto, ya que es posible que varias técnicas sean insensibles a una o mas transiciones en un proceso de mas de dos estados, por lo tanto existe la posibilidad de que las coincidencias disminuyan con el uso de tres o mas técnicas siendo una manera concluyente para elegir el modelo de desplegamiento apropiado.

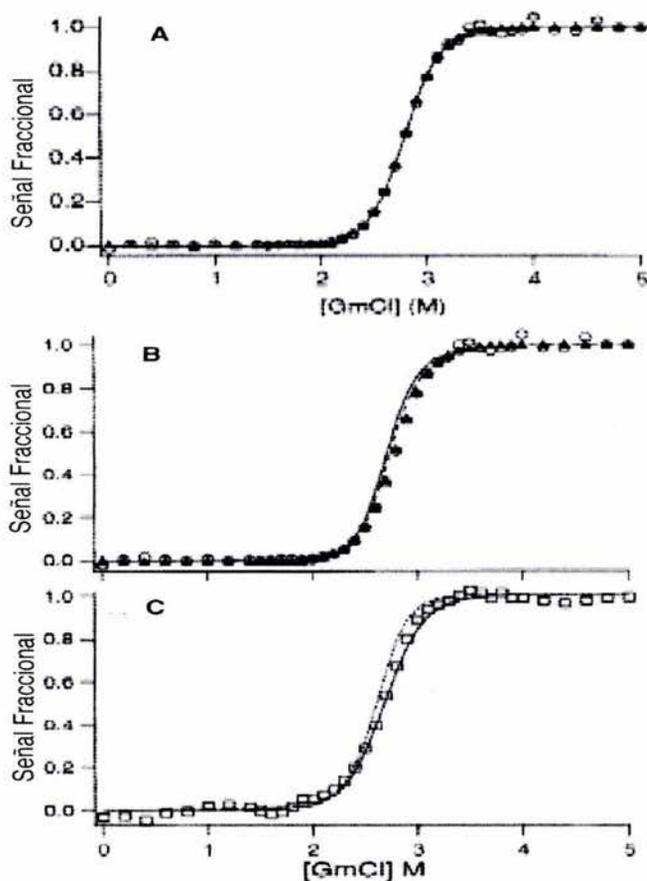


Fig. 2. Comparación entre las curvas de desnaturalización normalizadas a un modelo de dos estados. (A) datos de IF (○) y DC (■). (B) predicción a partir del modelo de dos estados. (C) comparación con los datos ajustados de DC, IF(—) e intercambio de hidrogeno (■), se puede apreciar que las mediciones no son coincidentes y se descarta el modelo de dos estados. Modificado de Mayne, L., Englander, S. W. (2000), *Protein Science*. 9:1873–1877.

1.3. Agentes desnaturalizantes.

Para el estudio del plegamiento de proteínas globulares *in vitro* es necesario el uso de agentes desnaturalizantes, los cuales pueden ser mecánicos como el aumento de la presión hidrostática; químicos (caotrópicos) como el cloruro de guanidinio (GuHCl), la urea o el dodecil sulfato de sodio (SDS); o fisicoquímicos como el aumento o disminución de la temperatura o el uso de condiciones extremas de pH.

La urea y el GuHCl son dos agentes desnaturalizantes útiles en los estudios de desplegamiento en condiciones de equilibrio y cinéticos, ya que es posible seguir la transición entre los estados nativo y desnaturalizado de la proteína. El mecanismo de acción de estos dos agentes no se conoce completamente, aun cuando son ampliamente usados. No se ha establecido si su acción es directa, análoga al mecanismo de unión a un ligando, o bien por el cambio en las propiedades del solvente (**20, 21, 22**).

Existen trabajos que presentan evidencias a favor de la interacción directa entre la proteína y el agente desnaturalizante (**23**), argumentando que su capacidad para inducir el desplegamiento esta relacionada a la interacción principalmente con las regiones no polares de la proteína, confiriéndoles cargas con lo que se favorece la solvatación y aumenta la solubilidad.

El GuHCl es un desnaturalizante más fuerte que la urea, experimentalmente se ha calculado la energía libre para la transferencia de aminoácidos y péptidos de agua a soluciones acuosas de urea y GuHCl, la cual es de dos a tres veces más grande para el GuHCl que para la urea, lo que indica una mayor afinidad de las cadenas laterales de los aminoácidos por el GuHCl y

que la desnaturalización con urea requiere el doble de la concentración de agente desnaturalizante (24).

1.4. La glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*.

La glucosamina-6-fosfato desaminasa pertenece a la clase (2-R) aldohexosa isomerasas. Presenta en *E. coli* un punto isoeléctrico de 6.0-6.1, una constante de sedimentación de 9.0 S, una k_{cat} por subunidad en el sentido de formación de Fru-6-P y amonio de 300 s^{-1} y de 76 s^{-1} en el sentido inverso.

La enzima es activada alostéricamente por la *N*-acetilglucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Ésta se une al sitio alostérico para aumentar la afinidad aparente de la enzima por su sustrato, la GlcN6P, lo que acompaña a la pérdida de la cooperatividad homotrópica. A concentraciones saturantes de GlcNAc6P, la GlcN6P desaminasa presenta una cinética hiperbólica. Este comportamiento es característico de los llamados sistemas *K* (25), debido a que al incrementar sucesivamente la concentración del activador, los valores de $K_{0,5}$ disminuyen (efecto *K*), mientras que los valores de V_{max} no se modifican, esto significa que el control alostérico opera por medio de la modificación de la afinidad aparente de la enzima por su sustrato sin cambio en su constante catalítica (3). En un sistema *K* la activación, ya sea homotrópica o heterotrópica, cambia la afinidad de la enzima por el sustrato sin que se modifique la k_{cat} , y por lo tanto la V_{max} de la reacción. La presencia del efector es suficiente para modificar la afinidad de la enzima por su sustrato y a su vez el sustrato modifica la afinidad de la enzima por el efector (25).

Estas propiedades son importantes en la regulación coordinada de la síntesis de aminoazúcares (26) y su utilización por la bacteria (*E. coli*) durante la síntesis de la pared celular bacteriana ya que los aminoazúcares, componentes de la pared celular bacteriana, pueden tomarse del medio cuando están disponibles o sintetizarse a partir de fructosa 6 fosfato y glutamina en ausencia de aminoazúcares en el medio (26).

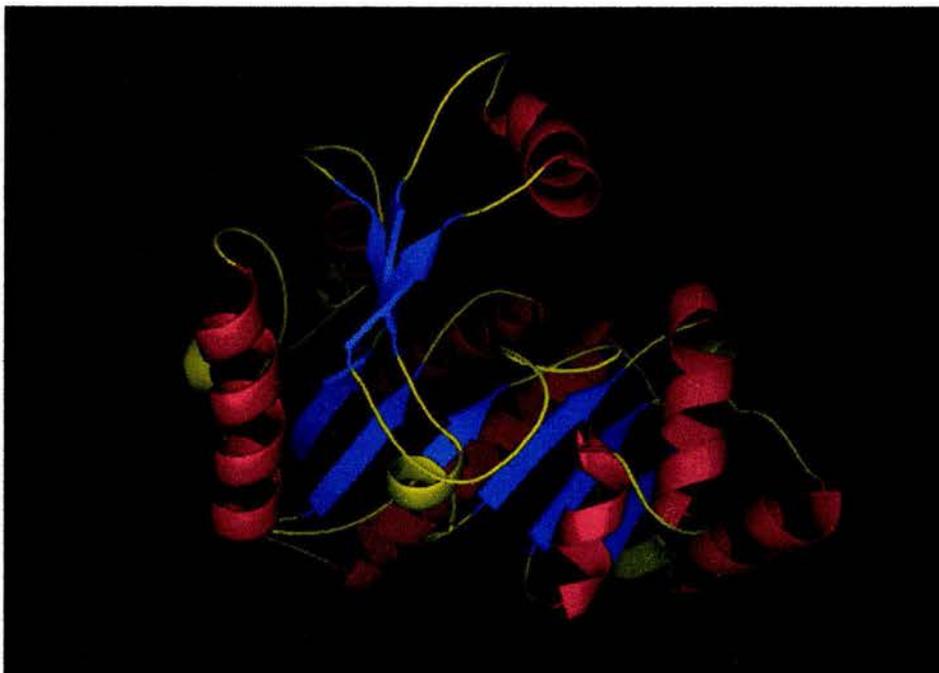
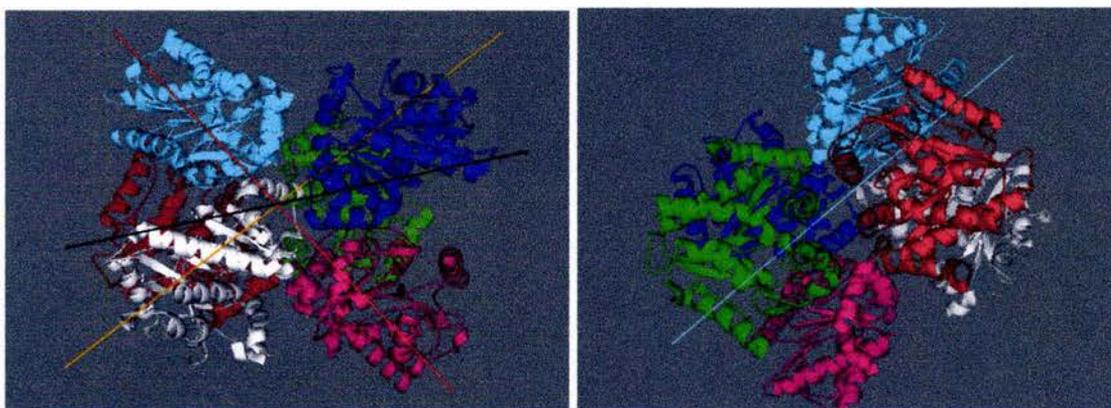


Fig. 3. Estructura de una subunidad de la glucosamina-6-fosfato desaminasa. Las hélices α están representadas en rojo; las hojas β en azul.



a)

b)

Fig. 4. Estructura hexamérica de la glucosamina-6-fosfato desaminasa. a) eje de simetría de orden dos. b) eje de simetría de orden tres.

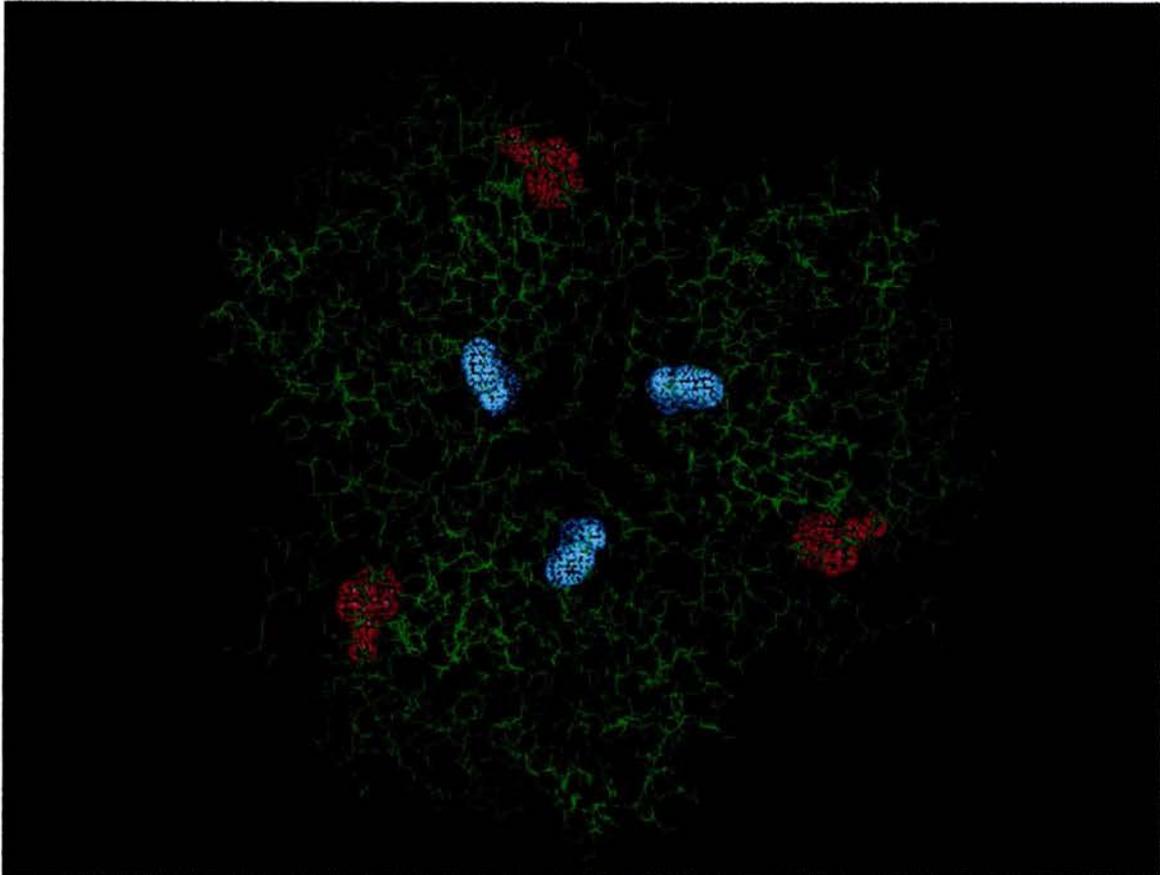


Fig. 5. Diagrama de un trimero de GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Se muestra la posición de los residuos de triptofano (W), el W 224 se muestra en azul y el W 15 en rojo.

La enzima fue descrita inicialmente por Leloir y Cardini (29) en 1956 y ha sido identificada en diversas especies de animales, protozoarios, hongos y bacterias. Se han purificado las GlcN6P desaminasas de *E. coli* (3), *Candida albicans* (30), de riñón canino (31) y bovino (32), así como de espermatozoides de *Metacricetus auratus* (33, 34) y *Homo sapiens* (35). Se conocen, entre otros, los genes de las GlcN6P desaminasas de *Caenorhabditis elegans*, *Micoplasma capricolum*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi* y *Bacillus subtilis*.

En mamíferos la desaminasa está presente en concentraciones considerables en espermatozoides maduros. En un principio Parrington y Lai identificaron a la desaminasa como el factor desencadenante de oscilaciones de los niveles intracelulares de calcio en el ovocito durante la fecundación, por lo que la llamaron “oscilina”. Finalmente se demostró que la verdadera oscilina había sido copurificada con la desaminasa de espermatozoide y que la GlcN6P desaminasa carece de la función que le había sido atribuida (34).

Se ha encontrado que en algunos mamíferos y en humano hay dos genes parálogos para esta enzima, que tienen una elevada identidad de secuencias con la enzima de *E. Coli* y un 96% de identidad entre sí. El gene de la enzima de cadena ligera se localiza en el cromosoma 4 y el de cadena pesada en el 5, ambas se expresan como isoenzimas. Se ha logrado obtener la enzima pura de cadena ligera y durante su purificación se obtiene en un estado de agregación distinto al hexamérico (Bióloga Laura Ileana Alvarez Añorve, proximo a publicación).

La estructura cristalográfica de la GlcNA6P desaminasa de *E. coli* ha sido resuelta al nivel molecular (2.3 Å) para la forma R y T (4, 27) (Fig.2). Presenta un dominio β/α abierto con siete hojas paralelas en la cavidad central rodeado por ocho hélices α , además presenta tres hebras β antiparalelas, entre dos de estas hebras β plegadas se encuentra una hélice α y una asa que conforman la tapa del sitio activo (Fig. 3). El arreglo de plegamiento de esta proteína es único (llamado “GlcNAc6P deaminase fold”) y no presenta similitud estructural con los arreglos de plegamiento de otras proteínas descritas.

Desde el punto de vista de emisión de fluorescencia, posee 6 tirosinas por monómero y dos triptofanos, W15 y W224. El W224 se encuentra en una región con una alta exposición al solvente, en cambio el W15 se encuentra poco expuesto, además de encontrarse en una región altamente hidrofóbica (Fig. 5), lo cual les confiere distintas propiedades espectroscópicas, principalmente en la emisión de fluorescencia, así el W15 por su posición se encuentra apagado por los residuos vecinos y no contribuye a la señal en el estado nativo. Se han construido mutantes con un sólo residuo de W en sus posiciones naturales (**28**) cambiándolos por un residuo de tirosina (Y), asumiendo que es un cambio conservador de la estructura y propiedades hidrofóbicas. Por estas diferencias, la mutante W224Y que sólo conserva el triptofano 15, resulta útil para seguir el proceso de desplegamiento del monómero durante los experimentos de desnaturalización.

1.5 Técnicas para seguir las transiciones estructurales durante el desplegamiento de las proteínas.

Durante la desnaturalización de una proteína por aumento en la concentración de desnaturalizante, es necesario seguir una o varias señales sensibles a cambios en el estado de asociación de la proteína y sus cambios conformacionales. La medición de la actividad enzimática es un método sensible, rápido y específico para caracterizar los cambios conformacionales que sufre la enzima durante el proceso de desnaturalización y repliegamiento, ya que sólo el estado nativo presenta actividad **(36)**.

Otras técnicas muy usadas para seguir y cuantificar los cambios estructurales durante el proceso de desnaturalización son la espectroscopia UV, la fluorescencia, el dicroísmo circular (DC), la dispersión óptica rotatoria (DOR) y la resonancia magnética nuclear (RMN) entre las más usadas.

Los métodos espectrométricos son útiles para caracterizar el comportamiento de la proteína en distintos medios o disolventes, comparar las características de moléculas relacionadas como enzimas homólogas o mutantes a estudiar **(37)**.

De las técnicas espectrométricas se puede obtener información sobre los cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína en solución y para algunas se requiere poca cantidad de la enzima para realizar mediciones, además de ser técnicas no destructivas (es posible recuperar la muestra).

1.5.1 Fluorescencia.

La fluorescencia es la emisión de energía en forma de radiación que ocurre cuando una molécula pasa de un estado excitado a su estado basal, esta emisión ocurre a longitudes de onda mayores en comparación al espectro de absorción, debido a que parte de la energía se pierde en otros procesos no radiativos (37).

Para este tipo de estudios se pueden usar grupos fluorescentes (fluoróforos) que pueden ser de tipo intrínseco (aminoácidos aromáticos, flavinas) o extrínseco (cloruro de dansilo, 1-anilino-8-naftalen sulfonato, por citar algunos) que pueden unirse de forma covalente o no covalente (38, 39), reflejando la interacción del fluoróforo con otras moléculas circundantes, observándose cambios en parámetros como la longitud de onda de emisión máxima (λ_{max}), la intensidad de la fluorescencia (IF) y la vida media de la señal (τ) (39).

La fluorescencia intrínseca se debe principalmente a la presencia de residuos de fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptofano (W), el cual da la mayor parte de la señal de fluorescencia de las proteínas, ya que su coeficiente de absorción y su eficiencia cuántica de emisión son mayores que los de F e Y (39).

La fluorescencia de W es útil para seguir la movilidad de regiones particulares de la proteína: si existen varios W en la proteína es difícil interpretar la señal obtenida, pero es posible sortear este inconveniente, mediante la sustitución de las cadenas laterales del W por las de otro aminoácido (preferentemente aromático pero menos fluorescente) por mutagénesis sitio dirigida y la subsiguiente medición de la señal residual. También ha permitido dilucidar aspectos estructurales y funcionales de varias proteínas. En estudios de

desnaturalización o renaturalización de proteínas con un sólo W se pueden asignar cambios de señal en estos procesos a regiones específicas de la proteína y proponer modelos de desnaturalización.

La espectroscopía de fluorescencia, presenta características tanto dinámicas como estáticas que permiten seguir transiciones conformacionales durante el desplegamiento inducido ya sea por temperatura, presión o agentes químicos. Esta técnica permite indagar acerca de la conformación de la proteína ya que es altamente sensible y muy económica en cuanto a material; sin embargo se debe tener cuidado en cuanto al manejo de la muestra y limpieza del material, ya que si existen pequeñas trazas de impurezas fluorescentes en el disolvente o en la celda, puede llevar a malas interpretaciones del espectro obtenido (38).

1.5.2 Cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía de exclusión molecular, es una técnica que se fundamenta en la correlación entre el tiempo de retención dentro de la columna y el radio de Stokes, para separar moléculas en solución de acuerdo a su tamaño al pasar a través de una columna empacada con un medio cromatográfico o gel con un tamaño de poro conocido.

Durante el proceso de desnaturalización de las proteínas se presentan cambios tanto fisicoquímicos como estructurales (entre ellos cambios en las dimensiones moleculares). Así, relacionando el volumen de elución de las especies en solución y su radio de Stokes, esta técnica se vuelve una herramienta poderosa para determinar los cambios hidrodinámicos durante la

desnaturalización (40). Si los cambios son más lentos que el tiempo característico de la cromatografía es posible detectar los distintos intermediarios por los que atraviesa una proteína al desnaturalizarse (41); observados como cambios en el tiempo de retención asociados a cambios en los radios de Stokes de los confórmeros (42) o la aparición de nuevos picos (19).

Se ha estudiado la influencia de la columna en el desplazamiento del equilibrio de las distintas especies en proteínas que se desnaturalizan atravesando por un estado de glóbulo fundido, estableciendo que la columna no afecta dicho equilibrio y puede usarse para realizar un estudio cuantitativo (41).

1.5.3 Dicroísmo circular.

El dicroísmo circular o DC forma parte de una serie de técnicas espectroscópicas que miden los efectos quiroópticos de la interacción de la materia con un tipo especial de energía electromagnética, la luz polarizada.

El termino quiral se refiere a un tipo de asimetría asociado con la geometría especular comúnmente ejemplificada por la comparación entre las manos derecha e izquierda y se aplica a moléculas que existen como formas enantioméricas, la característica más importante de dichos compuestos es su habilidad de rotar el plano de la luz polarizada. Este fenómeno se conoce colectivamente como actividad óptica e incluye la medición de la rotación óptica (o cuando es medida como una función de onda, dispersión óptica rotatoria) y el dicroísmo circular.

En caso del DC, el tipo de energía electromagnética que se usa son dos haces monocromaticos de luz circularmente polarizados de igual intensidad,

uno con su vector eléctrico rotado hacia la izquierda (L) y el otro con su vector eléctrico rotado a la derecha (R), los cuales al incidir en una molécula no quiral los dos haces se transmiten a igual velocidad (tiene el mismo índice de refracción para ambos haces) y su coeficiente de absorción es igual. Para moléculas quirales los dos índices de refracción (n) no son iguales ($n_L \neq n_R$) observándose el efecto de birrefringencia que resulta en rotación óptica, al mismo tiempo si los coeficientes de extinción molar (ϵ) no son iguales ($\epsilon_L \neq \epsilon_R$), se observa una absorción desigual de los dos haces, es decir se observa el fenómeno de dicroísmo circular.

La actividad óptica se observa sólo cuando ocurre una transición asimétrica, las proteínas usualmente muestran una rotación negativa en su estado nativo en la region del visible y el UV cercano. Después de la desnaturalización estas se vuelven más levoratorias que en su estado nativo debido a que contienen varios elementos estructurales o conformacionales ópticamente activos como el enlace peptídico, las hélices α , hebras β , entre otros.

El dicroísmo circular puede usarse para determinar la estructura de una proteína de una forma empírica, usando modelos de estructuras secundarias como polipéptidos de L-lisina que pueden existir en tres formas: hélices α , hojas β y plegamiento al azar (random coil) y de los cuales se ha determinado por difracción de rayos X su estructura. Además existen nuevos modelos que emplean bases de datos de proteínas con estructura tridimensional conocida (39).

2. Planteamiento del problema.

El estudio de la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa implica analizar los cambios locales de estructura terciaria así como la propagación de cambios estructurales cuaternarios. Estos cambios estructurales son la base de la regulación alostérica debido a la existencia de confórmeros estructuralmente diferentes y con propiedades ligantes o catalíticas distintas, los cuales están en equilibrio entre sí.

Los fenómenos alostéricos en esta enzima se han estudiado por métodos fisicoquímicos, de cinética enzimática, de biología estructural combinados con técnicas de ingeniería de proteínas, pero sin duda es necesario realizar estudios que correlacionen el proceso de plegamiento de la enzima con los cambios estructurales observados durante la transición alostérica; para poder abordar este tipo de estudios hace falta estudiar el patrón de plegamiento y desplegamiento, iniciando por determinar la existencia y estado de agregación de intermediarios presentes durante el proceso de desnaturalización de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* mediante el seguimiento de sus propiedades hidrodinámicas (cromatografía de exclusión molecular) (estructura cuaternaria), intensidad de fluorescencia (estructura terciaria), cinética enzimática (estructura cuaternaria) y el dicroísmo circular (estructura secundaria).

3. Objetivo.

Determinar la existencia y el estado de agregación de intermediarios presentes en el proceso de desnaturalización de la Glucosamina 6-P desaminasa de *Escherichia coli*.

4. Hipótesis.

Mediante el estudio de la desnaturalización de la glucosamina-6-fosfato desaminasa y utilizando técnicas como la cromatografía de exclusión molecular, la espectroscopia de fluorescencia, la espectroscopia de dicroísmo circular y actividad catalítica es posible establecer la existencia y el estado de agregación de los intermediarios presentes en el desplegamiento de la enzima.

5. Materiales y métodos.

5.1. Materiales.

El GuHCl se obtuvo de Boheringer Mannheim, el NaCl se obtuvo de J.T. Baker, el Tris se obtuvo de Sigma, el agua usada es de grado mili Q y desionizada. La mutante W224Y fue amablemente proporcionada por el Dr. Ismael Bustos Jaimes. La GlcN6P desaminasa Humana de cadena ligera fue amablemente proporcionada por la bióloga Laura Iliana Alvarez Añorve.

5.2. Metodos

5.2.1. Sobreexpresión y purificación.

Se inocularon tubos de 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) en presencia de ampicilina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubaron a 37°C en una agitadora orbital a 200 rpm durante 12 h. Posteriormente, se uso este cultivo para inocular matraces Erlen Meyer con 100 mL del mismo medio y se incubaron en las mismas condiciones durante 3 h. Este cultivo se uso para inocular matraces Erlen-Meyer de 2 L conteniendo 1 L del mismo medio y se incubó a 30°C durante 6 h a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 1 leyendo a 512 nm.

La proteína se purificó con el método de cromatografía de afinidad descrito previamente (3), utilizando una columna empacada con una matriz de afinidad de *N*-6-amino-*n*-hexanoil-*D*-glucosamina-6-fosfato agarosa, preparada por la unión de glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) con agarosa-ácido 6-amino-*n*-hexanoico ($2\mu\text{eq}$ de grupos aminohexanoato/mL de gel), que tiene unidas moléculas de GlcN6P en el grupo amino de manera que se asemejan al activador alostérico (*N*-acetil glucosamina-6-fosfato, GlcNac6P). La proteína específica, en este caso la

GlcN6P desaminasa, se une al ligando inmovilizado, mientras que las demás sustancias que no tienen afinidad por la matriz se eliminan de la columna.

La proteína se recuperó, en forma pura, variando las condiciones de elución de modo que se libere de la matriz cromatográfica.

La pureza de la enzima se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), equilibrando con amortiguador Tris-HCl 75 mM y 100 mM de acetato de potasio pH 7.5.

La concentración de la enzima se determinó por absorbancia en UV a 280nm usando su coeficiente de absorción molar ($\epsilon = 0.2020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.2.2. Experimentos de desnaturalización.

Para los experimentos de desnaturalización la GlcN6P desaminasa se incubó en Tris 100 mM pH 7.5, NaCl 50 mM y diferentes concentraciones de GuHCl, durante 48 horas a 25 °C, ya que la pérdida de actividad catalítica, los espectros de fluorescencia intrínseca y de dicroísmo circular indican que en estas condiciones se alcanza el equilibrio en el estado desnaturalizado, ya que no se observan cambios en dichas propiedades entre las 24 y las 48 horas.

Cinética enzimática.

El estudio cinético se realizó a 30 °C a una concentración de 2 nM de GlcN6P desaminasa. La determinación de la actividad catalítica se realizó en dirección de la formación de fructosa-6-fosfato. La concentración de la Fru6P se determinó mediante la reacción colorimétrica del resorcinol en medio ácido, leyendo el complejo colorido a 510 nm y calculando la concentración de fructosa formada mediante una curva patrón de Fru6P, de acuerdo a Calcagno *et al.* (3).

Los experimentos control mostraron que las mediciones de la actividad catalítica no son afectadas por la presencia de GuHCl residual después de la dilución.

5.2.3. Fluorescencia.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluórometro ISS PCI (ISS inc. Champaign, IL), a una temperatura de 25 °C usando celdas de cuarzo de 4 mm de paso de luz.

5.2.3.1. Obtención del tiempo de Equilibrio.

El espectro de fluorescencia se obtuvo para distintas concentraciones de GlcN6P desaminasa (0.2, 2 y 19 μM) y se siguió el cambio en el centro de masa espectral ($\text{CME} = \sum \lambda I_\lambda / \sum I_\lambda$, donde I_λ es la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda λ). Se incubaron muestras a concentraciones crecientes del agente desnaturizante (0 M hasta 6 M de GuHCl) con sus respectivos blancos, obteniendo los espectros de fluorescencia a las 6 horas y cada 24 horas hasta 72 horas, excitando a $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm y $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm (ancho de banda de 8 nm), hasta que no se observó cambio alguno en la forma del espectro ni corrimiento en la λ_{max} .

5.2.3.2. Desnaturalización al tiempo de equilibrio.

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en el intervalo de 300-400 nm y 310-410 nm (ancho de banda de 4 nm), para $\lambda_{\text{ex}}= 280$ nm y 295 nm respectivamente.

Los CME de las muestras al tiempo de equilibrio se usaron para calcular la fracción aparente de moléculas nativas (α) (ver subsección de tratamiento de datos) y construir las curvas de desnaturalización (CME vs. concentración de GuHCl).

Estos mismos experimentos se realizaron con la mutante W224Y GlcN6P desaminasa, a la cual se le sustituyó por mutagénesis sitio dirigida el triptofano 224 por una tirosina, conservando sólo el triptofano 15, con la finalidad de seguir la exposición gradual de dicho triptofano durante el desplegamiento del monómero (Fig. 5).

5.4. Cromatografía de exclusión molecular.

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se realizaron con una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) y un equipo de FPLC (Pharmacia. Uppsala, Sweden) acoplado a un detector de UV a una longitud de onda fija de 280 nm y un detector de fluorescencia Waters 474 usando una longitud de onda de 280 nm (ancho de banda 18 nm) en la excitación y 320 (350) nm en la emisión (ancho de banda 18 nm). La matriz de dicha columna es estable en presencia de agentes desnaturalizantes como el GuHCl dentro de un rango de pH entre 3 y 12, el rango óptimo de separación de proteínas globulares es de 10 000 a 600 000 (Da) para la Superdex 200 y su límite de exclusión es de 600 000 (Da).

5.4.1. Calibración de la columna Superdex 200.

La calibración de las columna se realizó tanto en condiciones nativas como desnaturizantes (equilibradas con una solución amortiguadora de Tris 100 mM NaCl 50 mM y con una solución de 6 M de GuHCl con Tris 100 mM NaCl 50 mM respectivamente).

La columna se calibró usando proteínas con radios de Stokes conocidos, tanto en condiciones nativas como en condiciones desnaturizantes: albúmina, ovoalbumina, anhidrasa carbónica, mioglobina, triosa fosfato isomerasa, ribonucleasa y citocromo C. Se cargaron 100 μ L de los estándares (0.2 mg/mL de proteína) previamente incubadas durante 24 horas a 25 °C en Tris 100 mM NaCl 50 mM pH 7.5 para condiciones nativas y GuHCl 6.0 M tris 100 mM NaCl 50mM pH 7.5 para las condiciones desnaturizantes de acuerdo a Uversky y Cháñez-Cárdenas et al. (20,39). La detección por fluorescencia es mas sensible a bajas concentraciones de proteína que por UV, además no hay variación entre ambas, por lo que sólo se usó la curva de calibración obtenida con este detector.

Los datos obtenidos muestran que la presencia del agente desnaturizante no modifica las propiedades de la matriz, por lo que se puede relacionar la dependencia de la velocidad de migración ($1000/V_e$) vs. el radio de Stokes (R_s); a partir de los volúmenes de elución de las proteínas con radios de Stokes conocidos se obtuvo la curva de calibración que se describe por la siguiente ecuación:

$$1000/V_e = R_s + mx$$

La curva de calibración que se obtuvo para 12 puntos experimentales. Los radios de Stokes determinados con la columna correlacionan muy bien con los

reportados en la literatura, por lo que puede usarse para determinar los radios de Stokes de las especies presentes en el proceso de desnaturalización de la desaminasa.

Las muestras experimentales se incubaron 48 horas (tiempo de equilibrio), se inyectaron en la columna previamente equilibrada con GuHCl a concentraciones crecientes desde 0.0 hasta 6.0 M, se eluyeron a un flujo de 0.4 mL/min. Los radios de Stokes de las muestras se calcularon a partir de los volúmenes de elución y de la curva de calibración construida.

5.5. Dicroísmo circular.

Para el seguimiento de la desnaturalización por DC se incubaron muestras (2 μ M de GlcN6P desaminasa) a concentraciones crecientes de GuHCl desde 0 M hasta 3 M en intervalos de 0.25 M, 4.0 M, 5.0 M y 6.0 M durante 48 horas a 25 °C.

Los espectros de DC se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715 usando celdas de 1 mm de paso de luz, termorreguladas a 25 °C. Se siguió la elipticidad en un intervalo de 290 a 207 nm.

5.6. Tratamiento de los datos.

Para comparar y usar los datos provenientes de distintas técnicas, es necesario normalizar los datos experimentales a un cambio fraccional o la fracción aparente de moléculas nativas (α) mediante la fórmula:

$$\alpha = [y(x) - y(x')] / [y(x=0) - y(x')]]$$

donde x' es la concentración de desnaturizante a la cual la enzima esta completamente desnaturizada y $x = 0$ es la proteína en ausencia de desnaturizante.

6. Resultados.

6.1. Fluorescencia intrínseca.

El cambio en la fluorescencia intrínseca de la GlcN6P desaminasa se siguió mediante los espectros de fluorescencia, excitando a una longitud de onda de 295 nm para obtener el espectro de emisión de los triptofanos de la enzima y a una longitud de onda de 280 nm para obtener el espectro de todos los aminoácidos aromáticos (esencialmente tirosinas y triptofanos).

El CME de la proteína nativa es 329.8 nm (280 nm) y 343.9 nm (295 nm) y cambia a 342.8 nm (280 nm) y 356.31 nm (295 nm) en condiciones desnaturizantes. Con los cambios en el CME se construyeron curvas de desnaturización a tres concentraciones de proteína: 0.2 μ M, 2 μ M y 19 μ M, para observar el corrimiento por el efecto de la concentración de la proteína en la desnaturización al equilibrio (Fig. 6).

Las curvas de desnaturización obtenidas no son monofásicas, se pueden apreciar dos transiciones en todas las concentraciones, la primera transición se observa en el intervalo de 0 a 1.25 M de GuHCl, la segunda transición es poco evidente y se presenta en el rango de 1.25 a 4.0 M GuHCl. A la concentración de 1.5 M de GuHCl se encuentra el punto de inflexión entre las dos transiciones (2 μ M de proteína), el comportamiento bifásico de las curvas indica la presencia de un intermediario distinto al hexámero.

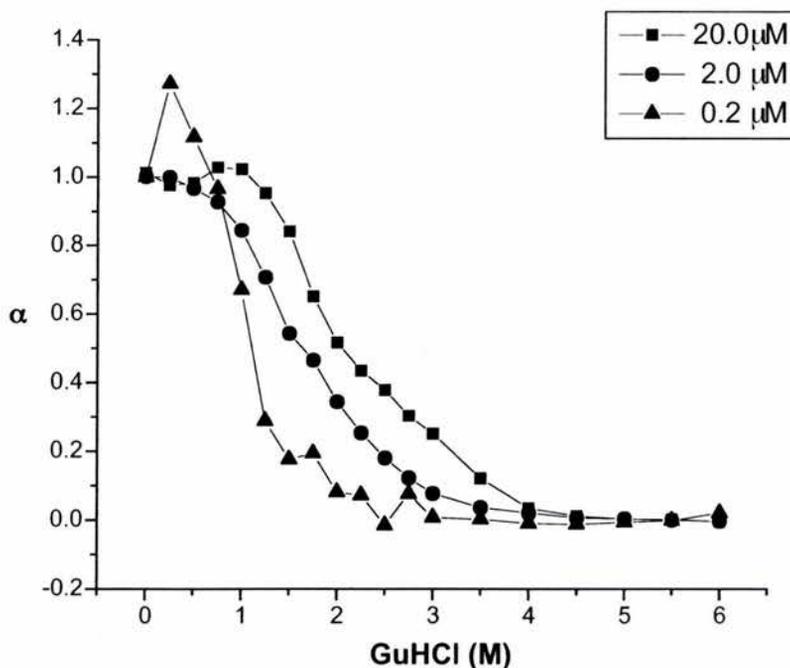


Fig.6. Efecto de la concentración de proteína en el patrón de desnaturalización seguida por el CME del espectro de excitando ($\lambda_{em} = 295$ nm). Curvas de desnaturalización a 0.2, 2 y 19 μ M de proteína.

Para corroborar la presencia de este intermediario, se compararon los espectros de fluorescencia (excitando a 295 nm) en el estado nativo (0 M de GuHCl) y en el estado desnaturalizado (6 M de GuHCl) (2 μ M de proteína) (Fig.7) y las curvas de desnaturalización (CME) de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y la mutante W224Y (Fig.8). Se puede observar que las λ_{max} de los espectros de ambas proteínas, en 6 M de GuHCl son similares, en tanto que los espectros de ambas en estado nativo son distintos, ya que el triptofano 15 al estar en una región con poca área expuesta al solvente se encuentra apagado y no contribuye a la señal total (Fig. 7); esto sugiere que este residuo es el que presenta mayores cambios en su señal de fluorescencia durante el desplegamiento de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y que el estado final

al que se llega al incubar ambas proteínas en 6.0 M de GuHCl es el mismo, aunque su eficiencia cuántica es menor ya que solo tiene un triptofano.

Al comparar las curvas de desnaturalización de dichas proteínas se observó la exposición del triptofano 15 en la curva de la W224Y a la concentración de 1.5 M de GuHCl (Fig.8 A) que es coincidente con el pequeño hombro observado en la curva de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*, lo que permite atribuir esta fase de la curva al desplegamiento de las especies disociadas en cadenas polipeptídicas completamente desplegadas (ver mas adelante), observable como un aumento en la señal de fluorescencia. Para asegurar que dicho cambio no es debido a un error en la medición las mismas muestras se excitaron a 280 nm y las curvas son idénticas entre si (Fig. 8 B).

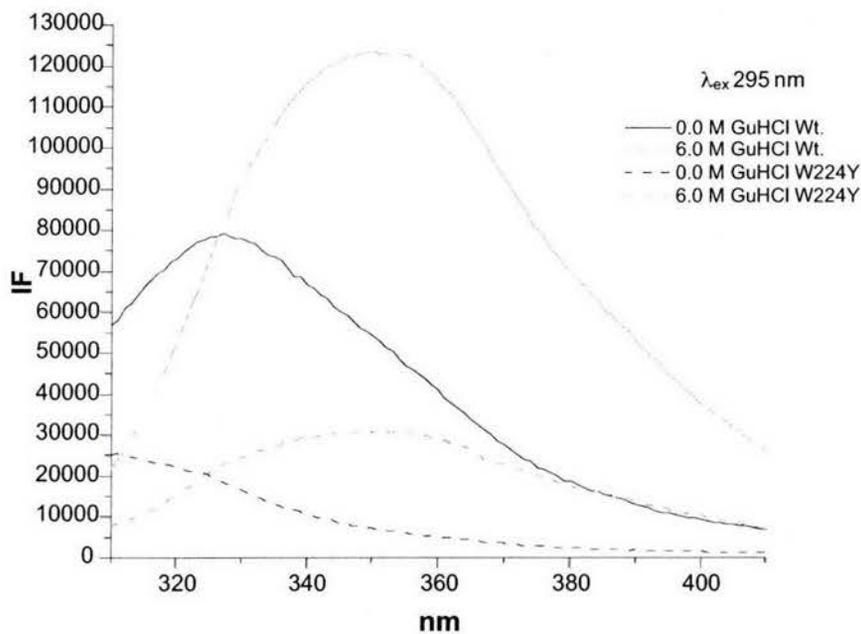


Fig. 7 Comparación de los espectros de fluorescencia de GlcN6P desaminasa de *E. coli* y W224Y en 0.0 M y 6.0 M de GuHCl. Se puede observar que la λ_{em} es igual para ambas proteínas (λ_{ex} 295 nm).

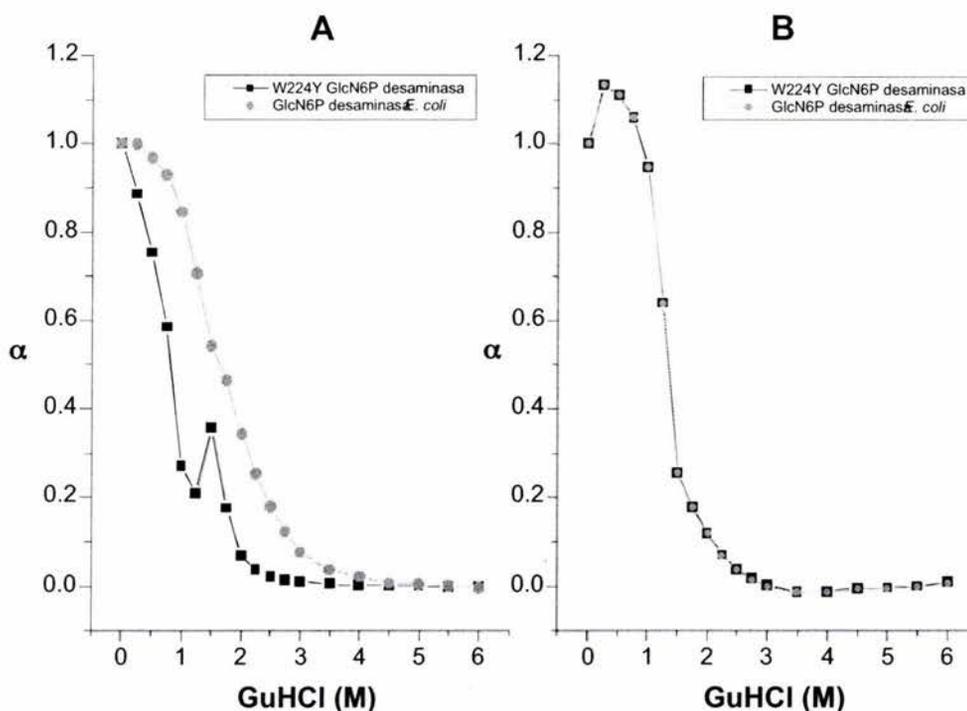


Fig. 8. Curvas de desnaturalización. Seguida por el cambio en el CME excitando a 295 nm (A) y a 280 nm (B), de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y la mutante W224Y a una concentración de 2 μ M de proteína.

6.2. Cromatografía de exclusión molecular.

6.2.1. Calibración de la columna.

La columna Superdex 200 se calibro de acuerdo a la sección de materiales y métodos.

La ecuación que describe a la curva de calibración es la siguiente:

$$1000/V_e = (41.5 \pm 0.9) + (0.87 \pm 0.02) \times \quad r = 0.99$$

La curva de calibración (Fig. 9) se uso en la determinación de las dimensiones de la enzima en sus estados nativo y desnaturalizado, así como del radio de Stokes de los posibles intermediarios observables durante el proceso de desnaturalización.

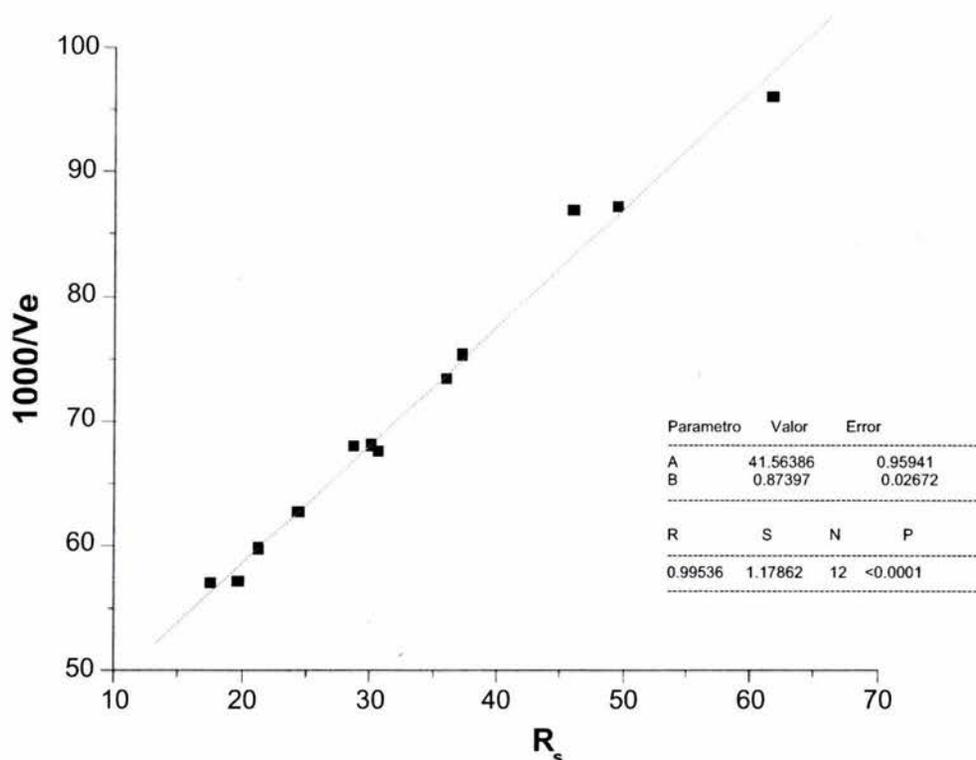


Fig. 9. Curva de calibración de la columna Superdex 200 para condiciones nativas y desnaturalizantes.

6.2.2. Propiedades hidrodinámicas de la GlcN6P desaminasa de *E. coli*.

Para relacionar la inactivación de la enzima con la pérdida de la estructura cuaternaria por la disociación del hexámero y para conocer el estado de agregación de los posibles intermediarios presentes a lo largo de la desnaturalización con GuHCl, los experimentos de cromatografía de exclusión molecular (CEM) se realizaron con la GlcN6P desaminasa de *E. coli* y con la GlcN6P humana de cadena ligera de la cual sólo se realizaron experimentos en condiciones nativas (0.0 M de GuHCl) y desnaturalizantes (6.0 M de GuHCl) a una concentración de 2 μ M de enzima. Los picos cromatográficos obtenidos de los experimentos con la GlcN6P desaminasa humana de cadena ligera se usaron como referencia en la determinación del estado

de agregación de los intermediarios observados en los experimentos con la GlcN6P desaminasa de *E. coli* (datos no mostrados).

En la figura 10 se pueden observar los perfiles de elución más representativos para la GlcN6P desaminasa. En el estado nativo sólo existe un pico de elución correspondiente a la enzima hexamérica, a la concentración de 1.0 M de GuHCl se observa la aparición de un nuevo pico, el cual tiene un volumen de elución menor a el pico de la proteína hexamérica .

En el intervalo de 1.0 a 2.0 M se observó la aparición de varios picos a volúmenes de elución menores que el de la enzima hexamérica, y muy cercanos al límite de exclusión de la columna cromatográfica debidos a la agregación inespecífica de los intermediarios formando especies de alto peso molecular; también se observó la desaparición del pico del hexámero e incremento del segundo pico. A la concentración de 1.5 M de GuHCl se detectaron cinco especies en equilibrio, dos de ellas se pueden clasificar como agregados inespecíficos, una especie con un volumen de elución muy cercano al del hexámero y dos especies con volúmenes de elución mayores que el de la especie hexamérica.

A concentraciones mayores de 2.0 M y hasta 6.0 M de GuHCl se observan los picos de los agregados y un pico mayoritario, el cual al aumentar la concentración de GuHCl cambia a volúmenes de elución cada vez más bajo, indicando un aumento en el volumen hidrodinámico (Rs).

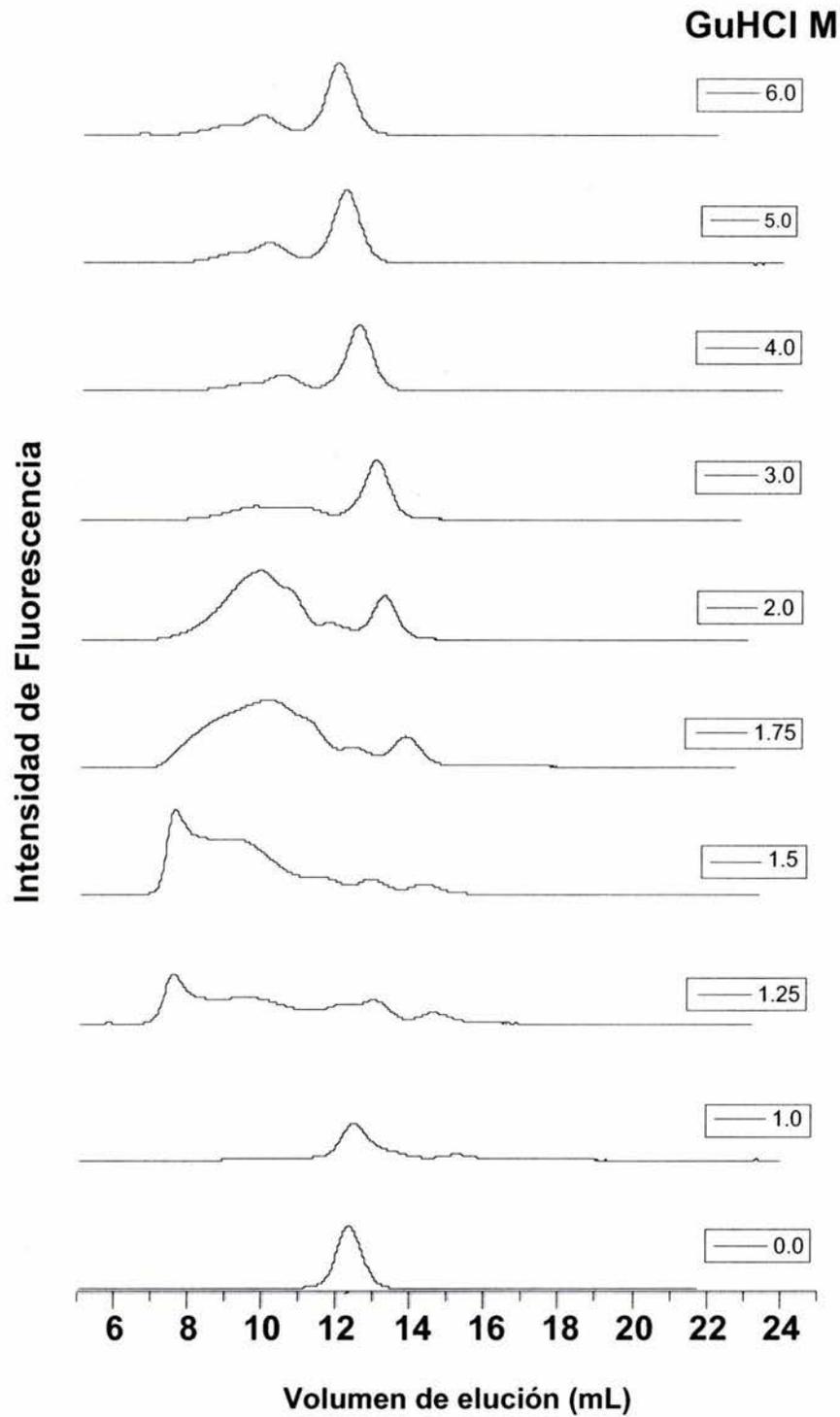


Fig. 10. Cromatogramas representativos de la GlcN6P desaminasa de *E. Coli*. Las muestras (2 mM) se incubaron en diferentes concentraciones de GuHCl durante 48 horas. Posteriormente se inyectaron 100 μ L en la columna Superdex 200 equilibrada a la misma concentración del agente desnaturizante.

6.2.3. Radio de Stokes

El radio de Stokes se calculó a partir del volumen de elución y la ecuación obtenida de la curva de calibración. En la figura 11 se observan los valores obtenidos, graficados en función del aumento en la concentración de GuHCl.

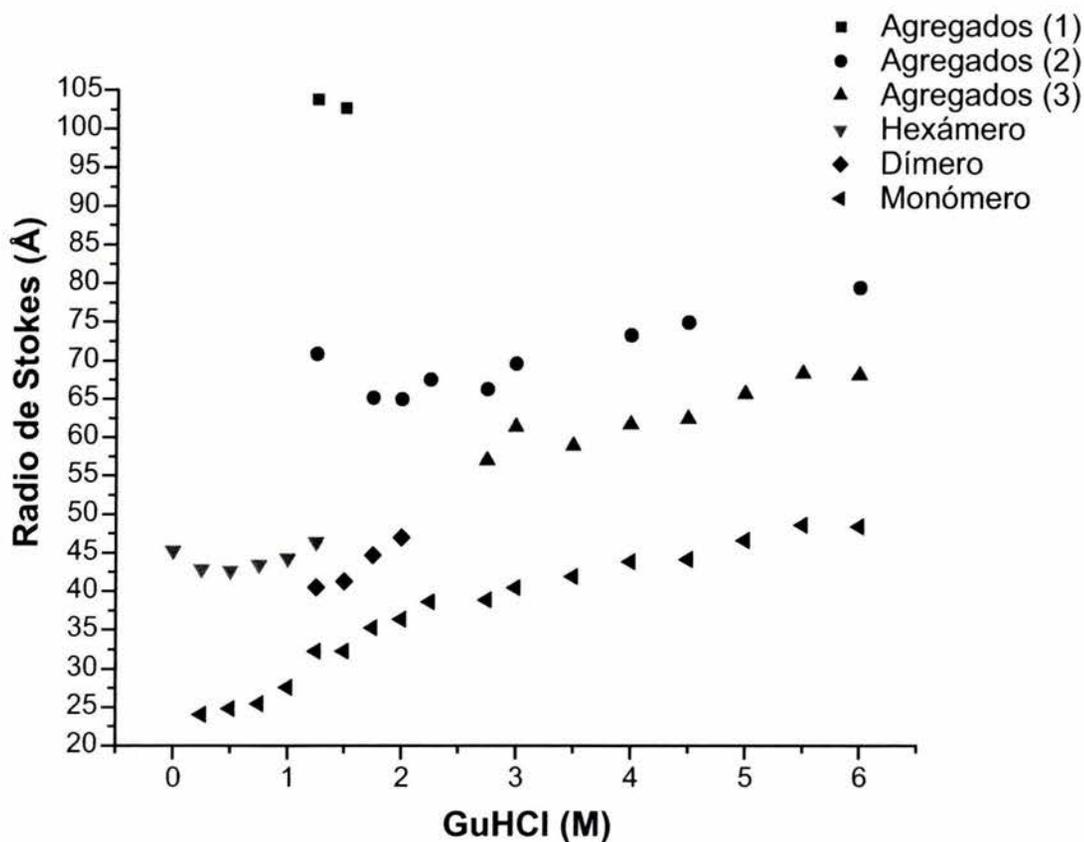


Fig. 11. Cambio en el radio de Stokes de los intermediarios presentes en el equilibrio a distintas concentraciones de GuHCl. Las muestras de GlcN6P desaminasa de *E. Coli* y Humana de cadena ligera se incubaron al tiempo de equilibrio, a una concentración de 2 μ M de proteína.

A partir de la concentración de 0.25 M de GuHCl se detectó la presencia de dos especies en equilibrio, una con un radio de Stokes de 24.02 Å la cual, de

acuerdo con la calibración corresponde a una especie monomérica plegada, y otra con un radio (42.9 Å) muy cercano al del hexámero nativo (45.3 Å).

A la concentración de 1.25 M de GuHCl se encontraron cinco especies en equilibrio (Fig. 11 y 12), dos se clasificaron como agregados inespecíficos ya que sus R_s fueron de 103.75 y 70.9 Å, los cuales están muy cercanos al límite de exclusión de nuestra columna. Las demás especies se clasificaron como hexámero (46.4 Å), dímero (40.5 Å) y monómero (32.25 Å) de acuerdo con la calibración.

A partir de 2.0 M y hasta 6.0 M de GuHCl sólo se observaron dos especies de agregados (69.6 Å y 61.31 Å), y una especie que presentó un aumento gradual en su R_s , de 36.33 Å a 48.36 Å, relacionado a una transición conformacional más rápida que el tiempo característico de la corrida cromatográfica. A la concentración de 6.0 M de GuHCl se observó un pico mayoritario con un R_s de 48.36 Å que de acuerdo con la calibración esta especie corresponde a un monómero desplegado (**U**).

En la figura 12 se puede ver que el proceso de desnaturalización es dependiente de la concentración y que el aumento en la concentración de proteína desplaza el equilibrio hacia la formación de agregados a 2.0 M de GuHCl lo cual explica que este proceso no sea reversible.

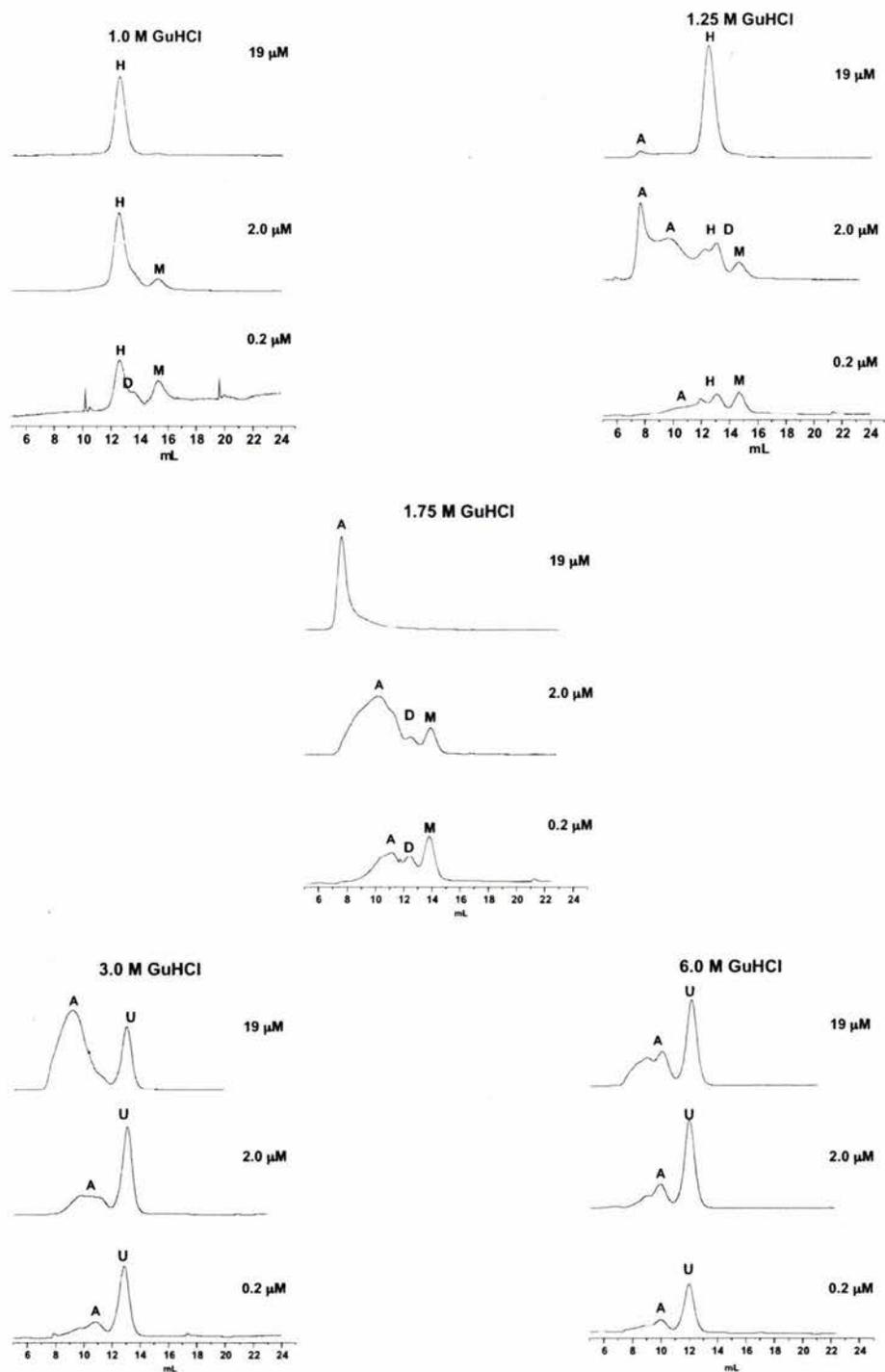


Fig. 12. Efecto de la concentración de proteína en el equilibrio de las especies hexámero (H), monómero (M), monómero desplegado (U) y agregados (A). Perfiles de elución representativos de las muestras a 19, 2.0, 0.2 μM incubadas al tiempo de equilibrio a diferentes concentraciones de GuHCl.

6.3. Dicroísmo Circular

El proceso de desnaturalización de la GlcN6P desaminasa inducido con GuHCl se siguió por DC en la región del UV lejano. Mediante el cambio en el valor de la elipticidad a 222 nm, se determinó la fracción de moléculas en estado nativo (Fig.13).

Se puede observar que el patrón de desnaturalización no es monofásico, presenta un punto de inflexión a una concentración de 1.5 M de GuHCl y dos transiciones coincidentes con lo observado por otras técnicas (ver figura 15).

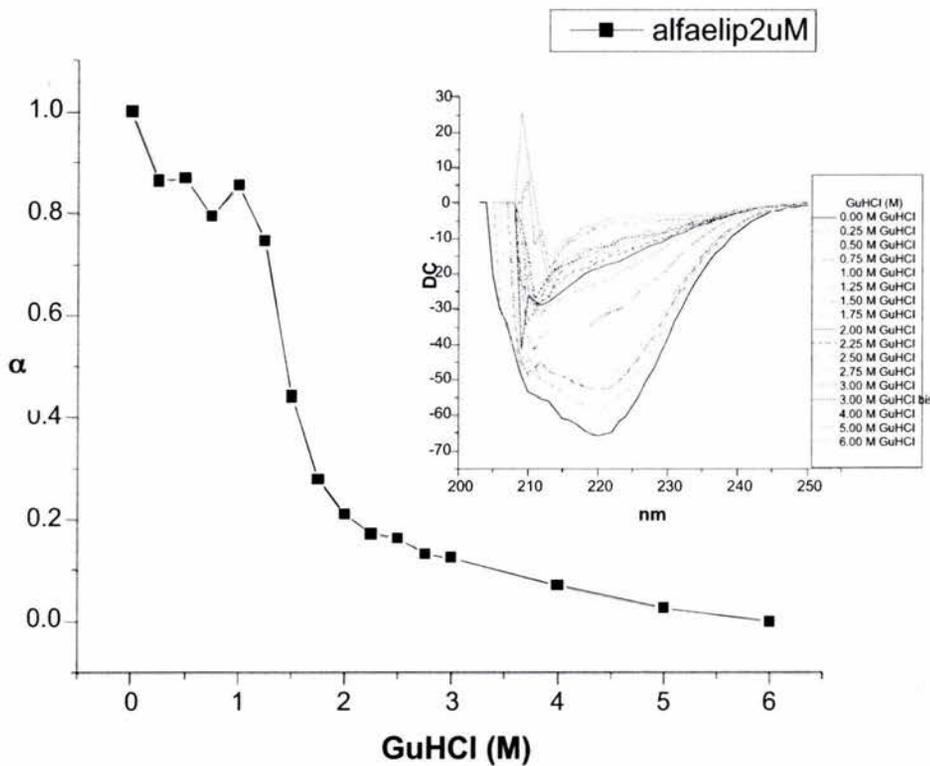


Fig. 13. Patrón de desnaturalización y espectros de dicroísmo circular (recuadro) a 2 μ M de GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Cambio en la fracción de moléculas en estado nativo seguido a 222 nm.

6.4. Actividad catalítica

El seguimiento de la pérdida de actividad catalítica debida al proceso de desnaturalización, se realizó por la comparación de la V_0 de las muestras previamente incubadas a concentraciones crecientes de GuHCl desde 0.0 M hasta 2.0 M, al tiempo en equilibrio a 25 °C. Los experimentos cinéticos se realizaron a concentraciones saturantes del activador alostérico (GlcNAc6P), variando la concentración de sustrato (GlcN6P) y a una concentración final de proteína de 2 nM .

Los resultados se ajustaron al modelo de Hill, con un numero de Hill igual a 1, por lo que el comportamiento cinético es de tipo Michaelis.

Con los resultados se calculó y graficó la fracción nativa aparente (α) vs. concentración de GuHCl (Fig. 14).

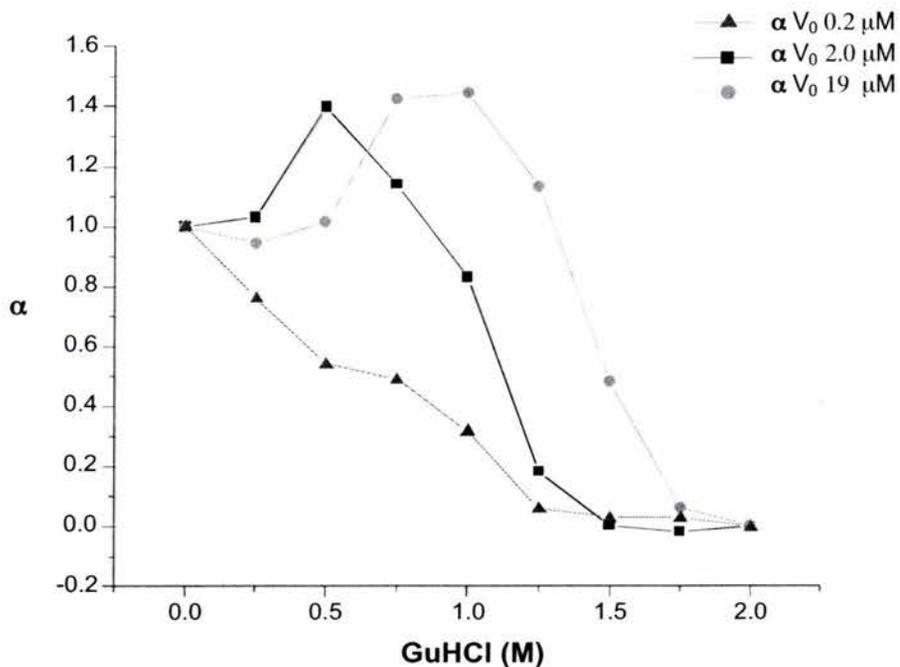


Fig. 14. Curvas de desnaturalización seguidas por actividad catalítica (fracción nativa aparente). Las muestras se incubaron a concentraciones crecientes de GuHCl desde 0.0 M hasta 2.0 M en el tiempo de equilibrio

Las curvas obtenidas muestran un aumento en la actividad catalítica de la enzima expuesta al GuHCl (0.25 a 0.75 M) con respecto a la enzima en condiciones nativas, esta activación aparente se observó a las concentraciones de GlcN6P desaminasa de 2.0 μ M y 19 μ M, además de un corrimiento de las curvas dependiente de la concentración.

El incremento de la actividad catalítica de las enzimas se puede atribuir a un aumento en la flexibilidad de la misma a bajas concentraciones de GuHCl dependiente de la concentración de proteína, ya que a concentraciones más altas de proteína se requiere mayor cantidad de desnaturizante para llegar al mismo estado, y partiendo del hecho de que sólo el estado hexamérico es activo, este aumento en la actividad se puede correlacionar a un intermediario hexamérico distinto al nativo, aunque no es posible determinar el grado de contribución a la actividad observada de esta población.

6.5. Comparación y análisis de todas las técnicas.

La información obtenida por el análisis individual de los resultados de las distintas técnicas usadas en los estudios de desnaturización de proteínas esta limitada por las características inherentes de cada técnica. Así, la señal obtenida con los métodos espectroscópicos más comúnmente usados en dichos estudios (ver anexo 2) es el promedio ponderado de la fracción mol de cada una de las señales de los componentes presentes en el equilibrio, ya que estas técnicas no son capaces de resolver por separado las señales de cada estado. Un análisis simultáneo de todas las técnicas, presenta un panorama más amplio respecto al equilibrio entre las especies.

Para eliminar las diferencias entre las señales medidas (magnitud) y facilitar su análisis conjunto, los resultados de todos los experimentos de desnaturalización obtenidos con las distintas técnicas se normalizaron a la fracción nativa aparente (α) (ver tratamiento de datos).

Este análisis se realizó con todas las concentraciones de proteína, pero sólo se eligió la concentración de 2.0 μ M como base del análisis, ya que además de contar con los experimentos de dicroísmo circular, en esta concentración se detectaron todos los intermediarios observados en las demás concentraciones de proteína.

Como se puede ver en la figura 15, las curvas de desnaturalización de las distintas técnicas no fueron coincidentes entre sí, esto nos indica que cada técnica sigue distintos tipos de transiciones. Un aumento en la actividad catalítica se observó a bajas concentraciones de desnaturalizante (0.25 a 0.75 M de GuHCl), como ya se discutió, este aumento se atribuye a un aumento en la flexibilidad de la proteína y comparando este comportamiento con los cromatogramas y las gráficas de radios de Stokes (ver figuras 11 y 12) a estas concentraciones de GuHCl, la actividad observada sólo se debe a una especie hexamérica que es más compacta que la nativa y que especies distintas a este estado de agregación no tienen actividad.

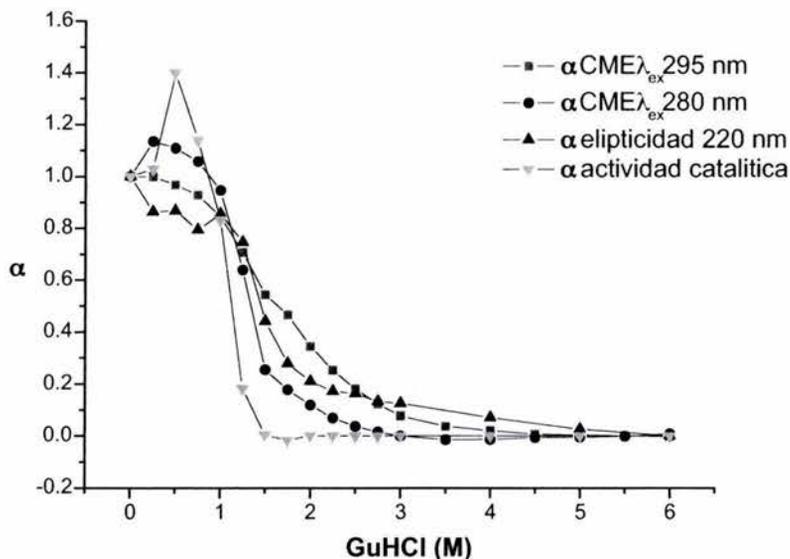


Fig.15. Curvas de desnaturalización a 2.0 μM de GlcN6P desaminasa seguida por IF excitando a 280 nm (■) y 295 nm (●); DC (▲) y actividad catalítica (▼).

A pesar de que las curvas no son coincidentes, presentan una caída en las señales observadas a partir de una concentración de 1.5 M de GuHCl, la misma concentración en la que la actividad catalítica prácticamente es nula. Al relacionar esto con los cromatogramas, se observó que la proporción de la especie hexamérica disminuyó considerablemente y que la contribución a las señales detectadas a partir de esta concentración de desnaturalizante es mínima, por otro lado, se encontraron cinco especies en equilibrio, dos fueron establecidas como agregados de distintas propiedades hidrodinámicas, y las otras tres se clasificaron como hexámero compactado, dímero y monómero respectivamente.

La primera transición observada en las curvas de desnaturalización (desde 0.0 M hasta 1.5 M de GuHCl) se atribuye a un proceso de disociación del hexámero ($H \rightleftharpoons D \rightleftharpoons M$, donde **H** es hexámero, **D** es dímero y **M** es monomero) ya que los cromatogramas muestran la existencia de dos intermediarios aparte de los agregados cuyos radios de Stokes coinciden con los esperados para especies

diméricas y monoméricas, además la formación de estos intermediarios esta acompañada de una reducción mayor al 50% de la señal de estructura secundaria (DC) con respecto a la señal de la especie nativa, un cambio de 8 nm en el CME (IF, λ_{ex} 295 nm) y pérdida de la actividad catalítica. La segunda fase de las curvas (1.75 M hasta 6.0 M de GuHCl) esta relacionada al desplegamiento de los intermediarios generados durante el proceso de disociación, en este intervalo de concentraciones se detectó mediante los datos cromatográficos, la desaparición de la especie hexamérica y a partir de 3.0 M de GuHCl se observa que la especie mayoritaria es de tipo monomérico (ver figura 13) y relacionando esto, con los datos de la pérdida de la estructura secundaria (DC) en estas concentraciones de desnaturizante. El tipo de transición propuesta para esta transición es $\mathbf{M} \rightleftharpoons \mathbf{U}$ que involucra la perdida de la estructura secundaria y terciaria.

Por otro lado, la existencia de agregados y la dependencia de estos, con la concentración de proteína explican la irreversibilidad del proceso de desnaturalización.

7. Discusión.

Como ya se menciona antes, el estudio del plegamiento de proteínas implica la caracterización cinética y/o termodinámica de los estados nativo, desnaturalizado y de los posibles intermediarios presentes durante el proceso de desnaturalización al aumentar la concentración de un agente químico desnaturalizante o al modificar alguna propiedad del solvente, como la presión, temperatura o pH. Para que esto sea posible, es necesario que todos los intermediarios se encuentren en equilibrio, y que dicho proceso sea reversible, para que el análisis termodinámico sea válido.

Para este estudio se determinaron las condiciones de equilibrio, a tres distintas concentraciones de proteína, obteniendo un tiempo de equilibrio de 48 horas al incubarse en GuHCl.

Por otro lado, la mayoría de los estudios del plegamiento de proteínas se han realizado con proteínas monoméricas, ya que generalmente las proteínas oligoméricas presentan procesos de plegamiento más complejos en los que se favorecen algunos mecanismos de agregación inespecífica provocando la irreversibilidad parcial o total del proceso (44). En los estudios de reversibilidad de la desnaturalización de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* con GuHCl como agente desnaturalizante, se encontró que el proceso de desnaturalización no es reversible. Esta irreversibilidad se debe muchas veces a la agregación de la proteína, siendo este fenómeno dependiente de la concentración de proteína (44,45,46).

En otros estudios con enzimas hexaméricas (44,45), se ha encontrado que bajo ciertas condiciones la desnaturalización puede ser reversible, así usando

bajas concentraciones de proteína y adicionando ligandos o cofactores el porcentaje de recuperación de la actividad catalítica es más elevado que el obtenido solamente por dilución del agente desnaturizante.

En estos trabajos, se ha encontrado que la cinética de replegamiento es de segundo orden y proponen la existencia de un paso limitante durante el replegamiento de la proteína, este paso lo relacionan a la asociación de monómeros plegados en un intermediario dimerico, el cual probablemente a altas concentraciones de proteína forme agregados inespecíficos de alto peso molecular (44). Aún cuando no han logrado detectar este intermediario durante la desnaturalización de dichas enzimas y propongan su existencia solamente a partir del comportamiento de la cinética de replegamiento (44), concuerda con el intermediario dimérico encontrado por CEM en este trabajo, por otro lado, en un estudio de desnaturalización de la GlcN6P desaminasa de *E. coli* por temperatura (46), se encontraron seis transiciones secuenciales que sugieren que la enzima se disocia a dímeros, relacionando las dos ultimas transiciones a la disociación del dímero y al desplegamiento de los monómeros. En este estudio también se encontró irreversibilidad en el proceso de desnaturalización.

Asi estos resultados sugieren que la formación del intermediario dimérico es fundamental en el plegamiento de la enzima nativa.

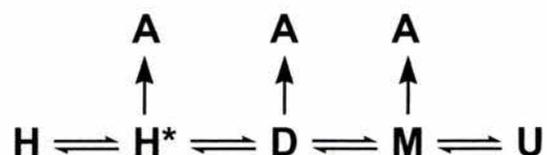
Por otro lado, el aumento de la actividad catalítica a bajas concentraciones de GuHCl, muy probablemente se deba un aumento en la flexibilidad del sitio activo de la molécula (28).

8. Conclusiones.

En este trabajo se determinó el patrón de desplegamiento de la GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* con GuHCl mediante técnicas de fluorescencia intrínseca, dicroísmo circular, actividad catalítica y cromatografía de exclusión molecular. A partir de la no coincidencia de las curvas de desnaturalización obtenidas tanto para la enzima silvestre como la mutante W224Y, se estableció la existencia de varios intermediarios, que con los experimentos cromatográficos se pudo determinar su número, su estado de asociación y con los datos de fluorescencia de dicha mutante se determinó la exposición gradual de distintas regiones durante su desnaturalización.

El modelo propuesto a partir de estos resultados contempla la existencia de dos intermediarios estructurales además de tres estados de agregación inespecífica y la existencia de una especie hexamérica (**H***) de radio de Stokes menor a el hexámero nativo (**H**). Mediante la comparación de los datos cromatográficos de dichos intermediarios con la GlcN6P desaminasa humana de cadena ligera que es monomérica y de la calibración de la columna cromatografica, se estableció su estado de asociación: un intermediario dimérico **D** y un intermediario monomérico **M**.

El proceso de desnaturalización de la GlcN6P desaminasa de *Escherichia coli* se describe de acuerdo al modelo:



En el cual la formación de agregados se favorece a concentraciones altas de proteína.

En resumen con las técnicas espectroscópicas sólo se pudieron detectar dos transiciones y la única técnica que fue capaz de detectar a los intermediarios fue la cromatografía de exclusión molecular, lo que demuestra la necesidad de usar varias técnicas en esta clase de estudios.

Por otro lado, es evidente que la GlcN6P desaminasa no es un buen modelo para estudiar las rutas de plegamiento de las proteínas, debido a su gran tamaño y complejidad en su asociación, además la alta afinidad por la formación de agregados impide la reversibilidad del proceso de desnaturalización, por lo que no es posible obtener parámetros termodinámicos de este proceso, a partir de los cuales calcular que intermediario contribuye más en el plegamiento de la proteína.

9. Perspectivas.

A pesar de que el proceso de desnaturalización de esta enzima es irreversible debido a la agregación inespecífica de algunos intermediarios estructurados, en otros estudios similares, realizados con enzimas hexaméricas como la glutamato deshidrogenasa y la nucleótido difosfato cinasa (44,45) se ha encontrado que la adición de ligandos o coenzimas facilitan el replegamiento de intermediarios estructurados (especies monoméricas) en especies capaces de reactivarse (formar hexámeros nativos), obteniendo un mayor porcentaje de recobro de la actividad catalítica que el obtenido solo por dilución del agente desnaturalizante. Esto y el hecho de que la agregación inespecífica es un

proceso dependiente de la concentración de proteína dejan abierta la posibilidad de que, bajo ciertas condiciones la desnaturalización sea reversible.

Los resultados obtenidos en este trabajo dejan abiertas varias vías de estudio del plegamiento de esta enzima. Algunos de los estudios propuestos para complementar este trabajo son:

- Estudio de desnaturalización de la mutante W15Y para seguir el cambio conformacional de la región de contacto entre los monómeros y observar la proceso de disociación de las subunidades
- Estudios de reversibilidad en distintas condiciones para poder calcular los parámetros termodinámicos de este proceso.
- Estudios de desnaturalización usando otros agentes desnaturalizantes.
- Estudio del aumento de la actividad catalítica a bajas concentraciones de GuHCl en relación al aumento en la flexibilidad de la molécula mediante técnicas de transferencia de energía por resonancia en fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés).

10. Anexos.

10.1. Regulación alostérica.

Una de las características más relevantes de los sistemas biológicos es el alto grado de control ejercido sobre todos sus procesos. A través de una gran variedad de mecanismos de regulación, es como los organismos pueden responder a cambios en su medio ambiente, mantener la comunicación intra e intercelular y ejecutar un programa ordenado de crecimiento y desarrollo.

La regulación de la interacción proteína-ligando, a través de un mecanismo alostérico (del griego *allos*, otro y *stereos*, espacio) es un tópico que aún genera una gran discusión teórica dentro de la exploración de la relación estructura-función. Esas interacciones cooperativas ocurren cuando el enlace de un ligando en un sitio específico, es influenciado por el enlace de otro ligando, conocido como efector o modulador, en un sitio (alostérico) diferente de la proteína. Si el ligando es idéntico, se conoce como efecto homotrópico, y si el ligando es diferente, el efecto se conoce como efecto heterotrópico. Estos efectos pueden ser de tipo positivo o negativo dependiendo del incremento o disminución en la afinidad de la enzima por el ligando. La transición alostérica implica la comunicación entre regiones distantes en la molécula de la enzima, lo que requiere la transmisión de señales conformacionales dentro de cada subunidad y entre las subunidades adyacentes.

Para poder racionalizar este tipo de efectos se han desarrollado dos modelos que explican que los sitios activos de las proteínas oligoméricas puedan exhibir diferentes afinidades.

10.1.1. Modelo MWC o modelo simétrico.

El modelo que mejor describe el enlace de ligandos a las proteínas es el modelo simétrico del alosterismo, formulado en 1965 por Jaques Monod, Jeffriess Wiman, Jean-pierre Changeux (23, 41).

Este modelo postula las siguientes reglas:

1. Una proteína alostérica es un oligomero de subunidades simétricamente relacionados (funcionalmente idénticos).
2. Cada subunidad en la proteína es capaz de existir en dos estados conformacionales, que se llaman T (tenso y menos afín al sustrato) y R (relajado y más afín al sustrato), aún antes de que se adicione un compuesto capaz de unirse.
3. El ligando puede enlazarse a cualquiera de los confómeros. El cambio conformacional sólo altera la afinidad de la subunidad por el ligando.
4. Las constantes de asociación de una molécula ligable para las forma T y R son diferentes, porque son estructuralmente distintas.
5. Cuando una proteína alostérica va de un estado al otro, se conserva la simetría molecular.

El modelo MWC, también propone la existencia de tres clases de comportamientos que pueden esperarse en los sistemas alostéricos:

- a) Sistemas K: la unión de un efector a la enzima cambia la constante de afinidad por el sustrato. Ya que tanto el activador como el sustrato tienen diferentes afinidades por las formas T o R, la presencia del efector modificará la afinidad aparente de la proteína por el sustrato, pero sin afectar la V_{\max} de la reacción.

b) Sistemas V: el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados. De esta manera, la unión del efector no modifica la afinidad de unión aparente del sustrato, pero produce un cambio en la V_{max} . Si el efector tiene afinidad máxima por la forma activa (R) o por la inactiva (T), funcionará como un activador (sistemas V positivos) o como inhibidor (sistemas V negativos). El sustrato no funciona como activador en ninguna concentración.

c) Sistemas mixto K-V: Todos los sistemas que no son completamente V o K.

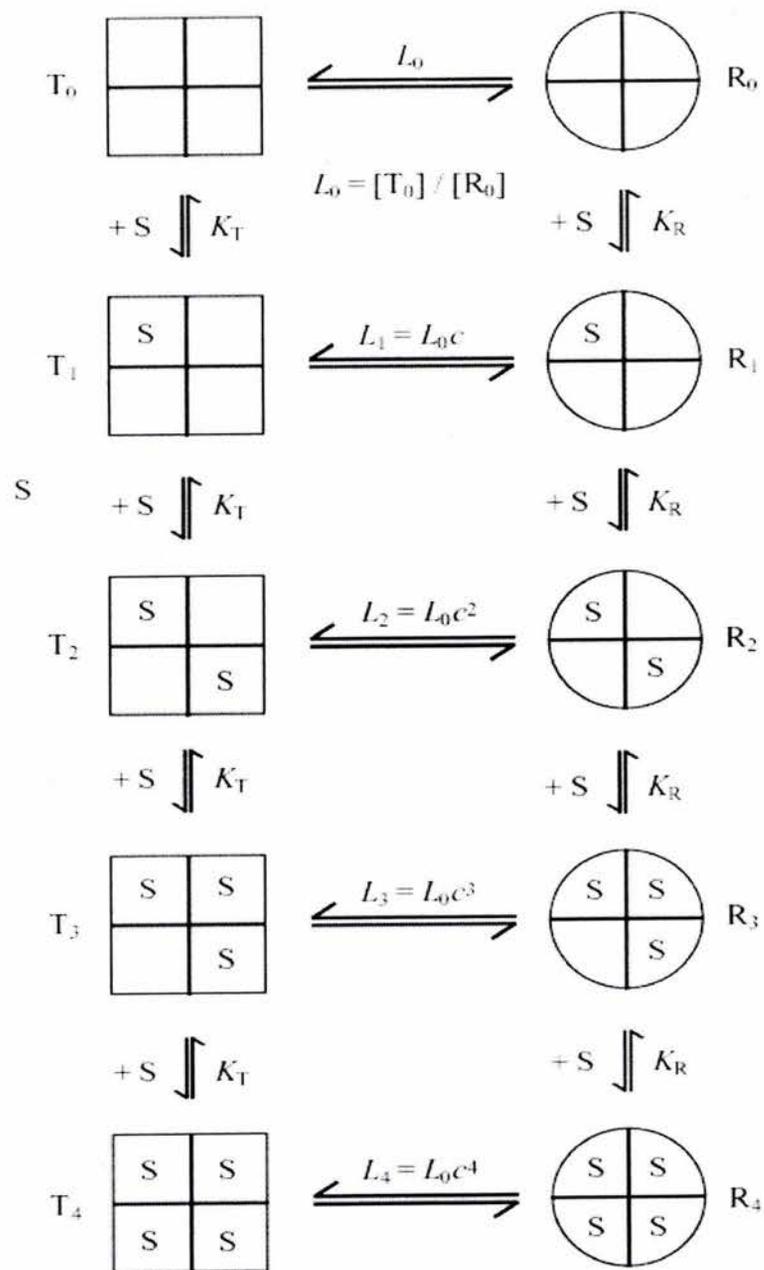


Fig.16. Representación esquemática de los equilibrios que involucrados en el Modelo MWC.

Utilizando este modelo (Fig.16), se pueden hacer varias afirmaciones:

- ❖ En un sistema alostérico enzimático K, un efector debe mostrar interacciones cooperativas homotrópicas,
- ❖ En aquellos sistemas en que el sustrato tiene la misma afinidad por los dos estados, el sustrato no muestra interacciones cooperativas homotrópicas.
- ❖ El cambio conformacional es debido a la diferencial de energías de unión entre los dos estados.
- ❖ El modelo MWC hace predicciones simples basándose en sólo dos parámetros físicos: la constante de equilibrio o constante alostérica, L , que representa la relación de los estados T a R en ausencia de cualquier molécula ligable ($L=[T_0] / [R_0]$) y el coeficiente de unión no exclusivo, c , que es la relación de las constantes de disociación de los estados R y T ($c= K_T/K_R$).
- ❖ No puede explicar la cooperatividad negativa en el esquema.

La ecuación derivada para el modelo de MWC es la siguiente:

$$v_o = \frac{k_{cat} n [E_t] \{L c \alpha (1 + c \alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}\}}{L (1 + c \alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Donde $\alpha = K_R / [S]$, $L = [T_0] / [R_0]$ y $c = K_R / K_T$

El modelo de MWC define también las propiedades de los sistemas alostéricos:

- 1) Las proteínas alostéricas son oligoméricas.
- 2) Las interacciones alostéricas están relacionadas con alteraciones en la estructura cuaternaria de las proteínas (como alteraciones en la unión entre las subunidades).
- 3) Mientras que los efectos heterotrópicos, pueden ser tanto positivos como negativos (activación o inhibición), los efectos homotrópicos parecen siempre positivos.
- 4) Muy pocos sistemas alostéricos presentan solamente efectos heterotrópicos. En otras palabras, los efectos cooperativos homotrópicos se observan invariablemente para al menos una de las moléculas ligables del sistema.
- 5) Las condiciones, los tratamientos o las mutaciones que alteran las interacciones heterotrópicas, también pueden alterar las homotrópicas.

10.1.2. Interacciones cooperativas.

La naturaleza simétrica del modelo permite, a partir de un análisis de las graficas obtenidas, observar algunas características relevantes:

1. El grado de aumento en la curvatura exhibida en la sección inicial de las curvas sigmoides es indicativo del grado de cooperatividad.
2. El enlace del primer ligando promueve el enlace de subsecuentes ligandos forzando la transición conformacional de las subunidades de un estado

con baja afinidad a uno con alta afinidad con el sustrato, evidenciando que la cooperatividad y la afinidad son dos parámetros distintos, de hecho para $c = 0$, las curvas indican una alta afinidad (con un valor bajo para L) por el sustrato y exhiben una baja cooperatividad.

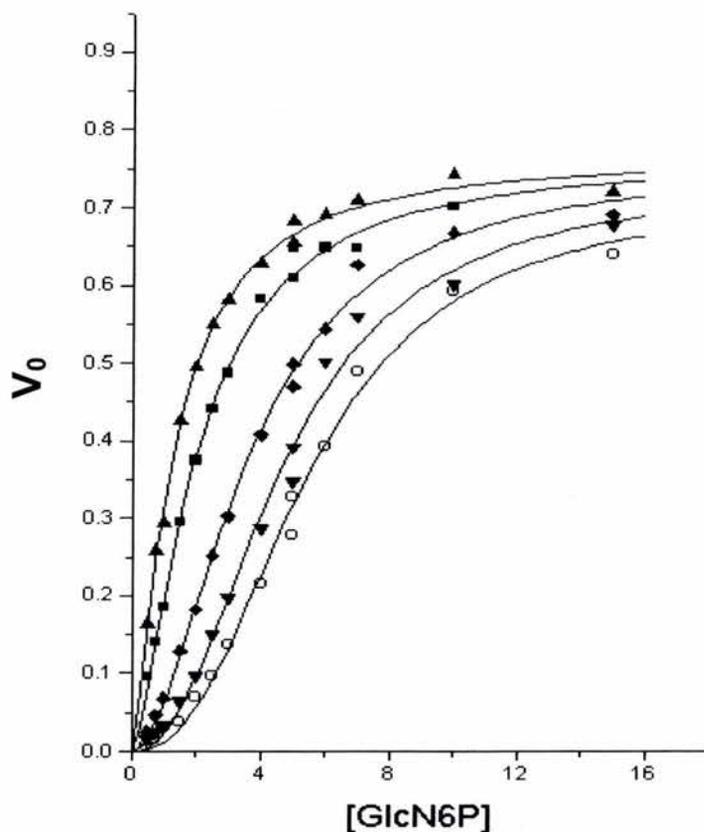


Fig.17. Curvas actividad catalítica en función de la saturación mediante el modelo MCW. El aumento en la curvatura de las graficas, al aumentar la concentración de sustrato indica una pérdida en el grado de cooperatividad y viceversa. La adición de un activador alostérico tiene el mismo efecto (pérdida de cooperatividad).

10.1.3. El modelo secuencial simple de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF).

Otro modelo para explicar la cooperatividad es el modelo KNF. Una forma de entender el modelo MWC consiste en relajar la cooperatividad y la simetría absolutas, permitiendo que coexistan ambas conformaciones alostéricas (R y T) en el mismo oligómero (41). La posibilidad de que existan subunidades

adyacentes con una conformación diferente se puede modelar añadiendo a la ecuación un término que modifique la energía de interacción. Incluso si el valor de la energía de interacción es casi infinito, se obliga a que la transición sea concentrada y se obtiene el modelo MWC. Este modelo más general puede tomar formas interesantes, así, si la energía de interacción es cero, no habría cooperatividad. Igual que en modelo MWC, la cooperatividad sigue siendo debida a la interfase entre los monómeros. Este modelo secuencial también se conoce como modelo KNF, secuencial simple o de "*induced fit*" y su característica principal es que permite la existencia de oligómeros mixtos, o híbridos (T y R), los cuales tienen más de una conformación por oligómero. En este modelo:

- 1) Cada subunidad, dentro del oligómero funcional, puede unirse a distintas moléculas y experimentar cambios conformacionales independientes de las subunidades vecinas.
- 2) Existen interacciones entre las subunidades que modifican la forma en que se unen los ligandos adicionales.
- 3) Debido al gran número de parámetros en este modelo, las predicciones del comportamiento enzimático no son claras como en el modelo MWC.
- 4) Puede explicar los fenómenos de cooperatividad negativa.

El tratamiento matemático de este modelo es muy complicado y algunas de sus variables no tienen sentido físico, por lo cual no se utiliza ampliamente.

10.2. Clasificación de las técnicas usadas en el seguimiento de transiciones estructurales.

Para el seguimiento de los cambios conformacionales durante un estudio de desnaturalización de proteínas es común el uso de distintas técnicas de manera que la información de todas se complementen entre sí. Junto con los métodos calorimétricos, las técnicas espectroscópicas son las más comúnmente usadas en esta clase de estudios. Las señales obtenidas pueden clasificarse en dos distintos grupos dependiendo del tipo de señal detectada. Uno tipo de medición es aquella en la cual la señal medida, (α) , es el promedio de la fracción molar ponderada de las señales de todos los componentes de un sistema. El otro tipo de medición usada es aquella que puede dar una señal discreta, resuelta para el estado nativo y el desnaturalizado. Para ambas la señal debe estar directamente relacionada con la concentración de las especies en equilibrio. Los métodos pueden entonces clasificarse en aquellos que sensan cambios en radio, forma, o estructura secundaria y aquellos que detectan cambios en el microambiente local de los residuos de aminoácidos individuales.

Dentro de las señales promediadas se encuentran las mediciones de fluorescencia, dicroísmo circular, espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier y la capacidad calorífica. Este tipo de señales son promedios porque los métodos no son capaces de resolver por separado las señales del estado nativo y el desnaturalizado (Fig. 18). La señal promedio (en una condición determinada) esta relacionada a la fracción molar de las especies por la ecuación:

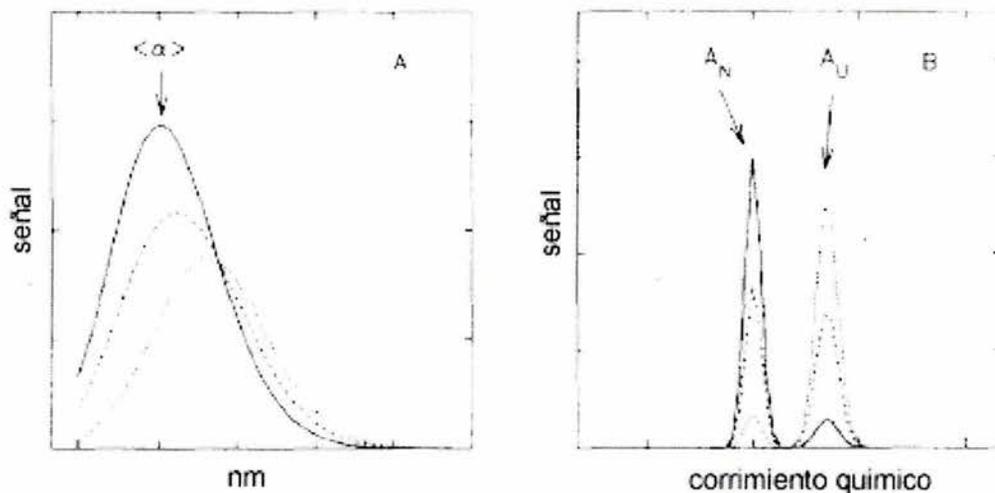


Fig.18. (A) Simulación de espectros promedio de las fracciones mol durante un estudio de desnaturalización. Notese que el valor de la señal (por ejemplo intensidad de fluorescencia) cuando $X_N = 0.9, X_U = 0.1$ (—); $X_N = 0.5, X_U = 0.5$, (---) y $X_N = 0.1, X_U = 0.9$ (...) no puede resolverse para una especie en particular. (B) simulación de señales resueltas (por ejemplo NMR) para un sistema de dos estados. El area bajo la curva de cada pico permite seguir la desnaturalización.

$$\alpha = \sum X \alpha_i$$

donde X_i es la fracción mol de la especie y α_i es la señal del estado i puro.

Por otro lado, existen diferencias de magnitud entre las señales en estado nativo y desnaturalizado al comparar diferentes técnicas, por lo que es importante tener en cuenta las líneas basales en las regiones pre y post-transicionales y los estados pueden no ser diferentes.

Es posible obtener señales resueltas con técnicas como la resonancia magnética nuclear, y en ocasiones con otros métodos como la espectroscopía de fluorescencia de tiempo resuelto. Con la resonancia magnética es posible obtener un seguimiento directo de una población en estado i durante una transición al asignar una señal específica a un residuo aromático en particular.

Otras técnicas como la electroforesis en condiciones nativas y la cromatografía de exclusión molecular tienen la capacidad de separar físicamente las especies nativas y desnaturalizadas, si su interconversión es más lenta que su migración a través de la columna o el gel. Si la interconversión es más rápida, se obtendrá una fracción mol promedio.

11. Referencias.

1. Comb, D.G., Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV: Glucosamine 6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* **232**: 807-882.
2. Midelfort, C., Rose, I.A. (1977). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* Glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry.* **16**: 1590-1596.
3. Calcagno, M. L., Campos, P. J., Mulliert, G, Suastegui, J. (1984). Purification, molecular and Kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **787**: 165-173.
4. Oliva, G., Fontes, M. R. M, Garratt, R. C, Calcagno, M. L., Horjales, E. (1995). Structure and catalytic mechanism of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure.* **3**: 1323-1332.
5. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Calcagno M. (1992). Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and study of their functional role by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* **31**: 1153-1158.
6. Altamirano, M. M., Hernández-Arana, A., Tello-Solís, Calcagno, M. (1994). Spectrochemical evidences for the presence of a tyrosyl residue in the allosteric site of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **220**: 409-413.
7. Altamirano, M. M., Plumbridge, J. A., Horjales, E., Calcagno, M. L. (1995). Asymmetric allosteric activation of *Escherichia coli* Glucosamine 6-phosphate deaminase produced by replacements of Tyr 121. *Biochemistry* **34**: 6074-6082.
8. Montero-Morán Gabriela M., Horjales, E, Calcagno M. L., Altamirano M. M. (1998). Tyr254 hydroxyl group acts as a two-way switch mechanism in the coupling of heterotropic and homotropic effects in *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* **37**: 7844-7849.
9. Lara-González, S., Altamirano, M. M., Dixon, H. B. F. , Mendoza-Hernández, G., Calcagno, M.L. (2000). On the Role of the N-terminal Group in the Allosteric Function of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **301**: 219-228.
10. Bustos-Jaimes I., Sosa-Peinado, A., Rudiño-Piñera E, Horjales, E., Calcagno, M.L. (2002). On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase. *J. Mol. Biol.* **319**: 183-189.
11. Jaenicke, R. (1999). Stability and folding in in the cell. En: Protein folding. (Creighton, T. E. ed.) W. H. Freeman and Co. New York. Pag. 445-539.

12. Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J.Chem. Phys.* **65**: 44-45.
13. Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and molecular proteins*. 2^a ed. W. H. Freeman and Co. New York. Pág. 455-539.
14. Baldwin, R. L (1999). Protein folding from 1961 to 1982. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 814-817.
15. Matthews, C. R. (1991). The mechanism of protein folding. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1**: 28-35.
16. Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**: 117-237.
17. Fersht, A. L., Dagget, V. (2002). Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell.* **108**: 573-582
18. Gottesman, M. E., Hendrickson, W. A. (2000). Protein folding and unfolding by *Escherichia coli* chaperones and chaperonines. *Cell Regulation.* **3**: 197-202.
19. Cháñez-Cardenas María Elena. (2002). Caracterización del patrón de desplegamiento de la Triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma brucei* con urea y cloruro de guanidinio. Tesis para obtener el grado de Doctora en Investigación Biomédica Basica. UNAM. México, DF.
20. Efkink, M. R., Ionescu, R. (1997). Thermodynamics of protein unfolding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model. *Biophys. Chem.* **64**: 175-197.
21. Makhatadze, G. I., Privalov, P. I., (1992). Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **226**: 491-505.
22. Hamaguchi, K. (1992). *The protein molecule: Conformation, stability and folding*. Japan scientificand societies press. Spinger Verlag.
23. Tandford, C. (1970). Protein denaturation (part C). *Adv. Protein Chem.* **24**: 1-95.
24. Staniforth, R. A., Burston, S. G. Smith, J. C. Jackson, G. S. Badme, I. G. Atkinson, T. Holbrook, J. J. & Clarke, A. R. (1993). The Energetics and cooperativity of protein folding: a simple experimental analysis based upon the solvation of internal Residuest. *Biochemistry.* **32**: 3842-3850.
25. Monod, J., Wyman, J. Changeux, J. P. (1965). On the nature of the allosteric transitions: A plausible model. *J.Mol.Biol.* **12**: 88-118.
26. Plumbridge, J. A, Cochet, O., Souza, J. M., Altamirano, M. M., Calcagno, M. L., Badet, B. (1993). Coordinated regulation of amino sugar synthesising and degrading enzymes in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **175**: 4951-4956.

27. Horjales, E., Altamirano, M. M., Calcagno M. L., Garratt, R. C, Olivia, G. (1999). The allosteric transition of glucosamine-6-Phosphate deaminase: The structure of the state at 2.3 Å resolution. *Structure*. **7**: 527-537.
28. Bustos-Jaimes, I. (2001). Estudio de la flexibilidad en el motivo asa/βB'/helice 5/asa/βC' (158-187) en la regulación alostérica de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Bioquímicas). UNAM. México DF. Pag 48-52.
29. Leloir, L. F. y Cardini, C. E. (1956). Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta* 33-42.
30. Natarajan, K., Datta, A. (1993). Molecular Cloning and Analysis of the *NAGI* cDNA Coding for Glucosamine-6-phosphate Deaminase from *Candida albicans*. *J. Biol.Chem.* **268**: 9206-9214.
31. Lara-Lemus, R., Libreros-Minotta, C.A., Altamirano, M.M., Calcagno, M. (1992). Purification and characterization of Glucosamine-6-Phosphate Deaminase from dog kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 213-220.
32. Lara-Lemus, R., Calcagno, M.L. (1998). Glucosamine-6-Phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system V-type. *Biochim. Biophys. Acta*. **1388**: 1-9.
33. Parrintong, J., Swann, K., Shevchenko, V. I., Sesay, A. K., Lai, F. A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. [Letter]. *Nature*. **379**: 364-368.
34. Wolny, Y. M., Fissore, R. A., Wu, H., Reis, M. M., Colombero, L. T., Ergun, B., Rosenwaks, Z. & Palermo, G. D. (1999). Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca²⁺ release in mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **52**: 277-287.
35. Lara-Lemus, R. (1999) Estudió cinético y caracterización molecular de la Glucosamina-6-fosfato desaminasa de la corteza renal de bovino. Tesis de doctorado, Facultad de Química. UNAM
36. Jaenicke, R; Rudolph, R. (1989) Protein folding. En Protein Structure a practical approach. Creighton, T.E (Ed) IRL Press, Oxford University pag 191-223.
37. Schmid, F. X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformations and conformational changes. En protein Structure a practical approach. Creighton, T.E. (Ed) IRL press. Oxford University.

38. Pain, R. H. (1996) Determinin of the fluorecence spectrum of a protein. En Current protocols in protein science Vol. 1 Ed. John Wiley and Sons, inc. USA. Pag. 7.7.1-7.7.19.
39. Campbell, I. D; Dwek, R. A. (1984) Biological Spectroscopy. The Benjamin/Cummings Publishing Company. California. Pag. 91-113.
40. Gel filtration. Theory and practice. Pharmacia Biotech, 6^a ed. Sweden, Pag. 1-23, 27-30, 44-60, 87-98.
41. Uversky, V. N. (1993) Use of fast protein size exclusion liquid cromatography to study the unfolding of proteins whith denature through the molten globule. *Biochemistry*. **32**: 13288-13298.
42. Corbett R. J. T., Roche, R. S. (1984). Use of high-speed size-exclusion chromatography for the study of protein folding and stability. *Biochemistry*. **23**: 1888-1894.
43. Voet, D., Voet, J.G. (1990) Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc. New York. Pag. 234-240.
44. Aghajanian, S., Engel, P. (1997). Re-activation of *Clostridium symbiosum* glutamate dehydrogenase from subunits denatured by urea. *Biochem. J.* **326**: 649-655.
45. Lascu, I., Deville-Bonne, D., Glaser, P., Veron, M. (1993). Equilibrium dissociation and unfolding of nucleoside diphosphate kinase from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **268** (27): 20268-20275.
46. Hernández-Arana, A., Rojo-Domínguez, A., Altamirano, M., Calcagno, M. L. (1993). Differential scanning calorimetry of the irreversible denaturation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. **32**: 3644-3648.