



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La interacción del factor de transcripción NagC de Escherichia coli con sus ligandos: un enfoque fisicoquímico.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Dana Mariel Díaz Jiménez

TUTOR PRINCIPAL: Mario L Calcagno Montáns
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosario Muñoz Clares

[Facultad de Química](#)

Dr. Lenin Domínguez Ramírez

[Universidad de las Americas Puebla](#)

Ciudad de México. abril, 2017



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.

Índice

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Regulación alostérica.....	8
1.2 Transición conformacional.....	8
1.3 Modelo concertado de Monod, Wyman & Changeux (MWC).....	10
1.4 Ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas.....	14
1.3 Funciones ligadas.....	14
1.4 Genes del metabolismo de aminoazúcares en <i>E. coli</i>	15
1.5 El represor NagC.....	17
1.6 El papel del zinc en las funciones biológicas.....	21
1.7 Espectroscopía de fluorescencia.....	22
2. Planteamiento.....	23
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivos.....	25
5. Materiales y métodos.....	26
5.1 Cepas.....	26
5.2 Purificación por cromatografía de afinidad por Niquel.....	26
5.3 Concentración de proteína.....	27
5.4 Cromatografía de exclusión molecular analítica.....	27
5.5 Ensayos de fluorescencia.....	28
5.6 Entrecruzamiento.....	28
5.7 Retardos.....	28
5.8 Cuantificación de las bandas del retardo.....	29
5.9 Ensayos de cinética rápida de flujo detenido.....	29
6. Resultados.....	30
6.1 Construcción y purificación de His6-TEV-NagC.....	30
6.2 Análisis del estado oligomérico de NagC.....	31
6.3 Interacción NagC-CAP.....	36
6.4 Efecto de la GlcNAc6P en la interacción de NagC con el DNA en presencia de CAP.....	38
6.5 Efecto del Zn ²⁺ en la unión de GlcNAc6P a NagC.....	40

6.6 Determinación de la constante de disociación de la GlcNAc6P por cinética rápida de flujo detenido.	42
6.7 Efecto de la unión de carbohidratos a NagC.....	45
7. Discusión.....	52
7.1 Estado oligomérico de NagC.....	52
7.2 Estabilización de NagC.	52
7.3 Determinación de la constante de disociación por la GlcNAc6P.	54
7.4 Unión de azúcares fosforiladas a NagC.....	54
7.5 Regulación de los operones divergentes <i>nagE-BAC</i>	55
8. Conclusiones	58
9. Referencias.....	59

Agradecimientos

A mi tutor Mario L. Calcagno y al candidato a doctor Sergio Zonszein Strauss, por asesorarme y guiarme durante la realización e interpretación del presente trabajo.

A la Dra. Jacqueline Plumbridge por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y apoyarme en la realización de algunos experimentos presentados en este trabajo.

A la M. en C. Laura I. Álvarez Añorve, quien amablemente me ayudó en la preparación de las cepas utilizadas en este trabajo y en el trabajo realizado durante la estancia de investigación en el IBPC.

A los miembros del jurado:

Dra. Adela Rodriguez Romero

Dra. Lilian Gonzalez Segura

Dra. Leticia H. Ramírez Silva

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Dr. José de Jesus García Trejo

quienes amablemente hicieron una revisión crítica de este trabajo.

A mi comité tutorial formado por los Doctores Rosario A. Muñoz Clares y Julio Lenin Domínguez, por guiarme en el curso de este trabajo.

A la coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo financiero para realizar una estancia en el IBPC, París en el laboratorio de la Dra. Jacqueline Plumbridge.

Al PAPIIT (IN213312 y IN216615) y al CONACyT (CB-2008-01 y C0004-2009-01) quienes nos brindaron apoyo económico para llevar a cabo las investigaciones y experimentos.

A mi alma mater la UNAM.

Resumen.

La proteína NagC de *Escherichia coli* es un represor transcripcional cuya función principal es la regulación de los operones divergentes *nagE-BAC* para el transporte y catabolismo de aminoazúcares.

La represión de los operones ocurre mediante la formación de una asa en el DNA en donde NagC en su forma tetramérica, junto con el regulador global CAP, forman un complejo nucleoproteico que impide la transcripción. La inducción ocurre cuando la GlcNAc6P, se une a NagC causando que se disocie del DNA permitiendo el inicio de la transcripción. La GlcNAc6P no solamente es la molécula inductora de los operones, también funciona como activador alostérico de la proteína NagB y es el sustrato de la proteína NagA, ambas codificadas en el mismo operón.

A pesar de conocer las condiciones en las que ocurre la inducción de los operones y los componentes necesarios para que ésta ocurra, aun no se sabe el mecanismo mediante el cual se disocia la asa de represión. Aunado a ello, el hecho de que se produzca más NagC al inducir los operones y que esta deba unir la GlcNAc6P en un intervalo de concentración suficiente para responder a la inducción, nos hace plantear la interrogante sobre la afinidad que tiene NagC por la GlcNAc6P y de qué manera el mecanismo de inducción permite que se mantenga desreprimido el operón y activada NagB simultáneamente.

En la presente tesis, hicimos un estudio *in vitro* con la proteína NagC purificada y encontramos que presenta un equilibrio oligomérico complejo entre las formas dimérica y tetramérica. Por otra parte, descubrimos que la molécula inductora causa un efecto desestabilizador en NagC que provoca la formación de agregados insolubles. Este efecto desaparece cuando la proteína se encuentra saturada de DNA o se evita parcialmente por la presencia de Zn^{2+} .

Encontramos que la disociación de NagC del DNA ocurre con una constante de $16.16 \mu M$ mientras que en presencia de CAP aumenta a $248 \mu M$. Además, logramos medir por cinética rápida una constante de disociación aparente de $53 \mu M$ de NagC por la GlcNAc6P en ausencia de DNA y CAP.

La disminución de la afinidad por la GlcNAc6P en ausencia de DNA, así como la especificidad en el fenómeno de agregación de NagC, revelado por la unión de otros azúcares fosforilados, nos llevaron a plantear que la agregación es parte del mecanismo de inducción de los operones y permite mantenerlos desreprimidos al mismo tiempo que la GlcNAc6P puede unirse a las demás proteínas del operón.

1. Introducción

De los aproximadamente 4000 genes presentes en un genoma bacteriano típico solamente se expresa una fracción en un momento dado. Algunos productos génicos están presentes en cantidades muy grandes: los factores de elongación requeridos para la síntesis proteica, por ejemplo, se encuentran entre las proteínas más abundantes de las bacterias. Otros productos génicos se encuentran en cantidades menores; por ejemplo, las enzimas necesarias para reparar el DNA. La necesidad de los distintos productos génicos pueden cambiar a lo largo del tiempo y también las condiciones ambientales. Los requerimientos de enzimas en ciertas vías metabólicas pueden aumentar o disminuir en función de los cambios en la disponibilidad de nutrientes. La regulación de la expresión génica es esencial para optimizar la utilización de la energía en la célula debido al elevado costo energético que implica la síntesis de proteínas.

El primer punto de control de la concentración celular de una proteína está determinada por la síntesis del transcrito primario, donde la maquinaria de transcripción produce el RNA mensajero (mRNA). Los factores de transcripción permiten la regulación de la expresión de múltiples genes, cuyos productos asumen actividades interdependientes. Una de las claves de la regulación de la transcripción es la interacción entre proteínas y DNA [1].

Una estrategia utilizada por las bacterias para coordinar la expresión génica, consiste en agrupar distintos genes involucrados en la misma vía metabólica bajo el control de la misma proteína reguladora o factor de transcripción. La mayoría de los mRNAs procariontes son policistrónicos, es decir que existen múltiples genes en un solo transcrito, los cuales están bajo el control de un mismo promotor que favorece el inicio de la transcripción. El promotor contiene las regiones reguladoras en donde existen secuencias y conformaciones específicas con alta afinidad por los factores de transcripción. Este grupo de genes, más el promotor se denominan operón [1]. El modelo del operón propuesto por Monod y Jacob en 1961 es el primer ejemplo que describe la regulación de la transcripción de genes inducibles en procariontes, como respuesta a los cambios en su medio ambiente [2]. Ellos proponen y demuestran la existencia de la proteína LacI, a la que nombran represor y que forma parte de un sistema de regulación dependiente de la presencia de lactosa en el medio como fuente principal de carbono.

Este sistema de regulación dependiente de lactosa de *Escherichia coli* consta de dos componentes, los genes estructurales que codifican las enzimas β -galactosidasa (LacZ), la permeasa (LacY) y transacetilasa (LacA), necesarias para el transporte y degradación de

lactosa. El segundo componente es el regulatorio que incluye la proteína LacI, el promotor y la región operadora (figura 1).

Todos los componentes excluyendo a LacI forman parte de la región del DNA que Monod y Jacob definieron como operón.



Figura. 1 Modelo del operón *lac* de *Escherichia coli*. Tomado y modificado de Lehninger [1]. El gen *I* codifica al represor Lac. Los genes *lac Z*, *Y* y *A* codifican la β -galactosidasa, la galactósido permeasa y tiogalactósido transacetilasa, respectivamente. P es el promotor para los genes *lac* y PI es el promotor para el gen *I*. O1 es el operador principal para el operón *lac*; O2 y O3 son los sitios secundarios del operador con menos afinidad por el represor *lac*.

LacI es una proteína que tiene diferentes sitios de unión a ligantes, el sitio de unión al DNA y el sitio de unión a lactosa. En condiciones donde no hay lactosa, LacI permanece unida a su región operadora, impidiendo así la transcripción de los genes por la RNA polimerasa. La presencia de lactosa favorece la disociación de LacI del DNA como efector de la transición conformacional [3]. A este “switch” genético asociado a los cambios conformacionales de los dos sitios de unión de LacI Jacob y Monod lo explicaron con un mecanismo alostérico.

La palabra alostérico (del griego *allos*: distinto u otro y *stereós*: sólido, forma o arreglo de átomos en el espacio) fue acuñada por Jaques Monod en el año de 1963 [4]. El término fue utilizado para describir el fenómeno de regulación de las proteínas en donde el ligante regulador no presentaba una inhibición competitiva clásica.

1.1 Regulación alostérica.

La regulación alostérica es una forma de control en la actividad de distintas vías metabólicas. Como resultado permite definir uno de los principios de la vida, que permite a los organismos vivos adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes. El reconocimiento de este importante papel biológico llevó a la descripción histórica de la alostería como 'el segundo secreto de la vida', sólo después del código genético.

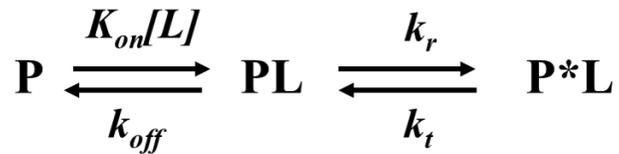
La regulación alostérica se propaga en el evento de unión de un ligante en un sitio distinto al sitio activo. La unión del ligante alostérico a su sitio modifica a distancia la actividad del sitio activo [4].

Este proceso ocurre generalmente a través de un cambio conformacional, que en la mayoría de las ocasiones implica una modificación en el arreglo cuaternario entre las subunidades. El cambio conformacional inducido por el efector o ligante alostérico se conoce como transición alostérica. La alostería en un sentido amplio puede entenderse como el cambio conformacional inducido por la unión de un ligante, que altera las funciones de la proteína en un sitio ligante distinto y se encuentra presente en una gran diversidad de proteínas, incluyendo proteínas monoméricas [5].

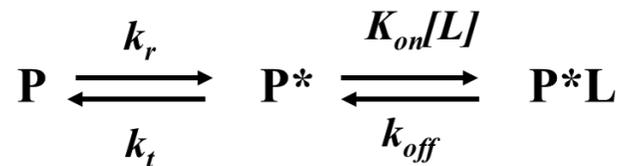
1.2 Transición conformacional

Uno de los grandes temas de investigación en la ciencia de proteínas ha sido el estudio de qué manera se encuentra relacionada la unión de un ligante con el cambio conformacional en su receptor. El campo en donde más se ha avanzado experimental y teóricamente en discernir un mecanismo del otro es en estudios de cinética rápida, estudios de NMR y en estudios de una sola molécula [6]. Se han propuesto dos mecanismos mínimos de tres especies y dos pasos, para analizar en qué orden ocurre cada evento. En el caso del ajuste inducido, la unión del ligante precede al paso del cambio conformacional en la proteína; en el segundo de selección conformacional, las proteínas sufren el cambio conformacional antes de unir al ligante. Esquemáticamente los mecanismos se ven de la siguiente manera:

Ajuste inducido



Selección conformacional



En donde P es la proteína en conformación de baja afinidad, P* es la proteína en la conformación de alta afinidad, L es el ligante, k_{on} es la constante de velocidad de unión del ligante, k_{off} es la constante de velocidad de disociación del complejo proteína ligante, k_r es la constante de velocidad del cambio conformacional de la especie de baja afinidad a la especie de alta afinidad y k_t es la constante de velocidad del cambio conformacional de la especie de baja afinidad a la especie de alta afinidad por el ligante.

Cuando el sistema se simplifica, suponiendo que la unión y disociación del ligante son considerablemente más rápidas que las velocidades de cambio conformacional, el sistema se considera que se encuentra en equilibrio rápido y el paso limitante es el cambio conformacional. La constante de velocidad observada (k_{obs}) es dependiente de la concentración del ligante, y de acuerdo a la simplificación del equilibrio rápido, esta aumenta de manera hiperbólica en el caso del mecanismo de ajuste inducido, y disminuye igualmente de manera hiperbólica en el mecanismo de selección conformacional. Por mucho tiempo este fue el diagnóstico aceptado para distinguir entre ambos mecanismos. No obstante, en muchos sistemas la suposición del pseudoprimer orden en equilibrio rápido no es del todo válida cuando existe un cambio conformacional.

Para resolver este problema, D. Vogt y Di Cera propusieron un método general para simular el comportamiento de la K_{obs} con respecto a la concentración del ligante sin suponer condiciones de equilibrio rápido [7]. El método se basa en el teorema de cinética química en el que, al hacer una transformación lineal del sistema de ecuaciones diferenciales, el valor negativo de los eigenvalores distintos de cero obtenidos de la matriz de constantes de velocidad, describen el comportamiento de la K_{obs} con respecto a la concentración del ligante.

A partir de estos cálculos, D. Vogt y Di Cera encontraron que el mecanismo de selección conformacional también puede comportarse de manera hiperbólica ascendente, dependiendo de los valores relativos de las constantes de velocidad.

La distinción del mecanismo de selección conformacional es clara en experimentos de cinética rápida, mientras que la evidencia experimental a favor del ajuste inducido es ambigua. La selección conformacional es suficiente para explicar la totalidad de los casos de cambio conformacional descritos, mientras que el ajuste inducido al ser un caso particular y poco probable queda prácticamente descartado [7].

El mecanismo de selección conformacional es parte fundamental del modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC). Este modelo es uno de los más utilizados para explicar el fenómeno de cooperatividad y de alostería al equilibrio, frecuentemente encontrados juntos. Originalmente el modelo sirvió para explicar la saturación cooperativa de oxígeno por parte de la hemoglobina, el paradigma de las proteínas alostéricas [8].

1.3 Modelo concertado de Monod, Wyman & Changeux (MWC).

Uno de los modelos más influyentes para explicar el fenómeno de cooperatividad y alostería, fue el propuesto por Jaques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux (MWC) en 1965 [9]. Como antecedentes del desarrollo teórico de Monod, Max Perutz ya se habían determinado las estructuras de la *oxi* y la *desoxi* hemoglobina [8]. Para entonces Monod y colaboradores contaban con la evidencia del cambio conformacional en la hemoglobina, que existía en dos conformaciones estructuralmente diferentes dependiendo del estado de ligación con oxígeno; además se sabía que en ambas estructuras la organización de los monómeros era simétrica. Esta simetría se conoce analizando la estructura tridimensional en los cristales.

Con esta evidencia, el modelo MWC asume de las siguientes premisas:

- La molécula debe poseer al menos un eje de simetría.

- Cada subunidad de la proteína oligomérica posee sólo un sitio de unión al ligante.
- A medida que se va uniendo el ligante a las diferentes subunidades, la simetría se mantiene.
- La conformación de una subunidad está determinada por la interacción con otra subunidad.
- Como consecuencia, la afinidad de un ligante en un oligómero se altera al ocurrir la transición de un estado a otro.
- Cuando la proteína pasa de un estado a otro, su simetría se mantiene.

Hasta ahora, los estados a los que hacen referencia los postulados del modelo MWC corresponden a los dos estados estructurales que se observaron cristalográficamente al estar la hemoglobina con o sin oxígeno ligado. A cada estado se le conoce como confórmero. Al confórmero sin ligante se le llamó T por tenso, mientras que al confórmero con ligante se le llamó R por relajado. El modelo MWC asume que existen estos dos confórmeros en diferentes proporciones, cuyas constantes de asociación por el ligante son diferentes. T es el estado de baja afinidad por el oxígeno, mientras que R es el estado de alta afinidad y ambos confórmeros se encuentran en equilibrio. En ausencia de ligante el equilibrio favorece a la población de baja afinidad, T. Conforme la concentración de ligante aumenta, se induce el cambio conformacional que lleva a la proteína del estado T al estado R, y el equilibrio ahora favorece a la conformación de alta afinidad [8].

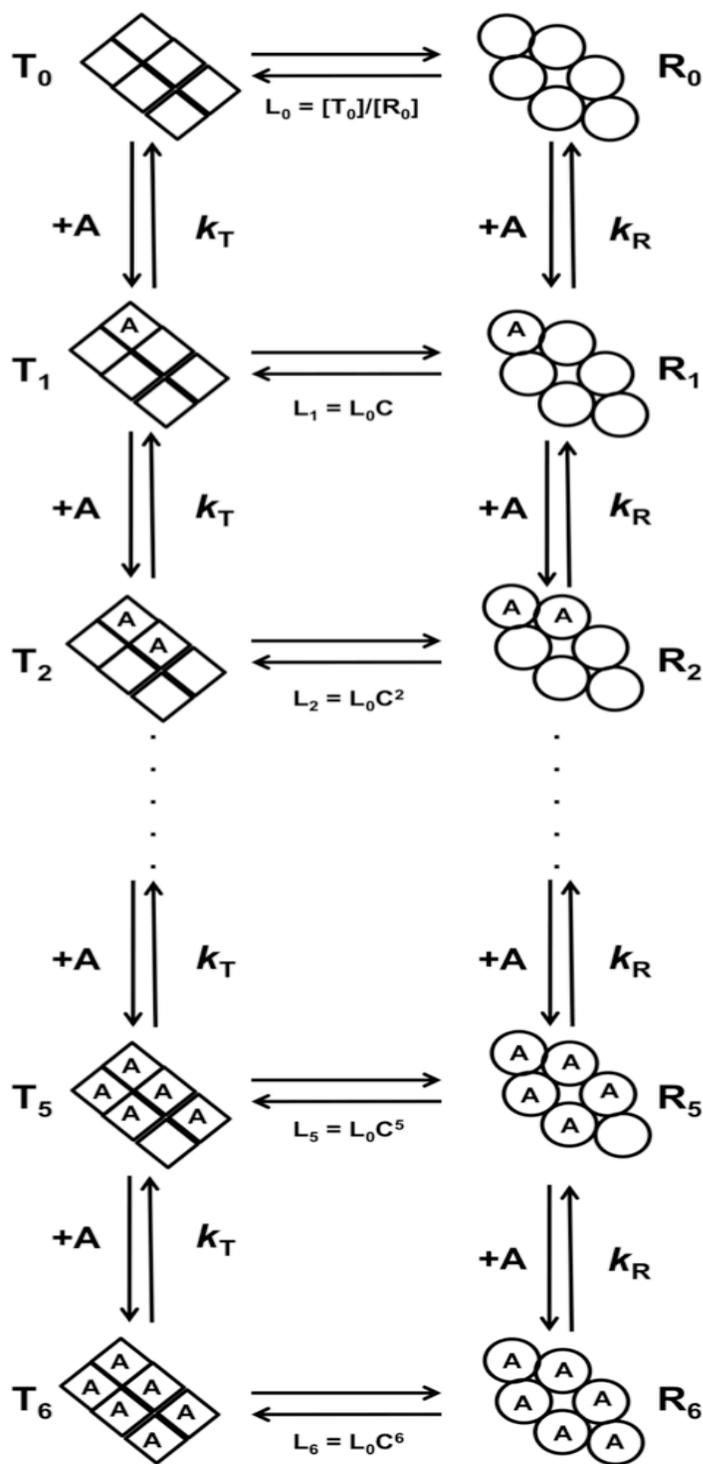


Figura 2. Esquema del modelo MWC. T_0 y R_0 corresponden a los confórmers de baja y alta afinidad respectivamente en ausencia de ligante. L corresponde a la constante de equilibrio conformacional. C representa el cociente entre las constantes de disociación; K_R/K_T . A corresponde al ligante [8]

Esquemáticamente el modelo MWC se representa en la figura 2.

A partir de los postulados precedentes, se dedujo la ecuación que describe al modelo.

$$\bar{y} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n}$$

En donde α es igual a $\frac{[A]}{K_R}$, $[A]$ es la concentración de ligante y K_R es la constante de disociación de A correspondiente al confórmero R; c es el cociente entre las constantes microscópicas de disociación de cada confórmero ($\frac{K_R}{K_T}$), L_0 es conocida como la constante alostérica y representa la constante de equilibrio de $R \rightleftharpoons T$ en ausencia de ligante, $\frac{[T_0]}{[R_0]}$. Finalmente, n es el número de sitios de unión al ligante de la proteína oligomérica.

En el caso en el que la constante c es igual a 1, es decir, que no exista diferencia en las afinidades de los confórmeros T y R, o que la constante de equilibrio L sea cercana a 0, ésta ecuación se reduce a la forma:

$$\bar{y} = \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{[A]}{k_R + [A]}$$

Que corresponde a la ecuación de una saturación hiperbólica. Con el sustento de un modelo y basado en la evidencia estructural de la hemoglobina, los valores experimentales de saturación de oxígeno se ajustaron a la ecuación de 8 e incluso los valores experimentales de otras proteínas también se ajustaron.

El modelo MWC representó un avance en el estudio de la hemoglobina utilizándose incluso en otras proteínas. Una de las grandes contribuciones del modelo MWC fue la unificación de la cooperatividad y alostería en un solo modelo, siendo así evidente la estrecha relación entre ambos fenómenos [8].

1.4 Ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas

En algunas situaciones una proteína puede presentar diferentes afinidades por su ligante, esto debido a diferentes isoformas, estados conformacionales, estados oligoméricos etc. Cuando se tiene una mezcla de las dos formas de la proteína con diferentes afinidades, la curva de saturación observada es el resultado de la combinación de dos eventos de unión.

Un método para analizar este tipo de sistemas es el empleado en el artículo de Zonszein *et al* [9]. En ese trabajo se desacopló la comunicación entre subunidades en la Glucosamina-6-fosfato desaminasa (NagB) de *E. coli*. Utilizando diferentes concentraciones de ligante alostérico se establecieron, en distintas proporciones, dos poblaciones conformacionales con diferente afinidad por su sustrato.

Para ajustar las curvas de velocidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\left[\frac{(n-i)V_2X}{K_2+X} + \frac{i(V_1X)}{K_1+X} \right]$$

Esta ecuación corresponde a la combinación lineal de dos uniones hiperbólicas. K_1 y K_2 son las constantes de baja y alta afinidad respectivamente, n es el número total de sitios disponibles para unir al sustrato X . El parámetro i representa el número de sitios de alta afinidad, mientras que $n-i$ los de baja afinidad. En este ejemplo en particular se incluyen los valores de velocidad máxima para cada población V_t y V_r , no obstante, esta ecuación puede ser utilizada para ajustarse a datos de saturación con un ligante, no necesariamente a velocidades de catálisis [9].

1.3 Funciones ligadas

Las funciones ligadas describen el acoplamiento termodinámico entre distintos sitios en la misma molécula. Este acoplamiento está ligado al cambio conformacional [10].

Parte central de la teoría detrás del modelo MWC es la teoría de las funciones ligadas propuesta por Jeffries Wyman. En ella se plantea que la unión de un ligante promueve un cambio conformacional siempre y cuando el ligante se una preferentemente a una de las dos conformaciones [10]. El concepto, que está acompañado de un profundo sustento

fisicoquímico, explica de que forma un ligante puede alterar las propiedades estructurales y funcionales de una proteína.

Las funciones ligadas de Wyman, además de ser la base del modelo MWC, también han sido el sustento de otros fenómenos, entre ellos la oligomerización de proteínas. El ejemplo clásico de ello se encontró también en una clase de hemoglobina que presentaba un equilibrio reversible entre dímero y tetrámero. Dicho equilibrio analizado como una función ligada a la unión del oxígeno fue físicamente explicado haciendo una extensión al modelo clásico MWC [11].

1.4 Genes del metabolismo de aminoazúcares en *E. coli*.

Los aminoazúcares son una importante fuente de carbono para todos los organismos, los cuales se encuentran distribuidos en todos los dominios de la vida, desde la pared celular en microorganismos como bacterias y hongos, hasta en la matriz extracelular y tejido conectivo en vertebrados, así como en el exoesqueleto de artrópodos [12].

En bacterias, los aminoazúcares más abundantes son la Glucosamina (GlcN) y la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), tanto como fuente de carbono como para la formación de la pared de peptidoglicano. Tal es su importancia que la enzima encargada de la síntesis de GlcN6P (GFAT o GlcN6P sintasa) está altamente conservada y es esencial [13].

Como fuente de carbono, la GlcN y la GlcNAc son transportadas y catabolizadas para incorporarlas a la vía central de la glucólisis. En *E. coli* el transporte de ambos aminoazúcares ocurre mediante sistemas de fosfotransferasa (PTS), por lo que la forma fosforilada (GlcN6P y GlcNAc6P) es la forma metabólicamente activa [14]. El transporte de GlcN6P ocurre preferentemente por el sistema PTS ManXYZ, codificado en un mismo operón (*manXYZ*), el cual también transporta glucosa, manosa y de manera muy ineficiente GlcNAc [15]. La principal vía de transporte de GlcNAc ocurre por un transportador PTS de la familia de transportadores de glucosa, cuya selectividad por la GlcNAc6P depende del componente II (EIICBA^{Nag}) codificado en el operón divergente *nagE* [16].

Las enzimas catabólicas se encuentran codificadas en el operón *nagBAC*. *nagA* codifica para la GlcNAc6P desacetilasa, mientras que *nagB* codifica para la GlcN6P desaminasa (GNPDA), la primera se encarga de la desacetilación de la GlcNAc6P, produciendo GlcN6P y acetato, la segunda cataliza la reacción de desamidación e isomerización de la GlcN6P produciendo

Fructosa6P (Fru6P) y amonio, la Fru6P es finalmente incorporada a la vía glucolítica (Figura 3) [17, 18, 19].

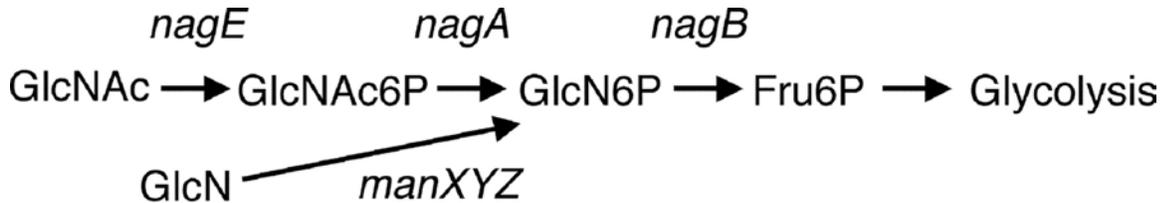


Figura 3. Ruta catabólica de los aminoazúcares GlcN y GlcNAc en *E. coli*. En cada uno de las reacciones se indica el gen que codifica a las enzimas tanto de transporte como de catálisis. (modificada de [20]).

La expresión de los genes de transporte y utilización de aminoazúcares ocurre cuando éstos son la única fuente de carbono. Los operones divergentes *nagE/BACD* son controlados por el represor NagC, codificado en el mismo operón que regula (Figura 4) [21]. Por otra parte, los genes *manXYZ* son regulados por la proteína Mlc [22]. El gen *nagB* es esencial para el crecimiento de *E. coli* cuando la GlcN o la GlcNAc son las únicas fuentes de carbono, sin embargo *nagA* es solamente esencial cuando la fuente de carbono es GlcNAc6P [23].

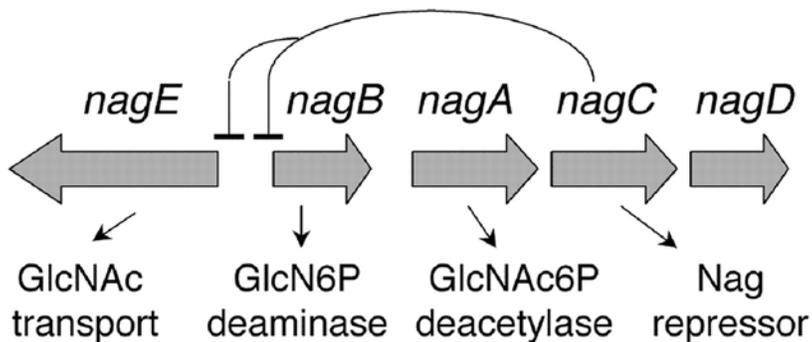


Figura 4. Organización genómica de los operones divergentes *NagE/BACD* en *E. Coli* y sus productos proteicos. (modificado de [20]).

En ausencia del transportador ManXYZ, la GlcN puede ser transportada por el simportador de protones GalP, el cual se encuentra también bajo represión transcripcional de NagC. No obstante, el transportador NagE es incapaz de transportar GlcN [24].

Por otra parte, el transporte de GlcNAc se encuentra prácticamente restringido a la presencia de NagE, ya que ManXYZ puede llegar a transportarla pero de manera ineficiente [25].

Al igual que la mayoría de los operones del catabolismo de carbohidratos, los operones divergentes *nagE/BACD* son controlados por el regulador global CAP (Proteína Activadora por Catabolitos). CAP forma parte del complejo de represión junto con NagC. Se ha descrito que, contrario a lo que ocurre en el operón *lac*, CAP estabiliza la interacción de NagC con el DNA, incluso en presencia de AMP cíclico (cAMP), por lo que el papel que juega CAP en la regulación de los operones aún no se conoce a detalle [26].

1.5 El represor NagC

El represor NagC, está codificado por el gen *nagC*, que codifica para un polipéptido de 406 aminoácidos y 44 kDa. Este represor pertenece a la familia ROK (Represores, ORFs y Cinasas) [25]. NagC se une a las dos regiones operadoras del operon divergente *nagE/BACD* que se sobrelapan con las secuencias promotoras. Estas dos regiones se encuentran separadas por 94 pares de bases, es decir, por nueve vueltas del DNA en forma de doble hélice B, de modo que las dos cajas se encuentran orientadas hacia la misma hebra del DNA (Figura 5) [27]. El arreglo genómico de las regiones operadoras quasipalindrómicas permite la unión de NagC en su forma tetramérica formando una asa de represión.



Figura 5. Organización de las regiones reguladoras de los operones divergentes *NagE/BACD* de *E. coli*. También se indica la región de unión de la proteína CAP (modificado de [23].

La evidencia de la formación de una asa de represión fue descrita mediante un análisis de footprint en donde la región inter-operadora mostró hipersensibilidad a la digestión por DNasaI (Figura 6) [28]. La asa abarca unos cientos de pares de bases y bloquea la actividad de la RNA polimerasa, ya sea impidiendo la unión o atrapándola en la asa sin ser capaz de reclutar otras proteínas activadoras impidiendo la expresión de los operones *nagBACD-nagE*. Este

mecanismo de represión se ha observado también en los operones de lactosa y arabinosa de *E. coli*.

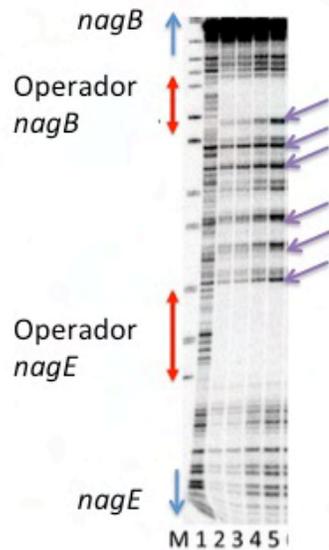


Figura 6. Footprint que demuestra la formación de entre la región de los operadores nagB-nagE. Figura tomada y modificada de Bréchemier-Baey et al. [29]. La letra M debajo del carril señala el patrón del peso molecular. Los carriles enumerados de izquierda a derecha representan concentraciones descendentes de NagC. Con flechas azules se señalan las regiones que corresponden a los genes nagB y nagE y con flechas rojas las regiones correspondientes a las regiones operadoras. Las flechas moradas señalan los sitios de corte hipersensibles que demuestran la existencia de la formación de un asa de represión.

El fenómeno de inducción ocurre cuando la GlcNAc6P se une a NagC disminuyendo su afinidad por el DNA, permitiendo la disociación del asa de represión y posterior transcripción de los operones.

No obstante, el hecho de que NagC se encuentra codificada en el mismo operón que regula, la estabilización del complejo por CAP y que la GlcNAc6P también sea activador alostérico de la proteína NagB, hacen que el mecanismo de inducción sea complejo, y no se haya descrito a nivel molecular hasta el momento.

Existen diferentes dominios estructurales que le permiten a las proteínas reconocer y unirse al DNA. En el caso de NagC el domino de unión al DNA presenta el plegamiento de hélice-vuelta-hélice (H-T-H), como en la mayoría de los factores de transcripción y proteínas que se unen al DNA en procariontes. Este dominio consta normalmente de tres hélices alfa de las cuales las 2

y 3 forman el dominio H-T-H y la 1 estabiliza la estructura (figura 7). La hélice 3 es descrita comúnmente como la hélice de reconocimiento, ya que los aminoácidos de esta hacen contacto con en el surco mayor del DNA [29].

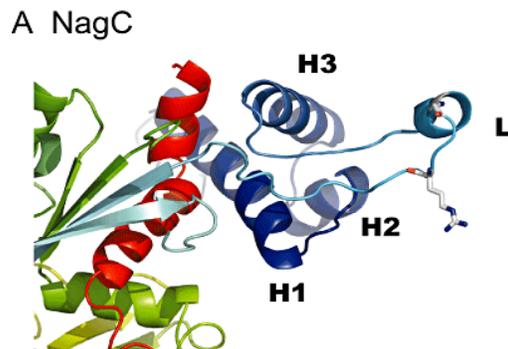


Figura 7. Modelo del dominio de unión al DNA de NagC . Imagen tomada de Bréchemier-Baey et al. [29].

Hasta el momento no se cuenta con una estructura cristalográfica de NagC, debido a ello, los estudios estructurales de NagC se han hecho con modelos por homología respecto a Mlc [29]. Además del dominio H-T-H descrito previamente, NagC también tiene un dominio de unión a Zn^{2+} cuya importancia no ha sido estudiada. Un elemento estructural importante para el estudio de NagC es la presencia de un solo triptófano situado entre los dominios de unión al DNA y de unión a la GlcNAc6P, el cual se ha utilizado como reportero de la unión de ligantes para su estudio fisicoquímico (Figura 8) [30].

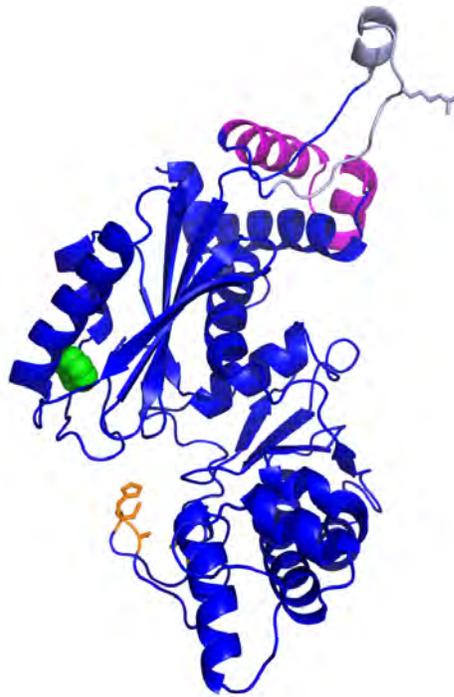


Figura8. Modelo estructural por homología del monómero de NagC, basado en la estructura cristalográfica de Mlc. En Magenta se resalta el dominio H-T-H, en azul claro la región linker con la R75 que hace contacto con el surco menor del DNA. En esferas verdes se indica el W176. En bastones naranjas se muestran los aminoácidos involucrados en la coordinación del Zn^{2+} .

NagC se ha podido purificar a homogeneidad lo que nos ha permitido estudiarla a nivel fisicoquímico. El único triptófano sirve como reportero de la unión de la GlcNAc6P y del DNA. La unión de ligantes se observó a través del cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia del triptófano en función de su concentración. En particular la unión a DNA permitió calcular una constante de disociación de NagC por el DNA en ausencia de inductor [30].

Por otra parte, cuando se intentó evaluar la unión de la GlcNAc6P se observó que la proteína formaba agregados irreversibles y precipitaba, siendo este efecto más notorio a concentraciones altas de inductor. Este efecto de agregación causaba incertidumbre en la determinación del cambio de fluorescencia e impedía calcular una constante de disociación.

Por otra parte, cuando la proteína está saturada con DNA y posteriormente se añade GlcNAc6P, el cambio en la señal del triptófano es menor y no sigue un patrón claro, por lo cual ha sido complicado determinar la constante de disociación por la GlcNAc6P en presencia de DNA utilizando este método [30].

De forma alternativa, se han hecho experimentos de *footprint* y retardos con diferentes concentraciones de GlcNAc6P y se ha observado el efecto de disociación de NagC del DNA lo cual nos permite comparar el efecto del inductor en un sistema que contiene la región operadora completa y que además está libre de los problemas que interfieren en las medidas fluorométricas. Por ello es importante establecer un método alternativo para determinar la constante de disociación de NagC por la molécula inductora, con la finalidad de entender el mecanismo de inducción en los operones divergentes *nagE/BACD*.

1.6 El papel del zinc en las funciones biológicas

Un caso de funciones ligadas de gran relevancia para este trabajo es el de la unión de Zinc a las proteínas. El Zinc se encuentra en condiciones fisiológicas en la forma iónica Zn^{2+} . Es el metal más abundante en los seres vivos después del Hierro [31].

La interacción que tiene el Zn^{2+} con las proteínas ocurre con mayor frecuencia con los residuos de Cys y de His, aunque en algunos casos puede interaccionar con el Asp o el Glu. La proteína NagC tiene un sitio de unión a Zn^{2+} formado por dos cisteínas y una histidina conservadas en sus homólogos como Mlc.

Tanto para NagC como para muchas otras metaloproteínas, el papel que juega el Zn^{2+} es aún desconocido y difícil de estudiar. Entre los ejemplos más relevantes que se han descrito sobre la función del Zn^{2+} en distintas metaloproteínas se encuentran las funciones estructurales, catalíticas (en el caso de enzimas) y las regulatorias.

Las funciones regulatorias son de particular interés para el estudio de NagC. Entre ellas se encuentran casos en los que el Zn^{2+} altera la función de la proteína, ya sea uniéndose en algún residuo de cisteína en el sitio de unión a ligantes (o sitio activo en el caso de las enzimas) funcionando como inhibidor, o regulando de manera alostérica, como en el caso de la Caspasa 9, en donde el Zn^{2+} tiene un papel importante para inducción de la apoptosis [31].

Otra de las funciones regulatorias del Zn^{2+} es conocida como “Switch redox”, en este caso el estado redox de las cisteínas determina la unión o disociación del Zn^{2+} , ya que para la unión efectiva del Zn^{2+} a las cisteínas, estas deben estar reducidas [30].

Finalmente, el Zn^{2+} también puede mediar la interacción entre dos subunidades de una proteína oligomérica. Uno de los casos descritos de este tipo de regulación ocurre en la sintasa de Óxido Nítrico. Esta enzima tiene un equilibrio oligomérico entre monómeros y dímeros. Se sabe que la forma activa es el dímero y que el Zn^{2+} funciona como activador, datos estructurales y bioquímicos demostraron que el Zn^{2+} es esencial para la interacción entre monómeros, por lo que este equilibrio oligomérico también depende del estado redox de las cisteínas [32].

Otro ejemplo es el de la citosina homotrímica Apo2L/TRAIL, en donde los datos cristalográficos permitieron observar un sitio de unión a Zn^{2+} en las interfaces de contacto entre las subunidades, demostrando la importancia que tiene este metal para la oligomerización de la proteína [33].

Si bien el Zn^{2+} puede asumir diferentes papeles en la regulación de las proteínas, su estudio es complejo, especialmente en proteínas sin actividad enzimática, debido a que en muchas ocasiones no se cuenta con métodos para detectar la función de la proteína al variar la concentración de Zn^{2+} , sin embargo, es evidente que su papel no es pasivo en proteínas con sitios para unirlos.

1.7 Espectroscopía de fluorescencia.

La fluorescencia es un fenómeno espectroscópico de carácter radiativo. En algunas moléculas con características químicas particulares como la aromaticidad, los electrones excitados por la incidencia de un fotón, pasan a un nivel energético más alto; posteriormente al regresar los electrones a su estado energético basal, parte de la energía se emite en forma de fotones. Los fotones de emisión son de menor energía que los fotones de excitación, es decir la longitud de onda de excitación λ_{ex} es menor a la de emisión λ_{em} [34].

Las proteínas regularmente tienen fluorescencia intrínseca debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). De estos aminoácidos el que presenta mayor rendimiento cuántico es el triptófano. El rendimiento cuántico es la fracción de fotones que se obtienen en la emisión al excitar a un fluoróforo.

2. Planteamiento.

El catabolismo de aminoazúcares está finamente regulado a nivel transcripcional y postranscripcional. A nivel transcripcional, la proteína NagC actúa como represor de los operones NagE/BACD formando un asa de represión. La disociación de la asa de represión ocurre cuando la molécula inductora GlcNAc6P se une a NagC disminuyendo su afinidad por el DNA. Hasta el momento se conoce a detalle la organización de la región operadora. También se conoce la afinidad que tiene NagC por sus cajas (dsDNA de 35 pares de bases) en ausencia de inductor mediante espectroscopia de fluorescencia. Por otro lado, se ha observado el efecto de disociación de NagC del DNA dependiente de GlcNAc6P mediante footprint [25]. Adicionalmente, el operón está bajo el control transcripcional de la proteína CAP, sin embargo, el papel que juega esta proteína en la estabilidad de asa se encuentra poco estudiado [25].

A nivel postranscripcional la molécula inductora también funciona como activador alostérico de la proteína NagB (GNPDA) y por lo tanto compite con NagC por la unión de dicho ligante. Por otra parte NagC se encuentra codificada en el mismo operón que regula, formando un ciclo de retroalimentación.

El hecho de que se produzca más NagC al inducir los operones y que esta deba unir la GlcNAc6P en un intervalo de concentración suficiente para responder a la inducción, nos hace plantearnos la interrogante sobre la afinidad que tiene NagC por la GlcNAc6P y de qué manera el mecanismo de inducción permite que se mantenga desreprimido el operón y activada la desaminasa (NagB, EcGNPDA) simultáneamente.

En este trabajo encontramos que por una parte el equilibrio oligomérico juega un papel importante para la estabilidad del asa de represión en conjunto con la proteína CAP. Además, proponemos un método de medición por cinética rápida para determinar la constante de disociación por la GlcNAc6P con menor interferencia del efecto de agregación. Finalmente descubrimos que NagC puede unir otras azúcares fosforiladas sin agregarse, sugiriendo que la agregación es un fenómeno exclusivo de la GlcNAc6P. Con base en esto, proponemos que la inestabilidad de NagC al unir a la GlcNAc6P es parte del mecanismo de inducción de los operones.

3. Hipótesis.

Si la agregación de NagC al unir la GlcNAc6P en ausencia de DNA es específica para este ligante, entonces puede ser parte del mecanismo de inducción, dejando libre a la GlcNAc6P para activar a la GNPDA y ser metabolizada, sin que afecte el incremento en la síntesis de NagC.

4. Objetivos.

Determinar los estados oligoméricos de NagC utilizando cromatografía de filtración en gel analítica.

Determinar la estabilidad de la interacción de NagC con el DNA en ausencia y presencia de CAP a distintas concentraciones de inductor mediante ensayos de retardo.

Evaluar condiciones de estabilidad para la unión de GlcNAc6P incrementando la concentración de Zn^{2+} y midiendo la unión por espectroscopia de fluorescencia.

Determinar la constante de disociación de la GlcNAc6P mediante ensayos de cinética rápida del decaimiento en la intensidad de fluorescencia de Trp.

Estudiar la unión de otros azúcares fosforilados a NagC mediante espectroscopia de fluorescencia y determinar si estos causan agregación al igual que la molécula inductora.

5. Materiales y métodos.

5.1 Cepas

La cepa utilizada en este trabajo, para purificar la proteína NagC, fue *E. coli* BL21 Δ nag PRARE PJES/NagCHistagH6 resistente a ampicilina. Esta cepa fue construida en el laboratorio de la Dra. Jacqueline Plumbridge sobre el vector pJES307 y con este plásmido se transformó una cepa BL21 Δ nag pRARE. Esta construcción permite expresar la proteína NagC mediante inducción con IPTG.

El gen nagC fue amplificado con un oligonucleótido río arriba que incorporó un sitio de restricción NdeI en el codón de inicio AUG, y un oligonucleótido río abajo que incorporó seis histidinas seguidas por el sitio de restricción EcoRI. El fragmento amplificado fue digerido con NdeI y EcoRI y fue clonado en el vector pJES307. Este plásmido es un vector de expresión basado en la inducción con IPTG de la RNA polimerasa de T7. El plásmido resultante pJES/NagC-H6Histag fue transformado en *E. coli* BL21Star (Invitrogen) [35].

Se realizaron cultivos de 100 mL. La cepa BL21 Δ nag PRARE PJES/NagCH6 resistente a ampicilina se dejó crecer en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL hasta llegar a una OD₅₅₀ de 0.6 nm, posteriormente se indujo la sobreexpresión de NagC con IPTG a una concentración final de 1 mM durante 4 h a 30°C a 250 rpm.

Obtuvimos la masa celular en tubos Nalgene de 250 mL centrifugando 15 minutos a 4°C a 5,000 rpm. El pellet se sonicó con 5 mL de amortiguador de lisis (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 2 mM imidazol pH 7.8) y se separaron los residuos celulares centrifugando 45 minutos a 4°C a 15,000rpm.

5.2 Purificación por cromatografía de afinidad por Niquel.

Se empacó la columna con agarosa Ni-NTA (Qiagen). El volumen de la columna fue de 1mL aproximadamente. Se equilibró la columna con 10ml de amortiguador de lisis (aproximadamente 3 volúmenes). El sobrenadante que se obtuvo después de la centrifugación se pasó por la columna previamente equilibrada.

Después de que pasara lentamente el sobrenadante se pasaron 20 mL de amortiguador de lavado (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 10 mM imidazol pH 7.8)

Se añadieron 2 mL del amortiguador de la primera elución (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 100mM imidazol pH 8.0), y se recolectaron dos fracciones la primera de 0.5 mL y la segunda de 1.5 mL.

Por último se añadieron 2 mL de amortiguador de la segunda elución (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 300 mM imidazol pH 7.8) y se recolectó la fracción.

Se corrieron las fracciones de las eluciones en un gel de acrilamida 12% en condiciones desnaturalizantes.

Las fracción con NagC se dializó en Amortiguador 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 % glicerol. Después se hizo el calculo para añadir 1OD de la proteasa TEV por cada 100OD de nuestra proteína y se agregó a la reacción 5mM de β -mercaptoetanol. Se dejó incubar durante 2 horas a 30°C y se pasó la reacción por la misma columna de afinidad a Niquel. Se añadieron 10 mL de Amortiguador de lavado, y se realizaron varias eluciones con concentraciones desde 30 mM de imidazol hasta 150 mM, encontrando que la proteína sin cola de histidinas eluía en el lavado y la proteína que no había sido cortada eluía a 150 mM de imidazol.

Se recolectó y concentró la proteína sin cola de histidinas a un volumen de 1 mL y se le añadió 50% de glicerol para su almacenamiento a -20°C.

5.3 Concentración de proteína.

Se determinó la concentración de la proteína mediante el método de ácido bicinonínico [36] y posteriormente se calculó con el coeficiente de absortividad molar.

5.4 Cromatografía de exclusión molecular analítica.

NagC se dializó en un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.8, NaCl 150 mM. La cromatografía se llevó a cabo en una columna superdex 200 10/300 equilibrada en el mismo amortiguador inyectando NagC en las concentraciones indicadas en los resultados. El flujo de la elución fue de 0.5 mL/min.

5.5 Ensayos de fluorescencia.

Los ensayos se llevaron a cabo detectando el cambio del máximo en el espectro de emisión de fluorescencia en el espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign,IL.).

Los ensayos se hicieron a una concentración de 0.5 mg/mL de NagC, a una temperatura constante de 30°C, en una celda de cuarzo Hellma de 10mm de paso de luz (101-QS) El máximo de emisión lo obtuvimos en 330 nm excitando a 295 nm. Las rejillas del paso de luz fueron de 2mm para la emisión y 1mm para la excitación.

Los valores de intensidad de fluorescencia fueron normalizados contra la intensidad en ausencia de ligantes. En donde se indique, se llevó una normalización adicional para expresar los valores en fracción de saturación. Los datos se graficaron y se ajustaron en el programa GraphPad Prisma 7 para Mac.

5.6 Entrecruzamiento

Se dializó la proteína en un amortiguador con 150 mM de NaCl, 20 mM Tris-HCl a un pH 8.0, se midió la concentración de proteína y se utilizó en una reacción de 50 µL a una concentración de 0.4 mg/mL, con 1.5% de Glutaraldehído durante 10 min a 30 °C. Se realizaron dos reacciones una en ausencia y otra en presencia de la sonda de DNA con la secuencia NagE-S.O. Después de transcurridos 10 min se detuvo la reacción añadiendo Tris 1 M pH 8. Cada reacción se analizó en un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Se tiñeron los geles con el método de tinción de plata utilizando tiosulfato de sodio como agente reductor de Blum, et al [37].

5.7 Retardos.

El fragmento de DNA con las regiones operadoras de NagC, así como la proteína CAP, fueron producidos como se reportó en [25]. La mezcla de las proteínas NagC y CAP con la sonda de DNA a concentraciones variable de GlcNAc6P y en su caso en presencia de cAMP, se hicieron en un amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0.5 mg/mL de albúmina de suero bovino, pH 7.5. Las muestras se incubaron 15 minutos a 30 °C, posteriormente a 8 µL de la muestra se

les añadió 1.2 μL de amortiguador de carga (50 % w/v) de sacarosa, azul de bromophenol y cianol de xileno. Las muestras se resolvieron en un gel de 10 cm \times 15 cm de poliacrilamida 5 % (29:1 acrilamida/bis-acrilamida). El gel se corrió en amortiguador TBE 50 mM durante 1 hora en posición vertical.

Los geles se revelaron mediante auto radiografía en un Typhoon Scanner

5.8 Cuantificación de las bandas del retardo.

A partir de la imagen obtenida de los geles de retardo, se procesó en el programa ImageJ, seleccionando, en el caso de el retardo en ausencia de CAP, las bandas de la sonda libre, tomando como referencia el carril sin GlcNAc6P. En el caso de la proteína en presencia de CAP, se seleccionó la banda del complejo binario DNA-CAP, tomando como referencia la intensidad de la banda en presencia de NagC y ausencia de GlcNAc6P. Los datos se graficaron y ajustaron en el programa GraphPad Prisma 7 para Mac.

5.9 Ensayos de cinética rápida de flujo detenido.

Los experimentos se hicieron en un equipo Chirascan (Applied Photophysics) adaptado con una unidad de *stopped-flow*. Las mediciones se hicieron mezclando la proteína con el ligante en una relación de 1:1 (0.5 mg/mL de NagC final) a una presión de 4 psi a 30 °C en una celda de 200 μL con un paso de luz de 2 mm. El tiempo muerto de la medición fue de 1.5 ms y se midió durante 10 s en intervalos de 5 ms. Cada curva se obtuvo promediando los valores de 10 mediciones. Los datos se graficaron y analizaron en el programa GraphPad Prism 7 para Mac.

6. Resultados

6.1 Construcción y purificación de His6-TEV-NagC.

El estudio de los estados oligoméricos de NagC se realizó utilizando la construcción de NagC con una etiqueta de histidinas en el N-terminal que incluye un sitio de corte específico para la proteasa TEV. Se optó por esta alternativa ya que se adiciona un solo un residuo de Gly en el extremo N-terminal de NagC.

La construcción se realizó sobre el vector pJES307 y con este plásmido se transformó una cepa BL21 Δ nag pRARE. Esta construcción permite expresar la proteína NagC mediante inducción con IPTG.

La figura 1 muestra la purificación mediante una columna con afinidad a níquel. La fracción en donde eluye NagC (Figura 9 carril 7), se dializó en un Amortiguador Tris-HCl pH 8.0, NaCl 300 mM y 20 % de glicerol. Una vez dializada la proteína, se corta con la proteasa TEV durante 3 horas a 30°C y se vuelve a pasar por una columna de afinidad a Histidinas. En este paso se libera de la proteasa TEV que también contiene etiqueta histidinas y de la His-NagC que no se cortaron; quedando únicamente NagC en el frente. En el segundo panel de la figura 9 se observa la diferencia de tamaño entre la proteína sin cola de histidinas (A) y la proteína sin cortar (B).

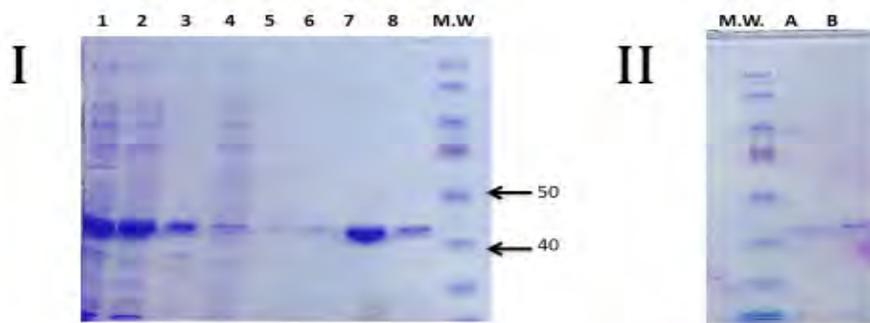


Figura 9 I) Purificación de NagC-TEV. En los carriles 1, 2 y 3 se muestra la sobreexpresión (extracto total), fracción soluble e insoluble de NagC respectivamente. En el carril 4 se muestra el frente y en el 5 el lavado de la columna. Las fracciones 6, 7 y 8 son la eluciones. Se puede apreciar que la mayor parte de la proteína pura se encuentra en el carril 7. II) Se muestra la diferencia de pesos que existe entre la proteína sin cola de histidinas (A) y la proteína con cola de histidinas (B).

6.2 Análisis del estado oligomérico de NagC.

NagC presenta un equilibrio oligomérico complejo. Esto se detectó con distintas estrategias experimentales como DLS y cromatografía de exclusión molecular.

Para poder determinar el estado oligomérico de NagC y establecer si la unión al DNA estabiliza alguna forma oligomérica, se preparó una muestra de 100 μL de proteína, dializada en un amortiguador de 350 mM de NaCl y 150 mM NaH_2PO_4 , con una concentración final de proteína de 0.5 mg/ml. El peso molecular esperado para NagC en sus diferentes estados oligoméricos son los siguientes: Monómero: 44 kDa, Dímero: 88 kDa y Tetrámero: 176 kDa.

En la figura 10 se muestra la gráfica de calibración para poder estimar el peso molecular de NagC, según los tiempos de elución. En la tabla 1 se muestra una tabla tomada y modificada del manual de estándares de la filtración en gel de Biorad que se utilizaron.

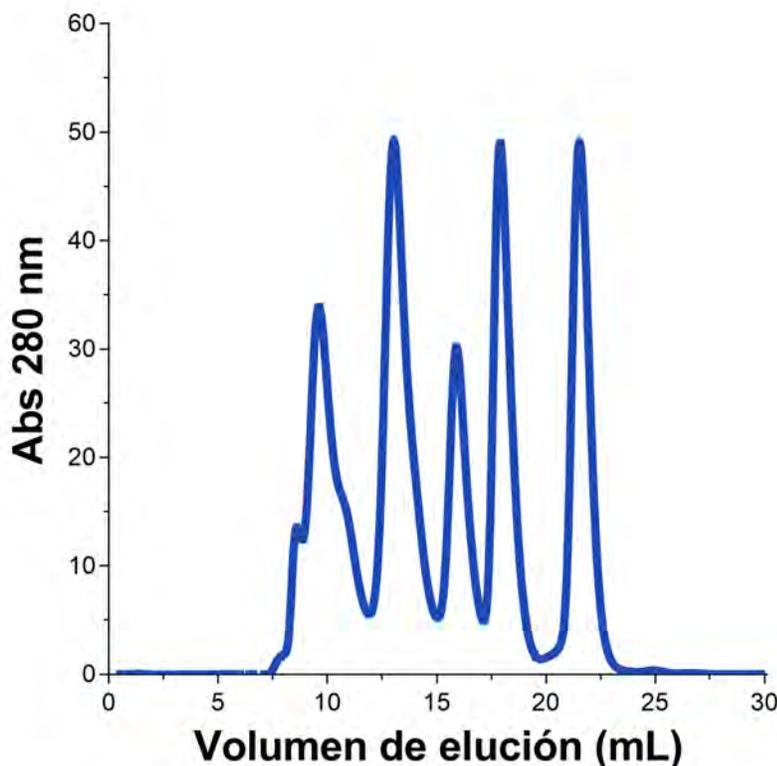


Figura 10 Elución del estándar de calibración en una columna de filtración en gel Superdex 200 GL.

Componente	Peso Molecular (Daltons)	Concentración por vial (mg)
Tiroglobulina (bovina)	670,000	5
γ -globulina (bovina)	158,000	5
Ovalbumina (pollo)	44,000	5
Mioglobina (caballo)	17,000	2.5
Vitamina B12	1,350	0.5
		18

Tabla 1. Cuadro de estándares Biorad, tomada y modificada del manual de estándares de filtración en gel.

A continuación se inyectó la muestra con NagC 0.5 mg/mL en la columna y se aprecia que el pico de elución principal aparece a los 20.79 mL, que se relaciona con la forma monomérica de la proteína. Se observó también un pico menor alrededor de los 24 mL, el cual probablemente corresponda a productos de degradación (Figura 11).

De acuerdo con el estándar de calibración, el peso molecular observado es de 10.23 KDa, un peso menor a la forma monomérica de NagC. No obstante, el análisis en el gel por electroforesis (Figura 9) muestra que la proteína se encuentra mayoritariamente íntegra, por lo que se descarta que el peso menor observado se deba a la degradación de la proteína. Por lo tanto, la discrepancia con el peso molecular teórico puede deberse que NagC se desvía más de la esfericidad que los patrones de peso molecular utilizados en la calibración. De acuerdo a modelos *in silico* por homología, NagC tiene una forma cilíndrica.

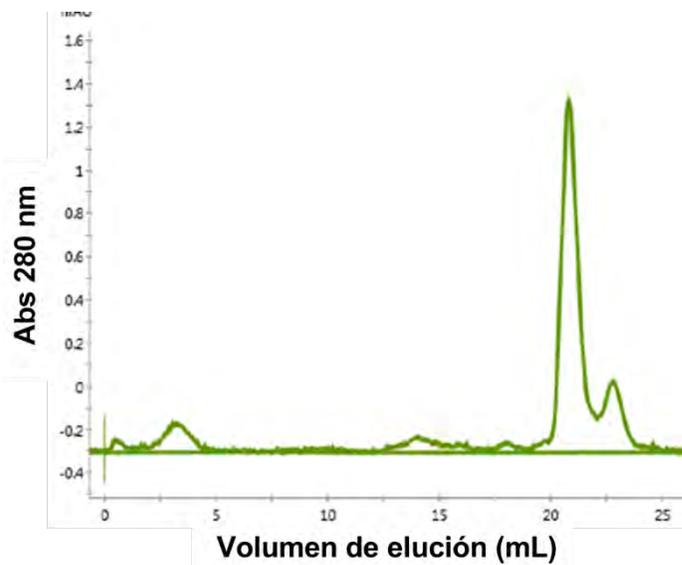


Figura 11 Elución de NagC 0.5 mg/mL. El pico principal (monómero) se observa a los 20.79 mL. El segundo pico menor puede tratarse de productos de degradación.

Se sabe que el estado oligomérico de una proteína puede depender de su concentración. Para ello se llevó a cabo nuevamente la cromatografía de exclusión molecular, pero en esta ocasión se probaron diferentes concentraciones de proteína notando una diferencia en el patrón de elución a una concentración de 2.5 mg/ml. En esta ocasión el pico principal eluyó a los 13.47 ml que corresponde a la forma tetramérica (figura12).

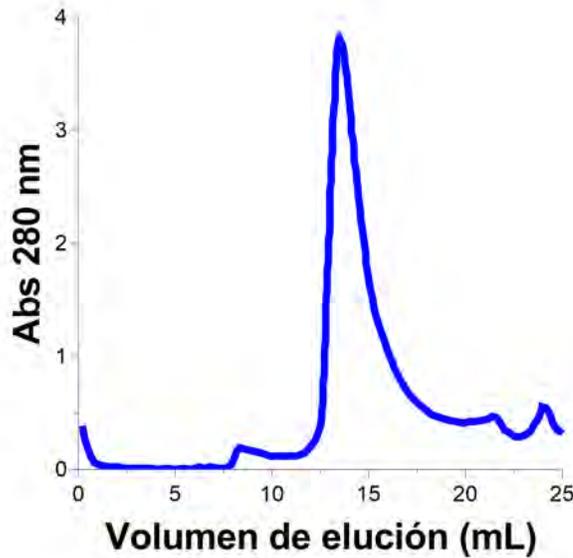


Figura 12 Elución de NagC 2.5 mg/mL. Se aprecia el pico principal de mayor absorbancia a los 13.47 mL corresponde al tetrámero de NagC.

De acuerdo al modelo de represión por formación de asa de NagC, ésta adopta una forma tetramérica al interaccionar con el DNA. Para corroborar que dicho estado oligomérico es observado en el análisis de filtración en gel, se pre incubó a NagC (0.5 mg/mL) con DNA y se inyectó en la columna (figura 13). El cromatograma muestra tres picos principales aparecen en los volúmenes correspondientes al monómero, dímero y al tetrámero.

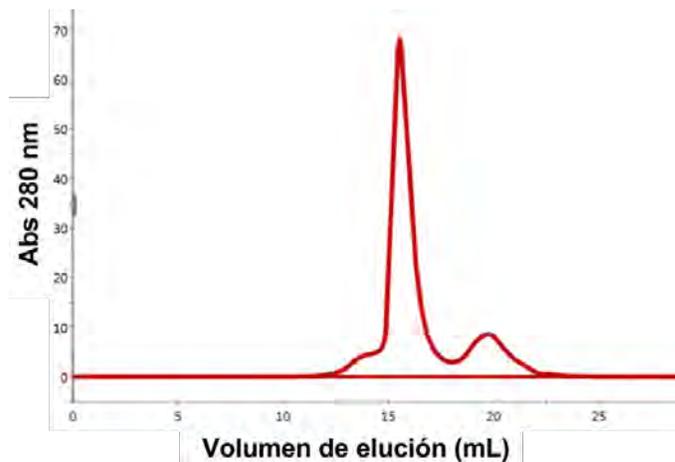


Figura 13 Elución de NagC 0.5 mg/mL pre incubada con DNA. Los picos principales se observan a los 13.52, 15.63 y 19.78 mL, siendo la forma dimérica la más abundante.

Los experimentos de cromatografía de filtración en gel, demuestran que NagC es una proteína estable y que existe en múltiples formas oligoméricas, incluso en ausencia de DNA. En la tabla 2 se resumen los tiempos de elución para cada experimento de cromatografía.

Muestra	Volumen de elución (mL)	Tamaño calculado (KDa)
NagC 0.5 mg/mL	20.79	2.8
NagC 0.5 mg/mL	22.83	1.01
NagC 2.5 mg/mL	13.47	117.49
NagC 0.5 mg/mL +DNA	13.52	116.41
NagC 0.5 mg/mL +DNA	15.63	39.76
NagC 0.5 mg/mL +DNA	19.78	4.8

Tabla 2. Tiempos de elución y pesos moleculares calculados a partir de la elución de los estándares de la tabla 1. Elución de NagC 0.5 mg/mL y eluciones de NagC 2.5 mg/mL y 0.5 mg/mL pre incubada con DNA.

Alternativamente realizamos un entrecruzamiento de la proteína con do. Para poder definir la banda de tetrámero decidimos utilizar geles de gradiente en condiciones desnaturizantes. En la Figura 14 es posible apreciar un ligero aumento en la concentración de tetrámero cuando NagC se encuentra unida al DNA.

Podemos ver que, además del monómero y dímero, se definen dos bandas, una corresponde al tamaño de un trímero, y otra a la de un tetrámero. Sin embargo, fisiológicamente un trímero no es una unidad funcional de NagC y por otro lado la cantidad de tetrámero no es la esperada para una proteína que se encuentra saturada de DNA. Una posible explicación es que aun estando saturada de DNA NagC está en equilibrio entre distintos estados oligoméricos, dímero y tetrámero, esto provoca que aparezcan especies intermedias. Este efecto ocurre para algunas proteínas con forma elongada, como esperamos que sea el caso de NagC. En futuros experimentos *in vitro* e *in silico* se pueden determinar las interfaces de oligomerización.

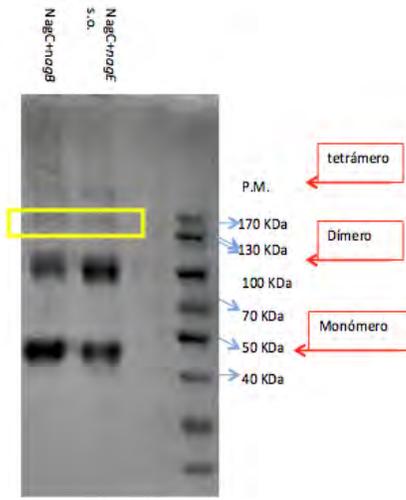


Figura 14. Gel de gradiente de NagC entrecruzada en condiciones desnaturalizantes. En orden descendente la primer banda corresponde al tamaño esperado de un tetramero, en el recuadro amarillo se señala la segunda banda que corresponde al peso de un trímero . Las últimas dos bandas corresponden a un dímero y monómero respectivamente

6.3 Interacción NagC-CAP.

Además de la interacción entre NagC y el DNA, la proteína CAP (Proteína activada por catabolitos) también participa en la regulación transcripcional del operón NagBACD. La proteína CAP tiene un dominio de unión a DNA, sin embargo, para cumplir su función reguladora es posible que interaccione directamente con NagC favoreciendo alguna conformación o estado oligomérico.

Para probar esta hipótesis, hicimos ensayos de retardo utilizando una sonda de DNA marcada radiactivamente (figura 15).

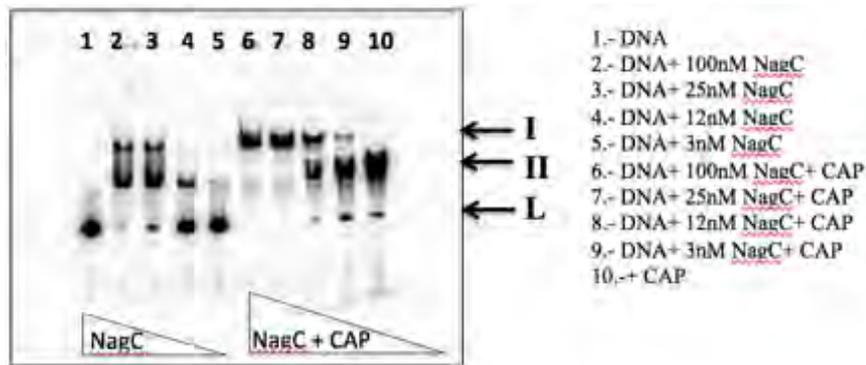


Figura 15. Experimento de retardo con una sonda de DNA marcada radiactivamente En el primer carril se colocó la sonda en ausencia de NagC y CPA. En los carriles del 2 al 5 se probaron concentraciones decrecientes de NagC. En los carriles del 6 al 10 se probaron las mismas concentraciones decrecientes de NagC pero en presencia de CAP-cAMP.

En los carriles del 2 al 5 evaluamos la interacción del DNA con NagC disminuyendo la concentración de la proteína. Se puede observar que la formación del complejo proteína DNA es dependiente de la concentración, tal y como se ha demostrado en los experimentos por espectroscopia de fluorescencia.

Posteriormente, evaluamos si la presencia de CAP estabiliza la formación de un complejo ternario (NagC-DNA-CAP). En los carriles del 6 al 9, se probaron las mismas concentraciones decrecientes de NagC con una concentración constante de CAP. Se observa que a las más altas concentraciones de NagC (carriles 6, 7 y 8) se forma un complejo de alto peso molecular, que corresponde al complejo ternario, el cual se observa en menor proporción a concentraciones bajas de NagC, siendo evidente solo el complejo CAP-DNA (carril 10).

Este resultado demuestra que existe un complejo ternario DNA, CAP y NagC.

6.4 Efecto de la GlcNAc6P en la interacción de NagC con el DNA en presencia de CAP.

Conociendo las condiciones en las que se forma el complejo ternario entre NagC, CAP y el DNA, nos preguntamos si el inductor GlcNAc6P tenía el mismo efecto sobre NagC en presencia de CAP.

Para ello hicimos los experimentos de retardo utilizando las dos concentraciones de NagC que nos permitieron ver la formación de complejo ternario, en presencia de diferentes concentraciones de GlcNAc6P (figura 16).

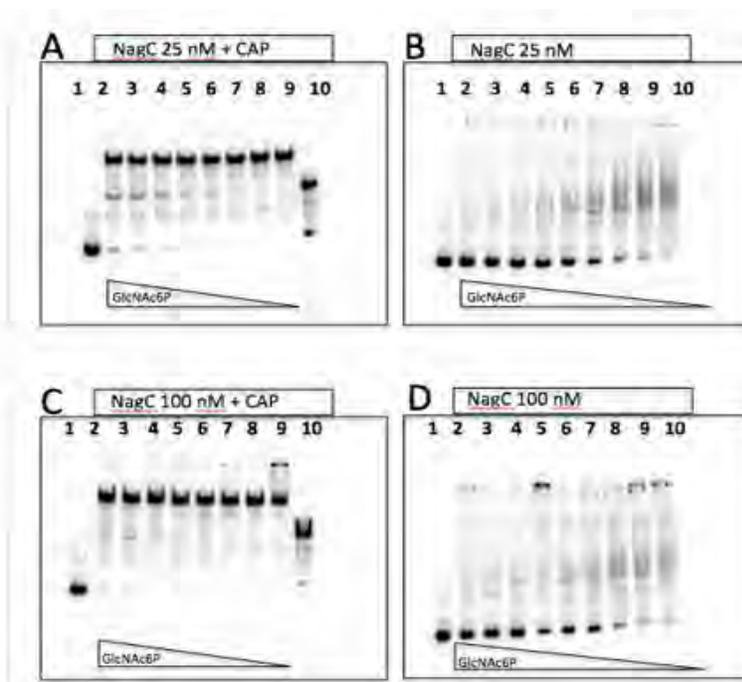


Figura 16 Experimentos de retardo con una sonda de DNA marcada radiactivamente. En todos los casos las concentraciones de GlcNAc6P probadas fueron 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.62, 7.8 y 3.9 μ M. A) NagC 25 nM en presencia de CAP. En el primer carril se corrió la sonda libre, del 2 al 9 se probaron las concentraciones de GlcNAc6P y en el carril 10 se corrió la sonda en presencia de CAP. B) NagC 25 nM a concentraciones variables de GlcNAc6P. C) NagC 100 nM en presencia de CAP. En el primer carril se corrió la sonda libre, del 2 al 9 se probaron las concentraciones de GlcNAc6P y en el carril 10 se corrió la sonda en presencia de CAP. D) NagC 100 nM a concentraciones variables de GlcNAc6P.

Por experimentos previos de footprint, se sabe que la GlcNAc6P provoca que NagC se disocie del DNA. Este efecto también lo hemos caracterizado por espectroscopia de fluorescencia.

En la figura 16 B y D, se observa este mismo efecto. En los primeros carriles (altas concentraciones de GlcNAc6P) NagC no interacciona con el fragmento de DNA, mientras que a bajas concentraciones de GlcNAc6P (últimos carriles) se aprecia la interacción.

En las figuras 16 A y C, se probaron las mismas condiciones, pero en presencia de CAP. Como puede observarse, se forma el complejo ternario, pero este no se disocia por completo en presencia de GlcNAc6P. Esto demuestra que la formación del complejo ternario disminuye el efecto de inductor de la GlcNAc6P sobre el represor NagC.

A partir de la cuantificación de las intensidades de las bandas en las figuras 16 A y B, se obtuvieron dos curvas de saturación para NagC por la GlcNAc6P en presencia y ausencia de CAP respectivamente (figura 17). Las curvas se ajustaron a la ecuación de Hill y se calculó una $K_{0.5}$ de $16.16 \pm 1.52 \mu\text{M}$ con un coeficiente de Hill de 1.37 ± 0.16 en ausencia de CAP, mientras que en presencia de CAP la $k_{0.5}$ fue de $248 \pm 13.84 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 1.54 ± 0.08 lo que demuestra, que en presencia de CAP se forma el complejo ternario y disminuye la afinidad de NagC por su inductor.

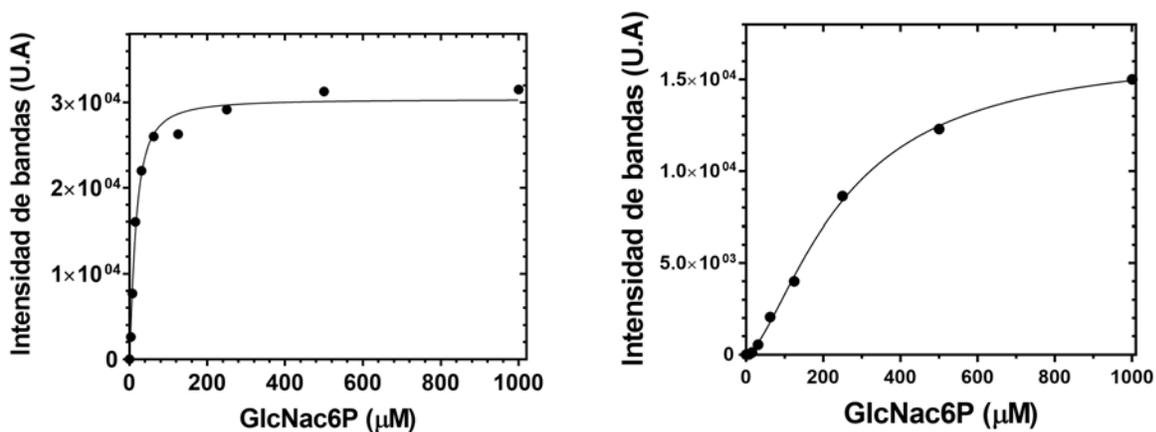


Figura 17. Cuantificación de la intensidad de las bandas en las figuras 14 A y B en unidades arbitrarias. A la izquierda se muestra el ajuste a la ecuación de Hill de la intensidad en función de la concentración de GlcNAc6P en ausencia de CAP. A la derecha se muestra la gráfica y el ajuste correspondiente en presencia de CAP.

Una posible interpretación a este fenómeno podría basarse en la sinergia de la estabilización del asa de represión por CAP, que favorece la tetramerización de NagC. Esto a su vez revela

que el estado tetramérico es el estado conformacional de menor afinidad por la GlcNAc6P y explica la sinergia entre CAP y NagC para la estabilización del asa de represión.

	$K_{0.5}$ (μM)	h	L^*	N^*	K_R^* (μM)	C^*
NagC	16.16 ± 1.52	1.37 ± 0.16	1000000	4	0.50 ± 0.07	0.022 ± 0.005
NagC+CAP	248 ± 13	1.54 ± 0.08	680	4	44.4 ± 2.54	0.081 ± 0.011

Tabla 3. Parámetros obtenidos de los ajustes por regresión no lineal a los datos de la Figura 17. Los parámetros marcados con * se obtuvieron del ajuste a la ecuación MWC [8], en donde L fue ajustada a mano considerando el error de los parámetros libres. N se fijó en 4. Los parámetros sin marca fueron obtenidos a partir de la ecuación de Hill.

6.5 Efecto del Zn^{2+} en la unión de GlcNAc6P a NagC

En ausencia de ligantes, NagC es una proteína suficientemente estable en la mesa de trabajo. Sin embargo, en un trabajo previo se demostró que la estabilidad de NagC disminuye drásticamente al unir su molécula inductora, provocando su desnaturalización y agregación irreversible. Por otra parte, cuando NagC se encuentra en complejo con el DNA su estabilidad aumenta, incrementando la concentración umbral a la que comienza a apreciarse visualmente el efecto de agregación de NagC por la GlcNAc6P. Una de las posibles causas de la inestabilidad de NagC al unir GlcNAc6P es la pérdida del Zn^{2+} durante el paso de purificación por afinidad a la etiqueta de histidinas. NagC al ser una metaloproteína, al igual que otros miembros de la familia ROK, es probable que requiera de Zn^{2+} para estabilizar su estructura, sin embargo, el papel del zinc en los miembros de esta familia aún no está descrito claramente. Para comprobar si el Zn^{2+} aumenta la estabilidad de NagC cuando une GlcNAc6P, hicimos titulaciones de la molécula inductora en presencia de concentraciones crecientes de Zn^{2+} , siguiendo el apagamiento de la fluorescencia del Trp único.

En la figura 12, en presencia de Zinc 10 μM , se observa un cambio en la señal que de acuerdo con el ajuste a la ecuación de Hill alcanza la mitad de la fracción de saturación a una concentración aproximada de 2 mM de GlcNAc6P. Cabe mencionar que la unión ocurre de manera cooperativa y que en el experimento mostrado no se llega a la saturación debido al efecto de agregación. La saturación se estimó extrapolando los datos a saturación de Zn^{2+} y GlcNAc6P. Posteriormente se repitió el experimento en presencia de 50 μM de Zn^{2+} . En

contraste con lo que ocurre a 10 μM de Zn^{2+} , la semisaturación se alcanza a una concentración de 0.86 mM de GlcNAc6P y la cooperatividad de la unión disminuye.

Finalmente, cuando la titulación se lleva a cabo en 75 μM de Zn^{2+} se observa una unión de mayor afinidad ($k_{0.5} = 0.46$ mM) y con menor cooperatividad en comparación con la realizadas a menor concentración de Zn^{2+} .

En la figura 18 se muestran en conjunto las tres titulaciones incrementando la concentración de Zn^{2+} . De estos experimentos podemos concluir que el Zn^{2+} aumenta en cierto grado la estabilidad de NagC, dado que es posible obtener una curva de saturación a altas concentraciones de Zn^{2+} . No obstante, el intervalo en el que se encuentra la semisaturación es más alto del valor esperado para la unión de GlcNAc6P sin CAP, además, el efecto de agregación causado por la GlcNAc6P persiste, incluso a la mayor concentración de Zn^{2+} estudiada, siendo congruente con que la agregación sea parte del mecanismo de desrepresión.

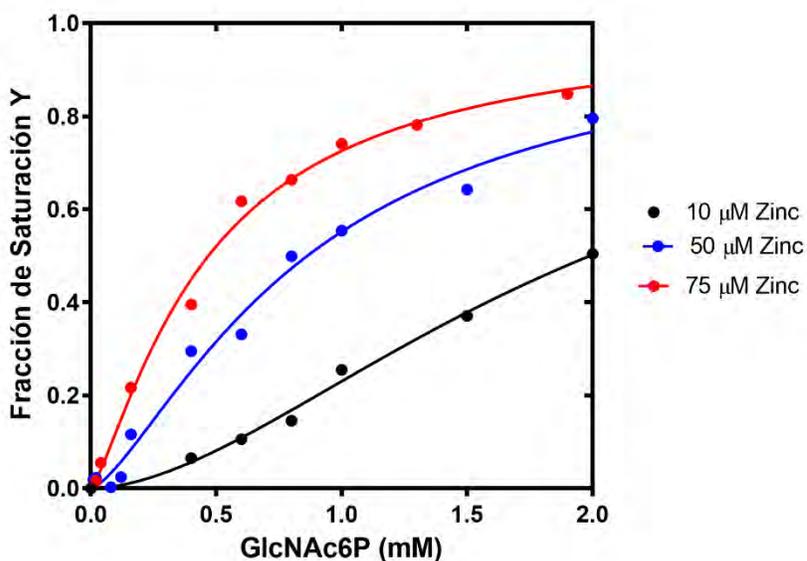


Figura 18 Curvas de saturación de NagC con GlcNAc6P en presencia de concentraciones crecientes de Zn^{2+} . Las líneas continuas corresponden al ajuste a la ecuación de Hill.

Zn ²⁺ (μM)	K _{0.5} (μM)	<i>h</i>	L*	N*	K _R * (μM)	C*
10	1.98 ± 0.93	1.75 ± 0.35	100	4	0.26 ± 0.01	0.08 ± 0.01
50	0.86 ± 0.25	1.41 ± 0.27	1500	4	0.13 ± 0.008	0.09 ± 0.01
75	0.46 ± 0.07	1.28 ± 0.27	100	4	0.15 ± 0.005	0.19 ± 0.02

Tabla 4. Parámetros obtenidos de los ajustes por regresión no lineal a los datos de la Figura 18. Los parámetros marcados con * se obtuvieron del ajuste a la ecuación MWC [8]. L fue ajustada a mano considerando el error de los parámetros

6.6 Determinación de la constante de disociación de la GlcNAc6P por cinética rápida de flujo detenido.

Con la finalidad de evitar el efecto de la agregación de NagC al añadir GlcNAc6P, en este experimento se registró el curso en el tiempo del apagamiento de la fluorescencia del Trp a distintas concentraciones de GlcNAc6P. Usando cinética rápida se logró medir la señal proveniente del cambio conformacional inducido por el ligante evitando el efecto de agregación que causa la GlcNAc6P, el cual es más lento. El cambio se midió durante 10 seg. y se puede observar como un solo evento (un decaimiento exponencial sencillo) lo que demuestra que el efecto de agregación aún no está presente. En la figura 19 se muestran dos cursos temporales representativos y se aprecia que la amplitud del decaimiento aumenta en función de la concentración de ligante.

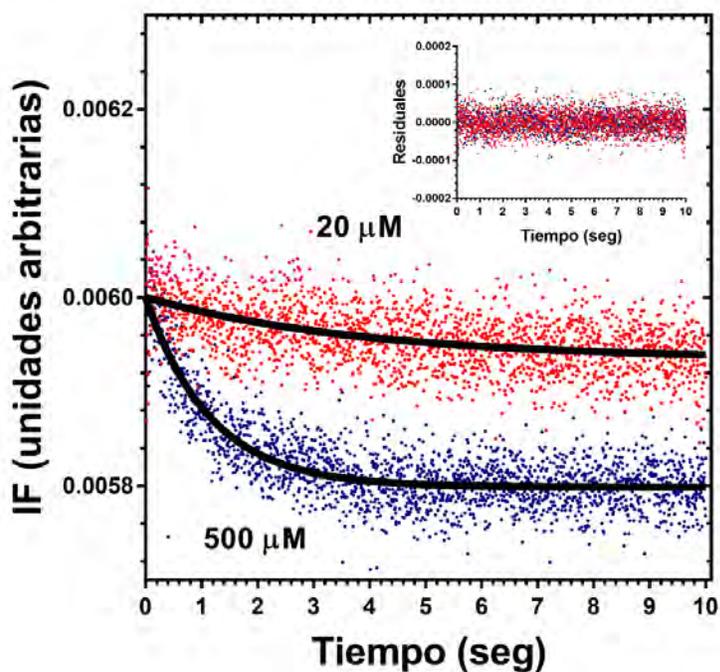


Figura 19. Cursos en el tiempo del decaimiento de la fluorescencia del triptófano utilizando un filtro de 305 nm. Las líneas continuas negras corresponden al ajuste a un decaimiento exponencial sencillo. En el inserto se muestra el grafico de residuales del ajuste, donde se aprecia que no hay una tendencia por parte de los datos experimentales respecto al modelo ajustado.

En la figura 20 se muestra el regráfico de la amplitud en función de la concentración de GlcNAc6P. La amplitud está directamente relacionada con la saturación del sistema al equilibrio, por lo tanto, el grafico de la figura representa la saturación de la proteína por el ligante.

A partir de ella se pueden obtener los parámetros de unión de la GlcNAc6P prácticamente libre del efecto de la agregación ($K_m=53.18 \pm 8.12 \mu\text{M}$ o $K_{0.5}=57.5 \pm 16.9 \mu\text{M}$, $h= 0.9 \pm 0.19$).

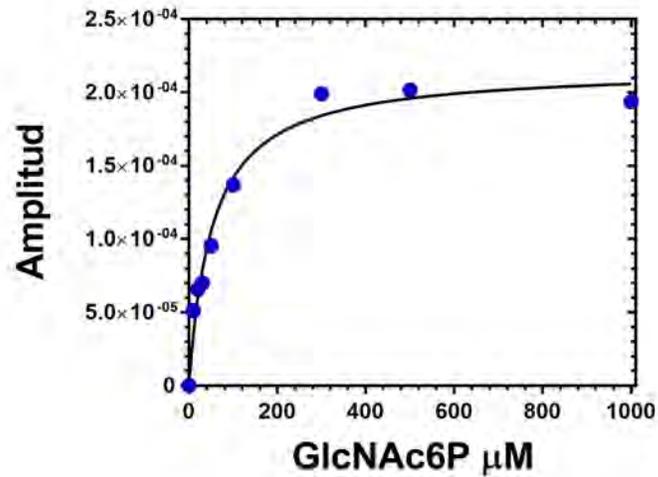


Figura 20. Curva de saturación de NagC con GlcNAc6P calculada a partir del cambio en la amplitud de las curvas de decaimiento de fluorescencia. La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación de una hipérbola con $K_m = 53.18 \pm 8.12 \mu\text{M}$

Además de las amplitudes, también estudiamos el comportamiento de la constante de velocidad con respecto a la concentración de ligante (figura 21). Encontramos que el comportamiento es ascendente con respecto a la concentración de ligante. Para analizarlo utilizamos la ecuación propuesta por D. Vogt y Di Cera para el mecanismo de selección conformacional. De acuerdo a los valores de las constantes de velocidad obtenidas del ajuste, calculamos una constante de disociación de aproximadamente $51.23 \mu\text{M}$ (Tabla 5) la cual coincide con la obtenida a partir de los datos de las amplitudes. Este hecho sugiere que el mecanismo de unión del ligante ocurre mediante selección conformacional. En futuros experimentos se puede comprobar si el mecanismo es correcto y discutir sobre su relevancia en el mecanismo de desrepresión.

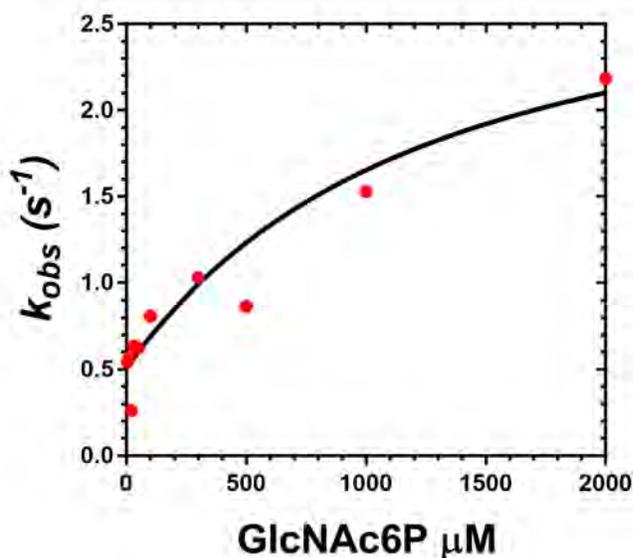


Figura 21. Gráfico de K_{obs} en función de la concentración de GlcNAc6P. La línea continua corresponde al ajuste a la ecuación del mecanismo de selección conformacional reportado en [7].

	$k_{on} (s^{-1} \mu M^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$k_r (s^{-1})$	$K_t (s^{-1})$	$k_D (k_{off}/k_{on}) (\mu M)$
Modelo de selección conformacional [7]	0.008918	0.51	3	9.155	51.23

Tabla 5. Parámetros obtenidos del ajuste a la ecuación del mecanismo de selección conformacional propuesta en [7].

6.7 Efecto de la unión de carbohidratos a NagC

La capacidad de una proteína de unir a varios ligantes con estructuras similares se ha estudiado en algunos sistemas. Para el caso de NagC no se conoce si puede unir otras moléculas similares estructuralmente o relacionadas metabólicamente con la GlcNAc6P. para ello seguimos la señal de apagamiento del triptófano a lo largo de una titulación con diferentes carbohidratos.

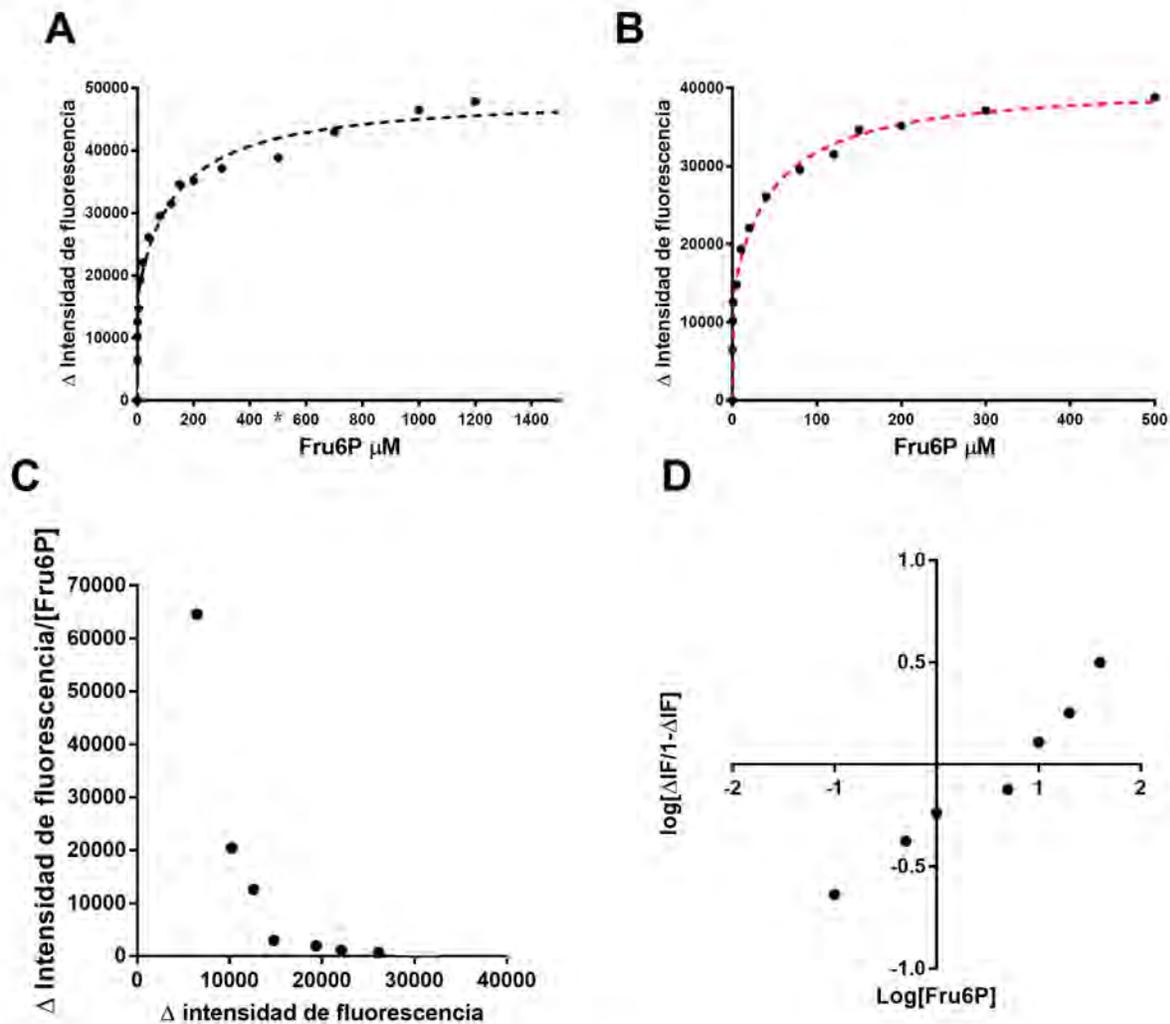


Figura 22. Unión de la Fru6P a NagC reportada por el cambio en intensidad de fluorescencia del W176. A. Isotherma del cambio en intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de Fru6P ajustado a la ecuación de Hill. B. Detalle de concentraciones bajas (indicadas por el asterisco en la figura A). C. Re gráfico de Scatchard en donde se aprecia la desviación del comportamiento hiperbólico de la unión. D. Re gráfico de Hill en donde también se muestra un comportamiento de dos fases en los datos experimentales.

En la figura 22 se evaluó el efecto de la fructosa-6-fosfato, la cual es el producto metabólico final de las proteínas del operón NagBAC y que conecta el metabolismo de amino azúcares y del reciclado de la pared celular [38] con el glucólisis. Se aprecia que hay un cambio en la fluorescencia del triptófano, que la señal depende de la concentración de Fru6P y que alcanza una saturación. Estas características indican la interacción entre ambas moléculas. La curva se analizó con la ecuación de Hill (figura 22 A) y se encontró cooperatividad negativa, de acuerdo con el comportamiento de los regráficos de Scatchard (Figura 22 C) y de Hill (Figura 22 D). En ambos regráficos, una saturación hiperbólica se observaría como una línea recta, sin embargo tanto en el regráfico de Scatchard como en el de Hill, los datos experimentales muestran una desviación del comportamiento lineal. Esto sugiere que NagC une a la Fru6P en distintas conformaciones con diferentes afinidades; otra posible interpretación es que parte de la señal proviene de una unión inespecífica. Un análisis alternativo, es a través la suma lineal de dos hipérbolas que incluyen un factor de cambio entre ambas especies, cumpliendo con las leyes de la conservación de la materia. En este análisis se asume que son dos especies distintas de la proteína las que unen al ligante, con afinidades distintas representadas por K_1 y K_2 . De acuerdo a este modelo, la proporción entre la forma de alta y baja afinidad representada por el número fraccional i , es aproximadamente la misma (Tabla 6), y la diferencia de afinidades entre ambas especies es de tres órdenes de magnitud.

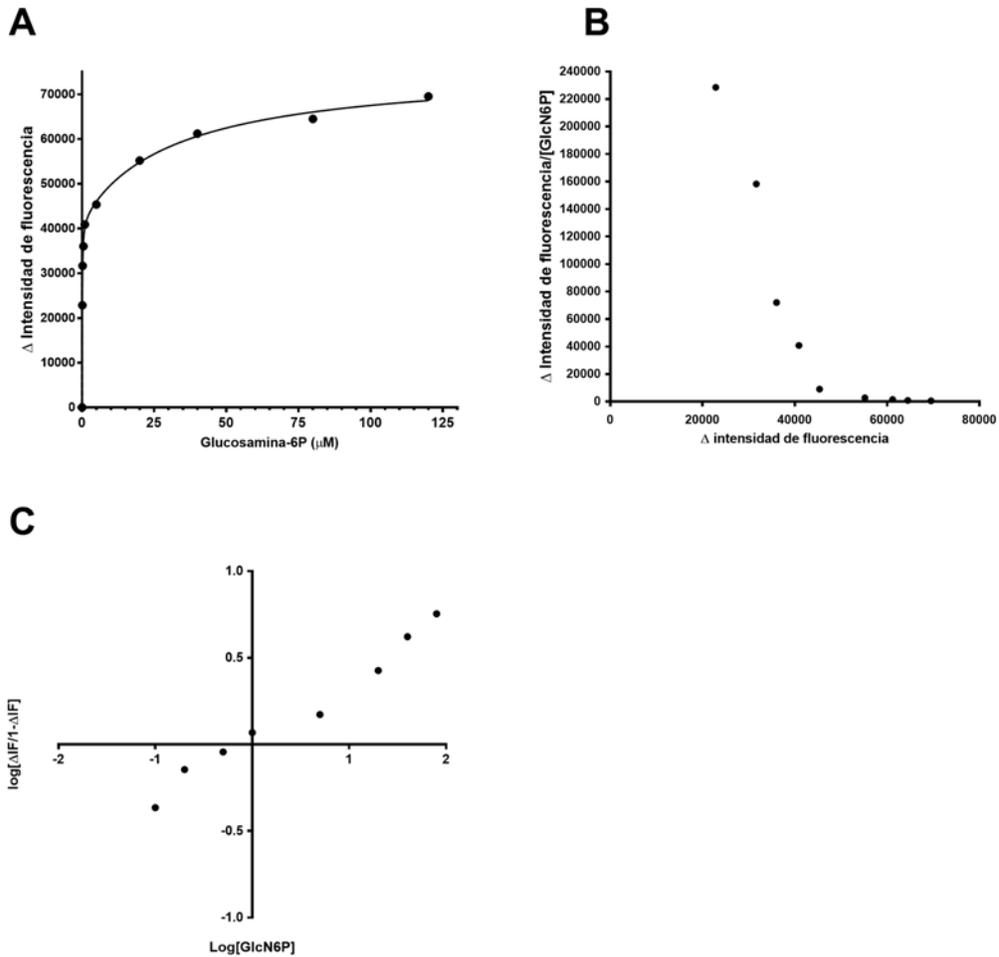


Figura 23. Unión de la Glucosamina6P a NagC reportada por el cambio en intensidad de fluorescencia del W176. A. Isoterma del cambio en intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de GlcN6P ajustado a la ecuación de Hill. B. Re gráfico de Scatchard en donde se aprecia la desviación del comportamiento hiperbólico de la unión. D. Re gráfico de Hill en donde también se muestra un comportamiento de dos fases en los datos experimentales.

El siguiente carbohidrato evaluado fue la glucosamina-6-P (Figura 23), sustrato de la proteína NagB codificada en el mismo operón regulada por NagC. Al igual que la Fru-6-P, también refleja un fenómeno de unión con cooperatividad negativa (figuras 23 A y B). Utilizando tanto la ecuación de Hill, como el modelo de dos hipérbolas, se encontró un evento de unión de muy alta afinidad (0.08 μM de acuerdo al modelo de dos hipérbolas)

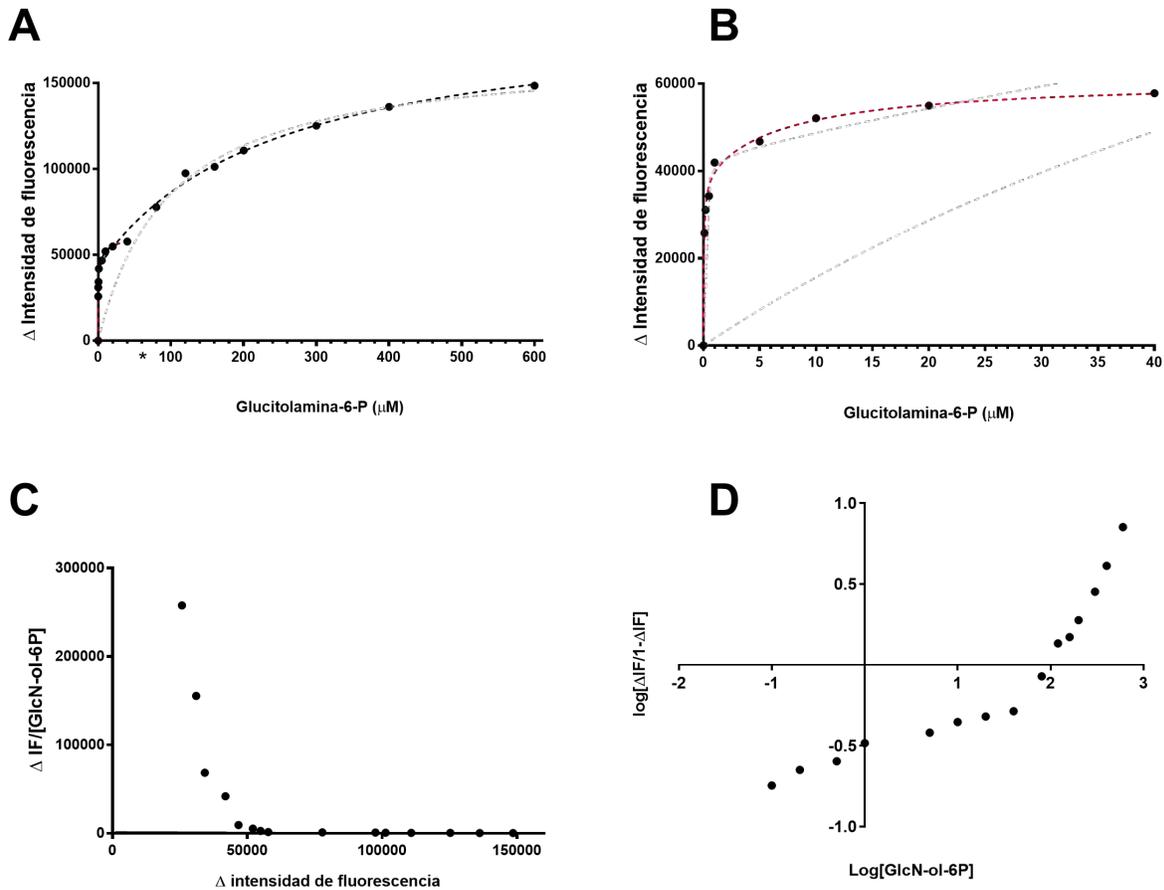


Figura 24. Unión de la Glucitolamina-6P a NagC reportada por el cambio en intensidad de fluorescencia del W176. **A.** Isotherma del cambio en intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de GlcN-ol-6P ajustado a la ecuación de Hill. **B.** Detalle de concentraciones bajas (indicadas por el asterisco en la figura A). **C.** Re gráfico de Scatchard en donde se aprecia la desviación del comportamiento hiperbólico de la unión. **D.** Re gráfico de Hill en donde también se muestra un comportamiento de dos fases en los datos experimentales.

A continuación, se evaluó la unión de la Glucitolamina-6-P (Figura 24), una molécula análoga al estado de transición de la catálisis de la GlcN-6-P, la cual se utiliza como inhibidor competitivo en la enzima NagB. La unión se presenta en dos fases, una de ellas parece saturar a concentraciones menores a 100 μ M, mientras que la segunda no llega cerca de la saturación,

probablemente la segunda se deba a una unión inespecífica. Debido a la forma irregular de la curva, no fue posible ajustarla a la ecuación de Hill ni a la suma de dos hipérbolas.

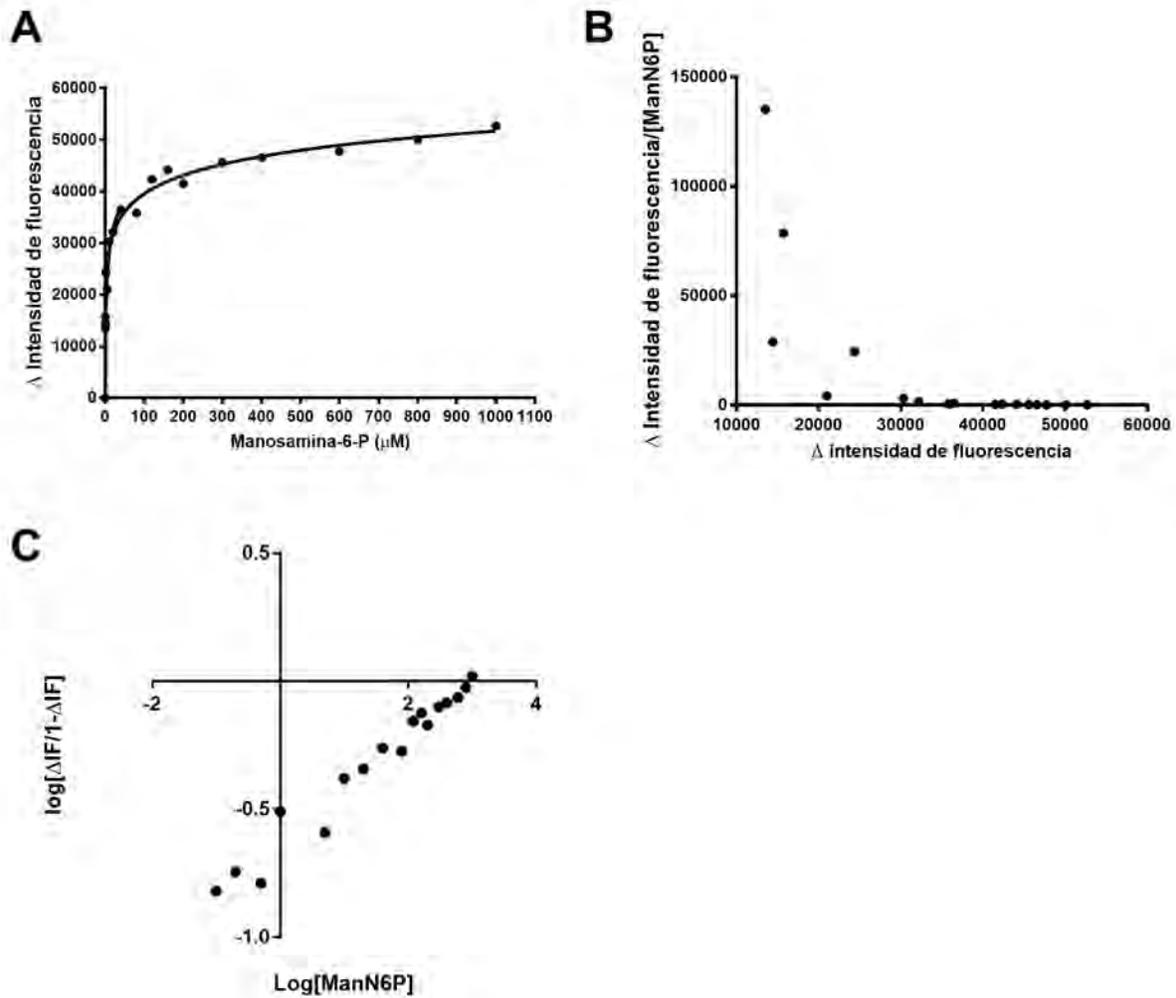


Figura 25. Unión de la manosamina-6P a NagC reportada por el cambio en intensidad de fluorescencia del W176. A. Isotherma del cambio en intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de ManN6P ajustado a la ecuación de Hill. B. Re gráfico de Scatchard en donde se aprecia la desviación del comportamiento hiperbólico de la unión. D. Re gráfico de Hill en donde también se muestra un comportamiento de dos fases en los datos experimentales.

Finalmente se utilizó la Manosamina-6-P (Figura 25), este compuesto ha sido evaluado como inhibidor de la enzima NagB. Al igual que los demás carbohidratos evaluado, la ManN-6P provoca una saturación con cooperatividad negativa de acuerdo al ajuste a la ecuación de Hill. El modelo de la suma de dos hipérbolas muestra una diferencia de constantes entre las dos formas ligantes de tres órdenes de magnitud, siendo dominante la forma de menor afinidad.

Uno de los efectos más notorios en la unión de las azúcares evaluadas en NagC, es que no causan la agregación de la proteína, a pesar de causar el apagamiento del Trp. Esto demuestra, por una parte, que NagC tiene la capacidad de unir diversos azúcares fosforilados, y por otra, que el efecto de agregación de NagC es específico a la unión de su molécula inductora GlcNAc6P.

	K0.5 (μM)*	h*	K1 (μM)	K2 (μM)	N	i
Fructosa-6P	≈ 29165	≈ 0.239	≈ 0.41	≈ 160.2	1	≈ 0.48
Glucosamina-6P	1.79 ± 4.8	0.28 ± 0.11	41 ± 24.8	0.08 ± 0.009	1	0.90 ± 0.02
Glucitolamina-6P	≈ 33.18	≈ 1	≈ 0.076	≈ 244.2	1	≈ 0.7759
Manosamina-6P	970.7 ± 3748	0.20 ± 0.04	61.04 ± 23.74	0.09 ± 0.04	1	0.38 ± 0.03

Tabla 6: Valores calculados a partir del ajuste de los datos de la unión de carbohidratos a NagC. Los parámetros marcados con * fueron obtenidos a partir del ajuste a la ecuación de Hill. Los demás parámetros se obtuvieron a partir del ajuste a la ecuación de la suma lineal de dos hipérbolas con dos constantes de disociación distintas (K1 y K2). Los valores en los que se indica una aproximación (≈) fueron calculados a partir de una regresión no lineal robusta (en donde se ponderan los datos considerados como fuera de intervalo). Los valores en donde no se indica error ni aproximación, fueron fijados en el ajuste.

7. Discusión

7.1 Estado oligomérico de NagC.

Debido a que no se cuenta con una estructura cristalográfica de NagC, ha sido complicado establecer su función a nivel estructural. Se han realizado modelos *in silico* a partir de estructuras homologas como la del represor Mlc, que pertenece a la misma familia que NagC. Algunas evidencias a nivel molecular revelan que la proteína presenta cambios en su organización oligomérica. En primer lugar, la disposición de las secuencias operadoras de DNA en el operón ya que son secuencias pseudo palindrómicas lo que indica que al menos dos moléculas de NagC deben unirse siendo consistente con una estructura dimérica. Por otra parte, los experimentos de Footprint demuestran que NagC forma un asa de represión entre los operones divergentes *nagBAC* y *nagE*, para lo cual debe al menos tetramerizar.

Previamente realizamos un estudio de entrecruzamiento para determinar la presencia de estos estados oligoméricos. Efectivamente el estudio reveló que NagC existe en 3 estados oligoméricos (monómero, dímero y tetrámero), sin embargo, el entrecruzamiento podría ser incompleto lo que podría aparentar estados oligoméricos no presentes en la muestra.

En este trabajo mostramos por medio de cromatografía analítica que NagC existe principalmente como un dímero y una proporción se encuentra en forma tetrámerica. Al diluir la muestra, la forma monomérica fue evidente, consistente con una disociación por dilución. Por otra parte, en presencia de DNA a pesar de estar diluida, NagC oligomeriza como dímero. Estos experimentos demuestran que NagC existe en diferentes estados oligoméricos. En condiciones fisiológicas a pesar de haber pocas copias por célula, mientras se encuentra en condiciones de represión, debe estar al menos como un dímero.

7.2 Estabilización de NagC.

En un trabajo previo intentamos determinar la constante de disociación de NagC por la GlcNAc6P. La determinación no fue posible incluso en presencia de DNA ya que la técnica utilizada reflejaba un fenómeno bastante complejo. Este fenómeno nos hizo preguntarnos si la agregación se debía a la ausencia de algún componente importante para la estabilidad o si es parte del mecanismo de desrepresión de la GlcNAc6P.

En primera instancia, evaluamos si la proteína CAP participaba en la estabilidad del complejo NagC/DNA. Como regulador global, CAP por lo general se une al DNA para evitar el inicio de la transcripción, sin embargo, su función puede ser complementada por un efecto directo en las propiedades ligantes de NagC. Los ensayos de retardo muestran que se forma un complejo ternario entre Nag, CAP y el DNA. En estas condiciones, la disociación de NagC del DNA causada por el inductor se ve disminuida drásticamente. Esto indica que efectivamente CAP participa en la estabilidad del asa de represión, se sabe que CAP dobla el DNA en un ángulo de 90°.

En futuros experimentos se planea evaluar de qué manera CAP causa la estabilidad. En principio se pueden plantear dos hipótesis: la primera es que la afinidad de NagC por la GlcNAc6P disminuye debido a un cambio conformacional causado por CAP. La segunda es que la afinidad de NagC por el inductor no se ve afectada, pero la afinidad por el DNA no cambia a pesar de unir GlcNAc6P. Esta última hipótesis puede ser más congruente con el hecho de que la afinidad de NagC por el inductor es mayor cuando está unida al DNA (se describirá más adelante), por lo que sería complicado que CAP cause un cambio conformacional de tal magnitud que disminuya considerablemente la afinidad por el inductor sin afectar el estado oligomérico. No obstante, una estabilización ya sea del tetrámero, de la conformación de DNA o de ambas, siendo esta última la más probable.

En otros ensayos evaluamos si el Zn^{2+} estabiliza a la proteína al unir GlcNAc6P. Reconstituimos el Zn^{2+} debido a que NagC es una metaloproteína y tiene un sitio conservado para la coordinación de Zn^{2+} al igual que otros miembros de la familia como Mlc. Además, el Zn^{2+} se quela durante el paso de purificación por afinidad a la cola de histidinas.

En los experimentos observamos que el Zn^{2+} tiene un efecto estabilizador sobre NagC, sin embargo, es parcial incluso a concentraciones altas de Zn^{2+} . Cabe mencionar que a concentraciones mM de Zn^{2+} también fue imposible determinar una constante de disociación. A pesar de causar estabilidad en la proteína, la señal del Trp se perdió (datos no mostrados). Posiblemente el Zn^{2+} a altas concentraciones estabiliza una conformación de NagC incapaz de sufrir el cambio conformacional provocado por el inductor.

Por el momento no podemos determinar una concentración ideal de Zn^{2+} para medir la constante de disociación por la molécula inductora, ya que a las concentraciones evaluadas no evitaron totalmente la agregación.

7.3 Determinación de la constante de disociación por la GlcNAc6P.

Ya que el efecto de agregación no desapareció añadiendo Zn^{2+} , decidimos estudiar la unión de GlcNAc6P a tiempos cortos, antes de que ocurra la agregación de la proteína. Para ello utilizamos la técnica de cinética rápida de flujo detenido. Partiendo del hecho que la agregación de la proteína es un fenómeno más lento que la unión y el cambio conformacional, medimos la señal de cambio inicial del Trp.

Una manera de saber que medimos únicamente el cambio conformacional, fue a partir del ajuste a un decaimiento exponencial sencillo. Cuando la señal se mide a tiempos más largos se observa una segunda fase lenta, la cual la atribuimos a la agregación (datos no mostrados).

La curva de saturación la obtuvimos a partir de la amplitud al ajuste del decaimiento exponencial, que es equivalente al cambio de fluorescencia medido en un experimento al equilibrio. Al ajustar la curva de saturación a la ecuación de Hill encontramos que el coeficiente de Hill era prácticamente 1, por lo que decidimos ajustarla a la ecuación de una hipérbola. La K_d calculada a partir de ese ajuste fue de aproximadamente $53.18 \mu M$. Esto demuestra que el fenómeno puramente de interacción proteína ligando ocurre en una sola forma oligomérica de la proteína, que de acuerdo al análisis por cromatografía de exclusión molecular es el dímero. A tiempos prolongados con GlcNAc6P NagC forma los agregados insolubles, para lo cual pueden ocurrir al menos dos eventos diferentes: el primero es que la proteína se disocie en monómeros y posteriormente se desnaturalice y agregue. El segundo escenario es que los oligómeros formen agregados sin disociarse previamente. La primera alternativa nos parece más probable debido a que solo hay pocas moléculas de NagC en la célula por lo que tener suficientes oligómeros es imposible, además que podría resultar en un efecto tóxico para la célula formar una gran cantidad de agregados.

7.4 Unión de azúcares fosforiladas a NagC.

De acuerdo a los experimentos previos, NagC es una proteína de regulación compleja, al menos tiene un sitio de unión para el inductor, un dominio de unión al DNA y posiblemente otro para la interacción con CAP. Por ello nos preguntamos si NagC es capaz de unir otros carbohidratos relacionados tanto estructuralmente como metabólicamente con la GlcNAc6P.

Comprobamos que efectivamente NagC puede unirlos en intervalos de concentración fisiológicos.

En todas las azúcares evaluadas, la saturación ocurrió en dos fases, dando el efecto de cooperatividad negativa. Este fenómeno puede estar relacionado con la proporción entre dímero y tetramero que observamos en el análisis cromatográfico. Como alternativa utilizamos un modelo propuesto para el análisis de la unión de la GlcNAc6P a la proteína NagB nanoencapsulada en geles. Debido a que las subunidades de NagB pierden comunicación entre ellas por la restricción de la nanoencapsulación, se crea una heterogeneidad de especies con dos afinidades diferentes por la misma molécula. En conjunto la curva se observó como una saturación con cooperatividad negativa. Para el caso de NagC, el efecto también se observó previamente en la unión de GlcNAc6P cuando la proteína está formando un complejo con la secuencia operadora *nagB*. Estudios futuros pueden enfocarse en estudiar el rol a nivel fisiológico de la unión de estas azúcares.

Para fines de este trabajo, uno de los efectos más importantes de las saturaciones fue que ninguno de los azúcares causó la agregación visible de la proteína como ocurre con el inductor. Esto demuestra, en primer lugar, que el efecto de agregación es específico de la GlcNAc6P. Por otra parte, también demuestra que el cambio conformacional que se observa por el apagamiento del Trp es necesario, pero no suficiente para causar la agregación de NagC.

En conjunto, la estabilidad de la proteína en ausencia de ligantes, y el efecto específico de la GlcNAc6P para causar su agregación, así como la contribución en la estabilidad por parte de CAP y del Zn^{2+} , nos llevan a proponer que la agregación de NagC es parte del mecanismo de regulación de los operones *nagE-BAC*.

7.5 Regulación de los operones divergentes *nagE-BAC*.

La formación de asa de represión está caracterizada tanto *in vitro* como *in vivo*. El desfaseamiento o mutaciones en alguna de las regiones operadoras causa defectos en la represión de ambos operones *in vivo*, lo que demuestra que la represión en ausencia de asa no ocurre [27]. Este hecho indica que, en la célula, la forma tetramérica es la conformación que une a la GlcNAc6P para iniciar el proceso de inducción.

Por otra parte, en condiciones normales, la GlcNAc6P causa que NagC se disocie del DNA. Este efecto se puede estudiar tanto en experimentos de footprint como de retardos. En este trabajo mostramos dicho efecto en un experimento de retardo (Figura 16). Tomando en cuenta la disociación del DNA como reportero de la afinidad por la GlcNAc6P, podemos calcular una constante de disociación por el inductor, a través del cambio de intensidad de las bandas de la sonda de DNA libre en el gel a distintas concentraciones de GlcNAc6P (Figura 17). La $K_{0.5}$ por la GlcNAc6P observada es de 16.1 μM con un coeficiente de Hill de 1.37. El efecto es distinto cuando la proteína se encuentra formando el complejo ternario con CAP, en donde la $K_{0.5}$ por la GlcNAc6P es de 248 μM . La diferencia de afinidades en ausencia y presencia de CAP, permite observar una diferencia de afinidades entre dos estados oligoméricos distintos. Al existir un complejo ternario NagC-DNA-CAP, NagC prácticamente no se disocia del DNA. Esto se puede explicar mediante la estabilización del asa de represión por CAP, que a su vez estabiliza la formación del tetrámero de NagC, el cual aparentemente presenta una mayor constante de disociación por el DNA; en este caso en los geles de retardo se puede observar la fuerte estabilización del asa y el estado tetramérico. Una vez que NagC se separa del DNA, debe tener una estrategia para mantenerse disociada de su secuencia operadora. Una alternativa sería manteniendo unida la GlcNAc6P, no obstante, se esperaría que la afinidad de NagC por el inductor aumente al estar separada del DNA y en este trabajo se demuestra lo contrario. La constante de disociación aparente de NagC por la GlcNAc6P en ausencia de DNA es de 57 μM mientras que en presencia de este es de 16 μM , lo que implica que el DNA funciona como activador alostérico para el sitio de la GlcNAc6P. Por lo que debe ocurrir un paso más en el mecanismo de desrepresión que la mantenga separada del DNA. Nuestra propuesta es que la GlcNAc6P causa una desnaturalización irreversible de NagC cuando se separa del DNA. La idea está sustentada en que encontramos que la GlcNAc6P causa un fenómeno de agregación específico y que este ocurre únicamente cuando la proteína está disociada del DNA (Figura 26). Esta alternativa daría una explicación que resuelva el problema entre la similitud de afinidades entre NagC y NagB por el mismo ligante, evitando la competencia. Al inducirse los genes del operón, la GlcNAc6P funciona como activador alostérico de la enzima NagB. La afinidad de NagB por la GlcNAc6P es de aproximadamente 30 μM , un valor muy cercano al calculado para NagC. Este hecho causaría una competencia entre NagC y NagB por la GlcNAc6P, teniendo como efecto por un lado que NagC pueda unirse nuevamente al DNA y formar el asa de represión y por otro que NagB no alcance el nivel de activación que se ha reportado en condiciones fisiológicas. También evitaría que vuelva a formar el asa de

represión, que es estabilizado por CAP, incluso se ha reportado que es más estable en presencia de cAMP (condiciones de activación de CAP).

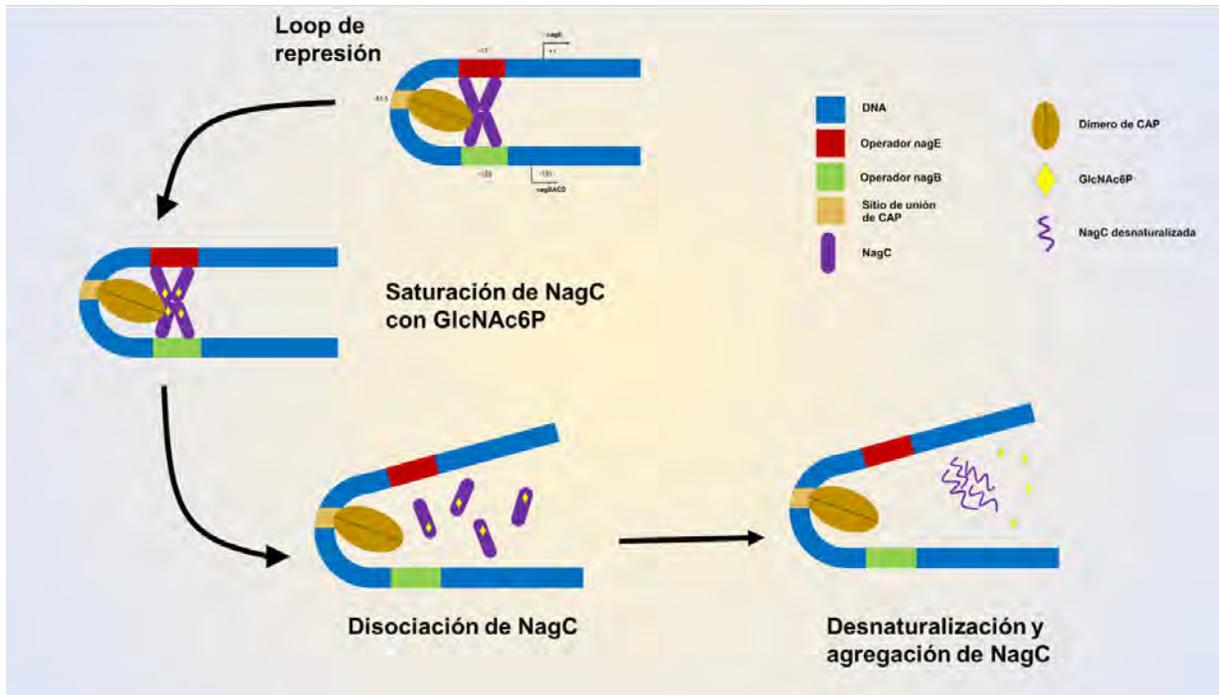


Figura 26. Modelo de inducción de los operones divergentes *nagE-BAC*. La asa de represión formado por NagC, es estabilizado por CAP, al saturarse NagC con el inductor se disocia del DNA, posteriormente se desnaturaliza y agrega de manera irreversible, dejando libre la GlcNAc6P para la activación de NagB.

8. Conclusiones

El equilibrio oligomérico de NagC es complejo, sin embargo, en presencia de DNA NagC presenta un equilibrio principalmente entre dímero y tetrámero.

La afinidad de NagC unida al DNA por la GlcNAc6P disminuye en presencia de CAP.

La agregación causada por la GlcNAc6P es un efecto causado específicamente por este ligante.

Los sitios de unión a la GlcNAc6P y al Zn^{2+} están acoplados. El posible mecanismo de inducción de NagC depende de la pérdida de la coordinación del Zinc, que a la vez está relacionado con las concentraciones crecientes de GlcNAc6P.

NagC es capaz de unir diferentes aminoazúcares, lo que implica que en *E. coli* cumple una función más compleja en el metabolismo de aminoazúcares.

9. Referencias.

- [1] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- [2] Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3), 318-356.
- [3] Swint-Kruse, L., & Matthews, K. S. (2009). Allostery in the LacI/GalR family: variations on a theme. *Current opinion in microbiology*, 12(2), 129-137.
- [4] Monod, J., Changeux, J. P., & Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of molecular biology*, 6(4), 306-329.
- [5] Peracchi, A., & Mozzarelli, A. (2011). Exploring and exploiting allostery: Models, evolution, and drug targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(8), 922-933.
- [6] Paul, F., & Weikl, T. R. (2016). How to distinguish conformational selection and induced fit based on chemical relaxation rates. *PLoS Comput Biol*, 12(9), e1005067.
- [7] Vogt, A. D., & Di Cera, E. (2012). Conformational selection or induced fit? A critical appraisal of the kinetic mechanism. *Biochemistry*, 51(30), 5894-5902.
- [8] Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of molecular biology*, 12(1), 88-118.
- [9] Zonszein, S., Álvarez-Añorve, L. I., Vázquez-Núñez, R. J., & Calcagno, M. L. (2014). The tertiary origin of the allosteric activation of *E. coli* glucosamine-6-phosphate deaminase studied by sol-gel nanoencapsulation of its T conformer. *PloS one*, 9(5), e96536.
- [10] Wyman, J. (1964). Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Advances in protein chemistry*, 19, 223-286.
- [11] Ackers, G. K., & Johnson, M. L. (1981). Linked functions in allosteric proteins: Extension of the concerted (MWC) model for ligand-linked subunit assembly and its application to human hemoglobins. *Journal of molecular biology*, 147(4), 559-582.
- [12] Chen JK, Shen CR, Liu CL: N-acetylglucosamine: production and applications. *Mar Drugs* 2010;8:2493-2516.

- [13] Milewski S: Glucosamine-6-phosphate synthase – the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta* 2002;1597:173-192.
- [14] White RJ: The role of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in the transport of N-acetyl-d-glucosamine by *Escherichia coli*. *Biochem J* 1970;118:89-92.
- [15] Jones-Mortimer MC, Kornberg HL: Amino-sugar transport systems in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* 1980;117:369-376.
- [16] Peri KG, Waygood EB: Sequence of cloned enzyme IIN-acetylglucosamine of the phosphoenolpyruvate:N-acetylglucosamine phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1988;27:6054-6061.
- [17] Midelfort CF, Rose IA: Studies on the mechanism of *E. Coli* glucosamine-6-phosphate isomerase. *Biochemistry* 1977;16:1590-1596.
- [18] Calcagno M, Campos PJ, Mulliert G, Suastegui J: Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *E. Coli*. *Biochem Biophys Acta* 1984;787:165-173.
- [19] Souza J-M, Plumbridge JA, Calcagno ML: N-acetyl-d-glucosamine-6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*: purification and molecular and kinetic characterization. *Arch Biochem Biophys* 1997;340:338-346.
- [20] Alvarez-Anorve, L. I., Calcagno, M. L., & Plumbridge, J. (2005). Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *Journal of bacteriology*, 187(9), 2974-2982.
- [21] Plumbridge J, Kolb A: CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of *E. Coli*. *J Mol Biol* 1991;217:661-679.
- [22] Hosono K, Kakuda H, Ichihara S: Decreasing accumulation of acetate in rich 60ol io by *Escherichia* 60ol ion introduction of genes on a multicopy plasmid. *Biosci Biotech Biochem* 1995;59:256-261.
- [23] Plumbridge J, Regulation of the Utilization of Amino Sugars by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: Same Genes, Different Control. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2015;25:154-167

- [24] El Qaidi S, Allemand F, Oberto J, Plumbridge J: Repression of galP, the galactose transporter in Escherichia coli, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism. *Mol Microbiol* 2009;71:146-157.
- [25] Plumbridge J, Kolb A: CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of E. coli. *J Mol Biol* 1991;217:661-679.
- [26] Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MH: Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology* 1994;140:2349-2354.
- [27] Plumbridge J, Kolb A: Nag repressor-operator interactions: protein-DNA contacts cover more than two turns of the DNA helix. *J Mol Biol* 1995;249:809-902.
- [28] Plumbridge J, Kolb A: DNA loop formation between Nag repressor molecules bound to its two operator sites is necessary for repression of the nag regulon of Escherichia coli in vivo. *Mol Microbiol* 1993;10:973-981.
- [29] Dominique Bréchemier-Baey, Lenin Domínguez-Ramírez, Jacques Oberto, Jacqueline Plumbridge; Operator recognition by the ROK transcription factor family members, NagC and Mlc. *Nucleic Acids Res* 2015; 43 (1): 361-372. doi: 10.1093/nar/gku1265
- [30] Dana Mariel Díaz Jiménez: Estudio fisicoquímico del represor transcripcional nagc de Escherichia coli. Tesis para obtener el título de Bióloga 2015. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [31] Pace, N. J., & Weerapana, E. (2014). Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs. *Biomolecules*, 4(2), 419-434.
- [32] Huber, K. L., & Hardy, J. A. (2012). Mechanism of zinc-mediated inhibition of caspase-9. *Protein Science*, 21(7), 1056-1065.
- [33] Zou, M. H., Shi, C., & Cohen, R. A. (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of clinical investigation*, 109(6), 817-826.
- [8] Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., ... & Kelley, R. F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, 39(4), 633-640
- [34] Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy. Springer 2009.

- [35] El Qaidi, S., & Plumbridge, J. (2008). Switching control of expression of ptsG from the Mlc regulon to the NagC regulon. *Journal of bacteriology*, 190(13), 4677-4686.
- [36] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- [37] Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- [38] Álvarez-Añorve, L. I., Gaugué, I., Link, H., Marcos-Viquez, J., Díaz-Jiménez, D. M., Zonszein, S. Calcagno ML & Plumbridge, J. (2016). Allosteric Activation of Escherichia coli Glucosamine-6-Phosphate Deaminase (NagB) In Vivo Justified by Intracellular Amino Sugar Metabolite Concentrations. *Journal of bacteriology*, 198(11), 1610-1620.