

CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA HOMÓLOGA A PROTEÍNAS DE UNIÓN A BALSAS LIPÍDICAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Bautista Cervantes Rosa Damaris (1), Franco Bárcenas Bernardo (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo] | [rd.bautista@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [bfranco@ugto.mx]

Resumen

En este trabajo se presenta caracterización de una mutante en el gen *yqjK* de *E. coli*, el cual codifica para una proteína de función desconocida pero que tiene homología con proteínas de unión a balsas lipídicas. Se analizó su fenotipo en relación a su posible asociación con la membrana plasmática, por lo que se caracterizó la sensibilidad a compuestos que perturben la estructura membranar directa o indirectamente. Se hicieron ensayos; sugieren que la proteína YqjK esté relacionada con la estructura de la membrana interna así como de los mecanismos de señalización que controlan la quimiotaxis y el nado.

Abstract

In the present study, we characterized a mutant of *E. coli*, *yqjK* gene, which encodes a protein of unknown function but with homology to proteins that bind to lipid rafts. We analyzed the phenotype regarding their possible relationship with the plasma membrane. We characterized the sensitivity to compounds which interfere with the plasma membrane structure directly or indirectly. Droplet tests by serial dilutions of cells exposed to different compounds were tested. Finally, the effect on the swimming behavior of the mutant in comparison to the wild strain was analyzed. Our results suggest that the YqjK protein is related to the inner membrane as well as in the signaling mechanisms that control chemotaxis.

Palabras Clave

YqjK; microdominios.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Las proteínas son biomoléculas esenciales para el desarrollo de los procesos biológicos tanto a nivel celular como a nivel de sistemas. Generalmente, las proteínas no actúan de forma independiente, establecen interacciones dinámicas entre más de una proteína para llevar a cabo las funciones biológicas. [1]

Las membranas celulares están compuestas de un gran número de especies de lípidos distintas, que difieren en sus estructuras moleculares y las propiedades físico-químicas. Estos lípidos constituyentes tienden a unirse en microdominios.

El modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson en 1972 sugiere que todos los constituyentes de la membrana difunden libremente y, de este modo, distribuidos al azar. El modelo dejó abierta la posibilidad de la existencia de mecanismos para lograr un orden de largo alcance en un sistema fluido homogéneo.

Un concepto interesante en la organización de la membrana es la existencia propuesta de las balsas de lípidos o balsas de membrana. Las membranas de las células eucariotas organizan una variedad de proteínas relacionadas con la transducción de señales en microdominios o balsas que están enriquecidos en lípidos particulares tales como colesterol o esfingolípidos.

Las balsas de lípidos también albergan proteínas específicas. Una de las características más relevantes de las balsas lipídicas es la capacidad de estas regiones discretas de membrana para organizar un subconjunto específico de proteínas en el espacio y el tiempo, para lograr en última instancia, una especificidad en la organización de las redes de señalización y maquinarias de transporte.

Se ha demostrado recientemente que las bacterias también son capaces de organizar algunas cascadas de transducción de señales y transporte de proteínas en microdominios de membrana funcionales (fMMS) constituidas por lípidos específicos; es decir, las membranas bacterianas

contienen balsas de lípidos similares a los encontrados en las células eucariotas.

La Orientación de FMMS ofrece una estrategia interesante para inhibir simultáneamente un gran número de procesos fisiológicos que están relacionados con el desarrollo microbiano. [2]

Justificación

Los microdominios de membrana con composiciones lipídicas diferentes al resto de la membrana, denominados balsas de lípidos, representan un mecanismo potencial para compartimentar funciones celulares dentro del plano de las membranas biológicas. [3]

El estudio de las balsas de lípidos en bacterias es un campo de creciente importancia, que tiene como objetivo ampliar las investigaciones a otras especies bacterianas para determinar en última instancia si la organización de fMMS es una característica universal de bacterias y si existen diferencias fundamentales entre las diferentes especies.

El uso de herramientas bioinformáticas es actualmente la primera aproximación más robusta para la detección de la existencia de fMMS en diversas especies bacteriana. [2]

Yqik es una proteína de membrana de la familia PHB, función desconocida

El gen tiene una longitud de 1662 pares de bases, 553 aminoácidos, se predice que se localiza en la membrana interna con un posible dominio citoplasmático. [4]

El presente trabajo pretende determinar la localización intracelular de la proteína Yqik para iniciar estudios acerca de su posible función en la bacteria *E. coli*. Recientemente se han descrito micro-dominios ricos en lípidos que dan rigidez a la membrana de las células bacterianas. [5] y forma dominios, en particular en las regiones de los polos. Este fenómeno ha sido caracterizado en las bacterias *B. subtilis* y *E. coli* y se ha propuesto que existen microdominios membranales también en bacterias, que potencialmente participen en la regulación de la estructura de la membrana así como en la función de proteínas de señalización ancladas a esta. [2]

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó la sensibilidad a H₂O₂ 1.0%, SDS 0.6% y 0.5%, Paraquat 100mm, Glicina 300mm.

Se cultivó en medio LB líquido con Kandamicina 50 µg/ml la cepa mutante en el gen *yqik* y la cepa silvestre en medio LB únicamente. Se hicieron los ensayos de goteo de las cepas, con una densidad óptica inicial de 0.500 y generando diluciones seriales hasta 10⁻⁴. Se sembraron 3 µl por gota y se incubaron a 37°C por 12 horas.

Se realizaron ensayos de motilidad de bacterias de las cepas silvestre y mutante en medio agar suave (peptona 1%, NaCl 0.5%, Agar 0.3%), y utilizando acetato de sodio 1mm con un pH de 5 como quimio-atrayente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Yqik es una proteína conservada entre enterobacterias. Usando la herramienta GenContII, se determinó su distribución en otras bacterias. En la Fig. 1 se muestra el resultado. Destaca que en enterobacterias guarda similitud con otros genes relacionados a metabolismo de azúcares y aminoácidos.

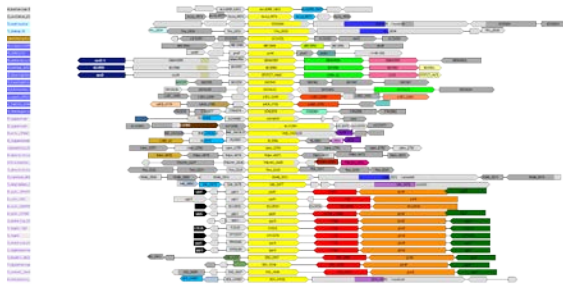


Fig. 1 Distribución de *Yqik* en bacterias.

Para determinar si *Yqik* participa como proteína esencial para la integridad de la membrana se hizo un análisis de compuestos que perturben la membrana. Se observó la sensibilidad de la membrana de la cepa silvestre y mutante, expuesta a los siguientes compuestos SDS 0.6%, H₂O₂ 1%, Paraquat 0.1mm, los cuales generan especies oxidadas de lípidos y Glicina 300mm que perturba la síntesis de la pared lo que expone la membrana a daño osmótico. En los resultados de este análisis que se muestran en la Fig. 2

claramente se observa que cuando estuvo expuesta la cepa mutante a los agentes perturbadores de membrana, Glicina y SDS y en menor grado al agente oxidante Paraquat, es más sensible ya que el número total de células viables disminuye.

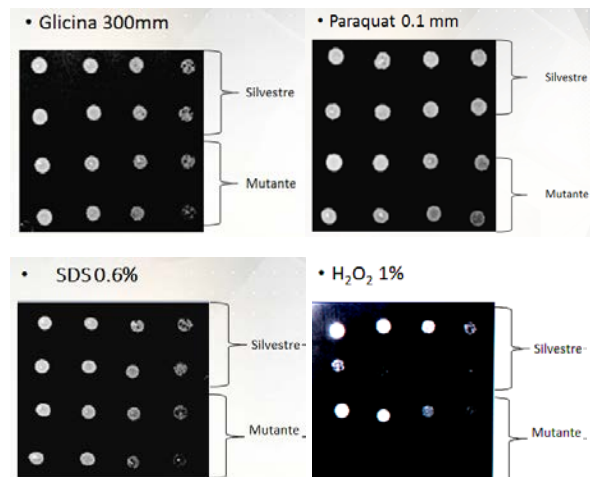


Fig 2. Fotografía de sensibilidad de membrana expuesta a Glicina 300mm, Paraquat 0.1mm, Peróxido de Hidrogeno 1%, SDS 0.6%

El ensayo de motilidad analizado en medio agar suave y medio suave/acetato de sodio. Se observa claramente como el nado de las bacterias silvestres es más lento que el de la cepa mutante, siendo más marcada la diferencia en ausencia de un quimio-atrayente como el acetato de sodio. Se estudió en un periodo de 18 horas a temperatura ambiente, donde se obtuvo una mayor diferencia. Observándose el nado notorio de la cepa mutante a partir de las 4 horas de haber inoculado las pacas. Ver Fig. 3

El orgánulo encargado de la motilidad en bacterias es el flagelo, en esta bacteria está constituido por subunidades de proteína y su desplazamiento es rotario. La estructura del flagelo es la que permite que desde un motor embebido en la superficie celular transmita una fuerza de rotación que genera un empuje mecánico, permitiendo a las bacterias cambiar aleatoriamente de dirección, y llamando a esto nado de bacterias.

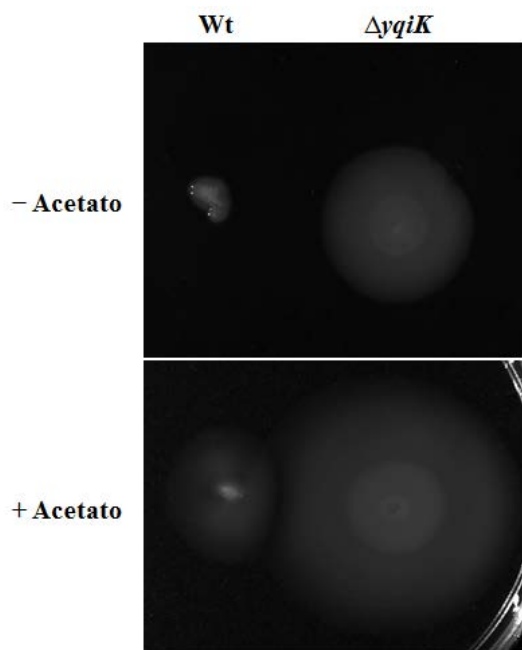


Fig. 3. Fotografía de Placas de nado de bacterias con acetato de sodio (parte inferior) y sin acetato de sodio (parte superior), de las cepas silvestre (wt) y mutante.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que Yqik es una proteína cuya función puede estar involucrada tanto en la estructura de la membrana/pared celular así como en el correcto funcionamiento de los mecanismos de transducción de señales para la regulación del flagelo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Felipe Padilla Vaca y la Dra. Ángeles Serrano Rangel.

A M.C Fátima Berenice Montiel y la QFB. Sairy Yareli Andrade por su apoyo en el laboratorio.

A Narciso Ulises Elizarraraz Vargas y Luis Alberto Hernández Zarate por su apoyo en el proceso experimental del proyecto.

PERSPECTIVAS

Con este trabajo se pretende generar construcciones para fusionar el quimio-receptor de serina TSR y Yqik a una proteína roja fluorescente mediante microcopia confocal para determinar la localización subcelular de la proteína Yqik. Con respecto a una proteína que tiene localización en los polos.

REFERENCIAS

- [1] Maynou J, Pairó E, Massanet R, Vallverdú M, Caminal P, y Perera A. Caracterización y análisis de las interacciones de regulación entre los factores de transcripción y los genes. *String*,
- [2] Bramkamp M, Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015 Mar;79(1):81-100.
- [3] Browman DT, Hoegg MB, Robbins SM. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Elsevier Volumen 17(8)*
- [4] EcoCyc, A member of the BioCyc database collection
- [5] Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol.* 2006 Sep;61(5):1110-7.