



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

**Implicación de las arsenito permeasas y arseniato reductasas de
Corynebacterium glutamicum en los procesos biológicos de
desintoxicación de arsénico**

**Role of arsenite permeases and arsenate reductases of
Corynebacterium glutamicum in the biological
mechanisms of arsenic detoxification**

Almudena Fernández Villadangos

León, 2011

**Memoria que presenta para optar al
grado de Doctor en Biología**

**Almudena Fernández Villadangos
León, 2011**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que me han ayudado durante la elaboración de esta Tesis Doctoral:

A mis directores de Tesis, los Doctores Luís Mariano Mateos y José Antonio Gil Santos, por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral, por su dirección y su apoyo.

A los Doctores Barry Rosen, de la Universidad Internacional de Florida en Miami, y Joris Messens, de la Universidad Libre de Bruselas, por dedicarme parte de su tiempo y disponibilidad en su laboratorio para el desarrollo de parte de este estudio.

Gracias a todos los compañeros del área de Microbiología con los que he compartido todo este tiempo, y en especial a María, Graciela, Carmen, Ástrid, Efrén y Michal, por todos los momentos que pasamos juntos, los recuerdos y las risas.

También quiero dar las gracias a Fu, Xuan, Jianbo, Yoshi, Jie, Mou, Jitesh, Kavitha, Karo, Ola, Koen, Khadija, Wael y Verónica, por ayudarme en las estancias tanto fuera como dentro del laboratorio.

A las instituciones que han hecho posible llevar a cabo esta investigación y en especial a la Junta de Castilla y León, por haberme otorgado una beca que ha permitido la realización de este trabajo.

En especial quiero agradecer a mis padres, hermana, hermano y a Rubén, por cuidarme durante este tiempo que he sido absorbida por este trabajo, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento y por estar siempre ahí.

Por último, quiero mencionar también a todos mis amigos y amigas que durante estos cuatro años me han mostrado su afecto y me han permitido desconectar del trabajo.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Abreviaturas	13
Resumen	15
<i>Summary</i>	16
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. El género <i>Corynebacterium</i>	19
1.2. El arsénico: situación actual	22
1.2.1. El arsénico como veneno	22
1.2.2. Especies de arsénico y su toxicidad	23
1.2.3. Distribución ambiental del arsénico: ciclo biogeoquímico	26
1.2.4. Efectos del arsénico sobre la salud humana	28
1.2.5. Aplicaciones médicas del arsénico	29
1.2.6. El arsénico y el estrés oxidativo	30
1.3. Mecanismo bioenergético microbiano ligado al arsénico: el arsénico como fuente de energía	33
1.4. Sistemas de entrada de arsénico en las células	36
1.4.1. Entrada de arseniato en la célula	36
1.4.2. Entrada de arsenito en la célula	39
1.5. Mecanismos de resistencia a arsénico en microorganismos	41
1.5.1. Metilación de arsénico	41
1.5.2. Quelación o secuestro de arsénico en compartimentos u órganos intracelulares	44
1.5.2.1. Proteínas con capacidad quelante de arsénico: Fitoquelatinas	44
1.5.2.2. Proteínas con capacidad quelante de arsénico: Metalotioneinas	46
1.5.3. Operones <i>ars</i> de resistencia a arsénico	47
1.6. Mecanismo de acción de los operones <i>ars</i>	53
1.6.1. Regulación transcripcional de los operones <i>ars</i>	53
1.6.2. Sistemas de reducción de arseniato	56
1.6.2.1. Arseniato reductasas dependientes del sistema Trx/TrxR	57

1.6.2.2.	Arseniato reductasas dependientes del sistema GSH/Grx	60
1.6.2.3.	Arseniato reductasas dependientes del sistema MSH/Mrx	65
1.6.3.	Sistemas de salida de arsenito de las células	68
1.6.3.1.	Proteínas de la familia ArsB	69
1.6.3.2.	Proteínas de la familia Acr3	77
1.6.3.3.	Proteínas de la familia MRP	79
1.7.	Técnicas de eliminación de arsénico del ambiente:	
	 biorremediación	80
1.8.	Objetivos	82
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	85
2.1.	Materiales	85
2.1.1.	Medios de cultivo para microorganismos	85
2.1.1.1.	Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	85
2.1.1.2.	Medios de cultivo para <i>C. glutamicum</i>	86
2.1.1.3.	Aditivos de los medios de cultivo	87
2.1.2.	Microorganismos	88
2.1.2.1.	Cepas utilizadas	88
2.1.2.2.	Crecimiento	88
2.1.2.3.	Mantenimiento	89
2.1.3.	Vectores	89
2.1.4.	Ácidos nucleicos	89
2.2.	Introducción de ADN	89
2.2.1.	Transformación de <i>E. coli</i>	89
2.2.1.1.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método del TSS	90
2.2.1.2.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método de cloruro de rubidio	90
2.2.1.3.	Procedimiento de transformación	91
2.2.2.	Electrotransformación de corinebacterias	92
2.2.2.1.	Preparación de células electrocompetentes	92
2.2.2.2.	Procedimiento de electrotransformación	93
2.2.3.	Conjugación entre <i>E. coli</i> y <i>C. glutamicum</i>	93
2.3.	Técnicas generales de manipulación y análisis del ADN	95

2.3.1.	Aislamiento de ADN total	95
2.3.1.1.	Aislamiento de ADN total a gran escala	95
2.3.1.2.	Aislamiento de ADN total a pequeña escala	96
2.3.2.	Aislamiento de ADN plasmídico	96
2.3.2.1.	Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	96
2.3.2.2.	Aislamiento de ADN plasmídico de corinebacterias	97
2.3.3.	Manipulación de ADN	98
2.3.3.1.	Eliminación de ARN y desproteización de ADN	98
2.3.3.2.	Digestión y manipulación de ADN	99
2.3.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	102
2.3.5.	Mutagénesis dirigida	104
2.3.6.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	106
2.3.6.1.	Extracción de ADN a partir de geles de agarosa	107
2.3.7.	Secuenciación de ADN y análisis bioinformático	107
2.4.	Técnicas de análisis de proteínas	110
2.4.1.	Preparación de extractos crudos de <i>E. coli</i> y <i>C. glutamicum</i> .	110
2.4.1.1.	Perlas de vidrio (<i>FastPrep</i>)	110
2.4.1.2.	Sonicación	110
2.4.1.3.	Prensa francesa	111
2.4.2.	Extracción heteróloga de proteínas en <i>E. coli</i> para su posterior purificación	111
2.4.2.1.	Expresión de los genes en <i>E. coli</i>	111
2.4.2.2.	Análisis de la expresión heteróloga de proteínas solubles	112
2.4.2.3.	Análisis de la expresión heteróloga de proteínas transmembranales	112
2.4.3.	Análisis del nivel de expresión de proteínas de <i>C. glutamicum</i>	113
2.4.3.1.	Expresión de los genes de <i>C. glutamicum</i>	113
2.4.3.2.	Análisis de expresión de proteínas solubles de <i>C. glutamicum</i>	114
2.4.3.3.	Análisis de expresión de proteínas transmembranales de <i>C. glutamicum</i>	114
2.4.4.	Cuantificación de proteínas	114
2.4.5.	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	115
2.4.6.	Tinción de geles de poliacrilamida	117
2.4.6.1.	Tinción con azul de Coomassie	117
2.4.6.2.	Tinción con plata	118
2.4.7.	Transferencia de proteínas a membranas	118
2.4.8.	Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas	119
2.4.9.	Purificación de proteínas con cola de histidinas	120

2.4.9.1. Usado células de <i>E. coli</i> : purificación <i>in vivo</i>	120
2.4.9.2. Purificación <i>in vitro</i>	122
2.4.10. Membranas invertidas	123
2.4.10.1. Preparación de membranas invertidas	123
2.4.10.2. Análisis de fluorescencia con membranas invertidas	126
2.4.10.3. Análisis de transporte de metales con membranas invertidas	128
2.4.11. Análisis de la actividad arseniato reductasa	129
2.4.11.1. Sistema redox Trx/TrxR	130
2.4.11.2. Sistema redox GSH/Grx	130
2.4.11.3. Sistema redox MSH/Mrx	131
2.4.12. Espectrometría de masas	133
2.4.13. Obtención de anticuerpos policlonales	133
2.5. Análisis microbiológicos	134
2.5.1. Análisis de resistencia a metales	134
2.5.2. Análisis de entrada/acumulación de metales en células	135
2.5.2.1. Cantidad total de metal retenido en células por ICP-MS	135
2.5.2.2. Análisis de especies de arsénico por espectrometría de absorción atómica	136
2.5.3. Observación microscópica de microorganismos	137
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	141
3.1. Mecanismos de entrada y salida de arsenito en <i>C. glutamicum</i>	141
3.1.1. Sistema de entrada de arsenito en <i>C. glutamicum</i>	141
3.1.2. Caracterización de las proteínas arsenito permeasas de <i>C. glutamicum</i>	145
3.1.2.1. Las arsenito permeasas de <i>C. glutamicum</i> pertenecen a la familia Acr3	147
3.1.2.2. Grado de implicación de las proteínas arsenito permeasas en la resistencia a arsénico de <i>C. glutamicum</i>	149
3.1.2.2.1. La proteína CgAcr3-3 no está implicada en la resistencia a arsénico en <i>C. glutamicum</i>	150
3.1.2.2.2. Las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 tienen diferente grado de participación en la resistencia a arsénico en <i>C. glutamicum</i>	155
3.1.2.3. Identificación de la fuente de energía asociada a la proteína CgAcr3-1	161
3.1.2.4. La proteína CgAcr3-1 actúa como un antiportador de arsenito y protones	169

3.1.2.5. La arsenito permeasa CgAcr3-1 es específica de arsenito	173
3.1.2.6. Modelo topológico transmembranal de la proteína CgAcr3-1	176
3.1.2.7. Identificación de residuos de CgAcr3-1 implicados en el transporte de arsenito	179
3.1.2.8. Implicación de los residuos C129 y E305 en el transporte de arsenito a través de la proteína CgAcr3-1	184
3.1.3. Incremento de la entrada de arsenito en <i>C. glutamicum</i> y su aplicación en procesos de biorremediación	188
3.2. Mecanismos de reducción de arseniato en <i>C. glutamicum</i>	192
3.2.1. Análisis de las arseniato reductasas CgArsC1' y CgArsC4 de <i>C. glutamicum</i>	192
3.2.1.1. Identificación <i>in vivo</i> de las arseniato reductasas en <i>C. glutamicum</i> mediante <i>Western blot</i> .	198
3.2.1.2. Análisis <i>in vivo</i> de la actividad arseniato reductasa de la proteína CgArsC1' en <i>C. glutamicum</i>	202
3.2.1.3. La arseniato reductasa CgArsC1' está acoplada al sistema redox Trx/TrxR	206
3.2.1.4. La proteína CgArsC4 no está implicada en la resistencia a arseniato en <i>C. glutamicum</i>	207
3.2.2. Análisis de acumulación de arseniato en mutantes de <i>C. glutamicum</i> y su aplicación en procesos de biorremediación	211
3.3. Discusión general	216
4. CONCLUSIONES.....	227
4.1. Conclusiones	227
4.2. <i>Conclusions</i>	230
5. ANEXOS	235
Anexo 1. Intento de purificación de la proteína arsenito permeasa CgAcr3-1 de <i>C. glutamicum</i>	236
Anexo 2. Identificación y estudio de las micorredoxinas de <i>C. glutamicum</i>	239

A2.1. Inactivación de los genes que codifican para las micorredoxinas en <i>C. glutamicum</i>	243
A2.2. Análisis <i>in vitro</i> de la proteína CgMrx3 de <i>C. glutamicum</i>	247
Anexo 3. Estrategias de clonación	250
A3.1. Clonación de los genes en vectores para expresión de proteínas	250
A3.2. Interrupción génica	251
A3.3. Complementación o aumento de la expresión génica	253
A3.4. Fusión de proteínas a cola de histidinas	256
Anexo 4. Oligonucleótidos, plásmidos y cepas	257
Tabla A4.1. Oligonucleótidos	257
Tabla A4.2. Plásmidos utilizados en este trabajo	260
Tabla A4.3. Plásmidos construidos en este trabajo	262
Tabla A4.4. Cepas utilizadas en este trabajo	266
Tabla A4.5. Cepas obtenidas en este trabajo	269
6. BIBLIOGRAFÍA	275

Abreviaturas

A: adenosina	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ABC: <i>ATP-Binding cassette</i>	FAD: flavín adenín dinucleótido
AcCoA: acetil Coenzima A	FMN: flavín mononucleótido
ADN: ácido desoxirribonucleico	
ADNasa: desoxirribonucleasa	g: gramo
ADP: adenosina 5' difosfato	G: guanosina
Am: antibiótico apramicina	GDP: guanosina 5' difosfato
am: gen de resistencia a apramicina	Grx: glutaredoxina
Am^R: fenotipo resistente a apramicina	GSH: glutatión
Ap: antibiótico ampicilina	GTP: guanosina 5' trifosfato
Ap^R: fenotipo resistente a ampicilina	GTR: glutatión reductasa
ARN: ácido ribonucleico	
ARNasa: ribonucleasa	h: hora
ARNm: ARN mensajero	H₂O_d: agua destilada
ARNr: ARN ribosomal	HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N-2-etanesulfónico
ARNt: ARN de transferencia	
ATCC: <i>American Type Culture Collection</i>	IAA: ácido indolacético
ATP: adenosina 5' trifosfato	ICP-MS: espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
ATPasa: adenosina 5' trifosfatasa	IPTG: isopropil-β-D-galactopiranosido
ATSDR: Agencia de sustancias tóxicas y registro de enfermedades de Estados Unidos (<i>Agency for Toxic Substances & Disease Registry</i>)	
	kan: gen de resistencia a kanamicina
BART: <i>Bile acid/Arsenite/Riboflavin Transport</i>	kat: catalasa
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	kb: kilobases
bla: gen de resistencia a ampicilina	kDa: kilodalton
BrEt: bromuro de etidio	Km: antibiótico kanamicina
BSA: sero albúmina bovina	Km^R: fenotipo resistente a kanamicina
	Kpb: kilo pares de bases
C: citidina	KSCN: sulfocianuro de potasio
cat: gen de resistencia a cloranfenicol	
CCA: arseniato de cobre y cromo	LMW: bajo peso molecular (<i>Low Molecular Weight</i>)
CCCP: carbonil cianida m-clorofenilhidrazona	LB: <i>Luria-Bertani</i>
CIA: cloroformo-alcohol isoamílico	
Cm: antibiótico cloranfenicol	Mb: megabases
cm: centímetro	MCS: sitio de clonación múltiple (<i>multicloning site</i>)
Cm^R: fenotipo resistente a cloranfenicol	MFS: <i>Mayor Facilitator Superfamily</i>
	min: minuto
dATP: desoxiadenosina 5' trifosfato	MIP: <i>Mayor Intrinsic Protein</i>
dCTP: desoxicitidina 5' trifosfato	MMC: medio mínimo para corynebacterias
DDM: N-dodecil-β-D-maltósido	MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico
dGTP: desoxiguanosina 5' trifosfato	MRP: <i>multidrug resistance-associated protein</i>
DMSO: dimetilsulfóxido	Mrx: micorredoxina
DO: densidad óptica	MSH: micotiol
DTNB: ácido 5-5-ditiobis-2-dinitrobenzoico	MS-SM: micotiona
DTT: ditiotreitól	MT: metalotioneina
dTTP: desoxitiromidina 5' trifosfato	MTR: micotiona disulfuro reductasa

Abreviaturas

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaI: antibiótico ácido nalidíxico
NaI^R: fenotipo resistente a ácido nalidíxico
NBD: *nucleotide binding domain*
NBT: azul de nitrotetrazolio
NEM: N-etilmaleimida
nm: nanómetro
NTA: *nickel-nitritotriacetic acid*

°C: grado centígrado
OMS: organización mundial de la salud
ORF: marco de lectura abierto (*open reading frame*)
oriT: origen de transferencia
oriV-C: origen de replicación en corinebacterias
oriV-E: origen de replicación en *E. coli*

p/v: relación peso/volumen
PAGE: electroforesis en gel de poli(acrilamida) (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino
PC: fitoquelatina
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PCS: fitoquelatina sintasa
PEG: polietilenglicol
Pgen: promotor del gen correspondiente
P_i: fosfato inorgánico (ortofosfato)
Pit: transportador inespecífico de fosfato (*phosphate inspecific transport*)
PMS: fenazida metosulfato
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNpp: p-nitrofenil fosfato
ppb: partes por billón (americano)
ppm: partes por millón
psi: libras por pulgada cuadrada (*pounds per square inch*)
Pst: transportador específico de fosfato (*phosphate specific transport*)
PTPasa: proteína tirosina-fosfatasa (*protein tyrosin phosphate*)

rpm: revoluciones por minuto
ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
RT-PCR: *Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SAM: S-adenosil-metionina
SDS: dodecil sulfato sódico
SDT: *signal transduction domain*
Sod: superóxido dismutasa

sp.: especie
T: timidina
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TFA: trifluoro acético
TM: transmembrana
Tn: transposón
Trx: tioredoxina
TrxR: tioredoxina reductasa
TSB: *tryptic soy broth*

U: unidades
v/v: relación volumen/volumen
V: voltio

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Δp: gradiente electroquímico de protones o motivo de fuerza protónica

Δψ: potencial de membrana

ΔpH: gradiente de protones

λ_M: longitud de onda de emisión

λ_X: longitud de onda de excitación

μg: microgramo

μM: micromolar

μm: micrometro

Abreviaturas para aminoácidos		
Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

Resumen.

La actinobacteria *Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo saprófito que exhibe una elevada resistencia a arsénico en comparación con el resto de microorganismos analizados. El arsénico es un elemento natural y ampliamente distribuido en la naturaleza que resulta altamente tóxico para los seres vivos, incluido los humanos. *C. glutamicum* utiliza un sistema de desintoxicación de arsénico basado en la presencia cromosomal de dos operones *ars* en su cromosoma que contienen genes para arsenito permeasas, arseniato reductasas y los reguladores transcripcionales.

C. glutamicum tiene tres genes que codifican para las arsenito permeasas: CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3. Mediante estudios *in vivo* se ha identificado que las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 son funcionales con un grado de participación diferente, siendo CgAcr3-1 la permeasa más importante. Los estudios *in vitro* usando membranas invertidas junto con análisis *in vivo* han revelado que la proteína CgAcr3-1 está exclusivamente ligada al transporte de arsenito utilizando el motivo de fuerza protónica como mecanismo energético. La salida de arsenito va acompañada de una entrada de protones, es decir CgAcr3-1, actúa como una proteína antiportadora de arsenito y protones. Los análisis topológicos de la proteína CgAcr3-1 han mostrado que CgAcr3-1 tiene diez segmentos transmembrana y varios aminoácidos transmembranales implicados en el proceso de translocación de arsenito.

La reducción de arseniato citoplasmático en *C. glutamicum* es un proceso realizado principalmente por las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 dependientes del sistema redox micotiol/micorredoxina 1. Otros dos genes que codifican para las enzimas arseniato reductasas CgArsC1' y CgArsC4 han sido identificados en el genoma de *C. glutamicum*. Análisis *in vivo* e *in vitro* han permitido estudiar y clasificar a la proteína CgArsC1' dentro de la familia de arseniato reductasas dependientes del par redox tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. Sin embargo, no hemos podido demostrar que la proteína CgArsC4 sea sintetizada en *C. glutamicum*.

Finalmente, como aplicación práctica de los resultados obtenidos se han utilizado diferentes mutantes afectados en los genes de resistencia a arsénico de *C. glutamicum* como bioacumuladores de arsenito y arseniato, con objeto de usar los mutantes indicados en procesos de eliminación de arsénico.

Summary

Corynebacterium glutamicum is a saprophytic microorganism from the Actinobacteria group which shows a high level of arsenic resistance when compared with other analyzed microorganisms. Arsenic is a chemical element widely spread in environment and very toxic for organisms including humans. The arsenic detoxification mechanism in *C. glutamicum* is based on the presence of two chromosomal *ars* operons containing genes for arsenite permeases, arsenate reductases and metalloregulatory proteins.

C. glutamicum has three genes coding for the arsenite permeases CgAcr3-1, CgAcr3-2 and CgAcr3-3. *In vivo* studies have shown that the proteins CgAcr3-1 and CgAcr3-2 are functional, with a more important detoxification role for CgAcr3-1. *In vitro* analyses using everted membranes vesicles showed that arsenite permease CgAcr3-1 is only involved in the extrusion of arsenite, using the cellular protonmotive force as energetic mechanism and the protein is behaving as an antiporter As(III)/H⁺ pump. The topological analyses of CgAcr3-1 protein showed the presence of 10 transmembrane domains with several aminoacids involved in the As(III) translocation process.

The arsenate reduction in *C. glutamicum* is performed basically by the arsenate reductases CgArsC1 and CgArsC2 which depend on the mycothiol/mycoredoxin 1 redox system. Two additional genes coding for arsenate reductases CgArsC1' and CgArsC4 have been identified in *C. glutamicum* genome. *In vivo* and *in vitro* analyses of CgArsC1' have shown that CgArsC1' belongs to the thioredoxin/thioredoxin reductase arsenate reductase family; however we were unable to identify the CgArsC4 protein by *in vivo* assays in *C. glutamicum* cells.

Finally, as a practical application of these results, several *C. glutamicum* mutants involved in arsenic detoxification have been applied as arsenate or arsenite bacterial biocontainers in order to remove arsenic from the environment.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Corynebacterium*.

El género *Corynebacterium* fue descrito por Lehmann & Neumann (1907) para clasificar taxonómicamente a los bacilos de la difteria. Inicialmente el género fue definido en base a características morfológicas: *corynebacteria* proviene del griego κορυνή (corunè), bastón nudoso, y βακτηριου (bacterion), bastoncillo. En general las corinebacterias son bacilos Gram-positivos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos y pleomórficos, con formas bacilares de diversa longitud y frecuentes engrosamientos en los extremos. Su tamaño oscila entre 2-6 µm de longitud y 0,5 µm de diámetro (Cure & Keddie, 1973).

La pared celular de las corinebacterias se estructura como un entramado complejo de peptidoglicano con ácido meso-diaminopimélico en el interpéptido, polímeros de arabinogalactanos y cadenas de ácidos grasos saturados y no saturados de 21-36 átomos de carbono (Barksdale, 1970). A partir de estudios moleculares por ARNr 16S, las corinebacterias

se agruparon en la subdivisión de bacterias Gram-positivas de alto contenido en G+C en estrecha relación filogenética con *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e incluso *Streptomyces* (Fitch & Bruschi, 1987; Woese, 1987). A su vez, Goodfellow (1989) definió el grupo de actinomicetos nocardiformes, en el que engloba los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukanella*, y cuya característica principal es la presencia de ácidos micólicos y derivados en su pared celular. De acuerdo con estos criterios filogenéticos, en la segunda edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, las corinebacterias aparecerán en el volumen 5, dentro de la clase *Actinobacteria* y englobándose dentro del suborden *Corynebacterineae* (Goodfellow, 2010) (Figura 1.1).

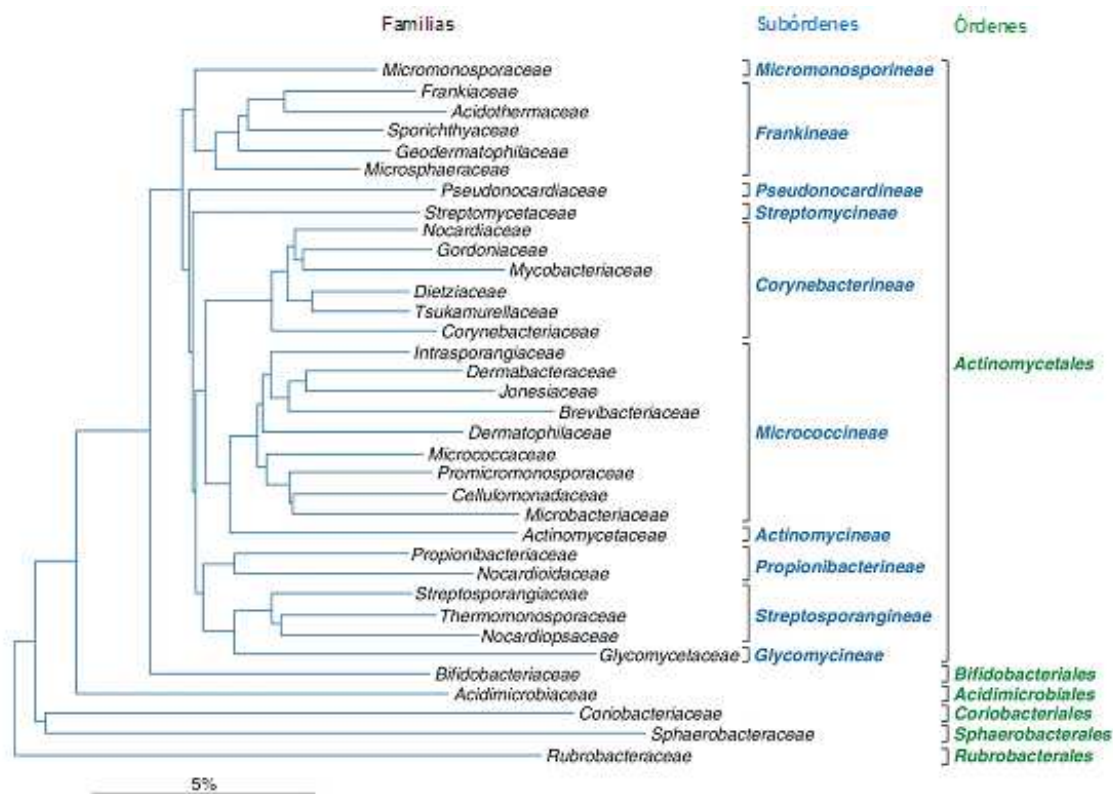


Figura 1.1. Clasificación de la clase *Actinobacteria*. Relaciones entre órdenes, subórdenes y familias basadas en los datos de ARNr 16S. La barra representa sustituciones de cinco nucleótidos en cien nucleótidos. Tomada de Stackebrandt *et al.*, (1997).

Las corinebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en mucosas y piel del hombre y animales. Algunas especies de este grupo son conocidas por sus efectos perjudiciales sobre el hombre, siendo *Corynebacterium diphtheriae* el patógeno más conocido (Costa *et al.*, 1981). En los últimos años, los avances en el campo de la microbiología

clínica han permitido la identificación de un gran número de especies del género *Corynebacterium* en muestras clínicas de humanos, consideradas como agentes patógenos oportunistas claramente asociados a enfermedades en pacientes inmunodeprimidos o con tratamientos crónicos. Bacterias como *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum* y *Corynebacterium freneyi* se aíslan frecuentemente de muestras clínicas (de Miguel-Martinez *et al.*, 1996; Esteban *et al.*, 1999; Renaud *et al.*, 1998; Renaud *et al.*, 2001; Fernández-Natal *et al.*, 2001).

El uso indiscriminado de antibióticos en medicina, agricultura y sanidad animal ha desencadenado una rápida diseminación de los genes de resistencia a antibióticos entre las bacterias, que a su vez se ha visto favorecida por el hecho de que estos genes se encuentran mayoritariamente localizados en plásmidos o transposones (Amyes, 1997). Recientemente, se ha observado la aparición de cepas de corinebacterias patógenas que son resistentes a diferentes antibióticos como es el caso de *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. urealyticum* o *Corynebacterium jeikeium* (Otsuka *et al.*, 2006; Funke *et al.*, 1996; Martínez-Martínez *et al.*, 1995; Olender & Letowska, 2010). En *Corynebacterium* sp. se han analizado los mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos macrólidos (Ortiz-Pérez *et al.*, 2010). Dichas resistencias a antibióticos han sido uno de los motivos que han llevado a la secuenciación del genoma de *C. jeikeium* y *C. urealyticum* (Tauch *et al.*, 2005; Tauch *et al.*, 2008).

Las especies de corinebacterias no patógenas han sido ampliamente utilizadas en la producción de metabolitos primarios (aminoácidos, como el ácido glutámico, o nucleótidos) o secundarios, la producción de queso, bioconversión de precursores de ácido L-ascórbico, conversión de esteroides y oxidación de terpenoides. Algunas corinebacterias pueden producir antibióticos y compuestos antitumorales (Kwaszewska & Szewczyk, 2007).

Las corinebacterias también están presentes en el suelo y el agua. Estudios de caracterización microbiológica de ambientes contaminados por compuestos orgánicos (cresol) o metales pesados (mercurio, arsénico, cadmio, oro, zinc, plomo y cobalto) (Margesin *et al.*, 2011; Fanous *et al.*, 2010; Lee *et al.* 2011) han demostrado la presencia de un considerable número de bacterias, la mayoría de ellas pertenecientes al grupo de las actinobacterias y más en concreto al género *Corynebacterium* (Margesin *et al.*, 2011). Esto hace pensar que los microorganismos se han adaptado a ambientes contaminados desarrollando mecanismos de resistencia a dichos contaminantes. Así, se han realizado análisis proteómicos en corinebacterias en respuesta a metales pesados (cobalto, oro, cadmio o mercurio) para elucidar los mecanismos de desintoxicación (Fanous *et al.*, 2010; Fanous *et al.*, 2008).

Parece evidente que existe una relación entre el hábitat natural de un microorganismo y la resistencia congénita del mismo a contaminantes o tóxicos. La presión evolutiva ha podido conducir a la adquisición de sistemas de resistencia a metales pesados en corinebacterias saprófitas como *Corynebacterium glutamicum*, mientras que en patógenos oportunistas como *C. diphtheriae* dichos sistemas han sido eliminados o podrían no haber existido nunca debido a que el contacto con los metales pesados de las corinebacterias que se encuentran en los humanos es relativamente bajo.

Dado que en esta memoria se ha intentado analizar y caracterizar, desde un punto de vista molecular, las proteínas implicadas en los procesos de resistencia a arsénico en *C. glutamicum*, en los siguientes apartados de esta introducción se realizará una visión global de las características del arsénico, así como de los mecanismos de resistencia de los organismos a dicho metal.

1.2. El arsénico: situación actual.

El arsénico (As) es un elemento cancerígeno, mutagénico y terapéutico que desde la antigüedad ha estado ligado íntimamente a la actividad humana. Actualmente el As es uno de los metaloides más ampliamente distribuido en la naturaleza, ocupando el número 20 en la lista de elementos más abundantes de la corteza terrestre con una concentración aproximada de 3 mg/Kg y formando parte de la composición de más de 200 minerales (Mandal & Suzuki, 2002; Zhao *et al.*, 2010). Su distribución en los diferentes ambientes de la corteza terrestre es muy variada y unido a que hasta la fecha y desde hace más de 10 años el As es el elemento químico con mayor toxicidad según la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR) (<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>), la exposición de los seres vivos (incluido el hombre) al As puede ser un hecho frecuente.

1.2.1. El arsénico como veneno.

El As es uno de los venenos más antiguos y conocidos por el hombre a lo largo de la historia. Su increíble acción y su dificultad de detección (sus síntomas se pueden confundir con los del cólera) ha hecho que el As haya sido considerado desde la Edad Media hasta la época del Renacimiento como “el rey de los venenos” por ser utilizado en diferentes conspiraciones y

homicidios (Vahidnia *et al.*, 2007). La idea de usar el As como un veneno ha sido incluso llevada a varias obras del cine y teatro.

El trióxido de diarsénico (As_2O_3), conocido antiguamente como anhídrido arsenioso, fue el compuesto “preferido” por los envenenadores para la consecución de sus fines. Entre los que hicieron uso del As_2O_3 en la Edad Media se encuentran la familia de los Borgia (Alexander VI y su hijo Cesar Borgia) que utilizaron el As contra cardenales y obispos de la Iglesia Católica para acrecentar su poder en Italia. En esa misma época en Francia la marquesa de Brinvilliers asesinó a la mayor parte de su familia por venganza y fue Luís XIV de Francia quien la descubrió, capturó y mandó decapitar y quemar en la hoguera. En la Inglaterra de la época victoriana, el uso de As como producto de belleza para mejorar la suavidad de la piel y el incremento notable del número de seguros de vida impulsó a utilizar el As para matar por motivos económicos, de venganza o celos. Una de las víctimas más famosas de envenenamiento por As es Napoleón Bonaparte. Aunque las últimas investigaciones apuntan a un cáncer estomacal como la causa más probable de su muerte, el hallazgo de elevadas cantidades de As en muestras de su cabello hizo postular la hipótesis de una posible exposición crónica externa al metaloide por un error en la medicación o por el uso de cosméticos con As (Lugli *et al.*, 2007; Kintz *et al.*, 2007). Recientes reanálisis sobre la muerte de Simón Bolívar, líder político Colombiano del siglo XIX, han apuntado a un posible asesinato por intoxicación con As como causa de su muerte, en contra de la muerte por tuberculosis como hasta ahora mencionaban los libros de historia (Auwaerter *et al.*, 2011).

1.2.2. Especies de arsénico y su toxicidad.

El As es un elemento clasificado como metaloide, que posee características químicas tanto de metales como de no metales y perteneciente al grupo XV y periodo 4 de la tabla periódica de elementos, junto al nitrógeno, fósforo, antimonio y bismuto. Su número atómico es 33 y su masa atómica es 74,92. El As se puede encontrar en la naturaleza en cuatro estados de oxidación: elemental (0), dos trivalentes (-3 o +3) y pentavalente (+5), donde el arseniato [+5, As(V)] y el arsenito [+3, As(III)] son las formas inorgánicas más comunes.

El As en estado puro (As elemental) se encuentra en raras ocasiones en la naturaleza, no obstante, se han localizado masas microcristalinas de este elemento en Siberia, Alemania, Francia, Italia, Rumanía y EE.UU. presentando un color gris metálico. Lo más común es encontrar el As combinado con azufre o con metales (manganeso, hierro, cobalto, níquel, plata, cobre o estaño) formando parte de minerales, donde la mayoría de ellos tienen una coloración

blanca o incolora. Los arseniuros metálicos más importantes son: arsenopirita (FeAsS), lollingita o löllingita (FeAs_2), cobaltita o cobaltina (CoAsS), domeykita (Cu_3As), niquelina (NiAs), rejalgar (As_4S_4) y oropimente (As_2S_3), todos ellos de origen hidrotermal; esto indicaría que se depositaron a partir de disoluciones acuosas a altas temperaturas, relacionadas con las últimas fases de la consolidación magnética o con las manifestaciones finales de una erupción volcánica (Drahota & Filippi, 2009).

El As aparece predominantemente en la naturaleza en forma inorgánica, As(V) o As(III) (Figura 1.2). El As(V) es mucho menos tóxico que el As(III). La toxicidad del arseniato viene dada por la similitud química con el fosfato y por ende la capacidad de sustituir al fosfato en los procesos bioquímicos donde éste participa (Fu *et al.*, 2011), por ejemplo, la síntesis de ATP o la fosforilación oxidativa pueden verse afectadas en presencia de arseniato (Mead, 2005; Gebel, 1997; Delnomdedieu *et al.*, 1994). Recientemente, se ha identificado una bacteria de la familia *Halomonadaceae* capaz de sustituir el fosfato presente en las macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) por arseniato (Wolfe-Simon *et al.*, 2010); no obstante hay ciertas dudas acerca de la reproducibilidad de dicho trabajo (Rosen *et al.*, 2011). El As(III) es considerablemente mucho más tóxico que el As(V). Su toxicidad es debida a la capacidad de formar uniones covalentes fuertes y estables con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteínas o con los grupos imidazol de los residuos de histidinas de las proteínas, inhibiendo la acción de las mismas (Rosen, 2002b). Una de las enzimas que es inactivada por el As(III) es la piruvato deshidrogenasa, cuya inactivación provoca el bloqueo del ciclo de Krebs, interrupción de la fosforilación oxidativa, disminución de la formación de ATP lo cual desencadena finalmente en un desorden del metabolismo celular (Samikkannu *et al.*, 2003).

El As también puede encontrarse en la naturaleza en formas orgánicas como compuestos de As mono, di o trimetilado [MMA(III), DMA(III), TMA(III), MMA(V), DMA(V), TMA(V)], arsina (AsH_3) y metilarsinas, arsenobetaína, arsenoazúcares, arsenocolina y arsenolípidos (Figura 1.2). Generalmente las formas orgánicas de As son menos tóxicas que las formas inorgánicas, sin embargo algunas formas de As metilado (ver apartado 1.5.1 de esta Introducción) y las arsinas presentan mayor toxicidad que el As(III) inorgánico (Qin *et al.*, 2006). En condiciones totalmente anóxicas el As(III) puede ser reducido por los microorganismos del suelo a arsinas y metilarsinas, las cuales son compuestos volátiles y están consideradas como las especies de As más tóxicas de la naturaleza (Figura 1.2).

1.2.3. Distribución ambiental del arsénico: ciclo biogeoquímico.

Actualmente el As tiene una amplia distribución en la corteza terrestre estando presente en el suelo, el aire y el agua a diferentes concentraciones (Lièvremont *et al.*, 2009). Se estima que 100 millones de personas de más de 70 países se encuentran expuestas, en el agua de consumo, a niveles de As superiores a los permitidos. La zona del planeta más castigada por la presencia de altos niveles de As en el agua para uso alimentario es Asia, destacando Bangladesh e India, donde millones de personas utilizan agua con 50 µg/L de As, y por lo tanto superior a los 10 µg/L de As recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bhattacharya *et al.*, 2007). Estudios recientes han revelado que la calidad del agua subterránea en otras áreas de Asia como Nepal, Vietnam y Camboya, también exceden las cantidades de As permitidas por la OMS (Mukherjee *et al.*, 2008). Otras zonas afectadas por este problema son determinadas áreas de Australia, Canadá, EE.UU., países latinoamericanos como Méjico, Argentina, Bolivia, Brasil y Nicaragua y varios países europeos como Eslovaquia, Hungría, Polonia y Rumanía (Silver & Phung, 2005b).

El As, al igual que otros elementos químicos, presenta un ciclo biogeoquímico entre los seres vivos y el ambiente (atmósfera, biomasa y sistemas acuáticos) con dos principales vías de entrada del As en la biosfera: la vía geoquímica y la vía antropogénica (Centeno *et al.*, 2007) (Figura 1.3). En la primera de las vías el As es liberado de rocas y minerales por fenómenos atmosféricos o procesos químicos permitiendo movilizar el As presente en los minerales en oxianiones solubles [As(III) y As(V)] para depositarlos en el agua, el aire o el suelo (Oremland & Stolz, 2005) Las emisiones volcánicas y el metabolismo del As por determinados microorganismos también liberan a la atmósfera diferentes compuestos de As volátiles como DMA(III), TMA(III), TMA(V), arsinas y metilarsinas.

En la vía antropogénica, es la acción humana la cual acelera todo el proceso de movilización del As a la atmósfera, suelo y agua a través de procesos industriales, como el refinado de cobre, plomo o zinc, la producción de oro y la utilización de compuestos arsenicales manufacturados por el hombre (Lightfoot *et al.*, 2010). El 90% de estos compuestos arsenicales manufacturados por el hombre son protectores de madera, siendo el más utilizado el arseniato de cobre y cromo (CCA) (Khan *et al.*, 2006), estando prohibido su uso en EE.UU. y en Europa desde 2004. El 10% restante son compuestos usados en la ganadería como controladores de plagas como la roxarsona (ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilarsónico), compuesto

organoarsenicado sintético utilizado como paliativo frente a infecciones en granjas de cerdos y pollos, que genera residuos con alta concentración de As. Otros compuestos son utilizados como fertilizantes, herbicidas [MMA(V)] o fungicidas en la agricultura, decolorantes en la fabricación del vidrio (tríóxido de arsénico, As_2O_3) y semiconductores (arseniuro de galio) en diodos, emisores de luz y en células solares fotovoltaicas. Es también frecuente la utilización de sulfuros de As como pigmentos y en aplicaciones pirotécnicas.

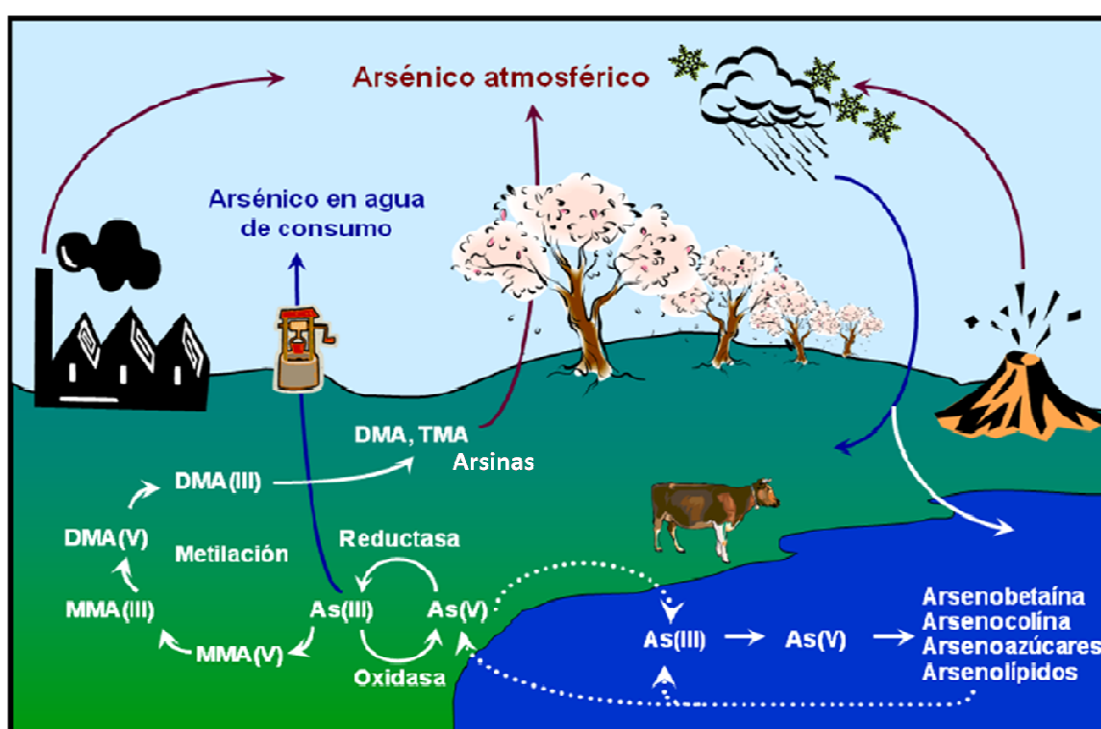


Figura 1.3. Ciclo biogeoquímico del arsénico. Modificada de Bhattacharjee & Rosen, 2007.

El As en forma soluble en la naturaleza se encuentra como As(III) o As(V) . El As(III) puede oxidarse química o enzimáticamente a As(V) , frecuentemente en zonas más superficiales de ambientes terrestres y acuáticos. El As(V) , es el compuesto de As más común en las aguas marinas, se incorpora por los organismos marinos (fitoplancton, peces, algas, moluscos y crustáceos) y se transforma en compuestos orgánicos sencillos [MMA(V) o DMA(V)] o formas orgánicas de As complejas o de almacenamiento (arsenobetaína, arsenoazúcares, arsenocolina o arsenolípidos) que son finalmente liberadas al ambiente (Figuras 1.2 y 1.3). De estos organismos marinos el fitoplancton y las algas son los principales productores de compuestos arsenicales complejos, pero estos organismos son también la ruta de entrada de As en las cadenas tróficas, por ser la fuente nutricional de los animales marinos. No se conoce

todavía cual es la ruta de síntesis de los arsenozucres y arsenolípidos pero se cree que su precursor principal es DMA(V) (Rosen *et al.*, 2011). Los peces y los invertebrados marinos (gambas, almejas, langostas) que se alimentan del fitoplancton retienen en sus tejidos As, y acumulan el 99% del As en forma de As orgánico como arsenobetaina. La arsenobetaina presente en los sedimentos de las aguas subterráneas costeras es degradada por acción del metabolismo microbiano a MMA(V) y finalmente a As(V), completando así el ciclo biogeoquímico del As (Figura 1.3).

1.2.4. Efectos del arsénico sobre la salud humana.

La elevada toxicidad del As y su ubicuidad en la corteza terrestre hace que la exposición de los seres humanos al As pueda ser habitual. En los animales, y más concretamente en los humanos, las vías de absorción habituales de As son principalmente tres: (i) la ingesta de alimentos; (ii) la inhalación de aire; (iii) la ingesta de agua.

Los niveles de As en los alimentos son generalmente bastante bajos, pero en algunos casos, como en los productos procedentes del mar (pescado, langostas, mejillones), estos niveles pueden llegar a ser mayores por la absorción directa del As a partir del agua. No obstante, las especies químicas de As que se acumulan en los organismos marinos son generalmente formas de As orgánico, especies menos tóxicas que las formas de As inorgánico (Rosen, 2002b). El verdadero problema de la ingesta de As se produce por el consumo de alimentos que presentan cantidades significativas de As inorgánico, como puede ocurrir con el arroz (Agusa *et al.*, 2010). El arroz es una importante fuente de entrada de As inorgánico en la cadena alimentaria debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de As y a que es el alimento que forma parte de la dieta de más de la mitad de la población del mundo (Meharg *et al.*, 2009).

Los riesgos de intoxicación por As son significativamente más elevados en aquellas personas que trabajan en procesos en los que se utilizan o se generan compuestos arsenicales (Katz & Salem, 2005), en individuos que toman grandes cantidades de vino (Greven *et al.*, 2007), en inquilinos de casas que contengan conservantes para la madera, como CCA (arseniato de cobre y cromo) (Zagury *et al.*, 2008) o en personas que vivan en granjas donde se hayan aplicado pesticidas con As (Robinson *et al.*, 2007). La mayor parte del As ingerido por el ser humano es rápidamente excretado por vía urinaria como As metilado, pero a pesar de ello, grandes cantidades de As se acumulan en diferentes tejidos como huesos, piel, pelo y

uñas, debido a la especial afinidad que tiene el As por la queratina (proteína muy rica en cisteínas) (Rice *et al.*, 2010).

La ingestión de elevadas cantidades de As inorgánico provoca graves problemas de salud (Centeno *et al.*, 2002; Balakumar & Kaur, 2009). Entre los efectos adversos más comunes encontramos irritaciones y afecciones gastrointestinales, además de alteraciones del sistema nervioso central que eventualmente causan la muerte (Vahidnia *et al.*, 2007). En etapas previas se observan disminuciones en la producción de glóbulos rojos y blancos (Heck *et al.* 2008), vómitos, diarreas, convulsiones, hemólisis, hepatomegalia, melanosis, polineuropatías y encefalopatías (Kapaj *et al.*, 2006). La ingesta de As inorgánico puede causar también patologías asociadas al sistema endocrino, como diabetes mellitus y bocio (Chen *et al.*, 2007), y al sistema vascular periférico, que en casos extremos evoluciona hacia episodios gangrenosos en las extremidades inferiores, afección más conocida como “enfermedad de los pies negros” (Pi *et al.*, 2005). Esta enfermedad fue descrita en Taiwan, y se cree que está relacionada con el hidroarsenicismo y la mala nutrición poblacional de la zona (Yoshida *et al.*, 2004); hoy en día la enfermedad de los pies negros es un grave problema en Bangladesh. Las especies inorgánicas de As están también asociadas con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer especialmente de piel, pulmón, vejiga, hígado y del tejido linfático, siendo clasificado el As inorgánico dentro del Grupo I de agentes cancerígenos humanos por la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer (Tokar *et al.*, 2011). Las personas que ingieren As presentan además problemas epidérmicos, como queratosis, cambios en la pigmentación de la piel o la enfermedad de Bowen (carcinoma epidérmico) (Kile *et al.*, 2011).

El As orgánico resulta menos nocivo que el As inorgánico, sin embargo se cree que los humanos pueden metabolizarlo a especies de As más tóxicas, y a dosis elevadas puede causar lesiones neuronales y dolores estomacales (Schmeisser *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2007).

1.2.5. Aplicaciones médicas del arsénico.

A pesar de su demostrada toxicidad, el As también se ha utilizado como agente terapéutico frente a diversos procesos patológicos durante más de 2.000 años. En la época de Hipócrates el As se usó para tratar abscesos ulcerados. Posteriormente los médicos han prescrito preparaciones de As para tratar alteraciones de la piel, tuberculosis, asma y lepra. Durante el siglo XIX, Thomas Fowler desarrolló un agente terapéutico conocido como la solución de Fowler combinando trióxido de arsénico (As₂O₃) con bicarbonato potásico (Scheidlin, 2005).

Esta solución se utilizó durante unos 200 años como tratamiento contra diferentes enfermedades como la malaria, la leucemia, la psoriasis y la dermatitis (Kwong & Todd, 1997). En 1905 se demostró que algunos compuestos de As eran eficaces contra la tripanosomiasis o enfermedad del sueño. Esto llevó a Paul Ehrlich, (quien recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908) a estudiar las propiedades del As y a sintetizar un compuesto conocido como Salvarsán o compuesto 606, la arsfenamina, que resultó ser extraordinariamente efectivo contra la sífilis y otras enfermedades infecciosas producidas por protozoos como la frambesia o la disentería amebiana. Hoy el As es considerado obsoleto en su uso como tratamiento contra la sífilis, habiéndose reemplazado por antibióticos más eficaces como la penicilina, pero todavía se utiliza contra la amebiasis y en estados avanzados de la enfermedad del sueño (Vahidnia *et al.*, 2007).

El Trisenox[®] es el fármaco derivado de As más conocido y se utiliza en el tratamiento paliativo de la leucemia promielocítica aguda; su principio activo es el compuesto As₂O₃. Desde 1970 varios grupos de investigadores están analizando el uso de As₂O₃ en la terapia contra el cáncer. Estudios recientes han demostrado que el As provoca la degradación de una proteína oncogénica, PML-RARalpha (*Promyelocytic Leukaemia Retinoic Acid Receptor Alpha*), causante de la proliferación de las células APL (*Acute Promyelocitic Leukaemia*), a pesar de que el mecanismo por el cual el compuesto As₂O₃ induce esa modificación no está del todo claro (Zhang *et al.*, 2010).

1.2.6. El arsénico y el estrés oxidativo.

Diversos estudios han demostrado que el As induce la formación de especies reactivas del oxígeno o especies ROS (*Reactive Oxygen Species*) en mamíferos y en levaduras, y disminuye los niveles de glutatión (GSH) reducido en el interior de la célula provocando un estado de estrés oxidativo (Bernstam & Nriagu, 2000; Flora *et al.*, 2011). En el ser humano, el estrés oxidativo está relacionado con diferentes enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, así como con el envejecimiento. En los últimos años se han encontrado evidencias de una correlación entre la formación de especies ROS, proliferación de cánceres y exposición a As (Shi *et al.*, 2004).

El estrés oxidativo en una célula es causado por la pérdida del equilibrio redox, es decir por un desequilibrio entre la producción de especies ROS y la capacidad de reparar el daño resultante, que causa efectos tóxicos en la célula. Las formas más importantes de especies ROS son los radicales anión superóxido (O₂^{•-}) y el radical hidroxilo (OH[•]) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las células han desarrollado mecanismos de defensa para mantener el

equilibrio redox y reparar el estrés oxidativo que se puede generar en su interior ante una pérdida del equilibrio redox. En condiciones normales, el radical anión $O_2^{\bullet-}$ generado se convierte rápidamente a H_2O_2 mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa (Sod) y el H_2O_2 es seguidamente convertido a agua por la proteína catalasa (Kat) o por la glutatión peroxidasa (Gpx) (Figura 1.4). Alternativamente, en presencia de metales de transición reducidos [Fe(II) o Cr(V)] el H_2O_2 puede reaccionar con el radical anión $O_2^{\bullet-}$ y generar radicales OH^{\bullet} a través de la reacción de Fenton, los cuales son altamente reactivos y poseen una vida media muy corta y la habilidad de reaccionar con cualquier molécula que encuentren a su paso (Liochev & Fridovich, 2002; Kitchin & Wallace, 2008).

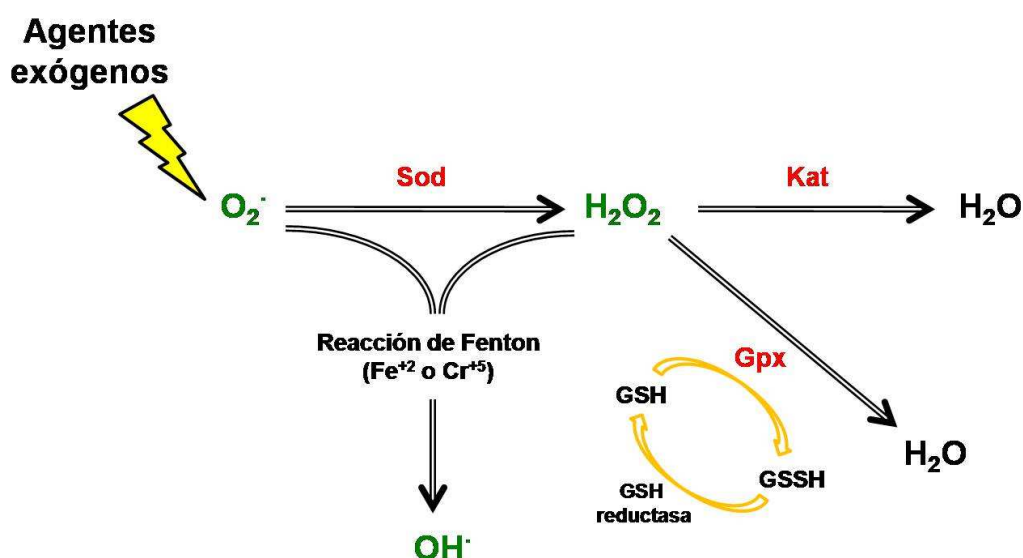


Figura 1.4. Formación y metabolización celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las especies ROS (marcadas en verde) son generadas normalmente en respuesta a agentes exógenos como el arsénico. La enzima superóxido dismutasa (Sod) transforma el radical anión $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , y el H_2O_2 es degradado principalmente a H_2O por las enzimas glutatión peroxidasa (Gpx) y catalasa (Kat). La enzima Gpx es regenerada a través del glutatión (GSH) y la glutatión reductasa. Mediante la reacción de Fenton el H_2O_2 es capaz de formar radicales OH^{\bullet} . Modificada de Shi *et al.*, (2004) y Vaquero-Raya & Molero-Richard (2005).

Las especies ROS causan graves daños a las macromoléculas en el interior de las células. El efecto más importante es el daño a nivel de ADN, como la rotura de la doble hélice de ADN, la oxidación o la mutagénesis, pero también pueden producir peroxidación lipídica (Shi *et al.*, 2004; Beyersmann & Hartwig, 2008). En éste último caso, se produce malondialdehído (MDA), una especie ROS extremadamente tóxica que puede provocar la degradación de lípidos de la membrana celular y agregados de ADN-ADN o ADN-proteína debido a la formación de

conjugados MDA-guanina (Marnett, 1999; Valko *et al.*, 2006). Las especies ROS también provocan inhibición de la función enzimática y oxidación de las proteínas de diversas formas. Así, los residuos proteicos arginina, glutámico, histidina, valina, tirosina, cisteína y metionina son susceptibles de oxidación por especies ROS, siendo los residuos de cisteína y metionina los más vulnerables a la oxidación (Luo & Levine, 2009).

Análisis proteómicos realizados en la β -proteobacteria *Herminiimonas arsenicoxydans* demuestran que la catalasa (KatA), la superóxido dismutasa (SodB) y las proteínas implicadas en la síntesis de GSH aumentan su expresión en presencia de As(III) (Cleiss-Arnold *et al.*, 2010). Estos resultados indican que el As provoca la formación de especies ROS, y por tanto, causa estrés oxidativo en *H. arsenicoxydans*; las células responden contra ese estrés oxidativo elevando la expresión de proteínas antioxidantes como SodB o KatA para disminuir las especies ROS formadas. Los mecanismos por los cuales el As causa la formación de especies ROS aún no están del todo claros pero pueden ser directos o indirectos. Ahmad *et al.*, (2000) demostraron que especies metiladas de As pueden provocar la liberación del hierro de la ferritina mediante la reacción de Fenton, contribuyendo a la formación directa del radical OH^\bullet . Otras investigaciones han demostrado que el MMA(III) provoca daños a nivel del ADN por la formación de radicales como O_2^\bullet o OH^\bullet o el compuesto H_2O_2 (Kligerman *et al.*, 2010). Las especies trivalentes As(III) y MMA(III) pueden formar uniones directas con tiorredoxinas y glutatión reductasas e inactivar de una forma indirecta a las tiorredoxinas y glutarredoxinas en un estado oxidado (Kitchin & Wallace, 2008). Las tiorredoxinas y glutarredoxinas son el principal sistema que protege a la célula del estrés oxidativo y su inhibición provoca un incremento de las especies ROS en el interior de la misma (Lu *et al.*, 2007).

Recientemente se ha demostrado que el As(III) puede interaccionar con otra serie de proteínas como la actina y la tubulina, provocando una inhibición enzimática a nivel de la síntesis de monómeros de actina y de tubulina (Zhang *et al.*, 2007). Sin embargo, la inactivación provocada por el As(III) a otras enzimas como la piruvato kinasa o la piruvato deshidrogenasa no es por una unión directa del metal con la enzima, sino por la unión de las especies ROS producidas por el As y las proteínas (Samikkannu *et al.*, 2003). Así, ciertas proteínas son susceptibles de ser inhibidas por la unión directa de As(III), y en cambio otras son oxidadas por una acción indirecta del As(III).

1.3. Metabolismo bioenergético microbiano ligado al arsénico: el arsénico como fuente de energía.

A pesar de su reconocida fama como potente agente tóxico, el As es utilizado por algunos microorganismos en sus reacciones metabólicas como fuente de poder reductor o como fuente de energía (reacciones bioenergéticas) sin ser incorporado por los microorganismos. Sin embargo, lo más común es que el As sea incorporado por los microorganismos y que los microorganismos desarrollen estrategias para evitar la toxicidad del metaloide (Oremland & Stolz, 2003).

Las reacciones metabólicas en las que el As participa en la generación de energía son realizadas por microorganismos taxonómicamente diversos y metabólicamente versátiles, poco habituales en el mundo microbiano y, en determinadas ocasiones, son reacciones metabólicas difíciles de diferenciar. Así, por ejemplo, existen bacterias y arqueas oxidantes de As(III) que oxidan As(III) a As(V) (Figura 1.5A). Estos microorganismos quimiolitotrofos utilizan oxígeno (respiración aeróbica) y en algunos casos nitrato (respiración anaeróbica) como aceptor final de electrones, generando la energía necesaria para la fijación de CO₂ atmosférico (Silver & Phung, 2005a). Existen también microorganismos oxidantes de As(III) que utilizan el carbono orgánico como fuente de carbono (mixotrofo). La oxidación de As(III) está catalizada por una enzima heterodimérica localizada en la membrana de la célula denominada arsenito oxidasa (Aso/Axo). El proceso oxidativo de As(III) habitualmente es considerado como un proceso desintoxicador y biorremediador, pues transforma el As(III) presente en las inmediaciones de la membrana plasmática de la célula en As(V), especie menos tóxica que la anterior y que se puede inmovilizar fácilmente con diferentes adsorbentes (Bhattacharjee & Rosen, 2007).

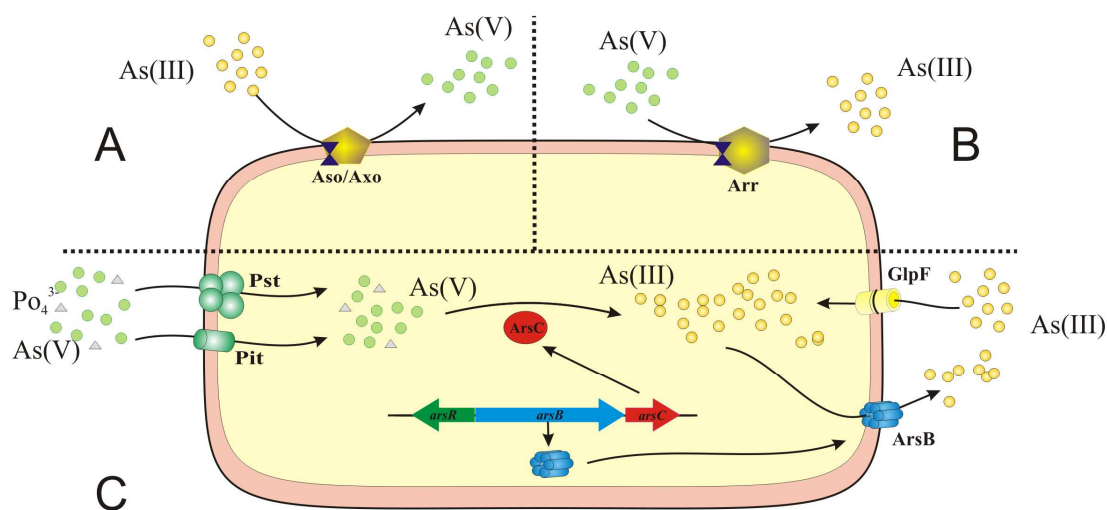


Figura 1.5. Mecanismos microbianos ligados al arsénico. **(A)** La oxidación de arsenito [As(III)] en microorganismos quimioautótrofos o quimioheterótrofos es realizada por una enzima arsenito oxidasa periplasmática (Aso/Axo). **(B)** La reducción de arseniato [As(V)] mediante una respiración desasimilativa del As(V) a través de una arseniato reductasa periplasmática (Arr). **(C)** Desintoxicación del As(III) y el As(V) incorporados en la célula a través de GlpF y transportadores de fosfato (Pst y Pit), respectivamente, por la reducción citoplasmática de As(V) a As(III) mediante la arseniato reductasa (ArsC) y la expulsión de As(III) a través de la arsenito permeasa (ArsB).

Otros microorganismos como bacterias (proteobacterias, bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C y bacterias termófilas) y arqueas (crenoarqueas), realizan una respiración de As(V) o reducción desasimilativa del As(V) utilizando el As(V) como aceptor terminal de electrones (respiración anaeróbica) (Ahmann *et al.*, 1994) (Figura 1.5B). Estos organismos oxidan diferentes compuestos, ya sean de origen orgánico (quimioorganotrofos) como el lactato, acetato, formiato, piruvato, succinato, glucosa o compuestos aromáticos como el benzoato y el tolueno (Niggemyer *et al.*, 2001), o compuestos inorgánicos (quimiolitotrofos) como el hidrógeno o los sulfuros, provocando la formación de As(III) y energía (Silver & Phung, 2005a). El acoplamiento de la reducción de As(V) a As(III) a procesos bioenergéticos impide que el As(V) se incorpore por lo tanto a la ruta de desintoxicación. A nivel molecular la enzima que hace posible el proceso de reducción es la denominada arseniato reductasa respiratoria (Arr), una proteína generalmente heterodimérica localizada en la membrana que forma parte de la cadena respiratoria de transporte de electrones (Figura 1.5B). La reducción desasimilativa del As(V) es un proceso frecuente en las zonas superficiales de los acuíferos e influye en la movilización y especiación del As(V). En colaboración con las bacterias reductoras de Fe(III), los microorganismos que respiran As(V) movilizan y reducen el metaloide desde los minerales

(estado sólido), a las fases acuosas (estado en solución), alterando significativamente la calidad del agua (Islam *et al.*, 2004).

Al margen de estos dos grupos de microorganismos que utilizan As en su metabolismo con fines bioenergéticos, algunos microorganismos incorporan As(V) a su interior y posteriormente lo reducen a As(III) meramente por supervivencia, desintoxicando un compuesto químico tóxico (Figura 1.5C). Estos microorganismos usan unos mecanismos moleculares que de forma concisa se basan en la presencia de una enzima arseniato reductasa citoplasmática para reducir el As(V) incorporado en la célula a As(III), y el As(III) generado es inmediatamente expulsado al exterior por arsenito permeasas (Bhattacharjee & Rosen, 2007); este proceso se detallará en los apartados 1.5.3. y 1.6. de esta Introducción.

1.4. Sistemas de entrada de arsénico en las células.

Todas las células poseen mecanismos que controlan el nivel de metales esenciales que existen en su interior, metales como el zinc y cobre, o metaloides tóxicos como el arsénico y el antimonio (Sb) (Finney & O'Halloran, 2003). Estos mecanismos son necesarios porque incluso los metales esenciales, cuando están en exceso pueden llegar a ser tóxicos para la célula.

El As puede actuar paradójicamente como un elemento tóxico y cancerígeno así como un agente quimioterapéutico para varias enfermedades, para lo cual necesita ser incorporado por las células. Para comprender y prevenir la toxicidad y carcinogénesis que ejerce el As, y aumentar su mecanismo de acción en el tratamiento de enfermedades, es importante conocer los sistemas de entrada de As en las células (Fu *et al.*, 2011), así como conocer la naturaleza química del metaloide en el entorno extracelular, hecho que condiciona el tipo de transportadores que utilizan las células para su incorporación.

1.4.1. Entrada de arseniato en la célula.

El ácido arsénico (H_3AsO_4) en solución presenta tres valores de pK_a (2,2; 7,0 y 11,5) similares a los valores de pK_a del ácido fosfórico (H_3PO_4 ; 2,1; 7,2 y 12,7). Esto significa que a pH fisiológico y neutro (pH 7) las especies HAsO_4^{2-} y $\text{H}_2\text{AsO}_4^{1-}$ de arsénico y HPO_4^{2-} y $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ de fósforo se mantienen en equilibrio. Debido a la similitud estructural y química del arseniato y el fosfato (Figura 1.6A), el arseniato sustituye al fosfato en muchos procesos de fosforilación celular como en la glicólisis o la fosforilación oxidativa (Rosen *et al.*, 2011).

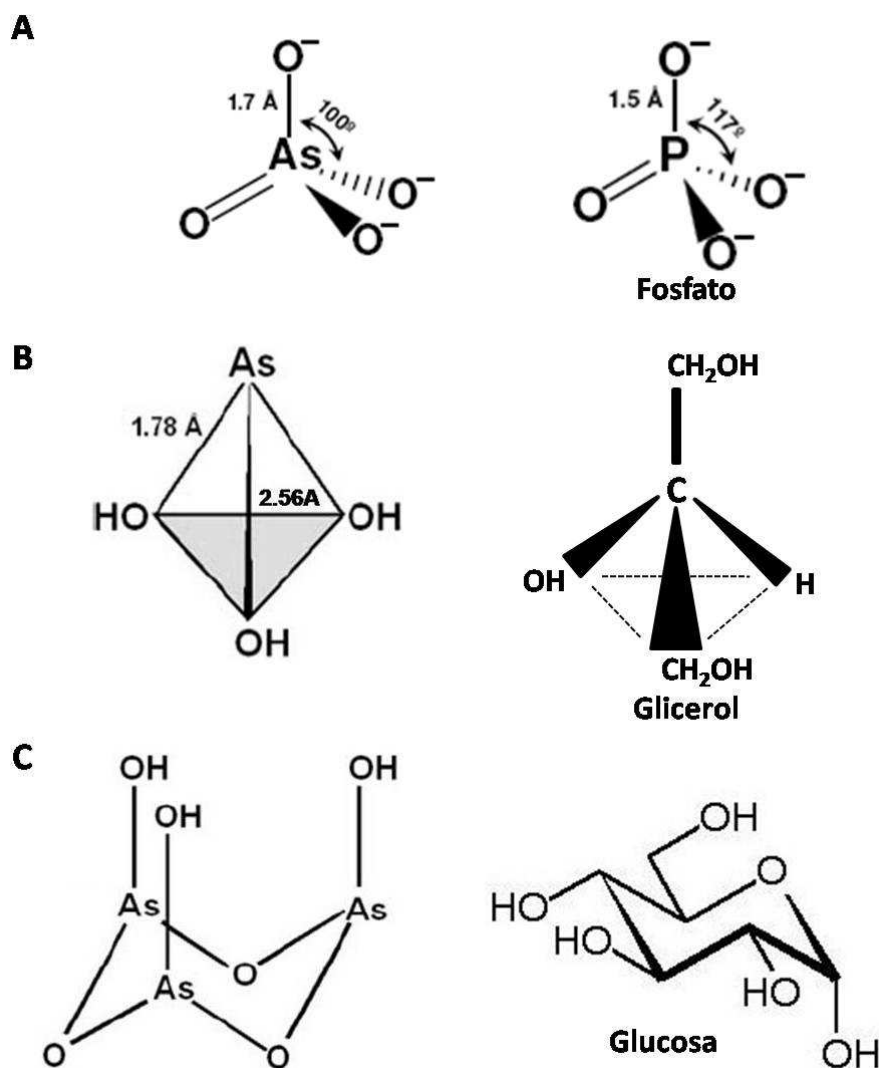


Figura 1.6. (A) Comparación entre los aniones de fosfato y arseniato. Los ángulos y las distancias de unión son aproximados. Modificada de Rosen *et al.*, (2011). (B) Estructura piramidal que presenta el As(III) en solución $[\text{As}(\text{OH})_3]$. Las tres uniones As-OH de 1,78 Å forman una estructura similar a la molécula de glicerol. Modificada de Meng *et al.*, (2004). (C) La polimerización de tres moléculas de $\text{As}(\text{OH})_3$ en solución forma un anillo que presenta una estructura similar a una hexosa como la glucosa. Modificado de Liu *et al.*, (2004b).

El ejemplo más claro de sustitución del fosfato por el arseniato se vería con la entrada del arseniato en las células a través de los sistemas de transporte específicos para el fosfato inorgánico (P_i). En *Escherichia coli* existen al menos dos sistemas de entrada de fosfato: el Pit (*Phosphate Inspecific Transport*) y el Pst (*Phosphate Specific Transport*) (Rosenberg *et al.*, 1977). Ambos sistemas parecen estar implicados en la entrada de As(V), aunque el sistema Pit parece ser el sistema predominante (Willsky & Malamy, 1980a; Willsky & Malamy, 1980b).

El sistema de transporte de fosfato Pit se expresa constitutivamente en *E. coli*, es de baja afinidad y depende energéticamente del motivo de fuerza protónica para el transporte de P_i . El P_i solamente es transportado a través de este sistema de transporte a alta concentración de P_i (más de 20 μM) (Willsky & Malamy, 1980b; Rosenberg *et al.*, 1977). A baja concentración de P_i se induce el sistema de transporte Pst (Willsky & Malamy, 1980b; Rosenberg *et al.*, 1977). El sistema Pst es un complejo proteico formado por cuatro proteínas (EcPstA, EcPstB, EcPstC y EcPiBP), pertenece a la familia de transportadores de tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) y utiliza como fuente de energía para el transporte la hidrólisis de ATP. En este sistema, la proteína EcPiBP (*P_i-Binding Protein*; codificada por el gen *EcpstS*) capta el P_i libre formado en el periplasma y lo dirige al canal transmembrana de la membrana citoplasmática. El canal está formado por dos proteínas, EcPstA y EcPstC, con seis y cinco segmentos transmembrana, respectivamente, y en la región citoplasmática de estas dos proteínas se une la proteína EcPstB, en cuya estructura se encuentra un sitio de unión a ATP. La hidrólisis del ATP proporciona la energía necesaria al sistema para el transporte del fosfato (Rao & Torrani, 1990).

En *Bacillus subtilis*, a diferencia de lo que ocurre con *E. coli*, el sistema Pst de transporte de fosfato no participa en la entrada de arseniato (Qi *et al.*, 1997). Sin embargo, recientes investigaciones de Aaltonen y Silow (datos no publicados) demuestran que *B. subtilis* aumenta su resistencia a arseniato en presencia de grandes cantidades de fosfato. Puesto que sólo se han encontrado dos sistemas de entrada de fosfato en *B. subtilis*, esto ha sugerido que el arseniato entra por el sistema de transporte Pit. En *C. glutamicum*, como ocurre en otros microorganismos, el arseniato también entra a través de los sistemas de transporte de fosfato; sin embargo no se conoce el grado de implicación de los sistemas Pit y Pst en el transporte del metaloide (Feo *et al.*, 2007).

En organismos eucariotas, el arseniato se incorpora también a través de los sistemas de transporte de fosfato. En *Saccharomyces cerevisiae* los transportadores ScPHO84, ScPHO86 y ScPHO87 están implicados tanto en la incorporación de fosfato como de arseniato (Bun-Ya *et al.*, 1992; Bun-ya *et al.*, 1996). En la planta *Arabidopsis thaliana*, la interrupción del gen que codifica para el transportador de fosfato AtPHT1;1 confirió resistencia a arseniato y redujo la entrada de arseniato y de fosfato en las células (Catarcha *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007). En diferentes mamíferos, los cotransportadores intestinales Na^+/P_i de tipo IIb participan en la entrada de As(V) cuando se expresan en oocitos de *Xenopus laevis* (Villa-Bellosta & Sorribas, 2008; Villa-Bellosta & Sorribas, 2009; Villa-Bellosta & Sorribas, 2010). Recientemente se ha identificado que la aguaglicerolporina hAQP9 de humanos participa en el transporte de As

pentavalente metilado, como MMA(V) y DMA(V), las dos formas mayoritarias de As excretadas en la orina de mamíferos (McDermott *et al.*, 2010). Un homólogo de hAQP9 en *Oryza sativa* (arroz), OsLsi1, también participa en el transporte de MMA(V) y DMA(V) (Li *et al.*, 2009).

1.4.2. Entrada de arsenito en la célula.

En forma sólida el arsénico trivalente se encuentra como trióxido de arsénico (As_2O_3). En solución a pH neutro, el As_2O_3 se encuentra totalmente protonado y sin carga debido a que posee un pK_a de 9,2 por lo que se presenta como una molécula polihidroxilada [$\text{As}(\text{OH})_3$]. Los análisis de espectroscopia de rayos-X han corroborado que el As(III) a pH neutro se encuentra ligado a tres átomos de oxígeno, presentando una estructura que de alguna manera mimetiza al glicerol (Ramírez-Solis *et al.*, 2004) (Figura 1.6B). A partir de la estructura cristalina del compuesto hexaóxido de arsénico, As_4O_6 , se extrapoló que el As polihidroxilado en solución puede encontrarse también como una estructura similar a una hexosa (Maxwell *et al.*, 1937; Liu *et al.*, 2004b) (Figura 1.6C). Como consecuencia de la diversidad estructural del As(III) en solución, hasta la fecha han sido identificados en las células dos sistemas de entrada de As(III): aguaglicerolporinas y permeasas de hexosas. Además, debido a las similitudes estructurales, termodinámicas y electrostáticas entre el As(III) y el antimonito [$\text{Sb}(\text{III})$], el Sb(III) presenta en solución una conformación neutra similar a la del As(III) en forma de $\text{Sb}(\text{OH})_3$ (pK_a 11,8), lo que indica que podría utilizar el mismo mecanismo de transporte que el As(III) (Porquet & Filella, 2007).

En *E. coli*, el transportador de glicerol EcGlpF (Heller *et al.*, 1980), fue el primer sistema identificado de entrada de As(III) y de Sb(III) (Sanders *et al.*, 1997; Meng *et al.*, 2004). La proteína EcGlpF es un miembro de la superfamilia MIP (Major Intrinsic Protein) de aguaporinas, la cual tiene dos grandes ramas: (i) las aguaporinas, como la enzima hAQP1 de humanos, que son proteínas con canales de pequeño tamaño que transportan principalmente agua (Agre *et al.*, 2002) y (ii) las aguaglicerolporinas, como EcGlpF, proteínas con poros de diámetro suficientemente grande como para permitir el paso de moléculas sin carga como el glicerol o la urea (Borgnia *et al.*, 1999). Los dos grupos de aguaporinas se encuentran en una gran cantidad de organismos.

En eucariotas, las aguaglicerolporinas también participan en la entrada de As(III) y Sb(III). Así, en *S. cerevisiae*, la proteína ScFps1p, un homólogo de EcGlpF en levaduras, participa en la entrada de As(III) y Sb(III) (Wysocki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002). Recientemente se ha demostrado que la fosforilación de Fps1p por la kinasa MAPK (Mitogen-Activated Protein

Kinase) regula su actividad (Thorsen *et al.*, 2006). En humanos se han identificado 13 aguaporinas, de las cuales cuatro pertenecen al grupo de las aguaglicerolporinas (Liu *et al.*, 2004a): hAQP3, hAQP7, hAQP9 y hAQP10. La proteína hAQP9 se expresa predominantemente en los hepatocitos del hígado, y es el principal mecanismo de entrada de As(III) y Sb(III) en ese órgano, seguida de hAQP7 (Liu *et al.*, 2002). Sin embargo poco o nulo transporte ha sido observado adscrito a hAQP3 y hAQP10.

El protozoo patógeno de humanos *Leishmania major*, también incorpora As(III) y Sb(III) a través de una aguaglicerolporina, LmAQP1 (Gourbal *et al.*, 2004). Esto es importante clínicamente porque en el tratamiento contra la leishmaniasis se usa Pentostam (estibogluconato de sodio) o Glucantime (antimoniato de meglumina), agentes quimioterapéuticos que contienen como principio activo antimoniato [Sb(V)]. El mecanismo de acción de los compuestos antimoniales pentavalentes es poco conocido pero se cree que el Sb(V) se reduce a Sb(III) en el interior del macrófago, donde reside *Leishmania*, y el Sb(III) formado entra en el parásito a través de la aguaglicerolporina LmAQP1 (Mukhopadhyay *et al.*, 2011).

En plantas también se han identificado proteínas de la superfamilia MIP (*Mayor Intrinsic Protein*) la cual se divide en cuatro subfamilias de las cuales la subfamilia NIP (*Nodulin 26-like Intrinsic Proteins*) es la equivalente a las aguaglicerolporinas. Recientemente se ha demostrado que ciertas isoformas de proteínas NIPs de *A. thaliana* y *O. sativa*, como AtNIP7;1 y OsNIP2;1 son capaces de transportar As(III) cuando se expresan en una cepa de levaduras carente de la proteína ScFps1p (Bienert *et al.*, 2008).

El segundo sistema de entrada de As(III) es a través de las permeasas de hexosas, las cuales pertenecen a la superfamilia MFS (*Mayor Facilitator Superfamily*). En *S. cerevisiae* se han identificado 18 genes que codifican para permeasas de hexosas (*Schxt1p-Schtx17p* y *Scgal2p*), de las cuales las proteínas ScHxt7p y ScHxt9p (específicas del transporte de glucosa) fueron las mayores responsables del transporte de As(OH)₃. La interrupción del gen que codifica para la aguaglicerolporina ScFps1p en *S. cerevisiae* en ausencia de glucosa redujo sólo el 25% de la entrada de As(III), atribuyendo el resto principalmente a la permeasas de hexosas ScHxt7p y ScHxt9p (Liu *et al.*, 2004b). En mamíferos la proteína GLUT1, homóloga de las permeasas de hexosas de levaduras, también participa en los procesos de entrada de As(OH)₃ (Liu *et al.*, 2006b). Liu *et al.*, (2006a) demostraron que la proteína hAQP9 de humanos también tiene como sustrato compuestos trivalentes orgánicos de arsénico como MMA(III). Además se ha demostrado que la proteína hGLUT1 de humanos podría ser el sistema más

importante de entrada de compuestos arsenicales metilados en los eritrocitos y células epiteliales de la barrera hematoencefálica (Liu *et al.*, 2006b); sin embargo el mecanismo de translocación utilizado por los compuestos arsenicales metilados a través de la enzima hGLUT1 es diferente al que realiza la glucosa (Jiang *et al.*, 2010).

1.5. Mecanismos de resistencia a arsénico en microorganismos.

Prácticamente todos los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia a metales tóxicos como Ag^+ , AsO_2^- , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , TeO_3^{2-} , Tl^+ y Zn^{2+} (Silver & Phung, 2005b). La mayoría de estos sistemas de resistencia consisten en una entrada del tóxico al interior de la célula y la posterior expulsión al exterior de la célula a través de proteínas transportadoras que requieren gasto energético.

Los mecanismos de resistencia al metaloide As han surgido a lo largo de la evolución para minimizar la toxicidad del As causada por su entrada en las células. A grandes rasgos se diferencian tres estrategias: (i) metilación del As incorporado en la célula; (ii) quelación o secuestro del As en compartimentos u orgánulos intracelulares; (iii) transformación del As(V) y expulsión del As(III) generado al exterior de la célula, haciendo uso de los operones *ars* de resistencia a As. A continuación se describen los tres mecanismos que intervienen en la resistencia a As; en cualquiera de los tres casos la consecuencia inmediata es que la concentración intracelular de As disminuye drásticamente (Rosen, 1999).

1.5.1. Metilación de arsénico.

A pesar de que la capacidad de metilar As está ampliamente distribuida en bacterias, arqueas, hongos, plantas y animales (Bentley & Chasteen, 2002), se sabe poco acerca del proceso de síntesis de compuestos organoarsenicales y de las enzimas implicadas. Sin embargo, la metilación microbiana de As inorgánico ha sido reconocida desde hace más de 150 años cuando dos médicos ingleses observaron síntomas de intoxicación por As en su propio organismo (Silver & Phung, 2005b). El origen de este As era el arsenito cúprico usado como conservante en la elaboración del papel pintado que cubría las paredes de sus despachos, el cual se transformaba en compuestos volátiles con olor a ajo debido a la acción de un hongo (*Scopulariopsis brevicaulis*); este gas se denominó "gas gosio" en honor a su

descubridor Bartolomeo Gosio. En 1945 Frederick Challenger demostró que el “gas gosio” era TMA(III) (Scheidlin, 2005), y propuso una ruta en la cual el As(V) o As(III) podía convertirse a TMA(III) (Figura 1.7A).

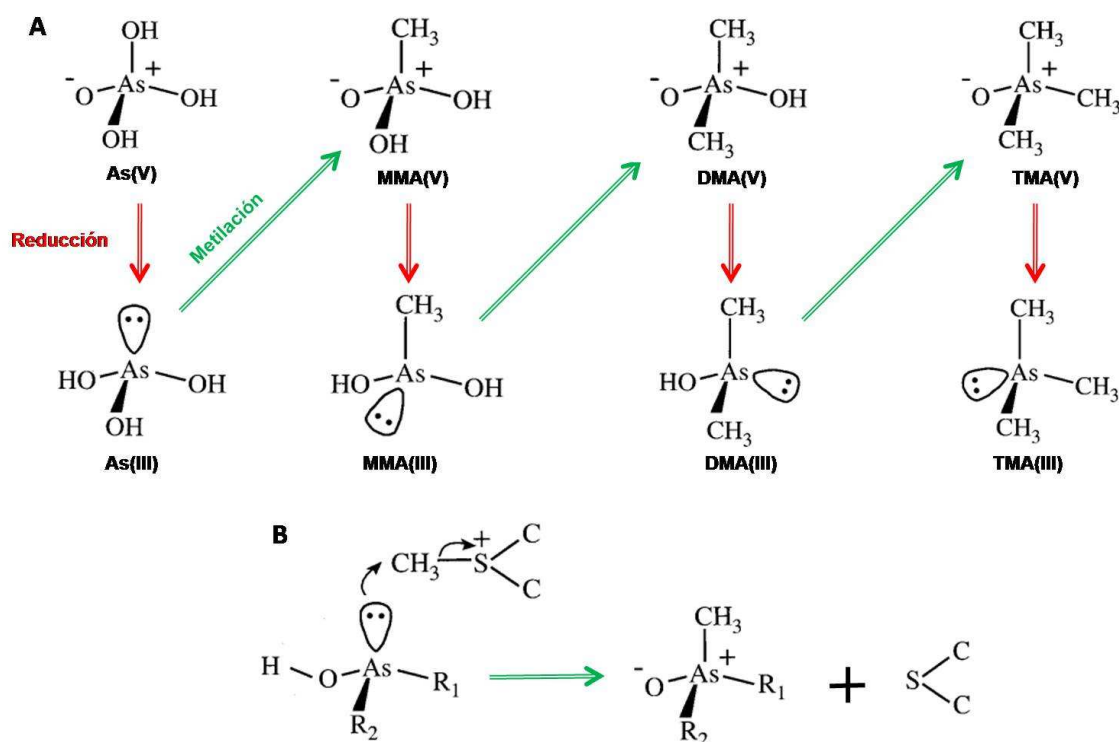


Figura 1.7. (A) Cascada de metilación del arseniato inorgánico [As(V)] a trimetilarsina [TMA(III)]. Las especies arsenicales de la línea de arriba corresponden a intermediarios pentavalentes y las de la línea de abajo a intermediarios trivalentes. Las flechas rojas (verticales) indican las reacciones de reducción y las flechas verdes (oblicuas) indican los pasos de metilación. **(B)** Explicación detallada de las reacciones de metilación (flechas verdes). Las reacciones de metilación llevan consigo también una reacción de oxidación. Los compuestos trivalentes se metilan por la adición de un grupo metilo (-CH₃) de una molécula de SAM [S-adenosil-metionina; abreviada como CH₃-S⁺-(C)₂] produciendo la liberación de una molécula de S-adenosil-homocisteína [abreviada como S-(C)₂] y un compuesto pentavalente metilado. Figura modificada de Bentley & Chasteen, (2002).

La metilación de As se inicia a partir de As(V) con una reacción de reducción. La metilación sigue con un proceso de oxidación de un compuesto en estado redox +3 a un producto en estado redox +5 junto con la unión de un grupo metilo (-CH₃) del compuesto S-adenosil-metionina (SAM) (Qin *et al.*, 2006) (Figura 1.7B). La reacción continúa con otra reacción de reducción en la que un compuesto pentavalente metilado se reduce a un compuesto trivalente metilado, que constituye el sustrato de la próxima metilación. Una cuestión importante que todavía permanece sin respuesta es cómo se produce esa reacción de reducción. Aunque se

creo que una tioredoxina actúa en esa reducción de un modo análogo a como reacciona con las reductasas de arsénico (ver apartado 1.6.2.1. de esta Introducción) (Thomas *et al.*, 2004), otros autores sostienen que la molécula realmente implicada en el proceso es el glutatión (Waters *et al.*, 2004; Hayakawa *et al.*, 2005).

Muchos mamíferos, incluyendo humanos y ratas, metilan el As inorgánico en el hígado. La identificación de especies de As en la orina de humanos revela que entre el 10 y el 15% del As total excretado corresponde a As inorgánico y MMA(V), y el 60-80% corresponde a DMA(V). No obstante, también se han detectado cantidades traza de MMA(III) y DMA(III) (Meza *et al.*, 2004). La metilación hepática está catalizada por la enzima As3MT, enzima con actividad As(III)-S-adenosilmetiltransferasa, descrita en ratas y en humanos (Wood *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005). En los roedores la actividad de la As3MT tiene localización multiorgánica, pero en humanos se limita a hígado, riñones y cerebro (Zakharyan & Aposhian, 1999). Se han realizado mutaciones en las catorce cisteínas conservadas de la proteína hAs3MT de humanos y se determinó que la cisteína 72 es necesaria para la metilación de As (Song *et al.*, 2011).

Las bacterias, hongos y arqueas son también conocidos por producir compuestos arsenicales volátiles extremadamente tóxicos y sintetizados por proteínas homólogas a As3MT, denominadas genéricamente como ArsM, y codificados por los genes *arsM* (Bhattacharjee & Rosen, 2007). Los genes *arsM* pueden formar parte de operones *ars* de resistencia a As, lo que indica que ArsM podría participar en la resistencia al metaloide. Recientemente dos proteínas ArsM han sido caracterizadas; el gen *arsM* de la bacteria *Rhodopseudomonas palustris* fue expresado heterológamente en una cepa hipersensible de *E. coli* (carente del operón *ars*) confiriéndole resistencia a As(III) y detectándose especies metiladas pentavalentes como DMA(V), TMA(V) y trivalentes como TMA(III) (Qin *et al.*, 2006). Dos genes *arsM*, denominados *arsM7* y *arsM8*, del alga extremófila *Cyanidioschyzon* sp., aislada de varios ambientes geotermales del Parque Nacional de Yellowstone (EE.UU.), demostraron conferir resistencia a As(III) en la misma cepa hipersensible de *E. coli* y transformar *in vitro* As(III) a MMA(III), DMA(V), TMA(V) y TMA(III) a una temperatura de 60-70°C (Qin *et al.*, 2009). Recientemente el gen *arsM* de *Cyanidioschyzon* sp., 5508 ha sido purificado y cristalizado (Marapakala *et al.*, 2010).

Puesto que el grado de toxicidad *in vivo* de las diferentes especies de As de mayor a menor toxicidad es el siguiente: TMA(III) = DMA(III) = MMA(III) > As(III) > As(V) > DMA(V) = MMA(V) = TMA(V) (Akter *et al.*, 2005), la metilación de As(III) a DMA(V), MMA(V) o TMA(V) puede ser considerada un proceso destoxicante de As. Por otro lado, la metilación de As(III) a MMA(III),

DMA(III) o TMA(III) podría ser considerado como un proceso perjudicial ya que estas especies son más tóxicas que el As(III). Sin embargo, la especie MMA(III) no se acumula en las células que expresan el gen *arsM*, por ser un intermediario del proceso de formación de las especies DMA(III) y TMA(III), y las formas DMA(III) y TMA(III) tampoco se acumulan en las células que expresan *ArsM* ya que son de naturaleza volátil (Qin *et al.*, 2009). Esto pone de manifiesto que la metilación del As constituye un proceso de desintoxicación del metaloide por obtención de especies arsenicales solubles, metiladas y volátiles, y tiene un importante papel en el ciclo global del As en la naturaleza (Qin *et al.*, 2009).

Recientemente algunas investigaciones han permitido conocer que existe una transformación bidireccional de especies inorgánicas de As a especies metiladas. El MMA(V), usado como herbicida, es desmetilado a compuestos arsenicales más tóxicos como el As(III) mediante un paso intermedio de reducción del compuesto MMA(V) a la especie metilada MMA(III). Este proceso se ha identificado en microorganismos de los géneros *Burkholderia* y *Streptomyces* pero el mecanismo por el cual se produce esta desmetilación actualmente se desconoce (Yoshinaga *et al.*, 2011).

1.5.2. Quelación o secuestro del arsénico en compartimentos u orgánulos intracelulares.

Un mecanismo general y recurrente para la desintoxicación de metales pesados en los organismos es la quelación de dicho metal con un ligando, y en algunas ocasiones, la compartimentación del complejo metal-ligando en orgánulos intracelulares. La naturaleza de estos ligandos es muy variada, abarcando desde ácidos orgánicos como el citrato y el malato, determinantes en la resistencia a aluminio, hasta proteínas como pequeños péptidos ricos en cisteínas como las fitoquelatinas, metaloquelatinas o incluso el glutatión (Rauser *et al.*, 1999).

1.5.2.1. Proteínas con capacidad quelante de arsénico: fitoquelatinas

Las fitoquelatinas (PCs) son péptidos formados por residuos de glutámico, cisteína y glicina, unidos por un enlace tipo γ -carboxilamida (Figura 1.8A). Debido a su alto contenido en cisteínas tienen la capacidad de unir iones metálicos de cadmio, cobre, zinc, mercurio y arsénico, lo que permite entre otras cosas mantener la homeostasis intracelular del metal (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Thumann *et al.*, 1991) y participar en un proceso de desintoxicación de los mismos (Hirata *et al.*, 2005). Ciertos estudios en el alga verde marina

Dunaliella tertiolecta ATCC 30929, han demostrado que las PCs también tienen un importante papel en la protección contra el estrés oxidativo causado por especies ROS (Tsuji *et al.*, 2005).

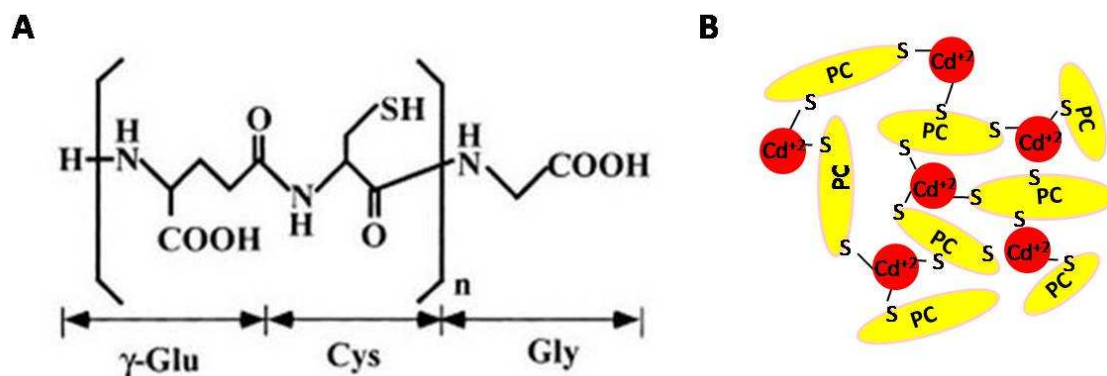


Figura 1.8. (A) Estructura primaria de las fitoquelatinas (PCs). La estructura de las PCs es generalmente indicada como $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n está entre 2 y 11 unidades. **(B)** Complejos inertes PC-Cd. Metales pesados como el cadmio se pueden unir coordinadamente a uno, dos, tres o más grupos sulfhidrilo de una o varias PCs, formando complejos inertes. Modificada de Hirata *et al.*, (2005).

Las PCs han sido identificadas en muchas especies de plantas, siendo la más estudiada la PC de *A. thaliana* (Ha *et al.*, 1999), pero también se han descrito en algunos hongos como *Schizosaccharomyces pombe*, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Vatamaniuk *et al.*, 2005) y en la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC7120 (Tsuji *et al.*, 2004).

La síntesis de las PCs se induce por la presencia de compuestos tóxicos como metales pesados. La enzima γ -glutamylcysteine dipeptidyl transferase o fitoquelatina sintasa (PCS) realiza la conversión enzimática del glutatión en el polímero $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ donde n está entre 2 y 11 unidades (Vatamaniuk *et al.*, 2004). La reacción enzimática consiste en la transferencia de un grupo $\gamma\text{-Glu-Cys}$ del glutatión a otra molécula de glutatión o al extremo de una PC ya sintetizada (Kang *et al.*, 2007). La unión coordinada de metales a varios grupos sulfhidrilo de una o varias PCs permite formar estructuras de PC-metal que constituyen complejos inertes (Cruz *et al.*, 2005) (Figura 1.8B). Sin embargo la síntesis de PCs no está restringida a la presencia de una actividad PCS. La levadura *S. cerevisiae* sintetiza PCs cuando se expone ante metales pesados (Kneer *et al.*, 1992), aunque su genoma no presenta genes homologos a los genes que codifican para las fitoquelatina sintasas. Recientes estudios realizados en levaduras muestran que las proteínas carboxipeptidasa-Y (CPY) y carboxipeptidasa-C (CPC) parecen ser responsables de la síntesis de PCs en *S. cerevisiae* (Wünschmann *et al.*, 2007).

El As(III) y el As(V) desencadenan la formación de PCs en plantas (Grill *et al.*, 1987; Maitani *et al.*, 1996), debido a la inducción de la expresión del gen que codifica para la PCS. Desde hace una década, se conoce que las PCs tienen una elevada capacidad de unión a As(III) (Schmöger *et al.*, 2000), lo que conlleva a que las PCs sean consideradas candidatos naturales con fines biorremediadores de As. En años recientes, la biorremediación ha sido sugerida como una estrategia beneficiosa y efectiva para la eliminación de As (Tsai *et al.*, 2009). Microorganismos como *E. coli* o *S. cerevisiae* modificados genéticamente con capacidad de producir péptidos de unión a metales, como las PCs de *A. thaliana*, *S. pombe* o *Nicotiana tabacum*, han sido utilizados para este propósito con diferentes grados de éxito (Sauge-Merle *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2008a; Singh *et al.*, 2010). Recientemente se ha realizado la expresión del gen que codifica para la PCS de *S. pombe* en una cepa de *E. coli* carente de la bomba de salida de As(III). En ese mutante también se sobreexpresó la enzima γ -glutamylcisteina sintetasa (GshI) de *E. coli* y el transportador de As(III) EcGlpF (Sanders *et al.*, 1997). La cepa resultante es capaz de acumular 16,8 μmol de As por gramo de peso seco, 80 veces más la cantidad de As que la cepa sin PCs (Singh *et al.*, 2010).

1.5.2.2. Proteínas con capacidad quelante de arsénico: metalotioneinas.

Las metalotioneinas (MTs) son polipéptidos intracelulares de bajo peso molecular (3,5-14 kDa), con un gran número de residuos con grupos tiol (30%), sin aminoácidos aromáticos en su secuencia y que proceden de síntesis no ribosomal. La primera MT se aisló de riñón de caballo (Thirumorthy *et al.*, 2007), pero muchos otros péptidos no proteinógenos con características similares han sido aislados a lo largo de toda la escala filogenética. Este conjunto de polipéptidos constituye la amplia superfamilia de las metalotioneinas que, basándose en homologías de secuencias y criterios filogenéticos, se ha subdividido en varias familias, subfamilias y otras categorías inferiores (Sutherland & Stillmann, 2011).

Las MTs se encuentran principalmente en invertebrados (*Drosophila melanogaster*, *C. elegans*), vertebrados (humanos) y hongos como *Neurospora crassa* (Kumar *et al.*, 2005). Sin embargo, se han identificado también MTs en procariotas como *Mycobacterium tuberculosis* con capacidad de unión a seis iones de Cu(I) (Gold *et al.*, 2008) o *Synechococcus* (Turner *et al.*, 1995) y en algas marinas como *Fucus vesiculosus*. Las MTs presentan una gran variedad de funciones como la metalorregulación de procesos (crecimiento y división celular), antioxidantes celulares, reguladores de la homeostasis de metales pesados, desintoxicación de metales pesados y xenobióticos y protección de la célula frente a la toxicidad asociada a los metales pesados (Karin, 1985). No obstante, la principal función de las MTs es la elevada afinidad y

capacidad de quelación de iones metálicos como cadmio, mercurio, platino o arsénico (Kägi, 1991), debido a su alto contenido en residuos de cisteína.

Las MTs presentan un papel importante en la atenuación de efectos tóxicos de compuestos arsenicales. Una prueba tácita de ello es la inducción de los genes que las codifican en ratones y ratas en presencia de arsenoderivados (Albores *et al.*, 1992; Kreppel *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2001). Se han descrito también casos de unión de As a MTs en el alga *F. vesiculosus* (Merrifield *et al.*, 2004). Estos resultados abren la posibilidad de diseñar absorbentes específicos de As mediante estrategias genéticas como la expresión intracelular de proteínas quelantes de tipo MTs. Así, la expresión de la MT de *F. vesiculosus* en *E. coli* constituye una solución económica para la eliminación de As(III) de las aguas residuales (Singh *et al.*, 2008b).

1.5.3. Operones *ars* de resistencia a arsénico.

Los genes de resistencia a As están generalmente organizados en operones, los operones *ars*, y constituyen la estrategia más ubicua, importante y estudiada de resistencia a As de las células (Oremland & Stolz, 2003; Páez-Espino *et al.*, 2009). Mediante este mecanismo de resistencia a As las formas inorgánicas de As se liberan al exterior de la célula.

Los operones *ars* pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas (Páez-Espino *et al.*, 2009). Generalmente, los operones *ars* se encuentran en microorganismos con genomas de entre 1.000 y 2.000 genes, debido a que la resistencia a As se desarrolló en fases tempranas al origen de la vida y en organismos unicelulares (Mukhopadhyay *et al.*, 2002a). Los operones *ars* más comunes están constituidos por tres (*arsRBC*) o cinco genes (*arsRDABC*) que generalmente conforman una unidad transcripcional (Silver & Phung, 2005b).

El sistema de tres genes está compuesto por un represor transcripcional de As (ArsR), que controla la expresión de los genes *arsB* y *arsC*; el gen *arsB/acr3* que codifica para una arsenito permeasa, y su función es expulsar As(III) al exterior de las células; y el gen *arsC* que codifica para una arseniato reductasa, que cataliza la reducción de As(V) a As(III) (Rosen, 2002a) (Figura 1.9A). Los operones *ars* de tres componentes se han localizado en los cromosomas bacterianos de *E. coli* (Carlin *et al.*, 1995) *Pseudomonas aeruginosa* (Cai *et al.*, 1998), *Pseudomonas fluorescens* MSP3 (Prithivirajsingh *et al.*, 2001), en *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (Azevedo *et al.*, 2008) y en los plásmidos pI258 y pSX267 del género *Staphylococcus* (Ji & Silver, 1992; Rosenstein *et al.*, 1992).

Alternativamente algunos operones *ars* como los codificados en los plásmidos R773 y R46 de *E. coli* (Chen *et al.*, 1986) y en el plásmido pKW301 de *Acidiphilium multivorum* (Suzuki *et al.*, 1998) tienen cinco genes (Figura 1.9B). Estos operones además de los tres genes ya indicados, contienen dos genes adicionales que codifican para los productos ArsD y ArsA. La proteína ArsD ha sido considerada como una proteína acompañante de As que facilita la accesibilidad del As(III) a ArsA. La proteína ArsA es una ATPasa intracelular que forma un complejo proteico con la proteína ArsB. La función de ArsA es la de suministrar la energía necesaria a la proteína de membrana ArsB para la expulsión de As(III) acoplándola a la hidrólisis del ATP (Rosen, 2002b).

Además de la tipología de los operones *ars* de tres y cinco elementos indicados, se han encontrado operones de composición génica diversa, con variabilidad tanto en el número de genes, como en la función y organización de los mismos (Páez-Espino *et al.*, 2009) (Figura 1.9C). Un operón *ars* con tan sólo dos componentes, *arsR* y *arsB*, ha sido identificado en la arquea *Ferroplasma acidarmanus* (Baker-Austin *et al.*, 2007). Otros operones *ars* presentan genes adicionales que codifican para proteínas diferentes a las cinco anteriormente analizadas o presentan duplicaciones de alguno de los genes anteriores, presentando una estructura de cuatro o más componentes (Figura 1.9C). Este tipo de operones *ars* se presentan en *B. subtilis* (Sato & Kobayashi, 1998), *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 (Butcher & Rawlings, 2002), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (López-Maury *et al.*, 2003), *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (Li & Krumholz, 2007), *Microbacterium* sp. A33 (Achour-Rokbani *et al.*, 2010), *Sinorhizobium meliloti* (Yang *et al.*, 2005), *Campylobacter jejuni* (Wang *et al.*, 2009) y en los plásmidos pHZ227 de *Streptomyces* sp. (Wang *et al.*, 2006) y pBD2 de *Rhodococcus erythropolis* (Silver & Phung, 2005b). Igualmente se ha descrito la presencia de varios operones *ars* en el cromosoma de microorganismos como *Pseudomonas putida* KT2440 (Cánovas *et al.*, 2003), *C. glutamicum* ATCC 13032 (Ordóñez *et al.*, 2005), *Ochrobactrum tritici* SCII24 (Branco *et al.*, 2008), *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF (Fu *et al.*, 2010), *Leptospirillum ferriphilum* (Li *et al.*, 2010) y *Herminiimonas arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007) (Figura 1.9D).

Entre los genes adicionales integrantes de operones *ars* en diferentes microorganismos encontramos el gen *arsH* que codifica para la proteína ArsH, el gen para la aguaglicerolporina AqpS descrita en el operón *ars* de *S. meliloti* (Yang *et al.*, 2005), los genes *arsO* y *arsT*, identificados en el plásmido lineal pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008 (Wang *et al.*, 2006) y el gen *arsN*.

Algunos de los genes alternativos de los operones *ars* codifican para proteínas que presentan un papel claro en la resistencia a As, pero en otros casos no es posible determinar con certeza el papel que juegan esos genes en la desintoxicación de As. Así, la proteína ArsH, en base a estudios de homología de secuencias y a la conservación de dominios consenso, se ha catalogado como perteneciente a la familia de las proteínas FMN (Elavin MonoNucleótido) reductasas dependientes de NADPH. La proteína ArsH ha sido localizada en un amplio grupo de organismos: bacterias Gram-negativas como *Yersinia enterocolitica* (Neyt *et al.*, 1997), *A. ferrooxidans* (Butcher *et al.*, 2000) y *P. putida* (Cánovas *et al.*, 2003); en cianobacterias como *Synechocystis* sp. (López-Maury *et al.*, 2003); en *S. meliloti* (Yang *et al.*, 2005) e incluso en arqueas, hongos, plantas y en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, aunque no hay evidencias de su presencia en bacterias Gram-positivas (Páez-Espino *et al.*, 2009). La función

de ArsH en el contexto de la ruta de desintoxicación de As se puede catalogar como desconocida, y su importancia en la desintoxicación del metaloide es ambigua. El producto del gen *arsH* en *Y. enterocolitica* confiere resistencia a As(III) y As(V); la delección del gen *arsH* del plásmido InCHI2 provoca la pérdida de la resistencia a As (Ryan & Collieran, 2002) y en *S. meliloti* ArsH podría estar implicada en la resistencia a As(III) y a Sb(III). Sin embargo en *A. ferrooxidans* y en *Synechocystis* sp., la proteína ArsH parece no requerirse para la resistencia a As, ya que no se han observado cambios fenotípicos en los mutantes; en otros muchos microorganismos como *P. putida* aún no se ha analizado el fenotipo. Recientemente dos grupos de investigadores han cristalizado la proteína ArsH de dos especies diferentes, *Shigella flexneri* (Vorontsov *et al.*, 2007) y *S. meliloti* (Ye *et al.*, 2007), y es de esperar que estudios posteriores permitirán desvelar el mecanismo de reacción de la proteína ArsH.

La aguaglicerolporina AqpS de *S. meliloti* (SmAqpS) es una proteína de membrana de 233 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de las aguaporinas (King *et al.*, 2004). Su secuencia aminoacídica tiene una estrecha homología con la proteína EcGlpF de *E. coli*, ScFps1p de *S. cerevisiae*, y hAQP9 de humanos. El operón *ars* de *S. meliloti* está formado por los genes, *arsR*, *aqpS*, *arsC* y *arsH*; carece del gen *arsB* el cual ha sido sustituido por el gen *aqpS* (Figura 1.9C). Esta combinación de genes *aqpS* y *arsC* ha sido también descrita en otros organismos como *Mesorhizobium loti*, *Caulobacter crescentus* y *Ralstonia solanacearum* (Yang *et al.*, 2005). Diferentes interrupciones génicas y análisis de transporte de As *in vivo* han demostrado que la aguaglicerolporina SmAqpS participa en la salida de As(III) generado de la reducción del As(V) incorporado mediante la arseniato reductasa SmArsC. Así los genes *aqpS-arsC* constituirían un sistema de desintoxicación de As cuando *S. meliloti* se encuentra expuesto a As(V) y a bajas concentraciones de As(III) (Yang *et al.*, 2005).

El gen *arsT* hasta la fecha sólo se ha identificado en el plásmido pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008 (Wang *et al.*, 2006), en *Microbacterium* sp. A33 y en el plásmido pBD2 de *R. erythropolis* (Achour-Rokbani *et al.*, 2010). En *Streptomyces* el gen *arsT* codifica para una tiorredoxina reductasa y se cotranscribe con el gen *arsC* que se encuentra aguas arriba de *arsT* (Figura 1.9C). La proteína ArsT de *Streptomyces* sp. es esencial para la resistencia a As(V) pero no para As(III), lo que podría hacer pensar que ArsT colabora con la proteína ArsC, esta última perteneciente a la familia de las arseniato reductasas dependientes de tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Wang *et al.*, 2006). Otro gen que también podemos encontrar en los operones *ars* es el gen *arsO*. El gen *arsO* se ha identificado en el plásmido pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008 y en *C. glutamicum* ATCC 13032. En *Streptomyces* el gen *arsO* se expresa en un transcrito de sentido contrario junto con los genes *arsR*, *acr3* y

arsO del operón *ars* (Figura 1.9C); en *C. glutamicum* el gen *arsO* también se transcribe con *arsR* (Figura 1.9C). La proteína ArsO tiene homología con las reductasas de unión a flavinas (FAD), por lo que podría tener una función similar a ArsH. Estudios *in vivo* en *Streptomyces* sp. parecen indicar que ArsO no es esencial para la resistencia a As de este microorganismo (Wang *et al.*, 2006).

Otro de los genes adicionales que podemos encontrar en los operones *ars* es el gen *arsN* que codifica para la proteína ArsN y se ha encontrado asociado a genes de resistencia a As de operones *ars*, como al gen *arsC* de *Methylibium petroleiphilum* y a *arsD* en *Burkholderia vietnamiensis* G4 (Chauhan *et al.*, 2009). La proteína ArsN es homóloga a las acetil-transferasas y fue identificada en microorganismos aislados de fangos de una planta de tratamiento residual utilizando una librería metagenómica (Chauhan *et al.*, 2009). Diferentes análisis *in vivo* han confirmado la participación de ArsN en la resistencia a As(V), incrementando hasta seis veces la resistencia al metaloide en la cepa silvestre *E. coli* W3110.

En el siguiente apartado se describirá el mecanismo de acción de los operones de resistencia a arsénico en base a sus componentes.

1.6. Mecanismo de acción de los operones *ars*.

1.6.1. Regulación transcripcional de los operones *ars*.

La expresión de los genes de resistencia a As de los operones *ars* en microorganismos suele estar sujeta a una regulación transcripcional por el propio As y por proteínas metalorreguladoras. Las proteínas metalorreguladoras que controlan la respuesta transcripcional pertenecen a la familia ArsR/SmtB cuyo número de miembros ha ido creciendo hasta dos centenares, con homólogos en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y arqueas. La familia ArsR/SmtB incluye proteínas que responden a As(III)/Sb(III) como el regulador ArsR (Wu & Rosen, 1991), a Zn(II) como los reguladores SmtB y ZiaR (Morby *et al.*, 1993), a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II) como CadC (Endo & Silver, 1995), a Cd(II)/Pb(II) como CmtR (Cavet *et al.*, 2003) y a Co(II)/Ni(II) como NmtR (Cavet *et al.*, 2002).

Los metalorreguladores ArsR, SmtB y CadC, y por extrapolación todos los miembros de la familia ArsR/SmtB, son homodímeros que reprimen transcripcionalmente la expresión de los genes de los operones *ars* por unión del metalorregulador al ADN en ausencia del inductor (metal/metaloide). En presencia del inductor, el metalorregulador sufre un cambio conformacional que provoca la disociación del metalorregulador del ADN y la expresión de los genes presentes en el operón *ars*. Estos reguladores tienen en común dos zonas de dimerización y una región HTH (*Helix Turn Helix*) de unión al ADN o centro activo al final de cada unidad del homodímero, cuyo origen podría tener un ancestro común (Qin *et al.*, 2007) (Figura 1.10); a pesar de compartir ciertas características difieren en otras muchas, las más significativas las encontramos en la zona reguladora de unión del metal/metaloide.

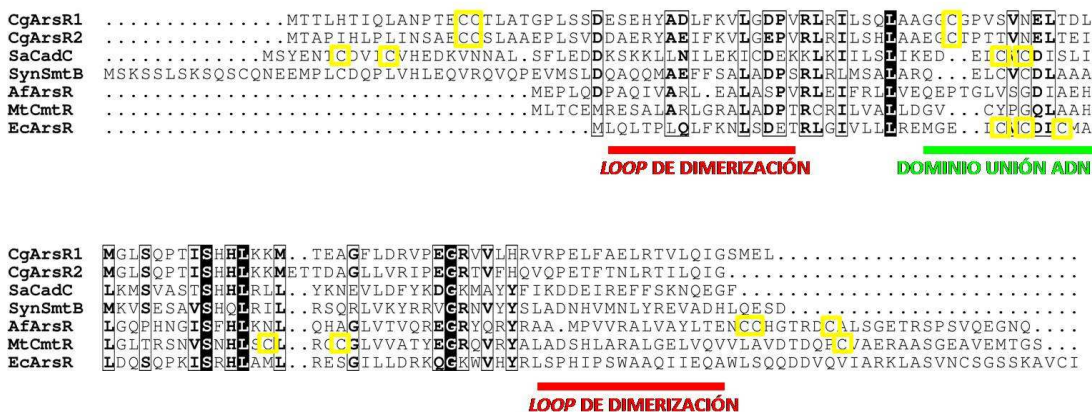


Figura 1.10. Alineamiento de proteínas de la familia ArsR/SmtB: CgArsR1 y CgArsR2 (*C. glutamicum*), SaCadC (*Staphylococcus aureus*), SynSmtB (*Synechocystis* sp. PCC 7942), AfArsR (*A. ferrooxidans*), MtCmtR (*M. tuberculosis* H37Rv) y EcArsR (*E. coli*). Las cisteínas implicadas en el sitio de unión a metales de cada proteína aparecen indicadas en amarillo; las zonas o *loops* de dimerización se indican en rojo y el centro activo o dominio de unión a ADN en verde. Figura modifica de Ordóñez *et al.*, (2008).

Las proteínas metalorreguladoras de la familia ArsR/SmtB descubiertas hasta la fecha presentan la zona reguladora de unión a metales cerca de la región de unión al ADN o en la zona de dimerización (Figura 1.10). Este sitio de unión a metales está típicamente compuesto de pares o triadas de residuos de cisteína y localizados frecuentemente en el extremo de la hélice- α . Las cisteínas que conforman el sitio de unión al inductor pueden proceder de uno de los monómeros del homodímero (intramoleculares), como ocurre en la proteína EcArsR del plásmido R773 de *E. coli* (Rastorguev *et al.*, 1998) (Figura 1.11A), o de los dos monómeros del homodímero (intermoleculares), como sucede en la enzima CgArsR1 de *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2008) (Figura 1.11B). El sitio de unión a metales es susceptible de sufrir cambios conformacionales, por lo que la unión del metal/metaloide genera un desenrollamiento de la hélice- α , que permite la disociación del represor del ADN.

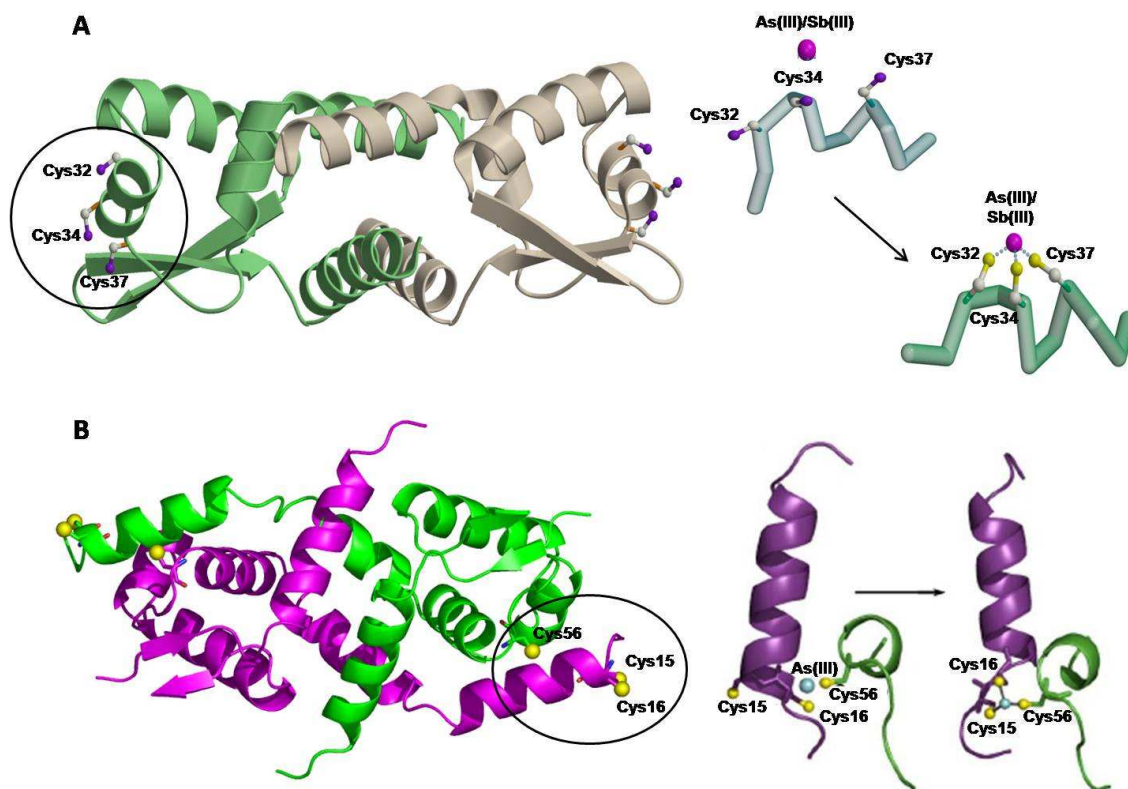


Figura 1.11. Modelos estructurales de miembros de la familia ArsR/SmtB. **(A)** Estructura de la proteína EcArsR del plásmido R773 de *E. coli* (Shi *et al.*, 1996). **(B)** Estructura de CgArsR1 de *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2008). Los dos monómeros de los homodímeros se colorean de forma diferente en cada uno de los ejemplos. Las cisteínas están representadas como círculos morados **(A)** o amarillos **(B)**. El inductor se representa como una esfera morada **(A)** o azul **(B)**.

Los dos metalorreguladores de *C. glutamicum*, CgArsR1 y CgArsR2, son también miembros de la superfamilia de reguladores ArsR/SmtB. Entre ellos existe una identidad del 66%, se encuentran en cada uno de los dos operones *ars* y se expresan divergentemente al resto de los genes del operón *ars* (Ordóñez *et al.*, 2005) (Figura 1.9D). Ambos tienen tres residuos de cisteína, dos en el extremo N-terminal (Cys15 y Cys16) y una tercera (Cys55) cerca de la región central del dominio de unión al ADN, y que conforman el dominio de unión a As(III) (inductor) (Figura 1.10). El sitio de unión a As(III) no presenta la secuencia típica CxCxC del regulador EcArsR y no está relacionado con los sitios de unión de otros metalorreguladores incluídos dentro de la familia ArsR/SmtB, como ocurre con AfArsR de *A. ferrooxidans* (Qin *et al.*, 2007). Esto confirma que el sitio de unión a metales de los reguladores de la familia

ArsR/SmtB presenta una evolución convergente en respuesta a las condiciones medioambientales (Ordóñez *et al.*, 2008).

La realización de diferentes tipos de análisis como espectroscopia de rayos-X, *cross-linking* o anisotropía de fluorescencia, junto con el modelado de CgArsR1 a partir de la estructura del regulador SaCadC de *Staphylococcus aureus* (Ye *et al.*, 2005), permitió predecir que el sitio de unión a metales de los reguladores de *C. glutamicum* está formado por tres cisteínas, dos procedentes de un monómero del homodímero (Cys15 y Cys16) y otra procedente del otro monómero (Cys55) (Ordóñez *et al.*, 2008) (Figura 1.11B). Esto es similar a lo que ocurre en el regulador SaCadC (Kandegedara *et al.*, 2009), aunque ninguno de los cuatro residuos de cisteínas de SaCadC se alinean con las cisteínas de CgArsRs (Figura 1.10).

1.6.2. Sistemas de reducción de arseniato.

Aunque el As(V) puede ser reducido a As(III) abióticamente, este proceso es muy lento para ser considerado significativo, por lo que los seres vivos han desarrollado genes en los operones *ars* que codifican para la enzima arseniato reductasa la cual cataliza esa reacción (Mukhopadhyay & Rosen, 2002b). Las arseniato reductasas citoplasmáticas, a diferencia de las ancladas a la membrana que reducen el As(V) bajo condiciones anaeróbicas (ver apartado 1.3. de esta Introducción), son proteínas monoméricas de pequeño tamaño (135 residuos aproximadamente) que llevan a cabo una reducción catalítica de As(V) a As(III) mediante varios pasos de reacciones redox (Mukhopadhyay & Rosen, 2002b). La reducción catalítica se realiza a pH neutro donde la especie de As(V) en solución se encuentra como un oxianión tetrahédrico en equilibrio entre HAsO_4^{2-} y $\text{H}_2\text{AsO}_4^{1-}$. Hasta la fecha se han descrito diferentes tipos de arseniato reductasas que presentan diferencias muy claras, asociadas no solo a la heterogeneidad de sus secuencias y su conformación estructural, sino también a sus mecanismos de reducción y a la localización de las cisteínas catalíticas, características éstas que permiten su diferenciación y su clasificación (Messens & Silver, 2006).

En todos los casos las arseniato reductasas son enzimas redox citoplasmáticas que reducen As(V) a As(III) gracias a la participación directa de tres grupos tiol de carácter nucleofílico que actúan a modo de cascada con los sistemas de oxidación-reducción de las células. Tanto las células procariotas como las eucariotas presentan como sistema de reducción de puentes disulfuro de las cisteínas proteicas las enzimas tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TrxR) (Arnér & Holmgren, 2000). Además, en la mayoría de los organismos existen moléculas de bajo peso molecular que contienen grupos sulfhidrilo y que

sirven como tampón para prevenir el estrés oxidativo. La más conocida es el glutatión (GSH), presente en animales, plantas, células eucariotas y en bacterias Gram-negativas. GSH mantiene el estado redox de la célula mediante su propia oxidación-reducción cíclica, proceso en el que participa activamente la glutarredoxina (Grx) y la glutatión reductasa (GTR). Sin embargo bacterias Gram-positivas como *S. aureus*, *B. subtilis* y el grupo de las actinobacterias como *Mycobacterium* o *Corynebacterium* no sintetizan GSH, sino que presentan elevados niveles de acetil-coenzima-A (Ac-CoA) reducido, bacilitiol o micotiol (MSH), respectivamente, que sustituyen a GSH como especie principal donadora de grupos tiol (delCardayré & Davies, 1998; Helmann, 2010; den Hengst & Buttner, 2008).

Todas las enzimas arseniato reductasas (ArsC) proceden de una evolución convergente clasificándose, en función del mecanismo de reducción que realicen, en tres familias diferentes: (i) aquellas dependientes del sistema Trx/TrxR, representadas por las enzimas ArsC del plásmido pI258 de *S. aureus* (Ji *et al.*, 1994) y ArsC de *B. subtilis* (Bennett *et al.*, 2001); (ii) arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx, caracterizadas por ArsC del plásmido R773 de *E. coli* y Acr2p de *S. cerevisiae* (Mukhopadhyay & Rosen, 2002b; Mukhopadhyay *et al.*, 2000); (iii) arseniato reductasas dependientes de MSH y micorredoxina (Mrx) identificadas hasta la fecha en *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2009).

1.6.2.1. Arseniato reductasas dependientes del sistema Trx/TrxR.

La arseniato reductasa del plásmido pI258 de *S. aureus* (SaArsC) es la reductasa mejor caracterizada de las dependientes de Trx/TrxR. Los ensayos de mutagénesis revelaron que en esta proteína los residuos cisteína 10, cisteína 82 y cisteína 89 (C10, C82 y C89) son esenciales para la catálisis enzimática (Messens *et al.*, 1999). Su estructura molecular es muy parecida a las enzimas proteín tirosín-fosfatasas de bajo peso molecular (LMW-PTPasa; *Low-Molecular-Weight Tyrosin Phosphatase*) (Zegers *et al.*, 2001) (Figura 1.12A), aunque este aspecto no se refleja a nivel de la homología de sus secuencias aminoacídicas (20% de identidad). La enzima SaArsC comparte con las proteínas LMW-PTPasas un plegamiento caracterizado por cuatro láminas- β paralelas y tres hélices- α , y su centro catalítico conservado (P-loop) donde el sustrato tirosina fosfato se aproxima al residuo C10 (cisteína activa) (Figura 1.12B). La estabilidad estructural de este centro catalítico requiere la presencia de un oxianión tetraédrico, por lo que oxianiones como el fosfato y el sulfato actúan como potenciadores de la actividad de la arseniato reductasa SaArsC (Messens *et al.*, 2003). En presencia del anión sulfato, la enzima SaArsC tiene una especificidad de sustrato alta, y su producto As(III), actúa como un inhibidor (Messens *et al.*, 2002a).

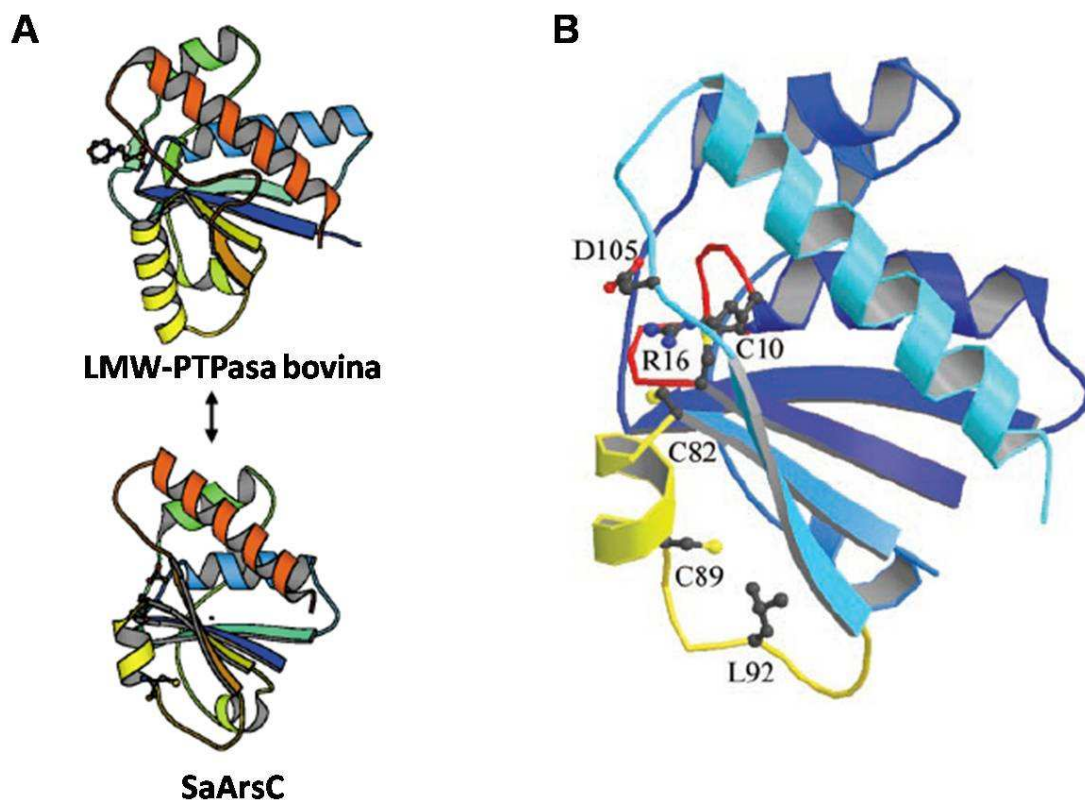


Figura 1.12. (A) Similitud estructural de la enzima SaArsC del plásmido p1258 de *S. aureus* con la proteína tirosín-fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTPasa) bovina. Figura modificada de Zegers *et al.*, (2001). **(B)** Esquema de plegamiento de la proteína SaArsC en forma reducida. La región catalítica C10x5R16 (P-loop) está mostrada en rojo y la parte de la proteína implicada en la reacción redox en amarillo. Figura tomada de Messens & Silver, (2006).

La enzima BsArsC de *B. subtilis* es otra de las arseniato reductasas dependientes de Trx/TrxR más estudiadas. Presenta una identidad aminoacídica de 65% con SaArsC, contiene 139 residuos y es un monómero en solución (Sato & Kobayashi, 1998).

La estructura cristalina (Bennett *et al.*, 2001) y la estructura en solución (Guo *et al.*, 2005) de BsArsC sugieren que su mecanismo de acción está basado en tres cisteínas (C10, C82 y C89), las mismas que en SaArsC de *S. aureus* (Figura 1.12B) (Zegers *et al.*, 2001; Messens *et al.*, 2002a). La combinación de técnicas de cristalografía de rayos-X, resonancia magnética nuclear y estudios cinéticos en SaArsC (Messens *et al.*, 2002b) permitieron determinar el mecanismo de acción de las enzimas ArsC dependientes de Trx/TrxR (Figura 1.13). El ciclo de reacción comienza con el ataque nucleofílico del residuo Cys10 de la enzima ArsC sobre As(V), resultando en un intermediario unido covalentemente Cys10-As(V). A continuación la Cys82 realiza un ataque nucleofílico sobre Cys10 y forma un intermediario Cys10-Cys82, provocando

la liberación de As(III). Finalmente el residuo Cys89 ataca a Cys82 y forma el intermediario Cys82-Cys89. La arseniato reductasa oxidada presenta una elevada flexibilidad que podría facilitar la reducción de la enzima por reacciones redox intermediarias mediadas por la tiorredoxina para regenerar la enzima ArsC activa (Li *et al.*, 2007). En *B. subtilis*, la tiorredoxina A (TrxA) interacciona con la enzima BsArsC mediante un ataque nucleofílico de la Cys29 de la proteína TrxA sobre la Cys89 de BsArsC, regenerando la arseniato reductasa. Un siguiente ataque de la Cys29 sobre la Cys32 de TrxA genera el intermediario Cys29-Cys32. Finalmente la tiorredoxina TrxA es regenerada con participación de la tiorredoxina reductasa (TrxR) y NADPH (Li *et al.*, 2007).

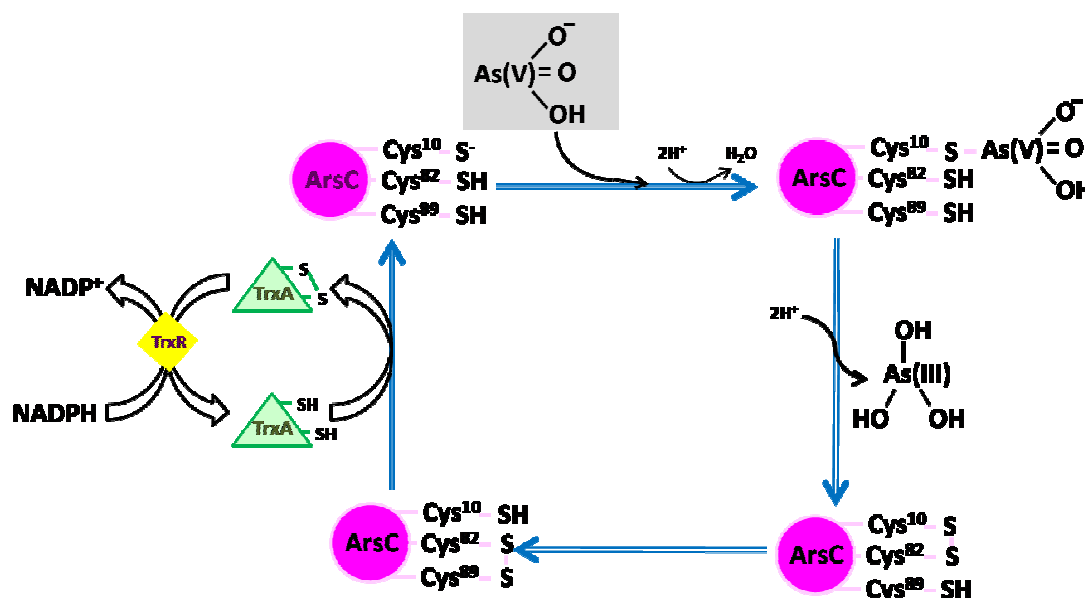


Figura 1.13. Mecanismo de acción de las arseniato reductasas dependientes de Trx/TrxR. El As(V), marcado en gris, marca el punto de comienzo de la reacción.

La enzima SaArsC de *S. aureus* es la única arseniato reductasa que tiene sitio de unión específico para el potasio localizado próximo al P-loop. La interacción del potasio con la Cys10 de SaArsC incrementa la actividad específica de esta enzima y crea un ambiente favorable en el entorno de la cisteína nucleofílica debido a la reducción del valor de pK_a de la Cys10 (Roos *et al.*, 2006). Además, las enzimas SaArsC y BsArsC presentan actividad tirosín fosfatasa (PTPasa) en presencia de p-nitrofenil fosfato (pNpp), actuando el As(V) como inhibidor de esa reacción (Zegers *et al.*, 2001).

Muchas otras arseniato reductasas de esta familia han sido identificadas en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C como *Microbacterium* sp. A33, así como en operones *ars* de proteobacterias Gram-negativas como *O. tritici*, *D. desulfuricans*, *P. aeruginosa* y *A. ferrooxidans* (Cai *et al.*, 1998; Butcher *et al.*, 2000). En estos dos últimos casos hay evidencias con estudios de mutagénesis que los genes *arsC* participan en la resistencia a As(V), pero faltan análisis experimentales *in vitro* que confirmen las conclusiones de los análisis de las secuencias.

1.6.2.2. Arseniato reductasas dependientes del sistema GSH/Grx.

La arseniato reductasa del plásmido R773 de *E. coli* (EcArsC) es la enzima dependiente de GSH (glutati6n) y Grx (glutarredoxina) mejor caracterizada desde el punto de vista estructural y enzimático (Gladysheva *et al.*, 1996). La enzima EcArsC utiliza en su catálisis tres residuos de cisteína, al igual que ocurre en las enzimas dependientes de Trx/TrxR, pero la diferencia fundamental es que tan solo uno de esos tres residuos lo aporta la enzima EcArsC (Liu *et al.*, 1995), los otros dos residuos son aportados por el GSH y la Grx, respectivamente.

Los parámetros cinéticos de la enzima EcArsC están muy alejados de los identificados para la arseniato reductasa SaArsC de *S. aureus*, y no presenta actividad PTPasa (Mukhopadhyay *et al.*, 2002b), ni sitios de unión a potasio como sí ocurre en ArsCs dependientes de Trx/TrxR (Roos *et al.*, 2006). El pH óptimo de EcArsC en la reacción es de 6,5 en contraposición al óptimo descrito para SaArsC que es de 8,0. En la proteína EcArsC el residuo cisteína 12 (C12) es esencial para la catálisis (Liu *et al.*, 1995), pero estudios y análisis de mutagénesis *in vitro* revelaron que tres residuos de arginina que rodean a la C12 (R60, R94 y R107) disminuyen el pK_a del grupo tiol e intervienen en la unión del As(V) a ArsC y en la estabilización del estado de transición (Shi *et al.*, 2003; DeMel *et al.*, 2004) (Figura 1.14). Esos mismos análisis revelaron que cinco residuos (H8, C12, S15, R60 y R94) son importantes para la catálisis de EcArsC. La estructura cristalina de EcArsC puso de manifiesto que la secuencia catalítica de EcArsC es Hx₃Cx₃R con una cisteína N-terminal (C12) que ocupa la posición homóloga a la que ocupa la C10 en el P-loop de SaArsC (Martin *et al.*, 2001).

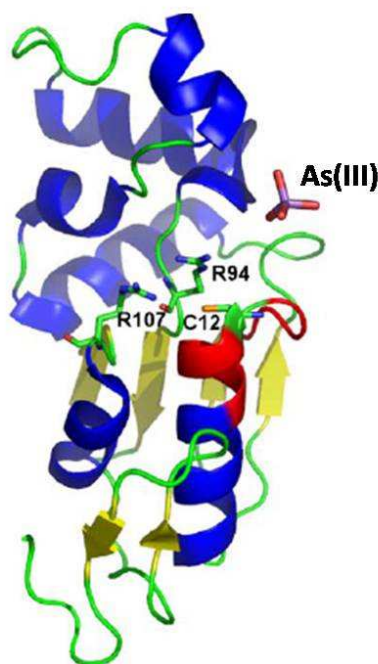


Figura 1.14. Estructura cristalina de la forma reducida de la enzima EcArsC del plásmido R773 de *E. coli*. Figura tomada de Messens & Silver, (2006).

Como se mencionó previamente la enzima EcArsC está ligada a la actividad del GSH y Grx para completar su ciclo catalítico. Grx es una proteína de pequeño tamaño que puede catalizar tanto la reducción de puentes disulfuro intramoleculares como intermoleculares (Bushweller *et al.*, 1992). *E. coli* tiene tres glutarredoxinas, EcGrx1, EcGrx2 y EcGrx3, que conservan el sitio activo con la secuencia consenso CPYC (Aslund *et al.*, 1994). De estas enzimas, la glutarredoxina EcGrx2 es la oxidoreductasa de puentes disulfuros más importante y efectiva en *E. coli*, siendo también la más efectiva en la cesión de los electrones necesarios para la reducción del As(V) por EcArsC (Shi *et al.*, 1999).

Análisis cristalográficos y bioquímicos han permitido proponer el mecanismo de acción de EcArsC (Martin *et al.*, 2001; DeMel *et al.*, 2004) (Figura 1.15). La reacción comienza por un ataque nucleofílico de la Cys12 sobre el As(V) para formar el intermediario Cys12-As(V). En ese momento la Arg94 se retira del sitio activo manteniéndose a una distancia de un puente de hidrógeno de la Cys12. La Arg60 entra entonces en acción para estabilizar este intermediario, mientras la Arg107 permanece en su sitio. En el segundo paso del mecanismo de reacción, un

ataque nucleofílico del GSH sobre el intermediario Cys12-As(V) resulta en la formación de un complejo ternario [Cys12-As(V)-GSH] (Liu & Rosen, 1997). En el siguiente paso la unión de Grx provoca la formación del complejo GSH-Grx. En dos pasos más se acaba liberando el As(III) por hidroxilación, con la regeneración de enzima EcArsC reducida y activa. La proteína Grx es también regenerada por acción de la glutatión reductasa (GTR) y NADPH (Holmgren & Aslund, 1995).

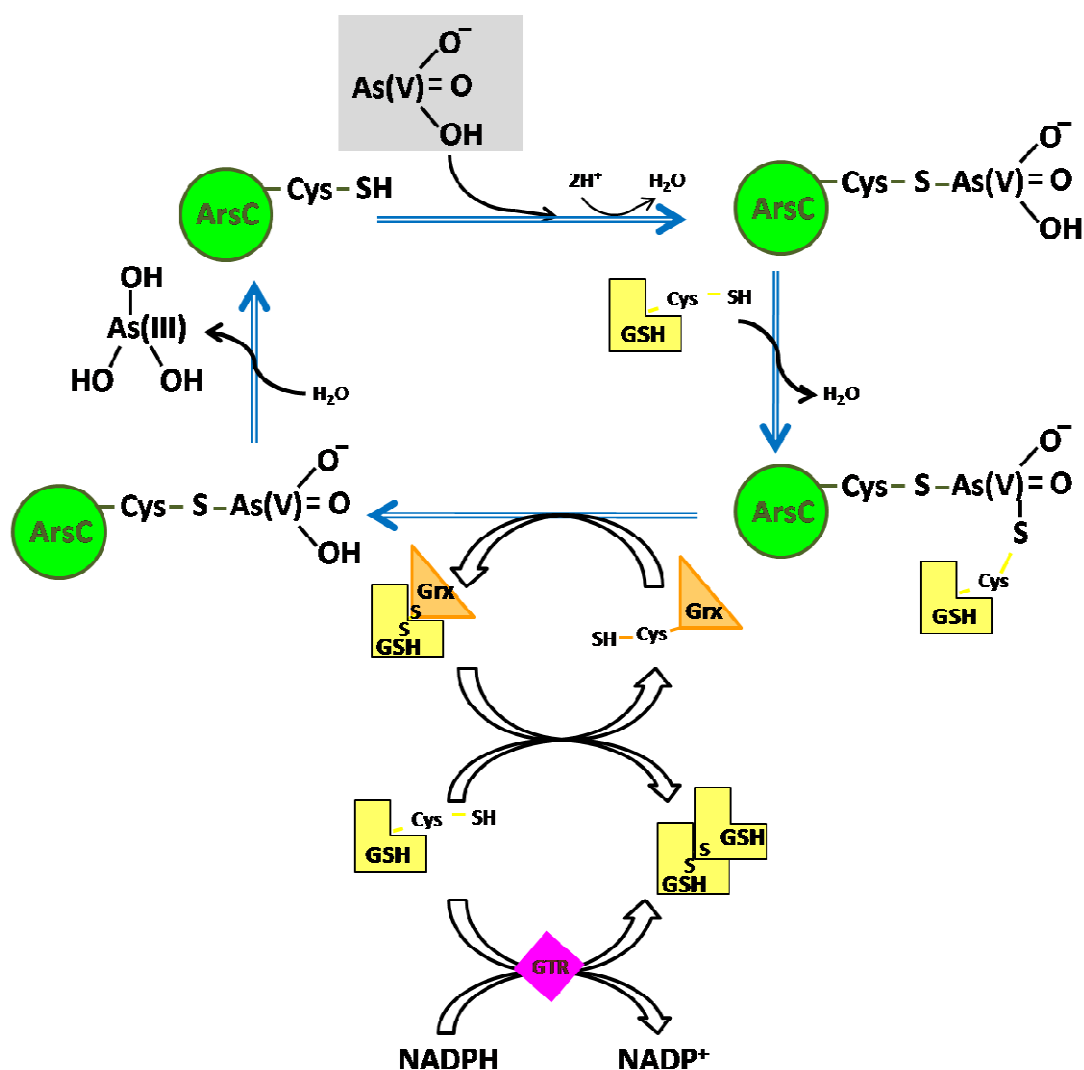


Figura 1.15. Mecanismo de acción de arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx. El As(V), marcado en gris, indica el punto de comienzo de la reacción.

A pesar de que las arseniato reductasas de eucariotas difieren evolutivamente de las de procariotas, varias arseniato reductasas han sido identificadas en *S. cerevisiae* (Bobrowicz *et al.*, 1997; Ghosh *et al.*, 1999), *Saccharomyces douglasii* (Maciaszczyk *et al.*, 2004), *Pteris vittata* (helecho) (Sundaram *et al.*, 2008) y *O. sativa* (arroz) (Duan *et al.*, 2007), como homólogas a la enzima EcArsC en base al uso de GSH y Grx y al mecanismo de acción llevado a cabo por las mismas. La mejor caracterizada de todas ellas es la arseniato reductasa Acr2p de *S. cerevisiae*.

La enzima Acr2p de *S. cerevisiae* (ScAcr2p) constituye el sistema de desintoxicación de As(V) más importante en eucariotas (Mukhopadhyay & Rosen, 1998). Esta proteína está codificada en el cromosoma XVI de *S. cerevisiae* y forma parte del agrupamiento ACR (Arsenic Compounds Resistance) constituido por los genes *acr1*, *acr2* y *acr3*, que codifican respectivamente para un regulador transcripcional, una arseniato reductasa y un transportador de membrana que expulsa As(III) de la célula (Bobrowicz *et al.*, 1997).

A diferencia de EcArsC, la arseniato reductasa ScAcr2p actúa como un homodímero de 130 residuos aminoacídicos por cada monómero (Mukhopadhyay *et al.*, 2000) y su actividad está ligada al sistema GSH/Grx como fuente de poder reductor para completar su catálisis. Esta enzima es capaz de completar *in vitro* el ciclo catalítico en presencia de GSH y Grx procedentes de *S. cerevisiae* o en presencia de cualquiera de las glutarredoxinas de *E. coli*, así como de complementar de forma heteróloga el fenotipo As(V) sensible de una cepa de *E. coli* que carece de su propia ArsC (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). La diferencia más reseñable entre las dos arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx (EcArsC de *E. coli* y ScAcr2p de *S. cerevisiae*) lo constituye la posición de la cisteína catalítica. En EcArsC la cisteína catalítica, C12, está en posición N-terminal, mientras que en ScAcr2p tiene una posición central, C76. Sin embargo, los parámetros cinéticos y el mecanismo de acción de ScAcr2p y EcArsC son equivalentes (Figura 1.15).

La enzima ScAcr2p presenta una homología muy elevada con el centro activo de las PTPasas y con las que comparte una secuencia consenso HCx₅R que participa en la catálisis (Figura 1.16A). Cualquier alteración en la C76 o en la R82 de la secuencia consenso de la enzima ScAcr2p elimina tanto la actividad arseniato reductasa de la enzima como la resistencia a As(V) *in vivo* (Mukhopadhyay & Rosen, 2001). Estos resultados sugieren que la C76 y la R82 son esenciales para la catálisis (Mukhopadhyay *et al.*, 2000) y parecen participar en la unión del sustrato y en la estabilización del estado de transición (Mukhopadhyay & Rosen, 2001). Aunque la arseniato reductasa ScAcr2p es un miembro de la superfamilia de las PTP-asas, y

se cree que tiene una estructura cristalina similar a la fosfatasa hCdc25b de humanos que pertenece a esa misma superfamilia (Figura 1.16B), la enzima ScAcr2p no presenta actividad PTPasa, es decir, no cataliza la hidrólisis del pNpp (p-nitrofenil fosfato) (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). La carencia de la actividad fosfatasa es debida a que no posee el dominio de unión a fosfato rico en glicinas (GxGxxG) típico de muchas fosfatasas. La sustitución de tres residuos de ScAcr2p por glicinas en las posiciones 79, 81 y 84, originó una enzima con mayor actividad fosfatasa, pero con una pérdida significativa de la actividad arseniato reductasa (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Esta actividad fosfatasa en la enzima con tres residuos de glicina extra se perdió cuando se eliminaron los residuos C76 y la R82.

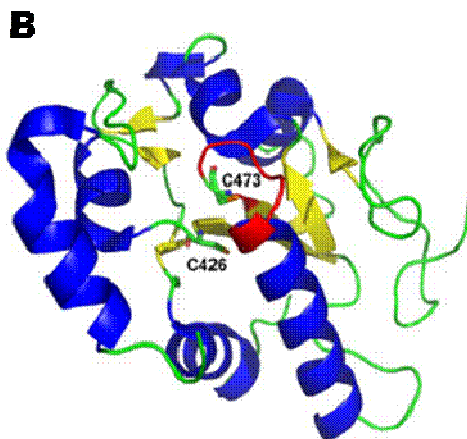
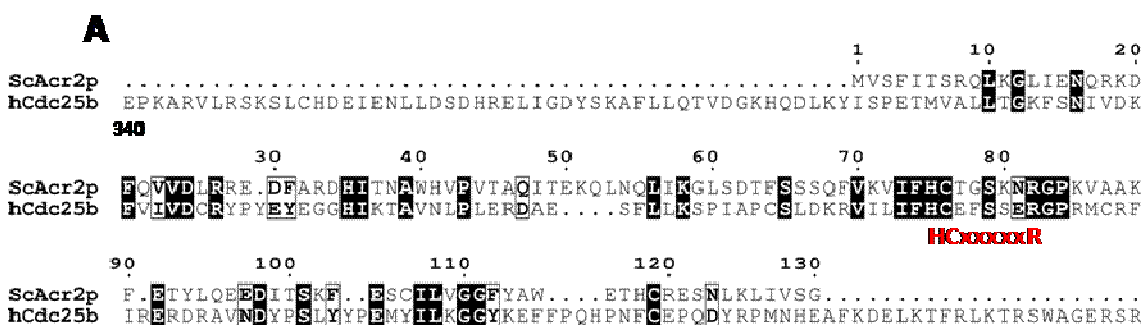


Figura 1.16. (A) Alineamiento de la enzima ScAcr2p de *S. cerevisiae* y la proteína hCdc25b de humanos la cual pertenece a la superfamilia de proteínas tirosín fosfatasas (PTPasas). El centro catalítico HC₅R está marcado en rojo. Se han eliminado los primeros 339 aminoácidos de la proteína hCdc25b. **(B)** Estructura cristalina de la proteína tirosín fosfatasa hCdc25b de humanos. Se cree que la enzima ScAcr2p tiene una estructura similar a hCdc25b. Modificada de Messens & Silver, (2006).

Una variante interesante de arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx es la enzima ArsC de *Synechocystis* sp. PCC6803 (Li *et al.*, 2003). La cianobacteria *Synechocystis* sp.

posee tres diferentes arseniato reductasas, ArsI1, ArsI2 y ArsC (SynArsI1, SynArsI2 y SynArsC), aunque sólo la última de ellas es la principal responsable de la resistencia a As(V) (López-Maury *et al.*, 2003). Las enzimas SynArsI1 y SynArsI2 podrían jugar un cierto papel en ausencia de SynArsC participando en la tolerancia de las células a bajas cantidades de As(V), ya que las enzimas SynArsI1 y SynArsI2 se expresan a bajo nivel y de forma constitutiva (López-Maury *et al.*, 2009). Las tres arseniato reductasas de *Synechocystis* sp. se consideran proteínas híbridas con algunas características de la familia ArsC dependiente de GSH/Grx y otras de la familia dependiente de Trx/TrxR. La proteína SynArsC de *Synechocystis* sp. contiene un P-loop con secuencias conservadas de las ArsC dependientes de Trx/TrxR, pero utiliza GSH y Grx como mecanismo de acción catalítico, lo que la engloba dentro de las arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx (Li *et al.*, 2003). La enzima SynArsC presenta una débil actividad PTPasa en ensayos realizados con pNpp, y forma un complejo ternario con GSH y As(V) durante su mecanismo de acción (Li *et al.*, 2003).

La secuencia primaria de SynArsC de *Synechocystis* sp. contiene tres cisteínas (C8, C80 y C82) esenciales para realizar su mecanismo de acción el cual ocurre de forma similar a lo descrito para la reductasa SaArsC de *S. aureus*, mientras que las arseniato reductasas de *E. coli* y *S. cerevisiae* tienen sólo una cisteína. Recientemente se han realizado análisis estructurales de SynArsC de *Synechocystis* sp. que permitirán descifrar el verdadero mecanismo de acción de esta enzima (Yu *et al.*, 2010).

1.6.2.3. Arseniato reductasas dependientes del sistema MSH/Mrx.

En general, en los actinomicetos no existen genes para la síntesis del glutati6n (GSH), y por ello, este grupo de microorganismos presenta un sistema alternativo que sustituye en muchas de las funciones moleculares al GSH, el micotiol [MSH; 1-D-myo-inositol-2-(N-actyl-L-cisteinil)-amido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside; Figura 1.17A]. El MSH es un pseudoazucar con una cisteína como centro activo, que se mantiene en estado reducido gracias a una micotona disulfuro reductasa (MTR); esta última enzima cataliza la reducci6n del enlace disulfuro del micotiol oxidado o micotona (MS-SM) obteniendo el poder reductor del NADPH. La prote6na MTR tiene un papel fisiol6gico similar al de la enzima glutati6n reductasa (GTR). En los últimos años se ha descubierto que *C. glutamicum* y *Corynebacterium ammoniagenes* sintetizan MSH (Feng *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2010).

La ruta de biosíntesis del MSH ha sido caracterizada en micobacterias pat6genas y no pat6genas como *M. tuberculosis* (Newton *et al.*, 2008) y *Mycobacterium smegmatis* (Rawat &

Av-Gay, 2007). El primer paso de la síntesis de MSH comienza con una reacción de tipo glicosiltransferasa, catalizada por la enzima MshA (Figura 1.17B). A continuación la proteína MshB participa en la formación del pseudodisacárido GlcN-Ins-1, necesario para la siguiente reacción catalizada por la enzima MshC que produce Cys-Glc-Ins. El último paso de la ruta de biosíntesis se lleva a cabo por la enzima MshD que produce finalmente MSH a partir AcCoA y el producto de la reacción anterior (Rawat & Av-Gay, 2007) (Figura 1.17B). Los genes que codifican para las enzimas responsables de la biosíntesis de MSH se han encontrado conservados en la mayoría de las actinobacterias.

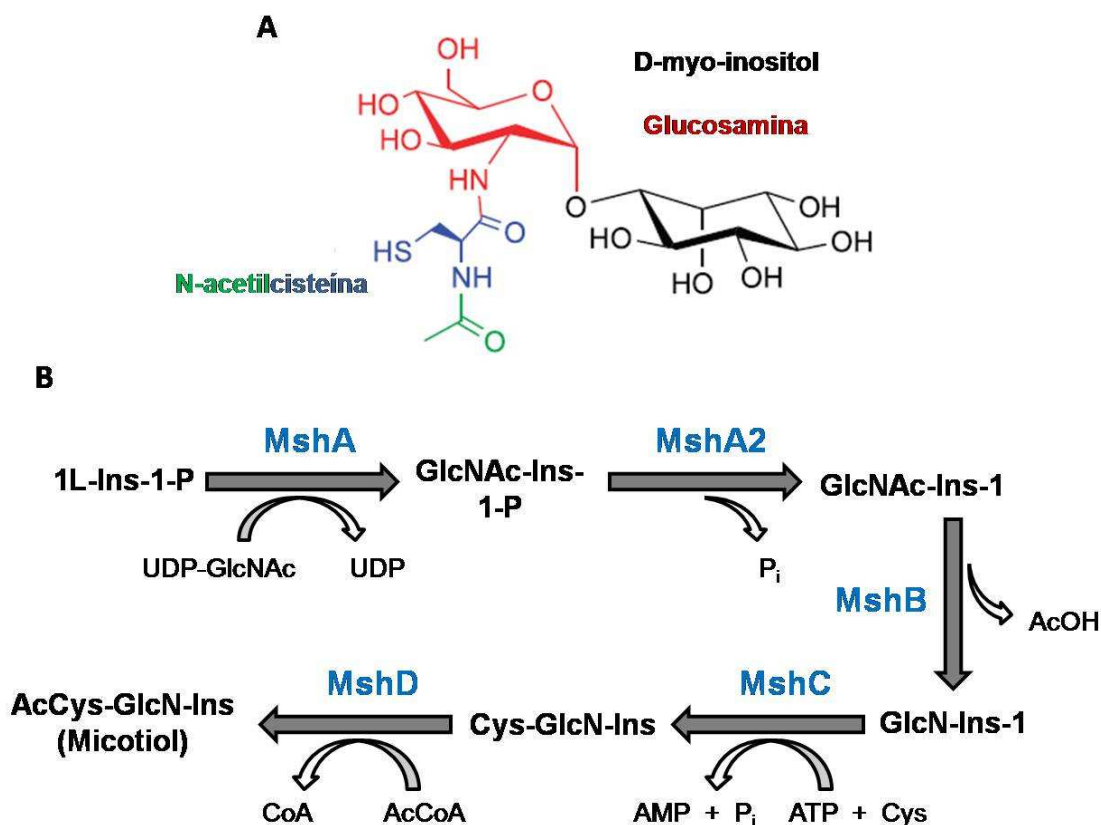


Figura 1.17. (A) Estructura de la molécula de micotiol (MSH). Figura modificada Rawat & Av-Gay (2007) y Roy *et al.* (2004). **(B)** Ruta de biosíntesis de MSH. MshA, N-acetil glucosaminilinositol; MshB, micotiol desacetilasa; MshC, micotiol ligasa; MshD, micotiol sintasa. Figura modificada de den Hengst & Buttner (2008).

Recientemente, dos de las cuatro arseniato reductasas de *C. glutamicum*, CgArsC1 y CgArsC2, han sido incluidas dentro de una nueva familia de arseniato reductasas dependientes de MSH y micorredoxina (Mrx) (Ordóñez *et al.*, 2009). Las micorredoxinas son proteínas homologas a las glutarredoxinas de *E. coli* con una secuencia consenso CxxC que participan

junto con el MSH en el mantenimiento del equilibrio redox de *C. glutamicum*. En el genoma de *C. glutamicum* se han identificado dos micorredoxinas codificadas por los ORFs cg0964, denominada micorredoxina1 (CgMrx1), y cg2789, denominada micorredoxina2 (CgMrx2); ésta última se ha observado que no funciona acoplada a MSH sino a Trx y TrxR (Ordóñez *et al.*, 2009).

Los análisis de interrupción génica de los genes *CgarsC1* y *CgarsC2* demostraron que las enzimas CgArsC1 y CgArsC2 constituyen el principal mecanismo de resistencia a As(V) en *C. glutamicum*. Aunque análisis de homología de secuencias hicieron pensar inicialmente que CgArsC1 y CgArsC2 podrían actuar acopladas al mecanismo Trx/TrxR, estudios *in vitro* revelaron que CgArsC1 y CgArsC2 no se acoplan al sistema Trx/TrxR de *C. glutamicum*. Estudios de mutagénesis *in vivo* permitieron determinar que las enzimas de *C. glutamicum* CgArsC1 y CgArsC2 presentan un único residuo esencial para la catálisis enzimática, C11 en CgArsC1 y C6 en CgArsC2, al igual que ocurre en la EcArsC de *E. coli* (Ordóñez *et al.*, 2009). Los análisis *in vitro* revelaron que CgArsC1 y CgArsC2 tampoco se acoplan al sistema GSH/Grx de *E. coli* pero sí se acoplan a MSH y a la enzima CgMrx1 de *C. glutamicum*. Los parámetros cinéticos de CgArsC1 y CgArsC2 son similares a los parámetros cinéticos de las enzimas ArsCs dependientes de GSH/Grx y marcadamente diferentes a los parámetros de SaArsC de *S. aureus*.

Un posible mecanismo de reacción secuencial ha sido hipotetizado, aunque serían necesarios análisis estructurales para desvelar el verdadero mecanismo de acción de las arseniato reductasas dependientes de MSH/Mrx (Ordóñez *et al.*, 2009) (Figura 1.18). El ciclo de reacción comenzaría con un ataque nucleofílico de la cisteína de CgArsC sobre el As(V), resultando en un intermediario unido covalentemente Cys-As(V). A continuación otro ataque nucleofílico en este caso del MSH sobre el intermediario de Cys-As(V) provocaría la liberación de la arseniato reductasa reducida y activa y un nuevo intermediario As(V)-SM. En el siguiente paso del mecanismo de reacción la unión de la CgMrx1 provoca la liberación del As(III) y un complejo MSH-CgMrx1. Finalmente la CgMrx1 se regenerará con la ayuda de otra molécula de MSH, formando MS-SM que se acabará reduciendo con la ayuda de la enzima CgMTR y NADPH (Ordóñez *et al.*, 2009).

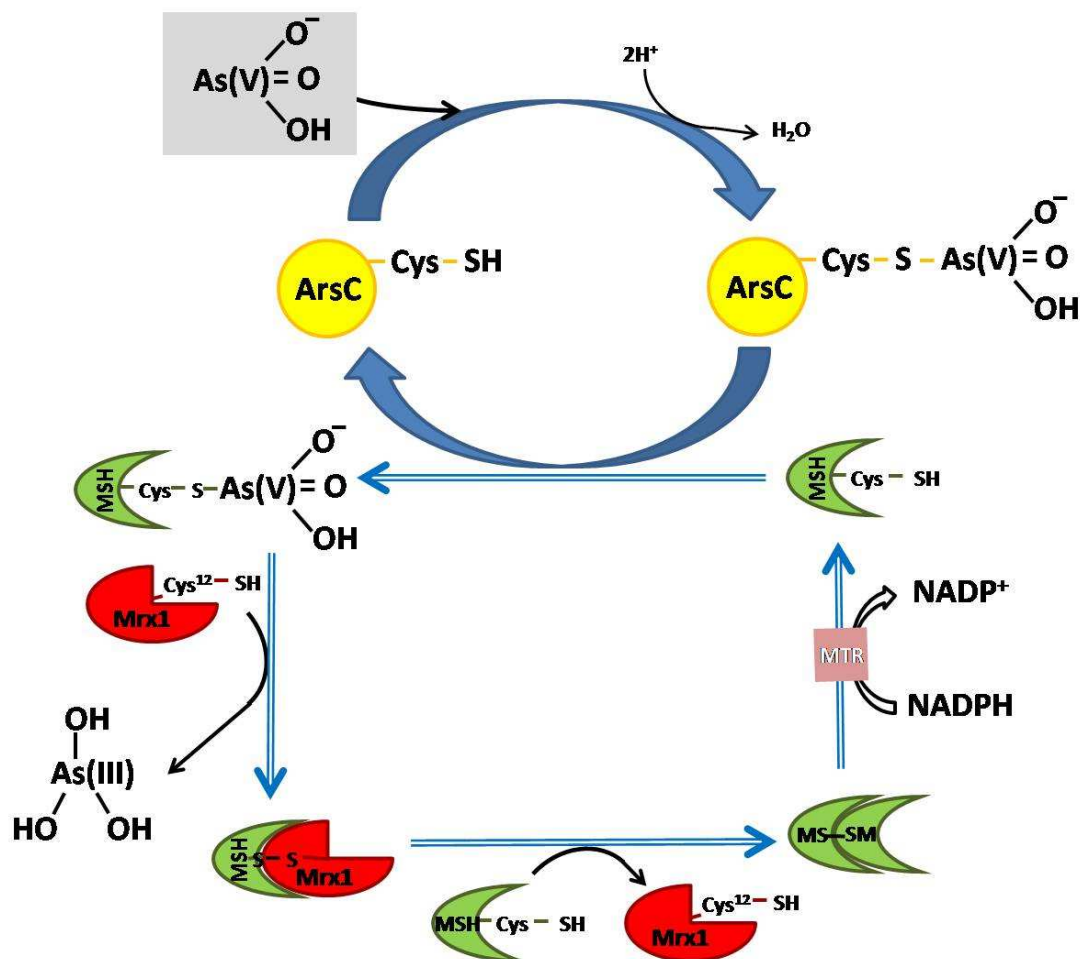


Figura 1.18. Mecanismo de acción de las enzimas arseniato reductasas dependientes de MSH/Mrx. El As(V), marcado en gris, marca el punto de comienzo de la reacción.

1.6.3. Sistemas de salida de arsenito de las células.

La estrategia más empleada en la resistencia frente a compuestos citotóxicos y metales como el As es la expulsión del tóxico al exterior de la célula a través de proteínas transportadoras, codificadas por genes de los operones *ars*. El 70% de las bacterias aisladas de suelos contaminados con As presentan genes *arsB/acr3* que codifican para las enzimas arsenito permeasas (Achour *et al.*, 2007), pero la mayoría de las bacterias sensibles a concentraciones de arsenito superiores a 1,7 mM carecen de genes para esas enzimas. Actualmente existen tres familias diferentes de arsenito permeasas que presentan variabilidad de especificidad y eficacia en la liberación del As(III) al exterior de la célula: las familias ArsB, Acr3 y MRP (Castillo & Saier, 2010).

Sin embargo, recientemente se ha descrito que las aguaglicerolporinas, las cuales constituyen la principal vía de entrada de As(III) y Sb(III) en las células (ver apartado 1.4.2. de ésta Introducción), también facilitan la salida de metaloides de la célula. Las proteínas SmAqpS de *S. meliloti* y ScFps1p de *S. cerevisiae* están implicadas en la liberación de As(III) de la célula. Además varias aguaglicerolporinas de plantas de la subfamilia NIP (*Nodulin 26-like Intrinsic Proteins*), así como la proteína hAQP9 de humanos, son igualmente consideradas canales bidireccionales de metales trivalentes cuando se expresan en levaduras y en oocitos de *Xenopus laevis* (Bienert *et al.*, 2008; McDermott *et al.*, 2010).

A continuación pasamos a explicar en detalle cada uno de los tres tipos de proteínas implicadas en la salida de As(III) de las células.

1.6.3.1. Proteínas de la familia ArsB.

La primera de las proteínas de liberación de As(III) que se identificó pertenece a la familia ArsB, codificada por el operon *arsRDABC* del plásmido conjugativo R773 de *E. coli* (Chen *et al.*, 1986; Tisa & Rosen, 1990). El gen *arsB* que codifica para la proteína ArsB está ampliamente distribuida en genomas y plásmidos de bacterias (sobre todo Firmicutes y γ -Proteobacterias) y arqueas, aunque ArsB está ausente en eucariotas, y su proteína es similar a los miembros de la superfamilia de transportadores de iones MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (Achour *et al.*, 2007).

La proteína ArsB del plásmido R773 de *E. coli* (EcArsB) tiene 45 kDa y su topología es muy similar a la de muchas proteínas de transporte; tiene 12 dominios transmembrana en hélices- α con cinco *loops* citoplasmáticos (C1 al C5) y seis *loops* periplasmáticos (P1 al P6) (Figura 1.19). La topología de la proteína EcArsB fue determinada experimentalmente mediante la construcción de fusiones génicas del gen *arsB* a tres diferentes tipos de genes que codifican para: fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y β -lactamasa (Wu *et al.*, 1992). Tres de los cinco *loops* citoplasmáticos (C1, C3 y C5) tienen una carga neta positiva, mientras que cinco de los seis *loops* periplasmáticos o no están cargados (P1 y P3) o tienen una carga negativa (P2, P4 y P5).

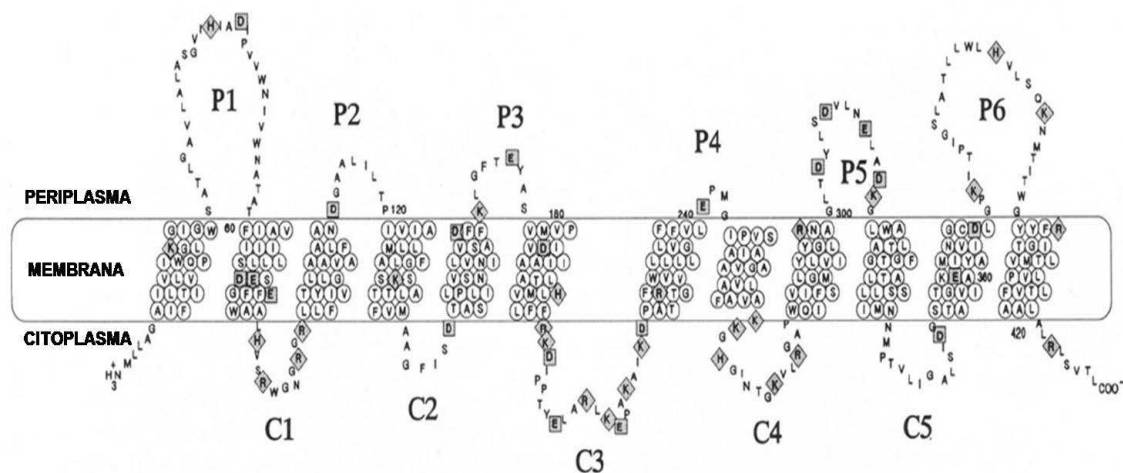


Figura 1.19. Modelo topológico de la proteína EcArsB del plásmido R773 de *E. coli*. Se representan doce segmentos transmembrana hélices- α unidos por cinco *loops* citoplasmáticos (C1-C5) y por seis *loops* periplásmicos (P1-P6). El extremo amino y carboxilo terminal se sugiere sean citoplasmáticos. Los residuos ácidos son marcados en cuadrados y los básicos en rombos. Modificada de Wu *et al.*, (1992).

La proteína EcArsB no se limita sólo al transporte de As(III), sino que también participa en la expulsión de Sb(III) al exterior de la célula, y con mayor afinidad por este último (Meng *et al.*, 2004). Análisis *in vivo* e *in vitro* con membranas invertidas de *E. coli* demostraron que EcArsB tiene dos métodos de obtención de energía para llevar a cabo el transporte de metaloides al exterior de la célula (Dey & Rosen, 1995; Dey *et al.*, 1994) (Figura 1.20): (i) a partir de energía asociada al motivo de fuerza protónica, actuando la proteína EcArsB en este caso como un transportador secundario y confiriendo un moderado nivel de resistencia a As(III) (Kuroda *et al.*, 1997) y (ii) a partir de energía asociada de la hidrólisis de ATP, formando un complejo con la ATPasa ArsA (complejo ArsAB) y confiriendo un elevado nivel de resistencia a As(III) (Dey *et al.*, 1994).

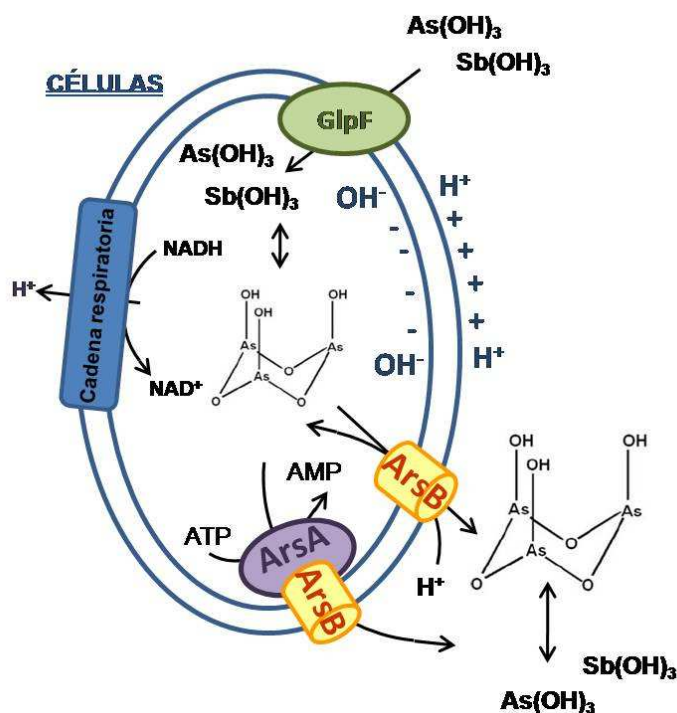


Figura 1.20. Modelo de transporte de metales trivalentes a través de EcGlpF y EcArsB en *E. coli*. En células de *E. coli* el $\text{As}(\text{OH})_3$ y $\text{Sb}(\text{OH})_3$ entran a través de proteínas EcGlpF. La permeasa de arsenito EcArsB utiliza dos tipos de fuente de energía: el motivo de fuerza protónica creado por la cadena de transporte de electrones o la hidrólisis de ATP cuando la proteína EcArsB se encuentra acoplada a la ATPasa EcArsA.

Así, la extrusión de As(III) en bacterias puede ser catalizada por la proteína ArsB sólo, o por el complejo ArsAB. *E. coli* puede utilizar cualquiera de los dos métodos de liberación de As(III) de un modo fisiológico ya que tiene en su cromosoma el operón *arsRBC* que cataliza la translocación de metales trivalentes a través de la proteína EcArsB (Carlin *et al.*, 1995), y puede tener plásmidos como R773 y R46 que contienen el operón *arsRDABC*, lo que permite a *E. coli* utilizar ATP como mecanismo energético de liberación de As(III) (Rosen, 1999). La principal diferencia entre los dos mecanismos es la eficacia, siendo el más eficiente el sistema que utiliza ATP como mecanismo de energía.

La proteína EcArsB actúa como un antiportador de metales trivalentes y protones. Ensayos *in vitro* con membranas invertidas procedentes de células de *E. coli* expresando sólo la proteína EcArsB, a las cuales se les creó un gradiente electroquímico de protones (compuesto de un potencial de membrana y un gradiente de pH) mediante la adición de NADH como fuente de energía (Figura 1.21A), demostraron que la expulsión de As(III) y de Sb(III) de las células se realiza como moléculas neutras [$\text{As}(\text{OH})_3$ y $\text{Sb}(\text{OH})_3$] y asociado a la entrada de protones a

través de la proteína EcArsB (Meng *et al.*, 2004). En base a los experimentos indicados y a otros experimentos de cotransporte utilizando Sb(III) y As(III), los autores sostienen que los verdaderos sustratos de EcArsB son polímeros de As(III) o Sb(III) exclusivamente, o bien copolímeros de As(III) y Sb(III) (Meng *et al.*, 2004) (Figura 1.21B). La naturaleza de esos polímeros es desconocida, pero Meng *et al.* (2004) propusieron una molécula cíclica de tres componentes AsO_3 o SbO_3 como posibles sustratos.

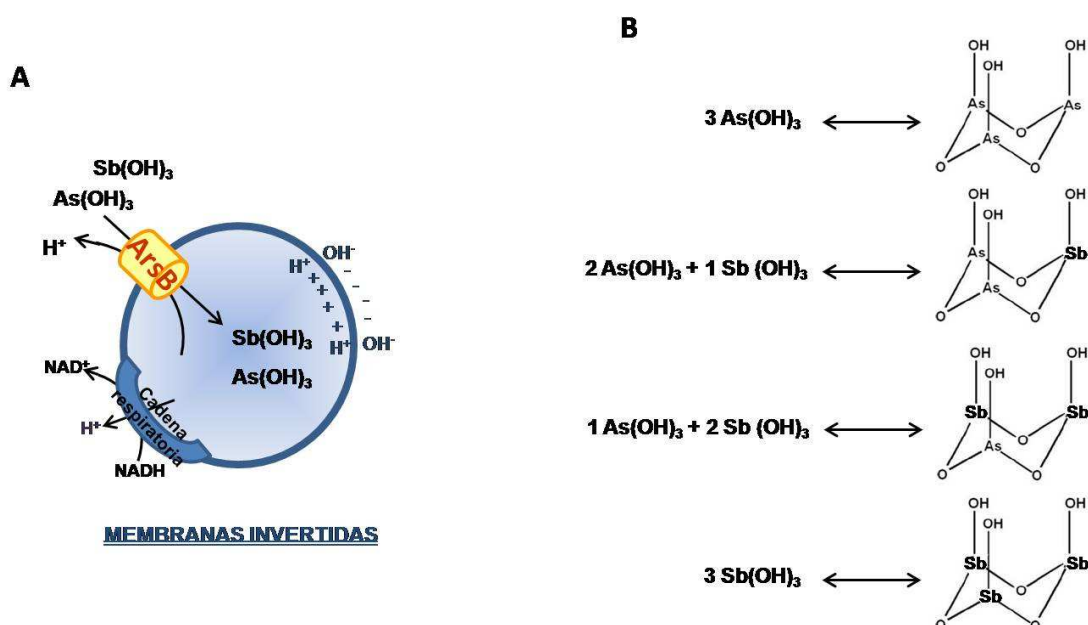


Figura 1.21. (A) Las membranas invertidas son estructuras con una orientación opuesta a las células que se utilizan para el estudio de proteínas de membrana. La adición de energía externa como el NADH hace que las membranas invertidas tengan energía en forma de motivo de fuerza protónica que después utilizarán las proteínas de membrana para llevar a cabo su función. Mediante estudios con membranas invertidas se ha observado que la proteína EcArsB de *E. coli* es un antiportador de As(OH)_3 o Sb(OH)_3 y protones. **(B)** El verdadero sustrato de EcArsB es generado por un equilibrio de tres As(OH)_3 o Sb(OH)_3 en forma de una molécula circular formada por tres componentes AsO_3 o SbO_3 [similares a los encontrados en el As_4O_6 (Maxwell *et al.*, 1937)]. De forma similar, se han propuesto como sustratos mezclas de As(OH)_3 y Sb(OH)_3 en distintas proporciones (3-0, 2-1, 1-2 y 0-3). Figura modificada de Meng *et al.*, (2004).

El complejo ArsAB es el transportador de metaloides trivalentes, As(III) y Sb(III), más extendido dentro de los procariontes (Chang *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2007). Se basa en un sistema de dos componentes: una subunidad catalítica, ArsA, y una proteína transmembrana, ArsB. La subunidad ArsA está ampliamente distribuida en bacterias, arqueas y eucariotas (Castillo & Saier, 2010; Tseng *et al.*, 2007), es un miembro de la familia ABC (ATP Binding Cassette) ATPasas, acoplada probablemente a GTPasas (Leipe *et al.*, 2002), que se une *in*

vivo a la proteína transmembrana ArsB (Dey *et al.*, 1994). Tisa & Rosen (1990) demostraron que la proteína EcArsB del plásmido R773 de *E. coli* actúa como anclaje de membrana de la enzima EcArsA. Aunque todos los *loops* citoplasmáticos son regiones potenciales de interacción con la enzima EcArsA, los *loops* citoplasmáticos más grandes y cargados positivamente son los candidatos más apropiados para la interacción. Basándose en este hecho se ha propuesto que el *loop* citoplasmático C3, con veintidós residuos de los cuales diez están cargados, sería el más adecuado como punto de anclaje de la proteína EcArsA sin descartar alguna otra función diferente. Hay otros *loops* citoplasmáticos como el C1 y C4 con cuatro y cinco residuos cargados, respectivamente, que también son candidatos adecuados para la interacción de la enzima EcArsA con la proteína EcArsB (Wu *et al.*, 1992) (Figura 1.19).

La enzima EcArsA más estudiada es la del plásmido R773 de *E. coli* con 583 amino ácidos. EcArsA exhibe una actividad ATPasa dependiente de sustrato y puede ser purificada como una proteína soluble del citosol (Hsu & Rosen, 1989), a pesar de encontrarse unida a EcArsB *in vivo*. Presenta dos mitades homólogas: mitad A1 (en el extremo N-terminal del residuo 1 al 288) y mitad A2 (en el extremo C-terminal del residuo 314 al 583) conectadas por un pequeño *linker* de 25 nucleótidos (del residuo 289 al 313) (Fu *et al.*, 2011) (Figura 1.22A). Zou *et al.* (1999) determinaron la estructura cristalina de la enzima EcArsA, a partir de la cual se observaron dos dominios de unión NBD (Nucleotide Binding Domain; NBD1 y NBD2), una secuencia similar entre ellos y necesarios para la actividad ATPasa (Walmsley *et al.*, 2001) (Figura 1.22B). En la interfase de las dos mitades y a 20 Å de distancia de los dominios NBDs se consideró el sitio de unión a metaloide, MBD (Metalloid Binding Domain). Este sitio une tres átomos de As(III) o de Sb(III) y participa en la actividad ATPasa. Las cisteínas C113 (de la mitad A1) y C422 (de la mitad A2) del dominio MBD forman un sitio de unión a metaloide de gran afinidad (Ruan *et al.*, 2006). En la unión del dominio MBD a los dominios NBD1 y NBD2 se encuentran los dos dominios STDs (Signal Transductions Domain; STD1 y STD2), uno en cada una de las mitades de EcArsA, formados por doce aminoácidos cada uno de ellos. Los dominios STDs están encargados de la transmisión de la energía procedente de la hidrólisis del ATP al transporte del metaloide (Fu *et al.*, 2011).

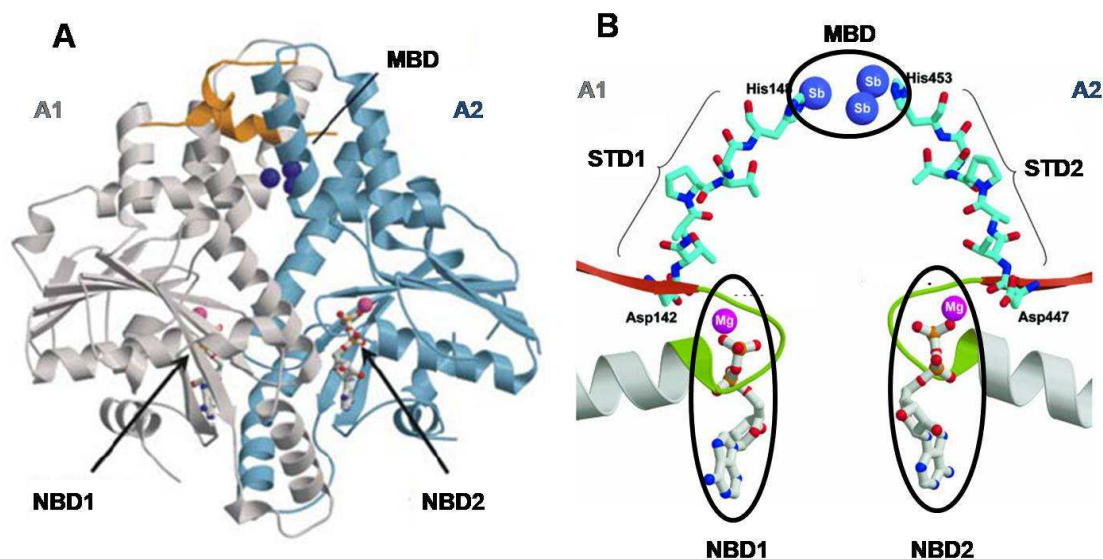


Figura 1.22. Estructura tridimensional de la enzima EcArsA ATPasa. **(A)** Visión de la enzima observando la cavidad central de la misma. La mitad A1 está coloreada en gris y la mitad A2 en azul. **(B)** Zona ampliada de los dominios STDs con doce aminoácidos en cada uno de ellos que conectan los dominios NBD1 y NBD2 con el dominio MBD. Un átomo de Mg^{2+} ADP está unido a cada dominio NBD y tres átomos de Sb(III) al dominio MBD. Figura modificada de Zhou *et al.*, (1999).

La unión del As(III) del citosol de la célula a la proteína EcArsA ATPasa se produce con la ayuda de una “metalo-chaperona” o proteína acompañante de As. Las “metalo-chaperonas” son proteínas de pequeño tamaño cuya función quelante está dirigida a facilitar el acceso de los metales a las proteínas diana con las que se combinan (Rosenzweig *et al.*, 1999; Finney & O’Halloran, 2003; Rae *et al.*, 1999). Entre las proteínas diana de algunas “metalo-chaperonas” se encuentra la superóxido dismutasa (Sod), donde la chaperona Lys7 de *S. cerevisiae* facilita la accesibilidad del cobre a la enzima Sod (Culotta *et al.*, 1997); o la ureasa de *Klebsiella aerogenes*, donde su chaperona, UreE, proporciona níquel al centro activo de la ureasa durante su activación (Mulrooney *et al.*, 2005). Entre este tipo de proteínas acompañantes también se encuentra ArsD, una enzima que se expresa a partir del gen *arsD* presente en los operones de resistencia a arsénico de cinco componentes (*arsRDABC*) (Rosen, 1999).

Hasta la fecha, todos los genes *arsD* y *arsA* se han encontrado juntos en operones de resistencia a As en bacterias y arqueas, lo que nos permite proponer que la agrupación de cinco genes *arsRDABC* probablemente ha evolucionado de la agrupación de tres genes *arsRBC* por inserción de los genes *arsD* y *arsA* como una unidad (Lin *et al.*, 2007). Esa unión de *arsD* y *arsA* sugiere que los dos genes han coevolucionado, y que la proteína ArsD tiene

una función bioquímica especialmente relacionada con la enzima ArsA y con la desintoxicación de As (Mukhopadhyay *et al.*, 2002a). Se han localizado más de 400 agrupaciones génicas de resistencia a As donde los genes de *arsD* y *arsA* están adyacentes, aunque el orden puede estar alterado. En ocasiones los genes *arsDA* sigue a los genes *arsRBC* y otras veces se transcriben de forma divergente con respecto a *arsRC*, como ocurre en la arquea *Halobacterium halobium* (Rosen, 2006).

La enzima ArsD más profundamente estudiada es la del plásmido conjugativo R773 de *E. coli* (EcArsD). La proteína EcArsD es una chaperona de As(III) que transfiere As(III) o Sb(III) a la proteína EcArsA, incrementando la afinidad de EcArsA por el As(III) o Sb(III) a baja concentración del metaloide (Lin *et al.*, 2007). EcArsD es una enzima citosólica que actúa como un homodímero compuesto por dos subunidades de 120 residuos cada una (Chen & Rosen, 1997). Presenta tres residuos de cisteína conservados, C12, C13 y C18, (Lin *et al.*, 2007) que constituyen el sitio de unión del metaloide requerido por EcArsD para ceder el As(III) o Sb(III) a EcArsA (Figura 1.23A), para la posterior liberación del metaloide al exterior por la acción de la correspondiente permeasa (Yang *et al.*, 2011).

Recientemente se ha propuesto un hipotético mecanismo de transferencia del As(III) o Sb(III) de la proteína EcArsD a la enzima EcArsA (Yang *et al.*, 2011), basándose en el proceso de transferencia de cobre de la chaperona Atx-1 a la permeasa de salida del cobre de la célula (Boal & Rosenzweig, 2009) (Figura 1.23B). Se ha propuesto también un modelo de interacción de las enzimas EcArsA y EcArsD (Ajees *et al.*, 2010) a partir de las estructuras cristalinas de EcArsA y EcArsD (Zhou *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2011). Mediante estudios de sistemas de dos componentes de levaduras (*yeast two-hybrid*) entre proteínas EcArsD mutadas al azar y EcArsA, permitieron apoyar el mecanismo de transferencia de As(III) o Sb(III) de la proteína EcArsD a la ATPasa EcArsA descrito por Yang *et al.* (2011), y confirmaron que el sitio de unión a metaloide y la hélice 1- α de la enzima EcArsD participan en la interacción de EcArsD con EcArsA (Yang *et al.*, 2011).

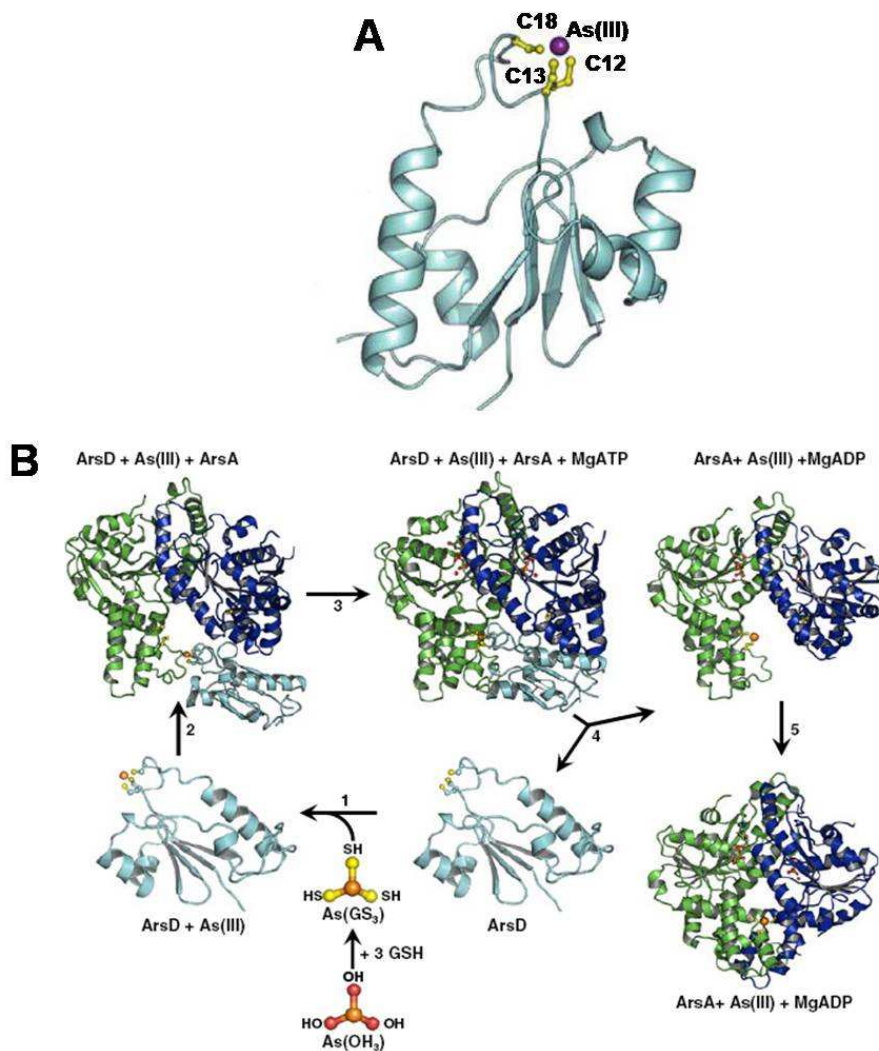


Figura 1.23. (A) Unión del As(III) a un monómero de la proteína EcArsD. Modificado de Ye *et al.*, 2011. **(B)** Mecanismo de transferencia de As(III) de la proteína EcArsD a la proteína EcArsA. En el citosol el As(III) en forma neutra y por lo tanto hidroxilada, reacciona con tres moléculas de GSH para formar As(GH)₃ (el sustrato de EcArsD) (Yang *et al.*, 2011). Aunque EcArsD actúa como dímero, en la reacción se muestra como monómero. *Paso 1:* EcArsD se une a As(III) a través de tres residuos de cisteína (C12, C13 y C18). *Paso 2:* EcArsD unido a As(III) se une a la estructura abierta de EcArsA. *Paso 3:* As(III) es transferido de los tres tioles de EcArsD a tres residuos de cisteína de EcArsA (C113, C172 y C422). *Paso 4:* La transferencia final de As(III) a EcArsA provoca la disociación del complejo ArsD-ArsA. *Paso 5:* El complejo As(III)-ArsA provoca un cambio conformacional originando la estructura "cerrada" de EcArsA con la hidrólisis de ATP. Figura modificada de Ajees *et al.* (2010).

1.6.3.2. Proteínas de la familia Acr3.

La familia Acr3 está formada por proteínas de membrana transportadoras de As(III) y se subdivide en dos subfamilias, Acr3(1)p y Acr3(2)p, en base a relaciones filogenéticas. Los miembros de la familia Acr3 han sido encontrados en aproximadamente 1.700 bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, predominando la subfamilia Acr3(1)p en actinobacterias y Acr3(2)p en α -Proteobacterias, así como en arqueas, hongos y plantas (Achour *et al.*, 2007). De forma generalizada se pensaba que las proteínas transportadoras del tipo ArsB eran más comunes que las proteínas de la familia Acr3, sin embargo los análisis recientes en bacterias aisladas principalmente de muestras de suelo contaminados con As mostraron que los miembros de la familia Acr3 están mucho más extendidos (Cai *et al.*, 2009; Achour *et al.*, 2007; Mansour *et al.*, 2007). La presencia de un transportador de la familia Acr3 o ArsB no parece ser el factor determinante del nivel de tolerancia a As de un microorganismo (Cai *et al.*, 2009).

La familia Acr3 de transportadores de As(III) está representada por la proteína Acr3 de *B. subtilis* (BsAcr3) (Sato & Kobayashi, 1998) y la proteína Acr3p de *S. cerevisiae* (Bobrowicz *et al.*, 1997; Wysocki *et al.*, 1997). Debido a que la proteína Acr3p de *S. cerevisiae* (ScAcr3p), con 404 residuos y 45,8 kDa de peso molecular, y EcArsB de *E. coli*, con 429 residuos y 45,6 kDa, presentan un tamaño y un peso molecular similar y catalizan la misma función, muchos miembros de la familia Acr3 han sido denominados erróneamente como proteínas ArsB, a pesar de no presentar una secuencia similar. Sin embargo, los análisis de los tamaños de las proteínas Acr3 revelaron que en la mayoría de los procariontes las permeasas Acr3 presentan un tamaño de entre 320-390 aminoácidos, con algunas excepciones, y en hongos las proteínas Acr3 suelen ser más grandes, entre 389-454 residuos (Mansour *et al.*, 2007).

Las proteínas Acr3 pertenecen a la superfamilia BART (*B*ile acid/*A*rsenite/*R*iboflavin *T*ransport) (Mansour *et al.*, 2007) y han sido mucho menos estudiadas en comparación con los transportadores de la familia ArsB. La estructura y el mecanismo de transporte de la proteína Acr3 es prácticamente desconocido, aunque algunos estudios predicen que las proteínas Acr3 tienen 10 segmentos transmembrana hélice- α y no utilizan una actividad ATPasa como fuente de energía. Sin embargo, se han identificado bacterias y arqueas, como *A. metalliredigens* QYMF, en las que los genes *arsA* y *acr3* se encuentran localizados en el mismo operón *ars*, en ausencia de *arsB* (Castillo & Saier, 2010; Fu *et al.*, 2010).

Aaltonen & Silow (2008) analizaron la topología transmembranal de la proteína BsAcr3 de *B. subtilis* (346 amino ácidos) mediante 42 fusiones traduccionales, en las cuales se crearon

proteínas quimeras de formas truncadas de la proteína BsAcr3 con dos proteínas indicadoras diferentes (fosfatasa alcalina y proteína fluorescente verde) en veintidós diferentes posiciones en la secuencia aminoacídica de BsAcr3. De estos estudios se dedujo que BsAcr3 está formada por diez regiones transmembrana, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citoplasma. La proteína parece tener unos *loops* similares a los de la proteína bacteriorhodopsina (Belrhali *et al.*, 1999), con *loops* extracelulares cortos y *loops* citoplasmáticos ligeramente más largos. La comparación de BsAcr3 con otras proteínas Acr3 de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, cianobacterias y hongos muestran que a pesar de tener unas identidades muy diferentes, comparten una topología común (Aaltonen & Silow, 2008). Todas las proteínas Acr3 homólogas estudiadas mantienen entre 38 o 39 residuos de los 41 conservados en regiones transmembrana, aunque también presentan residuos conservados tanto en *loops* intracelulares como en *loops* extracelulares.

La proteína BsAcr3 presenta exclusividad de transporte para As(III), sin embargo varios homólogos de Acr3 parecen transportar además de As(III) otros metales. Análisis de resistencia e incorporación de Sb(III) en *S. cerevisiae*, indican que la proteína ScAcr3p de *S. cerevisiae* transporta As(III) y Sb(III) aunque con más afinidad por el primero (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010). No obstante, se deberían realizar más estudios para determinar el mecanismo de transporte a través de la proteína Acr3p y las formas químicas de sus sustratos en *S. cerevisiae*. Recientemente se ha desvelado que la proteína Acr3 de la bacteria *Shewanella oneidensis* (SoAcr3) confiere resistencia a As(V) pero no a As(III). La proteína SoAcr3 purificada se une a As(V) y a no As(III), lo que hace pensar que esta proteína no es un ortólogo de Acr3 (Xia *et al.*, 2008). López-Maury *et al.* (2003) identificaron en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 una arsenito permeasa que se incluyó inicialmente dentro de la familia ArsB, aunque realmente pertenece a la familia Acr3 (Achour *et al.*, 2007), la cual parece ser responsable de la resistencia a As(III) y Sb(III).

Se han identificado también unas proteínas homólogas a Acr3 de levaduras, en plantas como *P. vittata* (PvAcr3) y otras especies de helechos, musgos y gimnospermas. Sin embargo estas proteínas están ausentes en angiospermas como *A. thaliana*, *O. sativa*, *Zea mays* (maíz) y *Vitis vinifera* (Indriolo *et al.*, 2010). La proteína PvAcr3 se encuentra en la vacuola del gametocito, participa en la resistencia a As(III) y presenta una topología similar a la de la proteína ScAcr3p de *S. cerevisiae* (Wysocki *et al.*, 1997).

1.6.3.3. Proteínas de la familia MRP.

Las proteínas de la familia MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*) forman parte del sistema de desintoxicación de As de la mayoría de los organismos eucariotas. Las proteínas MRP conforman un subgrupo de la superfamilia de transportadores de tipo ABC ATPasas (Haimeur *et al.*, 2004) que eliminan conjugados glutatiónilados (GS-conjugados) de drogas del citosol celular asociando el transporte a la hidrólisis de ATP (Keppler, 2011; Leier *et al.*, 1994; Deeley & Cole, 2006).

En *S. cerevisiae* la proteína ScYcf1p (*Yeast Cadmiun Factor*) que confiere resistencia a varios agentes citotóxicos, bombea conjugados de glutatión con arsénico, cadmio o antimonio al interior de la vacuola celular, asociando el transporte a la hidrólisis de ATP (Mielniczki-Pereira *et al.*, 2008). La compartimentación de los metales en la vacuola y su aislamiento del citosol, provoca un incremento de la resistencia al metaloide por parte del microorganismo. La interrupción del gen que codifica para la proteína ScYcf1p de *S. cerevisiae* origina un fenotipo sensible tanto a As(III) como a As(V) (Rosen, 2002a).

Los homólogos de ScYcf1p en humanos son las proteínas hMRP1 y hMRP2 que confieren resistencia a muchos compuestos tóxicos, entre ellos el As(III). El transportador hMRP1 cataliza el transporte de conjugados de glutatión y tóxicos o drogas, y se encuentra frecuentemente extendido en células cancerígenas (Cole *et al.*, 1994). El transporte de esos conjugados se ve incrementado en presencia de As(III), lo que sugiere que la proteína hMRP1 funciona como un transportador de triconjugados de glutatión y As(III) [As(GS)₃] con gasto de ATP (Leslie *et al.*, 2005; Cole & Deeley, 2006). La proteína hMRP2 se encuentra en el hígado humano y libera conjugados de As(GS)₃ al tracto biliar, lo que hace pensar que ésta sea la principal ruta de desintoxicación de As en humanos (Nies *et al.*, 2008; Carew & Leslie, 2010).

1.7. Técnicas de eliminación de arsénico del ambiente: biorremediación.

La eliminación de As de aguas contaminadas se ha realizado a lo largo del tiempo mediante diferentes técnicas o procedimientos. Métodos físicos como la coprecipitación o coagulación, son considerados demasiado caros, poco prácticos a la hora de aplicarlos a gran escala, ineficaces para distinguir formas de As no cargadas en condiciones fisiológicas como el As(III) e incapaces de eliminar cantidades traza del metaloide (Lee *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2010). Una tecnología emergente que ha recibido gran atención en los últimos años es el desarrollo de biosorbentes; sin embargo aunque una gran variedad de especies de bacterias han sido aisladas de ambientes contaminados con arsénico (Cánovas *et al.*, 2003), muy pocas investigaciones han sido realizadas relacionadas con el uso de microorganismos como biosorbentes de As. Diferentes estudios demuestran que la mayoría de los biosorbentes de metales carecen de especificidad y afinidad por el sustrato (Saleem *et al.*, 2008; Eapen & D'Souza, 2005).

La biorremediación de As es el uso de organismos (algas, bacterias, levaduras, hongos o plantas) para eliminar As de ambientes contaminados; la biorremediación es considerada como una alternativa efectiva y económica a los métodos físicos para eliminar As del medio ambiente (Kim *et al.*, 2006; Datta *et al.*, 2011; Vala, 2010). El uso de bacterias como biosorbentes de As presenta numerosas ventajas; las bacterias son de pequeño tamaño, su organización es simple, presentan diversidad catabólica y metabólica en ambientes extremos y una capacidad de crecimiento rápida. Además muchas especies de bacterias son capaces de usar nutrientes inaccesibles para otros organismos o incorporar metales en diferentes fases de su crecimiento.

En los últimos años algunas cepas de *E. coli* modificadas genéticamente en los sistemas de salida de As, han sido utilizadas como biosorbentes o bioacumuladores con la finalidad de eliminar el metaloide de ambientes contaminados (Singh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2008a). La sobreexpresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la entrada de As, como GlpF o Hxt, junto con la modificación de los mecanismos de salida, ha provocado un incremento de la acumulación del metaloide en *S. cerevisiae* (Shah *et al.*, 2010).

Las fitoquelatinas (PCs) son polipéptidos identificados principalmente en plantas y hongos, y caracterizadas por poseer una capacidad de unión con metales; a diferencia de las metalotioneinas (MTs), las PCs presentan una capacidad de unión específica con el As(III) (ver

apartado 1.5.2. de esta Introducción). Diferentes investigaciones han demostrado que cepas de *E. coli* o *S. cerevisiae* con capacidad de producir PCs de *N. tabacum*, *A. thaliana* o *S. pombe* acumulan grandes cantidades de As con diferente grado de éxito y han sido utilizadas en procesos de biorremediación de As (Singh *et al.*, 2008a; Singh *et al.*, 2008b; Singh *et al.*, 2010).

En la última década ha aumentado el número de referencias bibliográficas en las que microorganismos modificados genéticamente muestran incrementos en la acumulación de As, constituyendo estos microorganismos una tecnología útil y barata para poder eliminar As de ambientes contaminados (Vala, 2010; Datta *et al.*, 2010).

1.8. Objetivos.

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

1.- Analisis *in vivo* e *in vitro* de las arsenito permeasas de *Corynebacterium glutamicum* para determinar el mecanismo de transporte asociado a estas proteínas.

2.- Caracterización de las arseniato reductasas de *C. glutamicum*, con énfasis en las enzimas CgArsC1' y CgArsC4, con objeto de conocer los mecanismos generales y particulares de resistencia a arseniato en esta bacteria.

3.- Estudios de incorporación de As en cepas mutantes y recombinantes de *C. glutamicum* capaces de acumular el metaloide en su interior para procesos de biorremediación.

Materiales y métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

2.1.1. Medios de cultivo para microorganismos.

2.1.1.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Medio LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972). Medio de cultivo para el crecimiento de cepas de *E. coli*.

Bacto-triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH. Para su utilización como medio sólido (**Medio LA**) se añadió un 2% de agar. Se esterilizó en un autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Medio SOB (Hanahan, 1983). Medio de cultivo para la obtención de células competentes de *E. coli*.

Bacto-triptona	20 g
NaCl	0,5 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7,5 con KOH y se esterilizó en un autoclave durante 20 minutos a 121°C. Para su uso como medio sólido se añadió un 2% de agar. Inmediatamente antes de ser utilizado se añadieron 1 ml de una solución de MgCl₂ y MgSO₄ 2 M esterilizada a través de un filtro estéril de 0,22 µm de diámetro de poro y 2 ml de glucosa 50% por cada botella con 100 ml de medio, obteniendo el **medio SOC**.

Medio TB (Terrific Broth) (Tartof & Hobbs, 1987). Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* con el fin de obtener ADN plasmídico.

Bacto-triptona	12 g
Glicerol	4 ml
Extracto de levadura	24 g
H ₂ O hasta	900 ml

Después de esterilizar en el autoclave durante 20 minutos a 121°C se añadieron 10 ml de una solución estéril de KH₂PO₄ 170 mM y K₂HPO₄ 720 mM por cada botella con 90 ml de medio.

2.1.1.2. Medios de cultivo para *Corynebacterium glutamicum*.

Medio TSB (Tryptic Soy Broth) (Maniatis *et al.*, 1982). Medio utilizado para el crecimiento de corinebacterias.

Peptona de caseína	16 g
Peptona de soja	3 g
NaCl	6 g
Glucosa	2,5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
H ₂ O hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7,0. Para su utilización como medio sólido (**Medio TSA**) se añadió un 2% de agar. Se esterilizó en un autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Medio mínimo para corinebacterias (MMC) (Kaneko & Sakaguchi, 1979). Medio de cultivo para corinebacterias.

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
Urea	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,41 g
FeSO ₄ ·4H ₂ O	2 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2 mg
NaCl	50 mg
Biotina	50 µg
Tiamina	200 µg
Glucosa	20 g
H ₂ O hasta	1 l

Se ajustó el pH a 7,3. Para su utilización como medio sólido se añadió un 2% de agar. El **medio mínimo para corinebacterias bajo en fosfato (MMCLP)** presenta 100 mg de KH₂PO₄ por cada litro de medio. Las vitaminas se esterilizaron por filtración; la glucosa y el KH₂PO₄ se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C por separado.

2.1.1.3. Aditivos de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo descritos fueron suplementados con diversos aditivos cuando el experimento lo requiera. Los más utilizados fueron antibióticos e indicadores de complementación del gen *lacZ*, que fueron preparados siguiendo las recomendaciones de Maniatis *et al.* (1982). Estos compuestos, mientras no se indique lo contrario, fueron adquiridos a la compañía Sigma Chemical Co.

Ácido nalidíxico (Nal). Preparación en solución a 12,5 mg/ml en NaOH 1 N. La concentración final utilizada en los experimentos de conjugación fue de 50 µg/ml.

Ampicilina (Ap). Preparada en solución a 200 mg/ml en agua. La concentración final utilizada fue de 100 µg/ml para *E. coli*.

Apramicina (Am). Preparada en solución a 100 mg/ml en agua. La concentración final utilizada fue de 100 µg/ml para *E. coli* y de 12,5 µg/ml para corinebacterias.

Cloranfenicol (Cm). Preparada en solución a 34 mg/ml en etanol. La concentración final utilizada fue de 20 µg/ml para *E. coli* y de 6 µg/ml para corinebacterias.

Kanamicina (Km). Preparación en solución acuosa a 100 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 50 µg/ml para la selección de plásmidos en *E. coli* y de 12,5 µg/ml para corinebacterias.

Isopropil-β-D-galactopiranosido (IPTG). Preparación en solución acuosa a 100 mM. Se empleó a una concentración final de 0,05 mM y fue adquirido a la casa comercial Apollo (UK).

5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal). Preparación en solución a 20 mg/ml en dimetilformamida utilizándose a una concentración final de 40 μg/ml. El X-Gal fue adquirido a la casa comercial Apollo (UK).

Las soluciones *stock* de antibióticos disueltas en agua fueron esterilizadas a través de un filtro Millipore estéril de 0,22 μm de diámetro de poro, mientras que las disueltas en etanol, dimetilformamida o NaOH no fueron esterilizadas.

2.1.2. Microorganismos.

2.1.2.1. Cepas utilizadas.

Las cepas utilizadas en el presente trabajo se indican en el Anexo 4 (Tablas A4.4 y A4.5).

2.1.2.2. Crecimiento.

El crecimiento en medio sólido se llevó a cabo a 37°C en medio LA en el caso de *E. coli* y a 30°C en medio TSA en el caso de corinebacterias, salvo que el microorganismo o experimento requiriera alguna variación, lo que se indicará en cada caso concreto.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio LB a 37°C para *E. coli* y en medio TSB a 30°C para corinebacterias. En ambos casos se emplearon matraces Erlenmeyer y una agitación orbital de 220 rpm.

El crecimiento de las bacterias se determinó midiendo la turbidez de los cultivos (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro.

2.1.2.3. Mantenimiento.

Las diferentes cepas bacterianas utilizadas han sido conservadas por siembra periódica (2 meses para las cepas de *E. coli* y 4 meses para las cepas de corinebacterias) en placas de agar con el medio de cultivo adecuado y los aditivos necesarios.

Las placas se mantienen selladas con Parafilm® a 4°C. La conservación a más largo plazo (entre 2 y 4 años) se realizó mediante congelación a -80°C del microorganismo en suspensiones con una concentración final de glicerol del 20% (v/v).

2.1.3. Vectores.

Los vectores utilizados se describen en el Anexo 4 (Tablas A4.2 y A4.3).

2.1.4. Ácidos nucleicos.

El ADN del bacteriófago lambda (fago λ), utilizado como marcador de tamaño en los geles de electroforesis tras su digestión con las endonucleasas *Hind*III, *Pst*I o la que corresponda, fue adquirido a la casa comercial MBI Fermentas.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y se detallan en el Anexo 4 (Tabla A4.1).

2.2. Introducción de ADN.

2.2.1. Transformación de *E. coli*.

A la hora de introducir ADN en *E. coli* por medio de procesos de transformación se requiere una “disponibilidad” de la bacteria que facilite el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. Este estado es lo que se denomina *competencia* y las células que lo presentan *células competentes*. La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado por distintos métodos dependiendo de la eficiencia (número de transformantes por μ g de ADN) deseada en cada caso.

2.2.1.1. Preparación de células competentes de *E. coli* por el método del TSS (Transformation Storage Solution).

Este método permite la obtención de 10^6 - 10^7 transformantes por μg de ADN. Normalmente se utilizaron células competentes obtenidas por este método para transformaciones de plásmidos y no de mezclas de ligación, que requieren una mayor eficiencia de transformación. El proceso seguido, descrito por Chung *et al.* (1989), fue el siguiente:

- 1.- Se siembra una placa de medio LA con la cepa de *E. coli* que vaya a ser utilizada como receptora en la transformación y se incuba a 37°C durante 12-14 horas.
- 2.- Se inoculan 100 ml de medio LB con una colonia aislada y se incuba a 37°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5.
- 3.- Se recogen las células por centrifugación a 4.000 rpm y 4°C durante 10 minutos.
- 4.- Se resuspende el precipitado celular en 10 ml de solución TSS fría y la suspensión resultante se reparte en alícuotas, congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenándose a -80°C hasta su utilización.

Solución TSS (Transformation Storage Solution). Bacto-triptona 10% (p/v); DMSO 5% (v/v); extracto de levadura 5% (p/v); MgSO_4 50 mM; NaCl 10% (p/v) y PEG de peso molecular 8.000 10% (p/v). El pH se ajustó a un valor de 6,5 y la solución se esterilizó a través de un filtro estéril de 0,22 μm de diámetro de poro.

2.2.1.2. Preparación de células competentes de *E. coli* por el método de cloruro de rubidio.

Este método fue descrito por Hanahan (1983) y se utilizó en todos aquellos casos en los que se requería una eficiencia de transformación elevada (hasta 5×10^8 transformantes por μg de ADN) como es el caso de la transformación de mezclas de ligación. Los pasos a seguir son los siguientes:

- 1.- Se siembra una placa de medio SOB con la cepa de *E. coli* que vaya a ser utilizada como receptora en la transformación y se crece a 37°C durante 12-14 horas.
- 2.- Se inocula un matraz con 100 ml del mismo medio con una colonia aislada y se incuba a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,4 y 0,5, manteniéndose posteriormente a 4°C durante 20 minutos.
- 3.- Se recogen las células por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

4.- A continuación se resuspenden las células (con suavidad y manteniendo su temperatura alrededor de 4°C) en 30 ml de solución RF1 fría y se mantienen en hielo durante 15 minutos.

5.- Se centrifuga en las mismas condiciones descritas en el paso 3, se resuspenden las células en 8 ml de solución RF2 fría y se mantiene la suspensión en hielo durante 15 minutos. Finalmente se reparte la suspensión en alícuotas de 200 µl que se conservan a -80°C, previa congelación en nitrógeno líquido.

Solución RF1. Acetato potásico 30 mM; CaCl₂ 10 mM; Glicerol 15% (v/v); MnCl₂ 50 mM y RbCl 100 mM. Se ajusta el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm de diámetro de poro. Se utiliza agua de calidad MilliQ para preparar todas las soluciones y medios de cultivo, así como para el lavado del material utilizado en la preparación y almacenamiento de soluciones y medios, y en el procesamiento de las células.

Solución RF2. CaCl₂ 75 mM; glicerol 15% (v/v); MOPS 10 mM pH 7 y RbCl 10 mM. Se ajusta el pH a 6,8 con NaOH y se esteriliza por filtración a través de un filtro Millipore estéril de 0,22 µm de diámetro de poro.

2.2.1.3. Procedimiento de transformación.

El protocolo de transformación de las células competentes de *E. coli* fue básicamente el descrito por Hanahan (1983), empleado independientemente del método seguido para inducir la competencia de las células.

Los pasos que se siguen se detallan a continuación:

1.- Se descongelan las células competentes en un baño de hielo y agua y se mezcla el ADN con 100 µl de células, manteniéndose en hielo durante 15-30 minutos. El volumen de la solución que contiene el ADN no debe superar el 5% del volumen de células utilizado.

2.- A continuación se somete la mezcla a un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de un rápido enfriamiento en hielo durante unos 2-3 minutos.

3.- Se añaden 900 µl de medio LB o medio SOC y se incuba a 37°C en agitación durante una hora con el fin de que las células que incorporen el plásmido expresen la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección (expresión fenotípica).

4.- Finalmente se siembra en placas de medio LA suplementado con el antibiótico necesario para la selección de los transformantes.

2.2.2. Electrotransformación de corinebacterias.

Los sistemas de electroporación o electrotransformación se basan en un generador que produce pulsos eléctricos de alto voltaje y alta densidad de corriente. Estos pulsos se transmiten mediante dos electrodos a una cubeta que contiene la preparación celular, que de este modo incrementa la permeabilidad de su pared celular. Este tipo de transformación en corinebacterias se utilizó para integraciones al azar de elementos transponibles en el genoma de *C. glutamicum* como: el transposón Tn5 (Epicentre, Biotechnologies); el elemento IS6100, a través del plásmido pAT6100 (Mormann *et al.*, 2006; Tabla A4.2) y el minitransposón Tn31831 mediante el plásmido pMV23 (Suzuki *et al.*, 2006; Tabla A4.2).

El protocolo utilizado para la electroporación de corinebacterias ha sido desarrollado a partir de los trabajos de Dower *et al.* (1988), Mormann *et al.* (2006), Suzuki *et al.* (2006) y Heery & Dunican (1989).

2.2.2.1. Preparación de células electrocompetentes.

1.- Se inocula 1 litro de medio TSB con 1% de un cultivo de *C. glutamicum* crecido durante toda la noche. Se incuban las células a 30°C con agitación hasta que alcanzan una DO_{600nm} entre 0,6 y 0,8.

2.- Los matraces se mantienen en hielo durante 30 minutos recogiendo posteriormente las células por centrifugación a 5.000 rpm y 4°C durante 10 minutos.

3.- Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 litro de agua MilliQ fría. Se repite la centrifugación y se efectúa un nuevo lavado de las células con 500 ml de agua MilliQ fría.

4.- Tras la centrifugación el sedimento celular se resuspende en 2 ml de glicerol 10% frío, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se deja descongelar en hielo lentamente. Se completa el volumen hasta 20 ml con glicerol 10% y se centrifuga de nuevo.

5.- Finalmente se resuspenden las células en 2-4 ml de glicerol 10% de manera que resulte una densidad aproximada de 3×10^{10} células/ml. Se reparten en alícuotas de 40 μ l y se vuelven a congelar en nitrógeno líquido almacenándose a -80°C.

2.2.2.2. Procedimiento de electrotransformación.

- 1.- Se descongelan las células a temperatura ambiente y se trasladan inmediatamente a hielo.
- 2.- Se mezclan 40 μ l de la suspensión celular con 0,1-1 μ g de ADN (que debe estar resuspendido en agua).
- 3.- Se transfiere la mezcla de células y ADN a la cubeta de electroporación de 0,2 cm que ha sido mantenida en hielo y se aplica un pulso de 2,5 kV.
- 4.- Se añade inmediatamente a la cubeta 1 ml de medio TSB (la rápida adición del medio tras el pulso es importante para incrementar el número de transformantes) y se resuspenden las células con una pipeta. Se transfiere la suspensión celular a un tubo de 2 ml donde se incuba a 30°C durante 3 horas.
- 5.- Transcurrido este tiempo se reparte la mezcla sobre las placas de medio TSA con el antibiótico adecuado para permitir la selección de los transformantes.

2.2.3. Conjugación entre *E. coli* y *C. glutamicum*.

El protocolo utilizado fue descrito por Schafer *et al.* (1990). En todos los ensayos de conjugación se utilizó como cepa donadora *E. coli* S17-1, transformada con las construcciones adecuadas, y como cepas receptoras *C. glutamicum* RES167 o derivadas debido a su mayor eficiencia de transformación producida por una alteración de sus sistemas de restricción.

- 1.- Se incuba la cepa donadora *E. coli* S17-1, previamente transformada con el plásmido que se quiere conjugar, en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado hasta alcanzar unos valores de DO_{600nm} entre 1,5 y 2.
- 2.- Se inoculan 100 ml de medio TSB con 1 ml de un precultivo de *C. glutamicum* incubado durante toda la noche y se permite el crecimiento del microorganismo a 30°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 3 y 4.
- 3.- Tanto las células donadoras como las células receptoras se lavan dos veces con medio LB y TSB, respectivamente. Se centrifugan a 3.000 rpm y se resuspenden con agitación suave.
- 4.- Para la mezcla de conjugación se utilizan 4×10^8 células donadoras y 4×10^8 células receptoras (relación 1:1), centrifugándose a 3.000 rpm durante 5 minutos. La mezcla de conjugación se resuspende cuidadosamente en 0,5 ml de TSB y se aplica sobre un filtro de acetato de celulosa estéril con un diámetro de poro de 0,45 μ m (Sartorius) colocado sobre una placa de medio TSA.

5.- Se incuba la placa con el filtro a 30°C durante 20 horas para permitir la transferencia del plásmido desde *E. coli* a *C. glutamicum*.

6.- Se recoge el filtro con la muestra celular en condiciones de esterilidad y se resuspenden las células en 5 ml de medio TSB. Se centrifuga posteriormente 5 minutos a 3.000 rpm y se resuspende el sedimento celular en 0,1-1 ml de medio TSB.

7.- Las corinebacterias transconjugantes se seleccionan extendiendo la muestra celular en placas de TSA suplementados con kanamicina o apramicina y ácido nalidíxico a 30°C durante 2-4 días. En general las corinebacterias y la mayoría de los microorganismos Gram-positivos presentan resistencia natural a ácido nalidíxico por lo que la adición de este compuesto a las placas permitiría únicamente el crecimiento de las corinebacterias.

2.3. Técnicas generales de manipulación y análisis del ADN.

2.3.1. Aislamiento de ADN total.

2.3.1.1. Aislamiento de ADN total a gran escala.

El método utilizado para obtener ADN total de los distintos microorganismos fue esencialmente el descrito por Correia (1995). Este método permite la rápida preparación de ADN total a partir de cultivos con un volumen comprendido entre 5 y 100 ml, obteniéndose entre 4-5 μg de ADN por ml de cultivo.

1.- Se inocula un matraz con 100 ml del medio de cultivo adecuado con una colonia de la cepa deseada y se incuba en agitación a la temperatura óptima de crecimiento durante 16-24 horas.

2.- A continuación se recogen las células por centrifugación a 4°C y 10.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspende en 4 ml de TES y se le añade lisozima a una concentración final de 20 mg/ml. Se incuba la mezcla a 30°C durante 2 horas, para las bacterias Gram-negativas, o hasta 12 horas, para las bacterias Gram-positivas.

3.- Se añaden 8 ml de una solución: EDTA 25 mM pH 8,0, SDS 2% y proteinasa K 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en presencia de la cual se incuba a 42°C durante 2 horas. En el caso de tratarse de microorganismos Gram-positivos este tiempo puede ser incrementado hasta 12 horas.

4.- Transcurrido este tiempo se trata la mezcla con un volumen de fenol neutro. Se mezcla suavemente para evitar la rotura mecánica del ADN y se centrifuga a temperatura ambiente y 13.000 rpm durante 10 minutos. Se recupera la fase acuosa (superior) y se desproteíniza mediante una extracción con 1 volumen de fenol-CIA hasta que se obtiene una interfase limpia. Por último, se efectúa una nueva extracción con un volumen de CIA para eliminar los restos de fenol que puedan interferir con el uso posterior del ADN purificado.

5.- Tras esta última extracción, se añade 0,6 volúmenes de isopropanol. En pocos instantes se observa la precipitación del ADN en forma de largas hebras que se recogen con una varilla de vidrio y se depositan en un tubo Eppendorf. Se lava con etanol al 70%. Se seca el precipitado y se resuspende en 0,1-5 ml de agua. La cantidad de ADN se cuantifica teniendo en cuenta que un valor de $\text{DO}_{260\text{nm}}$ de 1 equivalente a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN.

TES. Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 25 mM y sacarosa 10,3%.

Fenol ácido. Se mezclan 500 ml de fenol sólido con 500 ml de H₂O_d. Se agita y se deja reposar retirando posteriormente la fase superior acuosa. Se burbujea con nitrógeno gaseoso durante 15 minutos y se guarda a 4°C en un recipiente oscuro. En este estado se puede mantener hasta 3 meses.

Fenol neutro. Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1 M pH 8,0 en la campana de extracción. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica y que alcance pH 8,0. El fenol así preparado se conserva a 4°C en un recipiente opaco, donde puede mantenerse durante al menos 1 mes.

Fenol-CIA. Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA.

CIA. Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

2.3.1.2. Aislamiento de ADN total a pequeña escala.

El método utilizado fue esencialmente el descrito por Vaneechoutte *et al.* (1995). Este método permite obtener ADN total de manera rápida y con cantidades suficientes para realizar un análisis por PCR utilizando el ADN extraído. Se utilizó para comprobar de manera rápida las integraciones en el cromosoma de *C. glutamicum* de los vectores suicida derivados de pK18mob y pOJ260 (Tabla A4.2) utilizados en el presente trabajo. Estos vectores presentan secuencias para los oligonucleótidos universales M13-26 y M13-20 (Tabla A4.1).

Se toma una pequeña cantidad de células crecidas en medio sólido con el asa de siembra. Las células se resuspenden en 300 µl de agua en un tubo Eppendorf y se hierven durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugan durante 2 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se utiliza directamente como ADN molde en ensayos de PCR.

2.3.2. Aislamiento de ADN plasmídico.

2.3.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*.

Para obtener ADN plasmídico de *E. coli* con un alto grado de pureza se utilizó el kit *Nucleo Spin[®] Plasmid Macherey-Nagel*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico obtenido mediante este método fue utilizado posteriormente para realizar las construcciones del presente trabajo. Para analizar múltiples colonias procedentes de la transferencia de mezcla de ligaciones de las correspondientes cepas se utilizó una modificación del protocolo descrito por Holmes & Quigley (1981) este método permite obtener ADN con una concentración y un grado de pureza suficiente para realizar reacciones de digestión con endonucleasas de restricción y es un método más rápido y menos costoso.

2.3.2.1.1. Minipreparaciones por el método de *Boiling Holmes & Quigley (1981)*.

1.- Se pica una colonia con un palillo estéril y se inocula en un tubo Eppendorf con 1,5 ml de medio TB, al que se añade el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido en la bacteria; se incuba a 37°C con agitación durante 12-16 horas.

2.- A continuación se recogen las células mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en 350 µl de STET y se añaden 13 µl de una solución de lisozima preparada a una concentración de 20 mg/ml en STET.

3.- Se mezcla con agitador durante 30 segundos y se hierve durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico se precipitan por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos y el precipitado mucoso formado se elimina con la ayuda de un palillo estéril. Posteriormente se añaden 450 µl de isopropanol y se mantiene a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, tras los cuales el ADN plasmídico precipita.

4.- Se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70%. posteriormente se seca y se resuspende en 30 µl de agua o tampón TE.

STET. Sacarosa 8% (p/v); Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0 y Tritón X-100 0,5% (v/v).

Tampón TE. Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM pH 8,0.

2.3.2.2. Aislamiento de ADN plasmídico de corinebacterias.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos en las conjugaciones de *C. glutamicum* con vectores que presentaban orígenes de replicación de corinebacterias, se aisló el ADN plasmídico de los transconjugantes obtenidos, siguiendo el método descrito para *Streptomyces* por Kieser *et al.* (2000).

1.- Se inoculan 1,5 ml de medio TSB, suplementado con el antibiótico adecuado, con células de *C. glutamicum* portadoras del plásmido que se pretende aislar y se incuban durante 24 horas a 30°C con agitación.

2.- Las células se recogen por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos, se resuspenden en 500 µl de solución TES con una concentración de lisozima de 10 mg/ml y se incuba durante 3 horas.

3.- Se añaden 250 µl de una solución de SDS al 2% en NaOH 0,3 N precalentada a 55°C. La mezcla se homogeneiza inmediatamente por agitación y se incuba a 70°C durante 10 minutos, transcurridos los cuales se deja enfriar a temperatura ambiente.

4.- A continuación se añaden 200 µl de fenol ácido y se homogeneiza la mezcla. Las fases se separan por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos (alícuotas de la fase acuosa pueden ser cargadas directamente en un gel para su análisis). Se recoge la fase superior, de aproximadamente 700 µl, en un tubo y se realiza una nueva extracción con fenol-CIA centrifugándose como en el caso anterior.

5.- El ADN plasmídico presente en la fase acuosa se precipita por adición de 70 µl de acetato sódico 3 M no tamponado y 700 µl de isopropanol. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 10 minutos centrifugándose a continuación durante 5 minutos. El precipitado se lava con etanol al 70% y una vez seco, se resuspende en 100 µl de tampón TE.

Para la extracción de ADN plasmídico de corinebacterias también se ha utilizado el sistema comercial *Nucleo Spin[®] Plasmid Macherey-Nagel*, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante para microorganismos Gram-positivos.

2.3.3. Manipulación de ADN.

2.3.3.1. Eliminación de ARN y desproteización de ADN.

Una vez extraído el ADN por cualquiera de los métodos no comerciales que se han descrito anteriormente puede ser necesario someterlo a un proceso de limpieza antes de que pueda ser utilizado en otros ensayos.

1.- El ADN obtenido se trata con ARNasa, en una concentración final de 100 µg/ml, incubándose a 37°C durante 90 minutos.

2.- Una vez transcurrido este tiempo se añade un volumen de fenol neutro, se mezcla y se centrifuga a temperatura ambiente y 14.000 rpm durante 5 minutos.

3.- Se recoge la fase acuosa (superior) y se homogeniza con un volumen de fenol-CIA, centrifugando en las mismas condiciones descritas en el paso anterior. Se repite este proceso hasta obtener una interfase limpia.

4.- Llegados a este punto se hace un último tratamiento con un volumen de CIA y se precipita a -20°C con 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.

Para la limpieza del ADN también se ha utilizado el sistema comercial *Nucleo Spin[®] Extract Macherey-Nagel*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

ARNasa. Se disuelve la ARNasa a una concentración de 10 mg/ml en una solución con NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,5. La mezcla se hierve durante 15 minutos y se deja enfriar lentamente. Posteriormente se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C.

2.3.3.2. Digestión y manipulación de ADN.

Las enzimas de restricción fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones del proveedor: MBI Fermentas. Como norma general, el volumen de las enzimas no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las mismas.

2.3.3.2.1. Esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción.

1.- En un tubo Eppendorf se mezclan, en el orden mencionado, los siguientes componentes de la reacción:

- Agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión.
- Tampón de digestión en la concentración óptima descrita (normalmente se requiere un volumen que sea la décima parte del volumen final de la mezcla, debido a que el tampón se distribuye con una concentración 10 veces mayor de la recomendada para su uso).
- n µg de ADN disuelto en H₂O_d o en tampón TE (si el ADN está disuelto en tampón TE es recomendable que el volumen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción, para evitar modificar las características del tampón de digestión).
- $2n$ unidades de enzima.

2.- Posteriormente se incuba a la temperatura adecuada durante 2-3 horas. El ADN se analiza por migración electroforética en geles de agarosa o se limpia mediante el sistema comercial *Nucleo Spin*[®] *Extract Macherey-Nagel*, siguiendo las instrucciones del fabricante, para su uso posterior.

2.3.3.2.2. Esquema general de reacción de las enzimas de manipulación de ADN más usadas

Rellenado de los extremos protuberantes del ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli.

Esta enzima ha sido utilizada para rellenar los extremos 3'-recesivos (polimerasa), o para degradar extremos 3'-protuberantes (exonucleasa) creados en el ADN tras la digestión con ciertas enzimas de restricción, convirtiéndolos así en extremos romos. Para que la enzima lleve a cabo su actividad polimerasa se sigue el protocolo que se describe a continuación:

1.- Se disuelve el precipitado de ADN obtenido tras su purificación y limpieza en 13 µl de H₂O y se añaden 2 µl de tampón de reacción 10x para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa-I.

2.- Se añade 1 µl de cada uno de los nucleótidos (la concentración final es de 0,1 mM para cada uno) y 1 µl (4 unidades) del fragmento Klenow de la polimerasa, incubándose a 28°C durante 20 minutos.

3.- Una vez finalizada la reacción se inactiva la enzima por calentamiento y se limpia el ADN mediante fenolización. El ADN se precipita a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol frío, y posteriormente se recupera por centrifugación a 14.000 rpm y 4°C durante 30 minutos.

Para la obtención de extremos romos a partir de extremos 3'-protuberantes mediante la actividad exonucleasa del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, antes de añadir los nucleótidos en el paso 2, se añade 1 µl (4 unidades) del fragmento Klenow de la polimerasa, incubándose a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añade 1 µl de cada uno de los nucleótidos y se incuba a 30°C durante 30 minutos, continuando con el paso 3 anteriormente descrito.

Tampón de reacción para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa-I (10x). MgCl₂ 0,2 M; NaCl 0,5 M y Tris-HCl 0,4 M pH 7,5.

Desfosforilación de los extremos 5' del ADN con la fosfatasa alcalina antártica.

Para evitar la recircularización de los vectores digeridos con enzimas de restricción durante las ligaciones, los vectores se trataron con fosfatasa alcalina. Esta enzima hidroliza los extremos 5'-fosfato del ADN e impidiendo la formación de los enlaces fosfodiéster en la misma molécula, pero no la unión a otras moléculas intactas que tengan extremos 5'-fosfato completos. Para que la enzima lleve a cabo su actividad se sigue el protocolo que se describe a continuación:

- 1.- Se disuelve el ADN (0,5 µg aproximadamente) en 30 µl de H₂O_d y se añaden 2,5 µl de tampón de reacción 10x para la fosfatasa alcalina antártica (BioLabs[®], New England, Inc).
- 2.- Se añaden 2,5 µl (2,5 unidades) de fosfatasa alcalina antártica y se incuba 30 minutos a 37°C.
- 3.- Se añaden otros 2,5 µl de enzima y se incuba la reacción otros 30 minutos a 37°C.
- 4.- Se inactiva la enzima por calentamiento de la mezcla a 65°C durante 10 minutos.

Tampón de reacción para la fosfatasa alcalina antártica (10x). MgCl₂ 1mM; ZnCl₂ 0,1mM; Bis-Tris-Propano-HCl 50 mM pH 6,0.

Ligación de fragmentos de ADN con la ADN ligasa del bacteriófago T4.

Esta enzima se utilizó para unir covalentemente los fragmentos de ADN originados por las distintas enzimas de restricción. La enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN, bien dentro de la molécula o bien entre dos fragmentos distintos, y requiere ATP y Mg²⁺ como cofactores.

- 1.- A una cantidad de ADN del vector de entre 10 y 40 ng se le añade una cantidad equimolar de ADN del inserto (aunque normalmente la ligación se favorece cuando la relación inserto/vector se triplica).
- 2.- Se añade el H₂O_d necesaria para alcanzar un volumen final de reacción de 10 µl y se calienta la mezcla a 65°C durante 15 segundos con el fin de relajar los fragmentos de ADN presentes en la mezcla.
- 3.- A continuación se enfría en hielo y se añade 1 µl de tampón de reacción 10x para la ADN ligasa y 1 µl (5 unidades) de ADN ligasa del fago T4 (MBI Fermentas).

4.- Se incuba la reacción a 22°C durante una hora, si el ADN a ligar posee extremos cohesivos, o a 15°C durante 12 horas, si los fragmentos de ADN poseen extremos romos. Las nuevas moléculas generadas durante este proceso serán posteriormente introducidas en la cepa adecuada mediante transformación.

Tampón de reacción para la ADN ligasa del fago T4 (10x). ATP 10 mM; BSA 500 µg/ml; DTT 200 mM; MgCl₂ 100 mM y Tris-HCl 500 mM pH 7,8.

2.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica permite la amplificación de ácidos nucleicos (Mullis *et al.*, 1986), ya que, mediante la utilización de unos oligonucleótidos o cebadores diseñados al efecto y partiendo de una molécula de ADN diana, se puede amplificar entre 10⁵ y 10⁹ veces una secuencia específica contenida en ella.

El método se basa en la repetición de un conjunto de tres pasos efectuados de forma sucesiva en unas condiciones determinadas y controladas de temperatura. Cada conjunto de estos tres pasos se denomina ciclo y consta de:

1. Desnaturalización: Las dos hebras del ADN utilizado como diana son separadas mediante la incubación a una temperatura elevada (92-96°C). Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los oligonucleótidos.

2. Anillamiento de los oligonucleótidos: Consiste en la unión de los cebadores al ADN diana. Los oligonucleótidos sintéticos diseñados son capaces de unirse a secuencias de ADN que limitan físicamente con la región que se pretende amplificar. Cada uno de ellos es una réplica de una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de ADN diana. La distancia entre ellos en el conjunto ADN-oligonucleótidos determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

3. Extensión: Consiste en la elongación de los oligonucleótidos en el conjunto ADN-oligonucleótidos por la acción de una ADN polimerasa durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar. El resultado es la formación de las dos cadenas de ADN, copiadas de las moléculas diana, que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia la del respectivo oligonucleótido.

Procedimiento experimental.

Se empleó la enzima *KAPATaq* ADN polimerasa (Kapa Biosystems) para uso rutinario o *PfuUltra® Hotstart High-Fidelity* ADN polimerasa (Stratagene) para conseguir PCRs de alta fidelidad. El termociclador utilizado fue un *Px2 Thermal Cycler* (THERMO Electron Corporation).

1.- Se prepara en un tubo Eppendorf de 200 μ l, que se mantiene en un baño de hielo y agua, la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 50 μ l:

Tampón 10x para ADN polimerasa	5 μ l
dNTPs (2 mM cada uno)	4 μ l
Oligonucleótido 1 (10 μ M)	2 μ l
Oligonucleótido 2 (10 μ M)	2 μ l
ADN polimerasa	1U
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
DMSO 60% (opcional)	5 μ l
ADN molde	2 μ l
H ₂ Od estéril	Hasta 50 μ l

2.- Se introduce el tubo en un termociclador programado con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	Amplificación			Extensión final
	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	
5 minutos 95°C	30 segundos 95°C	30 segundos X°C*	X segundos** 72°C	10 minutos 72°C
1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo

* Se determina la temperatura óptima según la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos calculada empíricamente.

** El tiempo de extensión varía en función del tamaño del fragmento esperado. Generalmente se utiliza 1 min/kb.

En las amplificaciones realizadas durante el desarrollo de esta memoria, se ajustaron las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción y los parámetros del termociclador para que la fidelidad de la síntesis de ADN fuera máxima. En el proceso de PCR ciertas combinaciones oligonucleótido-molde pueden dar lugar a amplificaciones inespecíficas de productos o a una baja eficiencia del producto deseado. Por modificación de los componentes de la mezcla de reacción, es posible mejorar la eficiencia y especificidad del producto de PCR deseado.

Los fragmentos de ADN amplificados en los distintos experimentos se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el sistema *Nucleo Spin[®] Extract Macherey-Nagel*, siguiendo las instrucciones del fabricante (ver apartado 2.3.6.1. de Materiales y métodos).

Tampón de reacción para la Taq polimerasa (10x). KCl 0,5 M y Tris-HCl 0,1 M pH 8,3.

Mezcla de nucleótidos (dNTPs). Mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP en una concentración de 2 mM cada uno de ellos.

2.3.5. Mutagénesis dirigida.

La técnica de mutagénesis dirigida utilizada permite, mediante PCR, introducir mutaciones puntuales, cambiar la secuencia de tripletes que codifican para un determinado aminoácido y eliminar o introducir determinados nucleótidos en una secuencia de ADN generalmente clonada en un plásmido. Para ello son necesarios dos oligonucleótidos mutagénicos que contienen la mutación deseada flanqueada aguas arriba y abajo por secuencias no modificadas de aproximadamente dieciocho nucleótidos. Ambos oligonucleótidos anillan exactamente en la misma secuencia en cada una de las cadenas del ADN plasmídico, reversa y complementaria. Se siguieron las indicaciones del kit *Quik-Change[®] Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, La Jolla, CA) con pequeñas modificaciones:

1.- Preparación del ADN plasmídico que se usará como molde. Se crecen 5 ml de medio de cultivo inoculado con una colonia de la cepa *E. coli* TOP10 transformada con el plásmido de interés. Posteriormente, se extrae el ADN plasmídico utilizando los sistemas descritos en el apartado 2.3.2.1.

2.- Reacción de PCR utilizando como molde el plásmido en el que está clonado el gen a mutar. Se utiliza una enzima de alta fidelidad como la *PfuUltra[®] Hotstart High-Fidelity*.

Tampón 10x para ADN polimerasa	5 µl
dNTPs (2 mM cada uno)	4 µl
Oligonucleótido 1 (10 µM)	5 µl
Oligonucleótido 2 (10 µM)	5 µl
ADN polimerasa	1U
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DMSO 60% (opcional)	4 µl
ADN molde	1 µl
H ₂ O estéril	Hasta 50µl

El programa de PCR utilizado:

Desnaturalización inicial	Amplificación			Extensión final
	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	
5 minutos 95°C	30 segundos 95°C	30 segundos 55°C	15 minutos 72°C	10 minutos 72°C
1 ciclo	20 ciclos			1 ciclo

3.- Limpieza del producto de PCR mediante el sistema *Nucleo Spin[®] Extract Macherey-Nagel* (descrito en el apartado 2.3.6.1) eluyendo con agua en un volumen final de 45 µl.

4.- Digestión con *DpnI* del producto de PCR. *DpnI* es una endonucleasa de restricción que actúa sobre ADN metilado y hemimetilado. El ADN plasmídico usado como molde procede de una cepa de *E. coli* TOP10 que es *dam⁺* por lo que está metilado y en consecuencia, es susceptible de ser digerido con *DpnI*, sin embargo, el producto de PCR (plásmido con la mutación) no está metilado y por lo tanto no es digerido por esta enzima. Para realizar la digestión de los 45 µl de producto de PCR se le añade 1 µl de *DpnI* (10 U/µl) y 5 µl de tampón de digestión. Se incuba 1 hora a 37°C y transcurrido este tiempo se añade 1 µl de enzima y se incuba 1 hora más a 37°C.

5- Transformar el producto de digestión en la cepa de *E. coli* TOP10. De los transformantes obtenidos se seleccionan 2 ó 3, y se extrae el plásmido utilizando los sistemas descritos en el apartado 2.3.2.1.; la secuenciación final comprobará la introducción de la mutación.

2.3.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se siguieron, básicamente, los métodos descritos por Maniatis *et al.*, (1982). Se utilizó agarosa *Gibco BRL* (Life Technologies) disuelta por calentamiento en tampón TAE en concentraciones de entre el 0,3 y el 2% (p/v). La concentración de agarosa utilizada depende del rango de tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 2.1).

Concentración de agarosa (%)	Tamaño de los fragmentos De ADN separados
0,3	5,0 – 60 kpb
0,5	1,0 – 30 kpb
0,7	0,8 – 12 kpb
1,0	0,5 – 10 kpb
1,2	0,4 – 7 kpb
1,5	0,2 – 3 kpb
2,0	0,1 – 2 kpb

Tabla 2.1. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN.

Las muestras de ADN se mezclan con un sexto del volumen final del tampón de carga concentrado. El ADN se carga en el gel y la electroforesis se desarrolla en tampón TAE mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 V/cm. La “tinción” del ADN se realiza con una solución de bromuro de etidio (BrEt; Fluka Biochemika) a una concentración final de 0,5 µg/ml (el BrEt se intercala en la doble cadena de ADN y permite su visualización tras iluminar el gel con luz ultravioleta). Los geles se fotografían sobre un transiluminador *Spectroline TR-302*, que emite luz con una longitud de onda de 302 nm, con el sistema *Video Graphic Printer UP-890CE*.

Los marcadores de tamaño utilizados, junto con la longitud [en pares de bases (pb)] de los fragmentos de ADN generados tras la digestión con determinadas endonucleasas de restricción, se muestran a continuación:

a. ADN del fago λ digerido con *HindIII* (λ *HindIII*): 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 y 125.

b. ADN del fago λ digerido con *Pst*I (λ *Pst*I): 11.509, 5.080, 4.649, 4.505, 2.840, 2.577, 2.454, 2.443, 2.140, 1.980, 1.700, 1159, 1092, 805, 516, 467, 448, 339, 265, 247 y 210.

Tampón TAE (50x). 57,1 ml ácido acético glacial; 100 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; 242 g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro.

Tampón de carga (6x). Azul de bromofenol 0,25% (p/v); sacarosa 40% (p/v) y xilencianol 0,25% (p/v). Se esteriliza en una olla a presión durante 20 minutos. Se conserva a 4°C.

Solución de Bromuro de Etidio (BrEt). La solución *stock* de bromuro de etidio se conserva a 4°C protegida de la luz. La solución de uso (2 μ g/ml) se prepara a partir de 200 μ l de la solución *stock* en un litro de agua destilada.

2.3.6.1. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.

Para la extracción de fragmentos de ADN separados en geles de agarosa se utilizó el sistema *Nucleo Spin*[®] *Extract Macherey-Nagel*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un sistema comercial basado en la unión específica y reversible del ADN a partículas de sílica-gel. Este método permite extraer fragmentos de ADN de entre 100 pb y 15.000 pb.

2.3.7. Secuenciación de ADN y análisis bioinformático.

Para la secuenciación del ADN se utilizó el método enzimático de terminación de cadena o método dideoxi de Sanger *et al.* (1977). Para la reacción de secuenciación se recurrió a *ABI PRISM*[®] *BigDye*[®] *Terminators* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para separar las moléculas de diferentes tamaños que se originaron se utilizó un secuenciador automático *ABI PRISM*[®] *3700 DNA Analyzer* (Applied Biosystems).

Posteriormente se han utilizado los programas señalados en la Tabla 2.2 para analizar las secuencias obtenidas. Todas las construcciones obtenidas en la presente memoria fueron verificadas por secuenciación.

Programa	Aplicaciones	Origen y referencias
BLAST	Identificación por homología de secuencias	(Altschul <i>et al.</i> , 1997)
CHROMAS	Programa de manejo de cromatogramas	(Technelysium Pty Ltd)
CLUSTAL W	Estudios filogenéticos y alineamientos de secuencias	(Thompson <i>et al.</i> , 1997)

ADN CALCULATOR	Identificación de estructuras secundarias y dímeros entre oligonucleótidos	http://www.sigma-geosys.com/calc/DNACalc.asp
EBI (European Bioinformatics Institute)	Base de datos de secuencias de genes o proteínas	(Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, UK)
EDITSEQ	Análisis y manejo de secuencias nucleotídicas y proteicas	DNASTAR (Dnastar Inc., London, UK)
ESPrpt	Alineamiento de secuencias	(Gouet <i>et al.</i> , 1999)
FASTA	Identificación por homología de secuencias	(Lipman & Pearson, 1985)
HeliQuest	Identificación de la hidrofobicidad de las hélices- α transmembranales de las proteínas de membrana	http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/CoputParams
MAPDRAW	Establecimiento de mapas de restricción y marcos de lectura abiertos en secuencias nucleotídicas	DNASTAR (Dnastar Inc., London, UK)
MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software)	Análisis filogenéticos llevados a cabo mediante el método neighbour-joining	(Tamura <i>et al.</i> , 2007)
NCBI (Pubmed) (National Center for Biotechnology Information)	Búsquedas bibliográficas	(Rockville Pike, Bethesda, USA)
NCBI (Taxonomy) (National Center for Biotechnology Information)	Búsquedas taxonómicas	(Rockville Pike, Bethesda, USA)
Neural Network Promoter Prediction	Identificación de posibles promotores	(Kulp <i>et al.</i> , 1996)
OLIGO CALCULATOR	Cálculo empírico de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos	http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html
Pfam	Determinación de motivos y dominios proteicos conservados	(Finn <i>et al.</i> , 2008)
PROSITE	Determinación de motivos y dominios proteicos conservados con función establecida	(Sigrist <i>et al.</i> , 2002)
PROTPARAM	Obtención de parámetros físico-químicos de proteínas	(Sigrist <i>et al.</i> , 2002)
PSIPRED	Análisis de la estructura secundaria de proteínas	(Bryson <i>et al.</i> , 2005)

SOSUI	Predicción de segmentos transmembranales en proteínas	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html
TABLE	Identificación por homología de secuencias	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi
T-Coffee	Alineamiento de secuencias	(Poirot <i>et al.</i> , 2003)
TMHMM	Predicción de segmentos transmembranales en proteínas	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TopPred2	Predicción de segmentos transmembranales en proteínas	http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/

Tabla 2.2. Programas bioinformáticos utilizados en la presente memoria.

2.4. Técnicas de análisis de proteínas.

2.4.1. Preparación de extractos crudos de *E. coli* y *C. glutamicum*.

Los cultivos bacterianos se incubaron hasta una DO_{600nm} apropiada en matraces Erlenmeyer en agitación con los medios oportunos en cada caso. En todos los casos las células se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 5.000 rpm y fueron resuspendidas en solución de lisis, generalmente PBS suplementado con *Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche). Se utilizaron distintos métodos de lisis en función del volumen de cultivo requerido.

PBS (1x). Por cada litro de agua mezclar: 8 g NaCl, 0,02 g KCl, 1,44 g NaH_2PO_4 y 0,24 g KH_2PO_4 . Ajustar el pH a 7,4.

2.4.1.1. Perlas de vidrio (*FastPrep*).

Se utilizó este método para cultivos bacterianos de pequeña escala (<10 ml). Las células fueron resuspendidas en 600 μ l de tampón de lisis o PBS y se añaden a microtubos Eppendorf, en los que previamente se ha introducido un volumen aproximado de 50 μ l de perlas de vidrio con un diámetro de entre 106-205 μ m (Sigma). Las células fueron homogeneizadas utilizando *FastPrep*TM FP120 (Thermo BIO101, MA) mediante cuatro pulsos de 45 segundos, con velocidad de 4 (para células de *E. coli*) o de 6 (para células de *C. glutamicum*) y un intervalo de 5 minutos de incubación en hielo entre cada pulso. Las muestras fueron centrifugadas posteriormente a 10.000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Los sobrenadantes fueron utilizados directamente como extractos crudos.

2.4.1.2. Sonicación.

Los cultivos bacterianos de *E. coli* (100 ml) se resuspenden en 10 ml de solución de lisis o PBS. Se homogeneiza la mezcla y se somete a la acción de ultrasonidos con un sonicador a 4°C (o en un baño de agua y hielo). Se aplican 5 pulsos de 10 segundos separados por periodos de 30 segundos. Para eliminar los restos celulares se realizó una centrifugación a 4°C y 8.000 rpm durante 10 minutos recogiendo posteriormente el sobrenadante.

La lisis de las corinebacterias resulta más dificultosa por la presencia de ácidos micólicos en su pared celular. El método descrito con anterioridad es aplicable a corinebacterias si bien el número de pulsos debe ser de 5-7 con una duración de 30 segundos a 1 minuto por pulso.

2.4.1.3. Prensa francesa.

Se utilizó este método para cultivos bacterianos a gran escala (>100 ml). Los cultivos se resuspenden en solución de lisis o PBS, en 1/20 del volumen inicial. Se añade ADNasa-I (Sigma) a una concentración final de 2 mg/ml. Esta suspensión se pasa 3 veces sucesivas por la prensa francesa (*French press*) a una presión de 20.000 psi (*pounds per square inch*). La temperatura del cultivo durante todo el proceso se mantiene a 4°C. El extracto se centrifuga a 8.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante.

2.4.2. Expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* para su posterior purificación.

Para la purificación de proteínas de *C. glutamicum* los genes que codifican para las proteínas de interés fueron expresados en *E. coli* mediante un sistema basado en el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Tabor & Richardson, 1992). En este sistema el fragmento de ADN que se quiere expresar se introduce en el sitio de clonación múltiple situado corriente abajo del promotor del bacteriófago T7 (P_{T7}). Este promotor es reconocido específicamente por la ARN polimerasa del propio fago, cuyo gen está integrado en el genoma de la cepa *E. coli* BL21(DE3) bajo el control del promotor del gen *lacUV5* (P_{lacUV5} ; inducible por IPTG). Así, una exposición de la cepa a este compuesto induce la expresión de la ARN polimerasa del fago T7 y por lo tanto su unión específica con el promotor T7, bajo cuyo control se encuentra el gen de interés que se quiere expresar.

2.4.2.1. Expresión de los genes en *E. coli*.

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

- 1.- Se usa el plásmido de la serie T7 (que contiene el gen a expresar bajo el promotor para la ARN polimerasa de T7) para transformar la cepa *E. coli* BL21(DE3) y se plaquea la transformación en medio LA suplementado con el antibiótico correspondiente, incubándose a 37°C hasta el crecimiento de los transformantes.

2.- A continuación se inocula un matraz con 100 ml de medio LB con una de las colonias obtenidas en la transformación anterior y se incuba a 37°C con agitación durante 12 horas.

3.- Se pasan 2 ml del cultivo a un matraz con 100 ml de medio LB y se incuba a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una DO_{600nm} de 0,6. En este momento se realiza la inducción por adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incuba durante tres horas más.

4.- Se recogen las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos.

Las temperaturas y los tiempos de crecimiento y de inducción fueron susceptibles de modificación dependiendo de las proteínas.

2.4.2.2. Análisis de la expresión heteróloga de proteínas solubles.

1.- Cada uno de los sedimentos celulares obtenidos tal y como se describe en el apartado anterior se resuspenden en tampón PBS. La cantidad de tampón a añadir se determina según el tamaño del precipitado.

2.- Se toman 5 μ l de la suspensión de células y se mezclan con 10 μ l de tampón de muestra desnaturante. La mezcla así obtenida se hierve durante 10 minutos y se carga en un gel de acrilamida, siguiendo la técnica que se describe en el apartado 2.4.5. La expresión de proteínas heterólogas se comprueba por comparación de los extractos proteicos de cada transformante en presencia y ausencia del compuesto inductor.

2.4.2.3. Análisis de la expresión heteróloga de proteínas transmembranales.

1.- El sedimento celular obtenido tras la inducción se resuspende en 20 ml del tampón de lisis-I y se rompe mediante alguno de los métodos descrito en el apartado 2.4.1.

2.- Se centrifuga el extracto a 8.000 rpm durante 30 minutos. Se recupera el sobrenadante y el precipitado. Este último se resuspende en tampón de lisis-I, la cantidad de tampón se determina dependiendo del tamaño del precipitado.

3.- El sobrenadante se somete a ultracentrifugación a 4°C durante 1 hora a 40.000 rpm, tras lo cual las membranas celulares quedan retenidas en el precipitado.

4.- Estas membranas celulares se resuspenden en 50 μ l de tampón de lisis-I suplementado con detergentes para solubilizarlas.

5.- Se toman 10 µl de las membranas solubilizadas y se mezclan con 5 µl de tampón de muestra desnaturante. La muestra así obtenida sin hervir se carga en un gel de acrilamida, siguiendo la técnica que se describe en el apartado 2.4.5. En las membranas podemos comprobar la presencia de la proteína expresada comparando extractos proteicos inducidos y sin inducir.

Tampón de lisis-I. Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 100 mM.

2.4.3. Análisis del nivel de expresión de proteínas de *C. glutamicum*.

Para analizar el nivel de expresión de proteínas de *C. glutamicum* en la propia actinobacteria o en *E. coli* la preparación de las muestras requiere un protocolo especial diferente en función de si las proteínas problema son solubles o transmembranales. Las muestras una vez preparadas fueron cargadas en un gel de acrilamida, transferidas a una membrana (*Western blot*) y detectadas inmunológicamente, como se detalla en los apartados 2.4.5., 2.4.7 y 2.4.8.

2.4.3.1. Expresión de los genes de *C. glutamicum*.

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1.- Se transforma el plásmido con el gen de *C. glutamicum* en la cepa *E. coli* AW3110 siguiendo la técnica que se describe en el apartado 2.2.1.3. o se conjuga a la cepa de *C. glutamicum* RES167 o derivada, siguiendo la técnica que se describe en el apartado 2.2.3.

2.- A continuación se inocula un matraz con 100 ml de medio LB (*E. coli*) o TSB (*C. glutamicum*) con una de las colonias obtenidas anteriormente y se incuba a 37°C o 30°C con agitación durante 12 horas.

3.- Se pasan 2 ml del cultivo a un matraz con 100 ml de medio LB o TSB, respectivamente, y se incuba a 37°C o 30°C con agitación hasta que el cultivo alcance una DO_{600nm} de 3. En este momento se añade arsenito ($NaAsO_2$; Fluka) o arseniato ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$; Fluka) a una concentración final de 1 mM o 5 mM, respectivamente (si fuera necesario), y se incuba durante toda la noche. Si el cultivo no necesitara inducción se mantiene creciendo el mismo tiempo que el cultivo inducido para alcanzar una masa celular equivalente.

4.- Se recogen las células por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos.

2.4.3.2. Análisis de expresión de proteínas solubles de *C. glutamicum*.

1.- El sedimento celular obtenido se resuspende en 2 ml de tampón de lisis-II y se rompe mediante *FastPrep*, siguiendo la técnica que se describe en el apartado 2.4.1.1. Posteriormente se centrifuga el extracto a 14.000 rpm durante 2 minutos y se recupera el sobrenadante.

2.- Se toman 10 µl de la suspensión de células y se mezclan con 3 µl de tampón de muestra desnaturante. La mezcla así obtenida se hierve durante 10 minutos y se carga en un gel de acrilamida.

Tampón de lisis-II. Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 0,3 M; MgCl₂ 1 mM; glicerol 20% (v/v).

2.4.3.3. Análisis de expresión de proteínas transmembranales de *C. glutamicum*.

1.- El sedimento celular obtenido se resuspende en 4 ml de tampón de lisis-III y se rompe mediante *FastPrep*, siguiendo la técnica que se describe en el apartado 2.4.1.1. Posteriormente se centrifuga el extracto a 14.000 rpm durante 2 minutos y se recupera el sobrenadante.

2.- El sobrenadante se somete a ultracentrifugación durante 1 hora a 40.000 rpm, tras lo cual las membranas celulares quedan retenidas en el precipitado.

3.- Estas membranas celulares se resuspenden en 200 µl de tampón de lisis-III con 1% de Tritón X-100 (Sigma) para solubilizarlas y se incuban a 4°C durante 1 hora en la plataforma agitadora.

4.- Se somete a ultracentrifugación durante 1 hora a 40.000 rpm, tras lo cual en el precipitado quedan las membranas celulares y en el sobrenadante quedan las proteínas de membrana solubilizadas con el detergente.

Tampón de lisis-III. HEPES-KOH 75 mM pH 7,5; KCl 150 mM; MgSO₄ 1 mM; Sacarosa 0,25 M.

2.4.4. Cuantificación de proteínas.

En todos los casos la concentración de las muestras proteicas se determinó a partir del método de Bradford (1976), basado en el cambio del máximo de absorción de 465 a 595 nm tras la unión específica del colorante Azul Brillante Coomassie G-250 a las proteínas. En el caso

de proteínas de membrana solubilizadas en detergentes hay que tener en cuenta que éstos detergentes interfieren con el reactivo de Bradford (*Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories).

1.- Se realizan sucesivas diluciones acuosas de la solución proteica a medir, manteniendo un volumen final de 800 μ l.

2.- A continuación se añaden 200 μ l de reactivo de Bradford y tras mezclar y dejar reposar durante 10-15 minutos, se mide la absorbancia a 595 nm de todas las reacciones.

3.- La concentración de proteína se determina a partir de una recta patrón previamente elaborada con diluciones de concentración conocida de la proteína BSA (Sigma).

La concentración (C) de las muestras proteicas también se determinó a partir del coeficiente de su densidad óptica a 280 nm (DO_{280nm}) y del coeficiente de extinción molar (ϵ) en unidades molares de la proteína según la fórmula siguiente (Pace *et al.*, 1995): $C = DO_{280nm} / \epsilon$.

2.4.5. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente iónico que disocia las proteínas oligoméricas en sus monómeros y rompe los enlaces de hidrógeno e hidrófobos entre los polipéptidos. El compuesto SDS desnaturaliza la estructura tridimensional de las proteínas y por su fijación uniforme les confiere una carga negativa proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica.

La electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). Este sistema discontinuo se basa en la utilización de dos geles contiguos: un gel separador, situado en la parte inferior, y un gel concentrador, situado en la parte superior. Los dos geles presentan distintas características de porosidad, pH y fuerza iónica. Además se utilizan distintos iones en los geles y en el tampón de electroforesis. La discontinuidad en los tampones permite la reducción del volumen de las muestras incorporadas al gel concentrador, favoreciendo la resolución de las bandas de proteína en el gel separador de acuerdo a su tamaño molecular.

Para la realización de esta electroforesis se siguió el siguiente protocolo:

1.- En primer lugar se monta la cubeta para la polimerización de los geles, según las instrucciones del fabricante y se limpian los cristales con etanol 70%. En nuestro caso se utilizó

el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm. El grosor del gel fue de 0,75 - 1 mm.

2.- Se prepara la mezcla con la acrilamida para el gel separador, excepto el persulfato amónico y el TEMED (catalizadores de la reacción). En la Tabla 2.3 se recogen los componentes de la mezcla para la separación de proteínas en distintos rangos de peso molecular.

3.- A continuación se añaden los catalizadores de la polimerización, se mezcla ligeramente y se deposita la solución con una pipeta entre los cristales de la cubeta. Cuando se alcanza la altura deseada para el gel separador, se cubre inmediatamente la solución de gel con isopropanol y se deja polimerizar durante 45-60 minutos.

Componente	Concentración de poliacrilamida (%)		
	7,5 ^a	12 ^b	15 ^c
Agua MilliQ	4,85 ml	3,35 ml	2,35 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	2,5 ml	4 ml	5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
Persulfato amónico 10%	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

a : Para proteínas de peso molecular entre 250 y 50 kDa.

b : Para proteínas de peso molecular entre 100 y 30 kDa.

c : Para proteínas de peso molecular entre 60 y 10 kDa.

Tabla 2.3. Volumen necesario de los distintos componentes para la preparación de 10 ml de mezcla de gel de poliacrilamida (suficiente para dos geles de 7 x 8 cm y 1 mm de espesor).

4.- Se prepara la solución del gel concentrador mezclando:

Agua MilliQ	6,1 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,3 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
Persulfato amónico 10% (p/v)	50 µl
TEMED	10 µl

Se añade el gel concentrador y se coloca un peine para formar los pocillos entre los dos cristales (donde se cargarán las muestras) dejándose polimerizar durante 15 minutos.

5.- Se diluyen las muestras con al menos dos volúmenes de tampón de muestra desnaturizante y se hierve la mezcla durante 10 minutos si es necesario.

6.- Se ensambla la cámara de electroforesis y se llenan las cubetas superior e inferior con tampón de electroforesis. Se cargan las muestras en los pocillos.

7.- Se conectan los electrodos a una fuente de corriente continua a 100-150 V. La electroforesis se detiene cuando la banda correspondiente al colorante del tampón de muestra desnaturizante comienza a salir del gel.

Los marcadores de peso molecular para la electroforesis de proteínas fueron adquiridos a MBI Fermentas y son:

- *Unstained SDS-PAGE Protein Ladder* con tamaños: 200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15 y 10 kDa.

- *Prestained SDS-PAGE Protein Ladder* con tamaños: 170; 130; 100; 70; 55; 40; 35; 25; 15 y 10 kDa.

Mezcla concentrada de acrilamida-bisacrilamida. 29,2 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida. Se añade agua MilliQ hasta completar 100 ml en campana de extracción y se cubre con papel de aluminio. Finalmente se filtra con papel *Whatmann 3MM*.

Tampón de muestra desnaturizante. Se mezclan 4,8 ml de agua MilliQ; 1,2 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 2 µl de SDS 10% (p/v); 1 ml de glicerol y 0,5% de azul de bromofenol 0,5% (p/v) en agua. Esta solución se puede conservar a temperatura ambiente. Si se desea reducir los puentes disulfuro de las proteínas, se añaden 50 µl de β-mercaptoetanol por cada 950 µl de tampón de muestra justo antes de utilizar el tampón.

Tampón de electroforesis (1x). Por cada litro de agua mezclar 3 g Tris base; 14 g de glicina y 10 ml de una solución de SDS 10% (p/v). Comprobar sin ajustarlo que el pH es 8,3 (± 0,2).

2.4.6. Tinción de geles de poliacrilamida.

Según la sensibilidad deseada y el uso posterior de los geles de poliacrilamida se realizaron distintas tinciones.

2.4.6.1. Tinción con azul de Coomassie.

La sensibilidad de este método detecta hasta 0,1 µg de proteína.

1.- Al finalizar la electroforesis se sumergen los geles en una solución de tinte durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.

2.- Una vez transcurrido este tiempo, se elimina la solución anterior y se lavan los geles con una solución de destinte varias veces hasta eliminar el color de fondo (generalmente durante 1-3 horas).

Solución de teñido. Azul brillante de Coomassie R-250 0,25% (p/v); metanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). El colorante se disuelve primero en metanol antes de añadir el resto de los componentes de la solución.

Solución de desteñido. Ácido acético glacial 7% (v/v), metanol 20% (v/v) y rellenar el volumen con agua.

2.4.6.2. Tinción con plata.

Este método es más sensible, permitiendo detectar cantidades de proteínas de hasta 10 ng o incluso menos. El protocolo seguido se describe a continuación:

1.- Se incuba el gel en la solución de fijación durante 30 minutos. A continuación se sumerge el gel durante 30 minutos en la solución de sensibilización tras los cuales se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno en H₂O.

2.- Se incuba el gel en la solución de reacción durante 20 minutos y se lava 2 veces con H₂O durante 1 minuto.

3.- Se sumerge el gel en la solución de detección durante 2-5 minutos (tiempo durante el cual aparecerán las bandas proteicas).

4.- Por último, se detiene la reacción manteniendo el gel en la solución de paro durante 10 minutos, realizando posteriormente 3 lavados de 5 minutos cada uno con H₂O.

Solución de fijación. 100 ml de etanol 100%; 25 ml de ácido acético y H₂O hasta 250 ml.

Solución de sensibilización. 75 ml de etanol; 10 ml de tiosulfato sódico 5% (p/v); 17 ml de ácido acético y H₂O hasta 250 ml.

Solución de reacción. 25 ml de nitrato de plata 2,5% (p/v) y H₂O hasta 250 ml.

Solución de detección. 6,25 g de carbonato sódico; 100 ml de formaldehído 37% (p/v) y H₂O hasta 250 ml.

Solución de paro. 3,65 g de EDTA-Na₂·2H₂O y H₂O hasta 250 ml.

2.4.7. Transferencia de proteínas a membranas.

La transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida a un soporte sólido recibe el nombre de *Western blot* o transferencia de *Western* (Towbin *et al.*, 1992) y se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

1.- Se equilibra el gel a transferir en un tampón de transferencia durante 1-2 minutos a temperatura ambiente. A partir de este momento es muy importante el uso de guantes para evitar la aparición de manchas inespecíficas.

2.- Se cortan 6 láminas de papel *Whatman 3MM* y una membrana de transferencia *Inmobilon-P[®]* de difluoruro de polivinilo (PVDF; Millipore) o de nitrocelulosa de idénticas dimensiones que la porción resolutive del gel que va a ser transferido. Las hojas de papel se empapan en tampón de transferencia mientras que la membrana de PVDF (extremadamente hidrofóbica) se humedece en metanol durante 1 minuto, tras lo cual se equilibra durante 1-2 minutos en tampón de transferencia. Las membranas de nitrocelulosa no necesitan ser equilibradas en metanol. Las láminas de papel y las esponjas se equilibran también durante 1-2 minutos en tampón de transferencia.

3.- La transferencia se lleva a cabo con un equipo *Mini Trans Blot* (Bio-Rad). Para la formación del sándwich sobre el ánodo se dispone una esponja y a continuación 3 láminas de papel *Whatman 3MM*, evitando la formación de burbujas entre las distintas capas. Después se coloca la membrana de transferencia e inmediatamente sobre ella el gel de poliacrilamida. Las tres hojas restantes de papel *Whatman 3MM* se disponen sobre el gel de igual modo que las anteriores y se coloca otra esponja. Finalmente se ensambla el sándwich en la unidad de transferencia.

4.- La electrotransferencia se desarrolla durante 1 hora a 60 V (entre 100-170 mA). Seguidamente se desmonta la unidad y el gel de poliacrilamida se tiñe con azul de Coomassie para verificar la calidad de la transferencia.

Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos que permiten determinar la eficiencia de la transferencia, así como calcular los pesos moleculares de las proteínas transferidas.

Tampón de transferencia (1x). Mezclar 3 g de Tris base; 14 g de glicina hasta 900 ml de agua. Luego añadir 100 ml de metanol hasta completar un volumen final de 1 litro.

2.4.8. Detección inmunológica de proteínas inmovilizadas.

La detección inmunológica de proteínas inmovilizadas requiere la separación electroforética de las proteínas y su posterior transferencia a una membrana (PVDF o nitrocelulosa). Una vez en este soporte, las proteínas son expuestas a la unión de anticuerpos específicos para una determinada secuencia de aminoácidos (los denominados epítomos antígenicos). El protocolo utilizado fue el siguiente:

1.- Cada conjunto de muestras que va a ser analizado mediante esta técnica se dispone en dos geles de poliacrilamida en la forma ya descrita en el apartado 2.4.5. Tras la separación electroforética, una de las réplicas se somete a tinción con azul de Coomassie (apartado 2.4.6.1.) y la otra se transfiere a una membrana (apartado 2.4.7.).

2.- Con el objeto de bloquear los sitios activos de la membrana que no han sido ocupados por proteínas, ésta se incuba durante 12 horas a 4°C o durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de saturación. A continuación se sumerge durante 1-2 horas en una dilución del primer anticuerpo (dirigido contra la proteína de interés) en tampón I. Las diluciones del primer anticuerpo oscilaron entre 1:1.000 y 1:10.000, según la cantidad de anticuerpo específico presente en el antisuero.

3.- Tras 2 lavados de 5-10 minutos cada uno en tampón I y otro de 5-10 minutos en tampón II a temperatura ambiente, el filtro se incuba durante 2 horas en tampón I con el segundo anticuerpo, añadido en una dilución 1:10.000. El segundo anticuerpo puede ser una anti-inmunoglobulina G de ratón o de conejo (dependiendo de si el primer anticuerpo es policlonal o monoclonal) que lleva acoplada en su molécula una fosfatasa alcalina. Al finalizar este tratamiento se lava de nuevo dos veces con el tampón I y otra vez más con el tampón II durante 5-10 minutos cada lavado.

4.- Para el revelado la membrana de transferencia se incuba en 30 ml del tampón de reacción suplementado con 30 µl de NBT y 30 µl de BCIP. Cuando se estime conveniente se detiene la reacción de revelado mediante la adición de varios volúmenes de agua destilada. Para cuantificar las señales obtenidas se realizaron análisis de imagen mediante *Image J* (NIH, USA).

Tampón de saturación. Leche desnatada en polvo 5% (p/v) o BSA 3% (p/v) en Tampón I.

Tampón I. NaCl 0,3 M y Tris-HCl 25 mM pH 7,5.

Tampón II. NaCl 1 M y Tris-HCl 25 mM pH 7,5.

Tampón de reacción. NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM y Tris-HCl 100 mM pH 9,5.

NBT. 100 mg/ml de NBT (cloruro de 4-nitroblutetrazolio) en 70% (v/v) de dimetilformamida.

BCIP. 50 mg/ml de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indololfosfato) en 100% (v/v) de dimetilformamida.

2.4.9. Purificación de proteínas con cola de histidinas.

2.4.9.1. Usando células de *E. coli*: purificación *in vivo*.

La purificación de proteínas que contienen una secuencia de seis histidinas se llevó a cabo utilizando la resina *Ni-NTA Agarose* (Qiagen) o las columnas ya empaquetadas *HisTrap HP*

(Amersham Biociences). Este proceso permite una purificación rápida mediante cromatografía de afinidad basada en la interacción de la cola de histidinas presente en la proteína a purificar con los iones Ni^{2+} de la resina de la columna.

El protocolo resumido de purificación en columna se describe a continuación:

1.- Una vez incubado el cultivo de *E. coli* hasta la absorbancia adecuada, se resuspende en tampón de lisis-lavado y se rompen las células con alguno de los métodos descritos en el apartado 2.4.1.

2.- A continuación se añade 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADNasa-I (Sigma) y 20 mM de MgCl_2 al lisado y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación.

3.- Se prepara la columna, si es necesario, siguiendo las instrucciones del fabricante y se equilibra con 5 volúmenes de tampón de lisis-lavado.

4.- Posteriormente se centrifuga el lisado a 4°C durante 10 minutos a 4.000rpm y se añade el extracto celular sobre la columna.

5.- Se realizan tres lavados añadiendo 5 volúmenes de tampón de lisis-lavado a la columna.

6.- Por último se realizan de 3 a 6 eluciones añadiendo 0,5 volúmenes de tampón de elución.

7.- Las diferentes fracciones recogidas se analizan en un gel de acrilamida para comprobar en cuál de ellas se ha producido la elución de la proteína de interés. Las muestras que presentan mayores cantidades de proteína fueron concentradas con concentradores adecuados a su peso molecular.

8.- Se mantuvieron congeladas a -80°C. Si las proteínas purificadas tienden a oxidarse se incubaron durante 15 minutos con DTT 20 mM a temperatura ambiente para mantenerlas en un estado reducido.

La purificación-concentración de proteínas con seis u ocho histidinas en el extremo C-terminal de células de *E. coli* o *C. glutamicum* se llevó a cabo usando la resina *Ni-NTA Agarose* (Qiagen) siguiendo el protocolo de purificación anteriormente descrito pero sin preparación de la columna (purificación en *batch*). Las proteínas con seis histidinas expresadas en células de *C. glutamicum* fueron concentradas 20 veces en comparación con la proteína silvestre.

Tampón de lisis-lavado. Tris-HCl 20 mM pH 7,9; Imidazol 5 mM; NaCl 1 M; DTT 1 mM; AEBFS [fluoruro de 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil] 0,1 mg/ml; leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tampón de elución. Tris-HCl 20 mM pH 7,9; imidazol 1 M; NaCl 1 M; DTT 1 mM.

2.4.9.2. Purificación *in vitro*.

Para la purificación *in vitro* de proteínas transmembranales se utilizó el kit RTS (*Rapid Translation System*) 100 *E. coli* HY (5-PRIME), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un sistema comercial basado en la síntesis de proteínas en una reacción *in vitro* (sin expresión previa de la proteína en células) donde se mezclan todos los componentes necesarios para llevar a cabo los procesos de transcripción y traducción: ADN molde, lisado de *E. coli* HY (*High-Yield*) y los aminoácidos. Este método permite expresar proteínas de entre 10 kDa y 120 kDa.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1.- Se clona el gen que codifica para la proteína de interés en un plásmido de la familia pIVEX (Tabla A4.2). El kit RTS requiere que el ATG inicial del gen que codifica para la proteína de interés se encuentre bajo el promotor del bacteriofago T7 a una distancia de no más de 100 pb y a una distancia de unos 5-8 pb del sitio de unión a ribosoma.

2.- Se prepara en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 50 µl:

Lisado de <i>E. coli</i> HY	12 µl
Aminoácidos (excepto metionina)	12 µl
Metionina	1 µl
Mix de reacción	10 µl
Detergentes (opcional)	5 µl
ADN molde	0,5-1 µg
H ₂ O estéril	Hasta 50 µl

3.- Se incuba la mezcla de reacción a 30°C durante 6 horas sin agitación.

4.- Se purifica la proteína de interés usando el kit *Dynabeads® Talon®* (Invitrogene). Este producto permite una purificación rápida mediante bolas magnéticas basada en la interacción de la cola de histidinas presente en la proteína a purificar con los iones de cobalto de la resina. Las proteínas se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C.

La temperatura y el tiempo de incubación, así como los detergentes y la cantidad del ADN molde pueden modificarse dependiendo de cada proteína.

2.4.10. Membranas invertidas.

Las membranas invertidas son vesículas procedentes de células completas formadas por membrana citoplasmática con un menor tamaño y una lateralidad contraria a la presentada por las células intactas y que carecen de los componentes citoplasmáticos. En las membranas invertidas la actividad metabólica es proporcionada exclusivamente por las proteínas de membrana y el transporte de solutos a través de las mismas es prácticamente nulo en ausencia de una fuente de energía exógena apropiada. Los compuestos utilizados como fuentes de energía con las membranas invertidas y la concentración final utilizada han sido: NADH 5 mM, D-lactato 20 mM, prolina 20mM, succinato sódico 20 mM, acetato sódico 20mM y el donador de electrones artificial ácido ascórbico 20 mM y fenazida metosulfato (PMS) 3 mM.

2.4.10.1. Preparación de membranas invertidas.

Las vesículas de membranas invertidas se prepararon a partir de células de *E. coli* o *C. glutamicum* mediante la formación de esferoplastos (*E. coli*) o de protoplastos (*C. glutamicum*) y el lisado de los mismos por alguno de los protocolos descritos en el apartado 2.4.1. El protocolo seguido fue el descrito por Schrempp *et al.* (1994) con algunas modificaciones.

2.4.10.1.1. Preparación de membranas invertidas de *E. coli*.

1.- Se cultiva un matraz con 1 litro de medio LB con *E. coli* y se incuba a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una DO_{600nm} de 2.

2.- Se recogen las células por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos, se resuspenden en un tampón de lisis-II y se rompen mediante alguna de las técnicas descritas en el apartado 2.4.1.

3.- Al lisado celular se añade el inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo; 20 mg/ml), para impedir la degradación de la proteína de interés, y ADNasa-I 7,5 µg/ml, para eliminar el ADN. Se centrifuga el extracto a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar las células que no se han roto y se recupera el sobrenadante.

4.- El sobrenadante se somete a ultracentrifugación durante 1 hora a 40.000 rpm, tras la cual las membranas celulares quedan retenidas en el precipitado.

5.- Estas membranas celulares se resuspenden en tampón de lisis-IV. La cantidad de tampón se determina dependiendo del tamaño del precipitado.

Las membranas invertidas se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta su utilización.

Tampón de lisis-II. Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 0,3 M; MgCl₂ 1 mM; glicerol 20% (v/v).

Tampón de lisis-IV. HEPES-KOH 75 mM pH 7,5; KCl 150 mM; MgSO₄ 1 mM; sacarosa 0,25 M.

2.4.10.1.2. Preparación de membranas invertidas de *C. glutamicum*.

1.- Se cultiva un matraz con 1 litro de medio MMC (con ácido glucónico 4% como fuente de carbono) con *C. glutamicum* y se incuba a 30°C con agitación hasta que el cultivo alcance una DO_{600nm} de 3.

2.- Se añade Penicilina G 0,3 U/ml en el litro de células y se incuba durante 5 horas a 30°C con agitación.

3.- Se recogen las células por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos, se resuspenden en 100 ml de un tampón de resuspensión-I y se incuba toda la noche con lisozima 2 mg/ml a 30°C sin agitación.

4.- Los protoplastos obtenidos se centrifugan a 4°C durante 10 minutos a 3.000 rpm, se lavan dos veces con tampón de lisis-IV, se resuspenden suavemente en 20 ml del mismo tampón y se rompen mediante alguna de las técnicas descritas en el apartado 2.4.1.

5.- Al lisado celular se añade el inhibidor de proteasas PMSF 20 mg/ml, para impedir la degradación de la proteína de interés, y ADNasa-I 7,5 µg/ml para eliminar el ADN. Se centrifuga el extracto a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar las células que no se han roto y se recupera el sobrenadante.

6.- El sobrenadante se somete a ultracentrifugación durante 1h a 40.000 rpm, tras lo cual las membranas celulares quedan retenidas en el precipitado.

7.- Las membranas invertidas obtenidas se resuspenden en tampón de lisis-IV. La cantidad de tampón se determina dependiendo del tamaño del precipitado.

Las membranas invertidas se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta su utilización.

Tampón de resuspensión-I. Medio MMC (ver apartado 2.1.1.2.) diluido a la mitad y estabilizado con sacarosa 0,25 M y MgSO₄ 10 mM. Esterilizado durante 20 minutos en un autoclave.

Tampón de lisis-IV. HEPES-KOH 75 mM pH 7,5; KCl 150 mM; MgSO₄ 1 mM; sacarosa 0,25 M.

2.4.10.1.3. Preparación de membranas invertidas para ser tratadas con agentes bloqueantes de cisteínas.

El proceso de preparación de membranas invertidas de *E. coli* y de *C. glutamicum* que son tratadas con agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteínas de las proteínas es el mismo que el descrito en los dos apartados anteriores con la diferencia de un tratamiento con EDTA para permeabilizar la membrana. Los compuesto bloqueantes utilizados son: NEM (N-etilmaleimida), IAA (Ácido indolacético) y DTNB (Ácido 5,5-ditiobis-2-dinitrobenzoico). Los compuestos NEM e IAA no atraviesan la membrana, mientras que el DTNB es capaz de embeberse en la membrana citoplasmática.

Las células de *E. coli* o los protoplastos de *C. glutamicum* obtenidos como se indica en los apartados 2.4.10.1.1. y 2.4.10.1.2. fueron lavados dos veces con un tampón de resuspensión-II sin MgSO₄, equilibrados en ese mismo tampón durante 1 hora a 37°C y resuspendidos finalmente en un tampón de lisis-IV conteniendo EDTA 2 mM. A los 10 minutos se añadió MgSO₄ a una concentración final de 10 mM. Transcurridos 10 minutos las células se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de un tampón de lisis-IV. El resto de los pasos son iguales a los descritos anteriormente.

Tampón de resuspensión-II. HEPES-KOH 75 mM pH 7,5; KCl 150 mM; sacarosa 0,25 M.

2.4.10.1.4. Preparación de membranas invertidas con gradientes artificiales.

El proceso de preparación de membranas invertidas de *E. coli* y de *C. glutamicum* con gradiente de pH artificial es similar al descrito en los apartados anteriores 2.4.10.1.1. y 2.4.10.1.2. con alguna diferencia. El protocolo seguido fue el descrito por Nakamura *et al.*, (1986) con algunas modificaciones:

1.- Se cultivan, se obtienen los esferoplastos o protoplastos de *E. coli* y *C. glutamicum*, respectivamente, de la misma forma descrita en los apartados 2.4.10.1.1. y 2.4.10.1.2.

2.- Los esferoplastos o protoplastos fueron resuspendidos en un tampón P o S, para obtener membranas invertidas con gradiente de iones potasio o de sodio, respectivamente.

3.- Al lisado celular se añade el inhibidor de proteasas PMSF 20 mg/ml, para impedir la degradación de la proteína de interés, y ADNasa-I 7,5 µg/ml para eliminar el ADN. Se centrifuga el extracto a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar las células que no se han roto y se recupera el sobrenadante.

4.- El sobrenadante se somete a ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 1 hora a 4°C, tras lo cual las membranas celulares quedan retenidas en el precipitado.

5.- Las membranas invertidas obtenidas se resuspenden en el mismo tampón anterior, se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta su utilización.

Tampón P. Tris-HCl 10 mM pH 7,0; KCl 0,5 M; sacarosa 0,25 M.

Tampón S. Tris-HCl 10 mM pH 7,0; NaCl 0,5 M; sacarosa 0,25 M.

2.4.10.2. Análisis de fluorescencia con membranas invertidas.

Los ensayos de fluorescencia se llevan a cabo para determinar el grado de funcionalidad energética de las membranas invertidas procedentes tanto de células de *E. coli* como de *C. glutamicum*. Para ello se analiza la formación del gradiente ΔpH y $\Delta\psi$ de las vesículas mediante cambios de fluorescencia de dos fluorocromos diferentes: naranja de quinacrina (para determinar el gradiente ΔpH ; Sigma) y oxonol-V (para determinar el gradiente $\Delta\psi$; Sigma). La fluorescencia fue observada a lo largo del tiempo en un espectrofluorímetro PTI (Photo Technology International, Inc) usando una cubeta de cuarzo con agitación. El protocolo seguido fue el descrito por Meng *et al.* (2004).

Antes de comenzar el ensayo se debe determinar la longitud de onda de emisión (λ_M) y de excitación (λ_X) de cada fluorocromo. Para el fluorocromo naranja de quinacrina establecimos como λ_M 527 nm y λ_X 492 nm, y para el fluorocromo oxonol-V, 616 nm como λ_M y 589 nm como λ_X .

2.4.10.2.1. Análisis del gradiente ΔpH .

1.- Una cantidad de 0,13 mg de proteínas de membrana de las vesículas invertidas fueron incubados con naranja de quinacrina 2 μM en un volumen final de 2 ml de tampón Q. La mezcla de reacción se realiza directamente en la cubeta de cuarzo y se mide la fluorescencia emitida por el fluorocromo a lo largo del tiempo a temperatura ambiente.

2.- Transcurridos 40 segundos, se añade la fuente de energía que se indique en cada caso a la mezcla de reacción y se continúa observando la fluorescencia a lo largo del tiempo. Si las membranas invertidas son energéticamente funcionales la fuente de energía añadida provoca una disminución de la fluorescencia del fluorocromo que indica la formación de gradiente de ΔpH .

3.- Transcurridos 3 minutos se añade $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM a la mezcla de reacción. El NH_4^+ provoca la pérdida del gradiente ΔpH en las membranas invertidas y por tanto la fluorescencia emitida por la naranja de quinacrina vuelve a valores basales u originales.

El grado de disminución de la fluorescencia determina el nivel de gradiente ΔpH que tienen las membranas invertidas en presencia de una fuente de energía determinada.

Tampón Q. HEPES-KOH 20 mM pH 7,2; KCl 0,1 M; MgSO_4 2,5 mM.

2.4.10.2.2. Análisis del gradiente $\Delta\psi$.

1.- Una cantidad de 0,13 mg de proteínas de membrana de las vesículas invertidas fueron incubadas con oxonol-V 5 μM en un volumen final de 2 ml en tampón O. La mezcla de reacción se realizó directamente en la cubeta de cuarzo y se midió la fluorescencia emitida por el fluorocromo a lo largo del tiempo a temperatura ambiente.

2.- Transcurridos 40 segundos, se añade la fuente de energía que se indique en cada caso, a la mezcla de reacción y se continúa observando la fluorescencia a lo largo del tiempo. Si las membranas invertidas son energéticamente funcionales la fuente de energía añadida provoca una disminución de la fluorescencia del fluorocromo que indica la formación de gradiente de $\Delta\psi$.

3.- Transcurridos 3 minutos se añadió KSCN (tiocianato de potasio) 10 mM a la mezcla de reacción. El SCN^- provoca la pérdida del gradiente $\Delta\psi$ en las membranas invertidas y por tanto la fluorescencia emitida por el oxonol-V vuelve a valores basales u originales.

El grado de disminución de la fluorescencia determina el nivel de gradiente $\Delta\psi$ que tienen las membranas invertidas en presencia de una fuente de energía determinada.

Tampón O. HEPES-KOH 20 mM pH 7,2; MgSO_4 2,5 mM.

Oxonol-V. 1 mM de oxonol-V en DMSO.

2.4.10.2.3. Análisis del gradiente Δ pH en membranas invertidas con gradientes artificiales.

Para determinar el grado de funcionalidad energética de las membranas invertidas de *C. glutamicum* con gradientes artificiales se analiza la formación del gradiente Δ pH de la misma manera que se indicó en el apartado 2.4.10.2.1. con algunas modificaciones.

1.- La mezcla de reacción consiste de un volumen final de 2 ml en tampón G con naranja de quinacrina 2 μ M realizada directamente en la cubeta de cuarzo. Este tampón carece de potasio y sodio.

2.- A continuación se añade una cantidad de 0,13 mg de proteínas de membrana de las vesículas en la mezcla de reacción y la adición de nigericina o valinomicina provoca la inhibición de la salida pasiva del potasio o del sodio, respectivamente, y por tanto se crea un gradiente artificial Δ pH entre las membranas invertidas y en exterior.

3.- Transcurridos 4 minutos se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM a la mezcla de reacción. El NH_4^+ provoca la pérdida del gradiente Δ pH en las membranas invertidas y por tanto la fluorescencia emitida por la naranja de quinacrina vuelve a valores basales u originales.

Tampón G. Tris-HCl 10 mM pH 8,0; cloruro de colina 0,5 M; MgCl_2 5 mM.

2.4.10.3. Análisis de transporte de metales con membranas invertidas.

Las membranas invertidas energéticamente funcionales, es decir que presentan un gradiente de Δ pH y Δ ψ cuando se les añade una fuente de energía (apartado 2.2.10.2.) y fueron analizadas mediante ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo) para detectar la cantidad de metaloide incorporado en ellas.

El protocolo seguido fue descrito previamente por Meng *et al.* (2004).

1.- La mezcla de reacción conteniendo 1 mg/ml de proteínas de membrana de las vesículas invertidas y arsenito 100 μ M o antimonio (40 μ M para vesículas de *E. coli* o 4 μ M para vesículas de *C. glutamicum*) en un volumen final de 600 μ l en tampón de transporte-I fue iniciada con la adición de un compuesto como fuente de energía. La reacción se realizó a temperatura ambiente.

2.- A lo largo de 20 minutos se tomaron muestras de 100 μ l cada una y se filtraron a través de filtros de 0,45 μ m (Millipore). Las células retenidas en los filtros fueron lavadas dos veces con 5 ml de tampón de transporte-I. El proceso de filtrado y lavado se realiza usando un *Ten*

place filter Manifold (Hoefer FH225V) acoplado a una bomba de vacío (ILMVAC GmbH, MP104E).

3.- Cada filtro con las células retenidas se retira del aparato de filtración con unas pinzas y se somete a una digestión usando 170 μ l de ácido nítrico 70% (Sigma) durante 2 horas a 70°C.

4.- Finalmente, cada muestra se diluye en un volumen final de 10 ml con agua MilliQ teniendo una concentración final de ácido nítrico de 2%.

5.- El As o Sb se mide mediante ICP-MS usando un espectrofotómetro Varian (Varian Inc., Palo Alto, CA). Las soluciones patrón utilizadas (Ultra scientific, N. Kingstown, RI) fueron realizadas en un rango de 0,1 a 50 ppb en ácido nítrico 2%.

Tampón de transporte-I. HEPES-KOH 75 mM pH 7,5; K₂SO₄ 150 mM; MgSO₄ 1 mM; sacarosa 0,25 M.

2.4.10.3.1. Análisis de transporte de arsénico con membranas invertidas con gradientes artificiales.

El ensayo de transporte con membranas invertidas de gradientes artificiales se realizó de la misma manera que se indica en el apartado 2.4.10.3. con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 600 μ l de tampón de transporte-II al cual se le añade As(III) 100 μ M y 1 mg/ml de proteínas de membrana de las vesículas invertidas. La reacción se inicia con la adición de 5 μ g/ml de nigericina o valinomicina en las membranas cargadas con potasio o sodio, respectivamente, y se realiza a temperatura ambiente. La toma de muestras y el análisis por ICP-MS se realiza como se indica en el apartado anterior.

Tampón de transporte-II. Tris-HCl 10 mM pH 8,0; cloruro de colina 0,5 M; MgCl₂ 5 mM.

2.4.11. Análisis de la actividad arseniato reductasa.

La actividad arseniato reductasa de las proteínas ArsCs fue analizada según tres sistemas de oxidación-reducción: sistema de Trx/TrxR, GSH/Grx y MSH/Mrx, siguiendo los protocolos descritos por Messens *et al.* (2002b) y Ordóñez *et al.* (2009).

En los tres sistemas redox la actividad arseniato reductasa se determinó mediante un seguimiento del consumo del NADPH en una mezcla de reacción por la disminución de la

absorbancia a DO_{340nm} durante 20 minutos a 37°C. La absorbancia se mide en un espectrofotómetro SPECTRA-max 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando placas de 96 pocillos (PolySorb, Nurc, Denmark). Como control negativo de cada reacción redox se pone una mezcla de reacción sin As(V).

2.4.11.1. Sistema redox Trx/TrxR.

1.- Las proteínas CgArsCs y la tiorredoxina (CgTrx) de *C. glutamicum* purificadas como se indica en el apartado 2.4.9.1. se descongelan en hielo y se reducen mediante incubación con DTT 10 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el DTT las proteínas se dializan a 4°C en equipos de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo scientific) de tamaño de poro adecuado, utilizando un tampón de diálisis durante 2 horas y con dos cambios de tampón.

2.- La flavoproteína tiorredoxina reductasa (CgTrxR) se purifica según Ordóñez *et al.*, (2009) y se mantiene a 4°C precipitada en sulfato amónico 80%. Se resuspende en 200 µl del tampón de reacción y se dializa de la misma manera que las proteínas anteriores.

3.- Se realiza la mezcla de reacción que contiene: CgArsC 500 nM; CgTrx 10 µM; CgTrxR 2 µM; NADPH 250 µM; As(V) 100 mM y tampón de reacción-I hasta 200 µl de volumen final. La reacción comienza con la adición del As(V).

Tampón de diálisis. Tris-HCl 20 mM pH 8,0; 150 mM NaCl.

Tampón de reacción-I. HEPES 20 mM pH 8,0.

2.4.11.2. Sistema redox GSH/Grx.

1.- Las proteínas CgArsCs de *C. glutamicum* purificadas como se indica en el apartado 2.4.9.1. y la glutarredoxina 2 de *E. coli* (EcGrx2) purificada como se describe en Shi *et al.*, (1999) se descongelan en hielo y se reducen mediante incubación con DTT 10 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el DTT las proteínas se dializan a 4°C en equipos de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo scientific) de tamaño de poro adecuado utilizando un tampón de diálisis durante 2 horas y con dos cambios de tampón.

2.- Se realiza la mezcla de reacción que contiene: CgArsC 5 µM; EcGrx2 20 µM; GSH 5 mM (Sigma); GTR 3 µM (Sigma); NADPH 500 µM; As(V) 100 mM y tampón de reacción-II hasta 200 µl de volumen final. La reacción se inicia con la adición de As(V).

Tampón de reacción-II. MES 50 mM pH 6,5.

2.4.11.3. Sistema redox MSH/Mrx.

1.- Las proteínas CgArsCs y la micorredoxina 1 (CgMrx1) de *C. glutamicum* purificadas como se indica en el apartado 2.4.9.1. se descongelan en hielo, y se reducen mediante incubación con DTT 10 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el DTT las proteínas se dializan a 4°C en equipos de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo scientific) de tamaño de poro adecuado utilizando un tampón de diálisis durante 2 horas y con dos cambios de tampón.

2.- La flavoproteína micotona reductasa (CgMTR) de *C. glutamicum* se purifica según Ordóñez *et al.*, (2009) y se mantiene a 4°C precipitada en sulfato amónico 80%. El micotiol (MSH; ver apartado 2.4.11.3.1. de Materiales y métodos) se purifica también según Ordóñez *et al.*, (2009). Se resuspende en 200 µl del tampón de reacción-I y se dializa de la misma manera que lo indicado para las proteínas precedentes.

3.- Se realiza la mezcla de reacción que contiene: CgArsC 200 nM; CgMrx1 10 µM; CgMTR 3 µM; MSH 470 µM; NADPH 250 µM; As(V) 100 mM y tampón de reacción-I hasta 200 µl de volumen final. La reacción comienza con la adición de As(V).

2.4.11.3.1. Extracción de micotiol (MSH).

El MSH no es comercial y sólo es sintetizado por microorganismos del grupo de las actinobacterias. La purificación de MSH se lleva a cabo utilizando células de *C. glutamicum* y una resina *Thiopropyl Sepharose 6B* (GE Healthcare, GEH). Este proceso permite una purificación mediante cromatografía de afinidad basada en la interacción del grupo tiol de la cisteína del MSH con el grupo 2-tiopiridil bisulfito de la resina. El protocolo seguido fue el descrito por Ordóñez *et al.* (2009):

1.- Una masa de 600 g de células de *C. glutamicum* ATCC 13032 crecidas en medio TSB con una DO_{600nm} de 3 se rompe con ácido perclórico 0,75 M (200 ml por cada 100 g de células).

2.- A continuación las células no rotas se eliminan por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

3.- Se ajusta el pH del sobrenadante (una solución amarilla) a 4,5 con KOH 4 M. Al aumentar el pH se observará la precipitación de perclorato potásico.

4.- Se incuba la solución a 0°C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos para eliminar el perclorato potásico precipitado. La solución obtenida se puede guardar a 4°C toda la noche.

5.- Se filtra la solución con filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore) y se mezcla la solución en una proporción 3:1 con un tampón A. Si la mezcla no ha alcanzado un pH de 7,5 se añade más buffer A hasta alcanzarlo.

6.- A continuación 7-8 g de resina se hidratan con 21 ml de agua desgasificada (relación 1:3), se equilibra con 10 volúmenes de tampón B y se deja decantar. Se retira el sobrenadante y se vuelve a repetir dos o tres veces más el equilibrado con el tampón B.

7.- Una vez equilibrada la resina, se carga en la columna y se conecta al *AKTA-FPLC* (Amersham Pharmacia Biotech AB 2000) donde se sigue equilibrando la resina con tampón B.

8.- Se carga la solución de la muestra en la columna a una velocidad de flujo de 0,5-1 ml/min. Se lava la columna con tampón B hasta que se vea totalmente limpia la columna.

9.- Se eluye la muestra con tampón C hasta observar el pico de la 2-tiopiridona a DO_{343nm} . En ese pico eluyen también el MSH, el DTT y el AcCoA.

10.- Los 30-50 ml recogidos del MSH se acidifican con trifluoroacético (TFA) a pH 2-3. Se añade a la muestra un volumen de acetato de etilo en un embudo de decantación y se agita durante 5 minutos hasta observar dos fases. Se recoge la fase superior donde se encuentra el MSH y se repite 5 o 6 veces el paso anterior. En la fase inferior (amarillenta) se elimina la 2-tiopiridona, el AcCoA y la mayor parte del DTT.

11.- La solución final de MSH se liofiliza, paso en el que se concentra la muestra y se evapora el acetato de etilo.

12.- El MSH se purifica mediante HPLC usando la columna Jupiter C18 (Phenomenex) equilibrada con un tampón D. La elución del MSH se produce sobre el minuto 7. La presencia de MSH se confirmó mediante espectrometría de masas y la concentración del micotiol reducido se determina usando el kit *Protein Thiol Florescent Detection* (Arbor assays) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tampón A. Tris-HCl 0,4 M pH 7,5; NaCl 2 M; EDTA 4 mM.

Tampón B. Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,5 M; EDTA 1 mM.

Tampón C. Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; DTT 30 mM; EDTA 1 mM.

Tampón D. Formato amónico 100 mM.

2.4.12. Espectrometría de masas.

Todas las proteínas y el MSH purificados son analizados mediante espectrometría de masas para determinar el tamaño real de las mismas. Las proteínas deben de ser inyectadas en el HPLC antes de ser analizadas mediante espectrometría de masas utilizando una columna Vydac C18 RPC.

El protocolo seguido es el siguiente:

1.- La proteína de interés se extrae del gel SDS-PAGE con la ayuda de un bisturí en un taco de aproximadamente 1 mm³. Es importante durante todo el proceso evitar la contaminación con pelos o piel que provocaría la posterior identificación de queratinas.

2.- Las bandas son lavadas con (NH₄)HCO₃ 25 mM y una solución de CH₃CN 50% y (NH₄)HCO₃ 25 mM y después se secan en una centrifuga de vacío.

3.- A continuación los tacos se hidratan en un baño de agua y hielo y se someten a una digestión proteolítica usando 10 ng/μl de tripsina (Promega) durante toda la noche a 37°C.

4.- Posteriormente, los péptidos obtenidos se extraen secuencialmente del sobrenadante mediante un solución de (NH₄)HCO₃ 25 mM, CH₃CN 50%, (NH₄)HCO₃ 25 mM y una mezcla de CH₃CN 50% y HCOOH 5%.

5.- Las muestras obtenidas son desaladas en una columna Zip Tip C18 (millipore) y eluidas con acetonitrilo 50% y ácido fórmico 1% (v/v).

6.- Finalmente, se realizaron los análisis de NanoLC/nanospray/MS/MS usando un *Q-STAR XL instrument* (QqTOF; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). La identificación de una proteína de interés se lleva a cabo con el *software MassLynx 4.0 system*.

2.4.13. Obtención de anticuerpos policlonales.

Las proteínas CgArsC2, CgArsC1' y CgArsC4 de *C. glutamicum* purificadas por colas de histidinas (ver apartado 2.4.9.1. de Materiales y métodos) fueron utilizadas para inmunizar tres conejos, siguiendo el protocolo de (De Kerpel *et al.*, 2006). Los anticuerpos obtenidos fueron purificados usando una columna de sefarosa 6MB con proteína-A de *S. aureus* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos policlonales de la proteína transmembranal CgAcr3-1 de *C. glutamicum* se obtuvieron a partir de la inmunización de un conejo con un péptido sintetizado comercialmente por Cocalico Biologicals (Cocalico Biologicals, Inc, USA). El péptido utilizado

GPCLFPNDPTLPSSARSTSQII (aminoácidos 347-366 y derivado del último dominio intracelular de la proteína CgAcr3-1) fue conjugado y posteriormente inmunizado en un conejo siguiendo un protocolo de 91 días. En el protocolo se realizaron cinco inmunizaciones del péptido a lo largo de los días 0, 14, 21, 49 y 70; cuatro sangrados durante los días 35, 56, 77 y 84 y un sangrado final el día 91.

Los anticuerpos anti-CgAcr3-1 obtenidos fueron purificados mediante el protocolo siguiente:

- 1.- Se crecen 100 ml de medio LB o TSB con *E. coli* o *C. glutamicum* durante toda la noche.
- 2.- Se centrifuga a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se resuspende en 3 ml de tampón de resuspensión (Tampón R).
- 3.- A continuación se rompen las células por prensa francesa, se centrifugan a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante.
- 4.- Se diluye la muestra de anticuerpo que se va a purificar 1:10 con tampón de bloqueo (Tampón BL).
- 5.- Se mezcla 0,5 ml del lisado celular (se coge uno u otro lisado celular dependiendo del extracto crudo que vayamos a utilizar posteriormente en el *Western blot*) con 1 ml del anticuerpo diluido y se incuba durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla una vez incubada se utiliza directamente como anticuerpo primario en el *Western blot* o se almacena a 4°C hasta su utilización.

Tampón R. Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0.

Tampón BL. Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05% (v/v); BSA 3% (p/v) o leche en polvo 5% (p/v).

2.5. Análisis microbiológicos.

2.5.1. Análisis de resistencia a metales.

El protocolo seguido se describe a continuación:

- 1.- Se incuba un cultivo de *E. coli* o *C. glutamicum* en medio LB o TSB, respectivamente, con el antibiótico correspondiente (si es necesario) toda la noche en agitación a 37°C o 30°C.
- 2.- Se diluyen los cultivos 100 veces en medio LB o TSB conteniendo las concentraciones indicadas de los metales. Los cultivos se incuban a 37°C o 30°C con agitación durante 24 horas. En caso de medir la resistencia a arseniato se utilizó medio MMCLP para *C. glutamicum*.

3.- Finalmente se mide la DO_{600nm} de cada uno de los cultivos en un espectrofotómetro *Hitachi V-200*.

El nivel de resistencia de *E. coli* o *C. glutamicum* a un metal lo hemos definido como la concentración del metal que causa al menos una disminución de la DO_{600nm} del 80% de la absorbancia obtenida por la misma cepa del microorganismo crecida en las mismas condiciones en ausencia metal.

2.5.2. Análisis de entrada/acumulación de metales en células.

2.5.2.1. Cantidad total de metal retenido en células por ICP-MS.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1.- Se incuba *E. coli* en medio LB a 37°C o *C. glutamicum* en medio TSB a 30°C toda la noche en agitación.

2.- Se inoculan 100 ml de medio LB con el cultivo de *E. coli* o 100 ml de medio MMC con el cultivo de *C. glutamicum* incubado durante toda la noche diluyendo las células 100 veces y se permite el crecimiento del microorganismo a 37°C o a 30°C, respectivamente, en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 1 o 2, respectivamente.

3.- Se recogen las células, se resuspenden en el tampón de transporte-III y se lavan dos veces con el mismo tampón.

4.- Finalmente se resuspenden a una densidad óptica de 10 y 6, respectivamente.

5.- La mezcla de reacción contiene 100 μ l de células, el metal a estudiar en la concentración adecuada y tampón de transporte-III hasta 1 ml de volumen final. La reacción de transporte se inicia con la adición del correspondiente metal: arsenito 0,1 mM para células de *E. coli* o 1 mM para células de *C. glutamicum*; antimonito 50 μ M para células de *E. coli* o 40 μ M para células de *C. glutamicum*; arseniato 100 μ M para *C. glutamicum*.

6.- A lo largo del tiempo se tomaron muestras de 100 μ l y se filtraron a través de filtros de 0,45 μ m (Millipore). Las células retenidas en los filtros fueron lavadas dos veces con 5 ml de tampón de transporte-III. El proceso de filtrado y lavado es realizado usando un *Ten place filter Manifold* (Hoefer FH225V) acoplado a una bomba de vacío (ILMVAC GmbH, MP104E).

7.- Cada filtro con las células retenidas se retira del aparato de filtración con unas pinzas y se somete a una digestión usando 170 μ l de ácido nítrico 70% (Sigma) durante 2 horas a 70°C.

8.- Finalmente, cada muestra se diluye en un volumen final de 10 ml con agua MilliQ teniendo una concentración final de ácido nítrico de 2%.

9.- El metal estudiado se mide mediante ICP-MS usando un espectrofotómetro Varian (Varian Inc., Palo Alto, CA). Las soluciones de referencia utilizadas (Ultra scientific, N. Kingstown, RI) fueron realizadas en un rango de 0,1 a 50 ppb en ácido nítrico 2%.

La cantidad de metal que retienen las células fue expresada por mg de peso seco de células. Para ello diferentes volúmenes de suspensiones celulares con una absorbancia similar a la utilizada en los ensayos de acumulación fueron filtrados en filtros de 0,45 μm (Millipore) y lavados con tampón de transporte-III; los filtros deben haberse pesado anteriormente al ensayo. A continuación los filtros con las células son secados a 65°C y de nuevo pesados, para determinar el peso seco aproximado de células que estamos utilizando en cada ensayo.

Tampón de transporte-III. HEPES-KOH 75 mM pH 7,3; KCl 150 mM; MgSO₄ 1 mM.

2.5.2.2. Análisis de especies de arsénico por espectrometría de absorción atómica.

Los análisis de identificación y cuantificación de diferentes especies de As en muestras celulares fueron realizados mediante espectrometría de absorción atómica por el Dr. Joris Messens en la Universidad Libre de Bruselas (VIB) en el Departamento de Interacciones Celulares y Moleculares.

El protocolo seguido es el siguiente:

1.- Se preparan las muestras celulares como se indica en la apartado 2.5.2.1. de Materiales y métodos hasta el punto 7. Una vez que tenemos los filtros digeridos con el ácido nítrico se llevan a un volumen aproximado de 2 ml con Tris-HCl 1 M pH 9,0 hasta que alcancen un pH neutro (pH 7,0) y se incuban a 37°C durante 2 horas.

2.- A continuación se eliminan todas las proteínas de la muestra mediante una columna de afinidad (Waters Oasis HLB).

3.- La muestra es después filtrada e inyectada en una columna de intercambio iónico de 250 x 4,1 mm (Hamilton PRP-X100) con un tampón de 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 6,0 a un flujo de 1 ml/min.

4.- El eluyente de la columna es mezclado con HCl 1,5 M, NaBH₄ 2,5% y NaOH 2% para formar arsina (AsH₃). Las arsinas son analizadas y cuantificadas usando un espectrofotómetro de absorción atómica (Excalibur, PS Analytical, Orpington, UK) calibrado con muestras de arsenito y arseniato.

2.5.3. Observación microscópica de microorganismos.

La observación microscópica de las células se realizó de manera rutinaria mediante un microscopio óptico de contraste de fase (Eclipse E400, Nikon) montando las muestras en PBS o H₂O.

Resultados y discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Mecanismos de entrada y salida de arsenito en *Corynebacterium glutamicum*.

3.1.1. Sistema de entrada de arsenito en *C. glutamicum*.

La especie *C. glutamicum* ATCC 13032 presenta una resistencia a arsenito [As(III)] de entre 12 y 14 mM, valores significativamente superiores al resto de las especies analizadas (Ordóñez *et al.*, 2005). Este elevado nivel de resistencia a As(III) puede ser debido a varias causas: (i) a una refractariedad de la célula a la incorporación del metaloide como consecuencia de la

ausencia de genes que codifican para las proteínas encargadas de la entrada de As(III) o (ii) a la presencia de potentes mecanismos de desintoxicación intracelular de As(III). Para comprobar la primera de las hipótesis, se realizaron estudios de entrada de As(III) en la cepa *C. glutamicum* ATCC 13032 (Tabla A4.4), y para ello las células de *C. glutamicum* se mantuvieron en un estado de reposo o no crecimiento (*resting cells*) para posteriormente ser incubadas en presencia de diferentes concentraciones de As(III); se tomaron muestras de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y se analizaron mediante espectroscopía de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Como se observa en la Figura 3.1 *C. glutamicum* incorpora As(III) y la cantidad de As(III) acumulado va aumentando a lo largo del tiempo y a medida que aumentamos la cantidad de As(III) total añadido; niveles similares de entrada de As(III) han sido encontrados en *Saccharomyces cerevisiae* (Singh *et al.*, 2008a; Shah *et al.*, 2010), y alrededor de diez veces superiores en *Escherichia coli* (Singh *et al.*, 2008b). Estos resultados confirman que en *C. glutamicum* existe algún sistema de entrada de As(III), el cual se tratará de identificar a continuación.

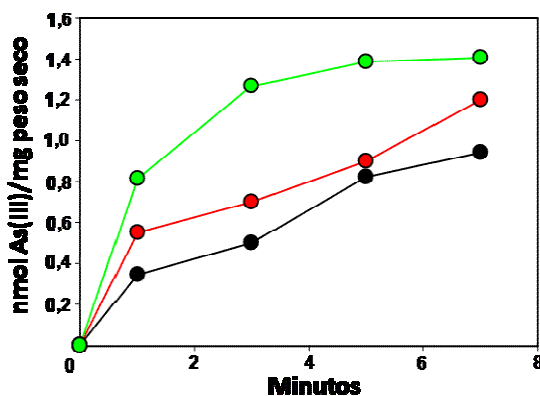


Figura 3.1. Entrada de As(III) en *C. glutamicum* ATCC 13032 en presencia de diferentes concentraciones de As(III): 0,2 mM (negra); 0,5 mM (roja) y 1 mM (verde).

Hasta la fecha se han identificado dos mecanismos de entrada de As(III) en microorganismos: (i) a través de aguaglicerolporinas (GlpF) (Meng *et al.*, 2004) y (ii) a través de permeasas inespecíficas de hexosas (Liu *et al.*, 2004b). Mediante análisis bioinformáticos buscamos en el genoma de *C. glutamicum* proteínas que presentaran una elevada homología con proteínas GlpF de microorganismos como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, pero no encontramos ninguna. Por tanto se descartó la presencia de genes *glpF* para aguaglicerolporinas en el genoma de *C. glutamicum*.

Los genes *glpF* suelen estar formando parte de un operón junto con otros genes que participan en el metabolismo del glicerol como *glpK* (gen que codifica para la enzima glicerol kinasa, GlpK), y *glpD* (gen que codifica para la proteína glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, GlpD). El análisis del genoma de *C. glutamicum*, a pesar de no identificar genes *glpF*, confirmó la existencia de los genes *glpK* (cg3198) y *glpD* (cg1853) separados en el cromosoma por 1,3 Mb pero sin funciones similares a una glicerol kinasa o glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, respectivamente (Rittmann *et al.*, 2008). Estas indicaciones explican que *C. glutamicum* sea incapaz de crecer en medios definidos de cultivo con glicerol como única fuente de carbono y energía, resultado éste que también justifica la ausencia de la proteína transportadora GlpF en *C. glutamicum* implicada de forma general en el transporte de glicerol al interior de la célula.

Dado que conocemos que *C. glutamicum* incorpora As(III) y que no tiene genes para aguaglicerolporinas en su genoma, se pasó a identificar otras proteínas como las permeasas de hexosas como posibles proteínas implicadas en el transporte del metaloide. Uno de los microorganismos con permeasas de hexosas mejor caracterizadas es *Streptomyces coelicolor* A3(2), un actinomiceto próximo filogenéticamente a *C. glutamicum* y que es capaz de incorporar glucosa por la permeasa GlcP1 (ScGlcP1; Sco7153) (van Wezwel *et al.*, 2005). En el genoma de *C. glutamicum* se han identificado más de diez proteínas homólogas a la proteína ScGlcP1 de *S. coelicolor*, de las cuales las dos con mayor homología con ScGlcP1 (28% y 26%) están codificadas por los marcos de lectura (ORFs) cg0223 y cg3387, respectivamente. Ensayos de interrupción simple y de sobreexpresión homóloga en *C. glutamicum* RES167 (Tabla A4.4) y heteróloga en la cepa *E. coli* OSBR1 (mutante que tiene interrumpido el gen para la aguaglicerolporina EcGlpF; Tabla A4.4) de los genes *cg0223* y *cg3387* bajo el promotor fuerte del gen de resistencia a kanamicina (P_{kan}) no mostraron una modificación significativa de la cantidad de As(III) incorporado en ninguna de las cepas indicadas (Ordóñez, 2009). Además la presencia de diferentes azúcares en el medio extracelular como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa o xilosa no provocó un efecto inhibitorio en la entrada de As(III) ni en la cepa silvestre *C. glutamicum* ATCC 13032 y ni en los mutantes de *C. glutamicum* o *E. coli* OSBR1 en los que se sobreexpresaron las permeasas de hexosas Cg0223 o Cg3387 (Figura 3.2 y Tabla A4.4).

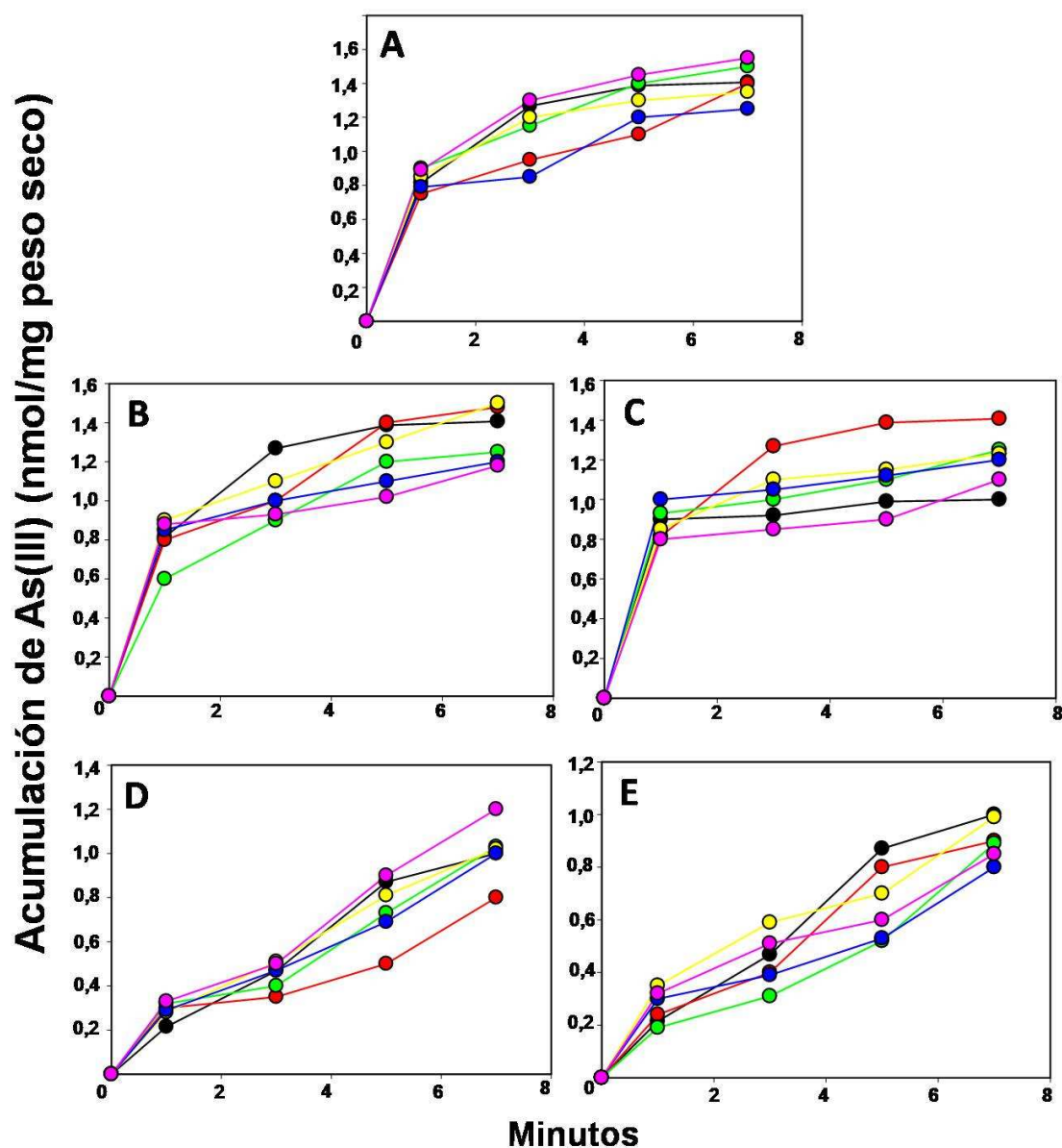


Figura 3.2. Entrada de As(III) en diferentes cepas de *C. glutamicum* (A, B y C) y de *E. coli* (D y E) en presencia de As(III) 1 mM y en ausencia de azúcares (rosa) o en presencia de diferentes azúcares a una concentración final de 2%: glucosa (verde), sacarosa (roja), fructosa (azul), galactosa (amarillo) o xilosa (negro). Las cepas utilizadas son: (A) *C. glutamicum* ATCC 13032, (B) *C. glutamicum* Cg0223, (C) *C. glutamicum* Cg3387, (D) *E. coli* Cg0223 y (E) *E. coli* Cg3387.

A la vista de los resultados obtenidos, continuamos la búsqueda de genes implicados en la entrada de As(III) en *C. glutamicum* con la realización de mutaciones al azar sobre el genoma del mutante *C. glutamicum* Δ ars (Tabla A4.4), cepa que carece de los dos operones *ars* de

resistencia a arsénico y que es extremadamente sensible a As(III). Para ello se usaron diferentes tipos de elementos transponibles que se integran al azar en el genoma: el transposón comercial Tn5, el elemento IS6100 y el minitransposón Tn31831, todos ellos introducidos en *C. glutamicum* por electroporación (ver apartado 2.2.2. de materiales y métodos). Los transformantes obtenidos se sometieron a ensayos de resistencia a As(III) comparando los resultados con la cepa receptora *C. glutamicum* 2Δars, sin embargo ninguno de los mutantes exhibió un incremento de la resistencia a As(III); es posible que la baja eficiencia de integración de los transposones utilizados y del método de electroporación en *C. glutamicum* no nos permitió detectar ningún clon afectado en la resistencia a As(III). Por ello se utilizó otro mecanismo de integración al azar basado en el plásmido movilizable suicida pSUP301 (Tabla A4.2) el cual se introduce en *C. glutamicum* por conjugación; mediante el uso del plásmido pSUP301 se identificó en *C. glutamicum* el gen *gntP*, gen que codifica para la proteína gluconato permeasa (Mateos *et al.*, 1996). Tras varios ensayos de conjugación obtuvimos un mayor número de transconjugantes que por cualquiera de los métodos de electroporación probados, pero ninguno de los transconjugantes obtenidos presentó un incremento de la resistencia a As(III).

Estos análisis no nos han permitido identificar el mecanismo de entrada de As(III) en *C. glutamicum*, sin embargo descartamos las aguaglicerolporinas como proteínas implicadas en el proceso.

3.1.2. Caracterización de las proteínas arsenito permeasas de *C. glutamicum*.

Otro de los factores que podría condicionar la resistencia a As(III) en *C. glutamicum* es la presencia de potentes mecanismos de desintoxicación intracelular de As(III) a través de arsenito permeasas. Sin embargo, en algunos microorganismos se han identificado mecanismos de resistencia a As alternativos a las permeasas de arsenito, como la metilación de As(III) a especies volátiles en el interior de la célula que posteriormente salen al exterior (Qin *et al.*, 2006).

En *C. glutamicum* se han identificado dos operones de resistencia a As separados en el cromosoma y que presentan una estructura génica similar y basada en el sistema de tres componentes (*arsRBC*) (Ordóñez *et al.*, 2005) (Figura 3.3). En cada uno de esos dos operones existe un gen que codifica para una arsenito permeasa, *Cgacr3-1* (cg1705) en el operón *ars1* y

Cgacr3-2 (cg0318) en el operón *ars2*; estos genes se transcriben en sentido contrario al de los reguladores transcripcionales (*CgarsRs*) situados corriente arriba de los genes *Cgacr3*. Además se ha localizado otro gen para una arsenito permeasa adicional *Cgacr3-3* (cg1661) que se encuentra aislado en el cromosoma de *C. glutamicum*. El análisis del genoma de *C. glutamicum* no nos han permitido identificar genes para metilasas de arsénico (*arsM*) que pudieran estar implicadas en la resistencia a As(III), lo que descarta definitivamente un proceso de metilación como mecanismo de desintoxicación del metaloide en este microorganismo. Por lo tanto, el único mecanismo de resistencia a As(III) presente en *C. glutamicum* se ha atribuido a la salida del metaloide a través de las arsenito permeasas.

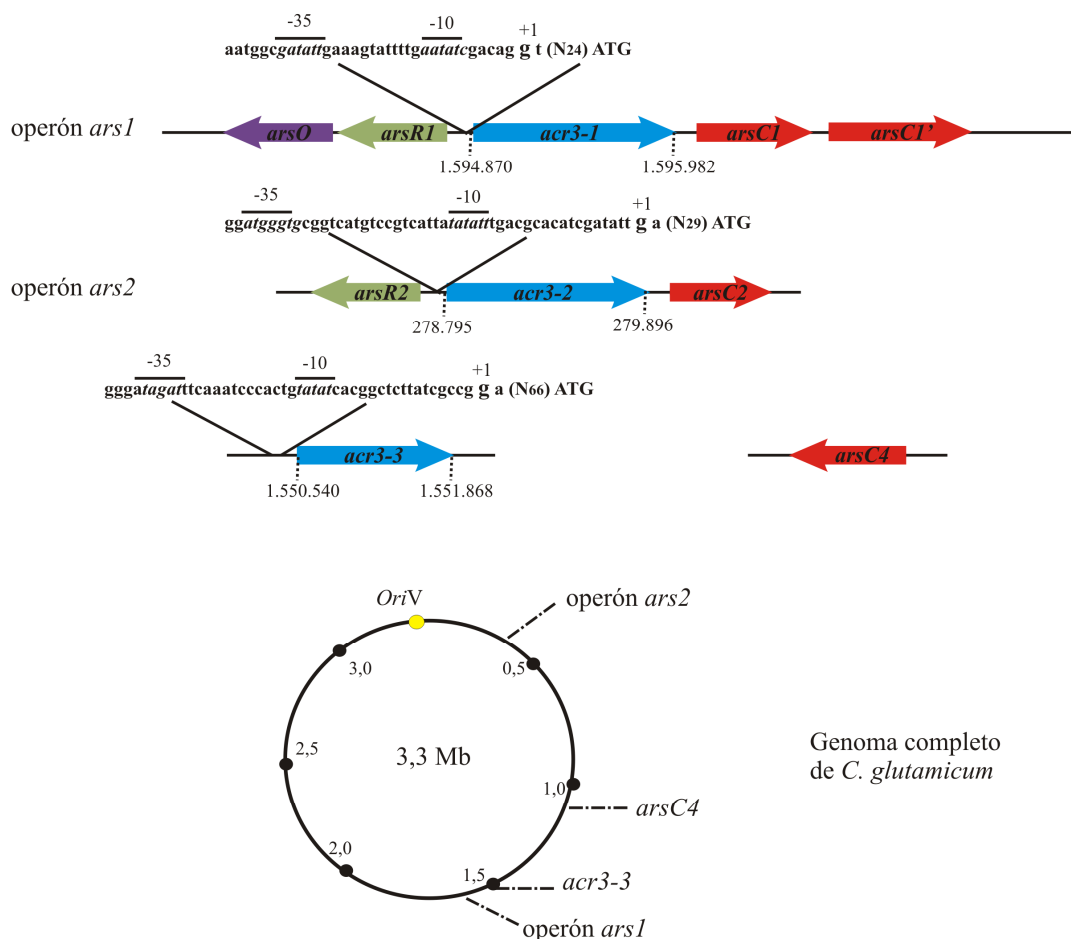


Figura 3.3. Representación esquemática de los genes que participan en la resistencia a arsénico en *C. glutamicum* (arriba) y su localización en el genoma completo de *C. glutamicum* (abajo). Se ha indicado la localización de los genes que codifican para las tres arsenito permeasas en el genoma de *C. glutamicum* de forma más exacta. La secuencia promotora de los genes *Cgacr3-1*, *Cgacr3-2* y *Cgacr3-3* también se ha incluido.

Hasta la fecha, la especie *C. glutamicum* es uno de los pocos microorganismos donde se han identificado tres genes para arsenito permeasas en su genoma, sin embargo la presencia de dos genes para arsenito permeasas en un mismo genoma es más frecuente y se ha descrito en microorganismos como *Ochrobactrum tritici* SC1124 (Branco *et al.*, 2008) o *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF (Fu *et al.*, 2010). Estas evidencias permiten especular que el elevado nivel de resistencia a As(III) (12 mM) de *C. glutamicum* pudiera ser debido al elevado número de arsenito permeasas presentes.

3.1.2.1. Las arsenito permeasas de *C. glutamicum* pertenecen a la familia Acr3.

En estudios iniciales de las arsenito permeasas de *C. glutamicum*, éstas fueron adscritas a la familia ArsB (ArsB1, ArsB2 y ArsB3; Ordóñez *et al.*, 2005). Sin embargo los análisis y estudios posteriores de las mismas identifican a las arsenito permeasas de *C. glutamicum* como pertenecientes a la familia Acr3 de actinomicetos y más en concreto dentro de la subfamilia Acr3(1) de acuerdo con sus relaciones filogenéticas (Figura 3.4). Las proteínas CgAcr3 de *C. glutamicum* se encuentran relacionadas con las proteínas Acr3 de *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Synechocystis* sp. y *S. coelicolor*, las cuales se encuentran filogenéticamente alejadas de las proteínas ArsB, como la proteína EcArsB de *E. coli* o PaArsB de *P. aeruginosa*. Por esta razón las tres arsenito permeasas de *C. glutamicum* han pasado a denominarse CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3.

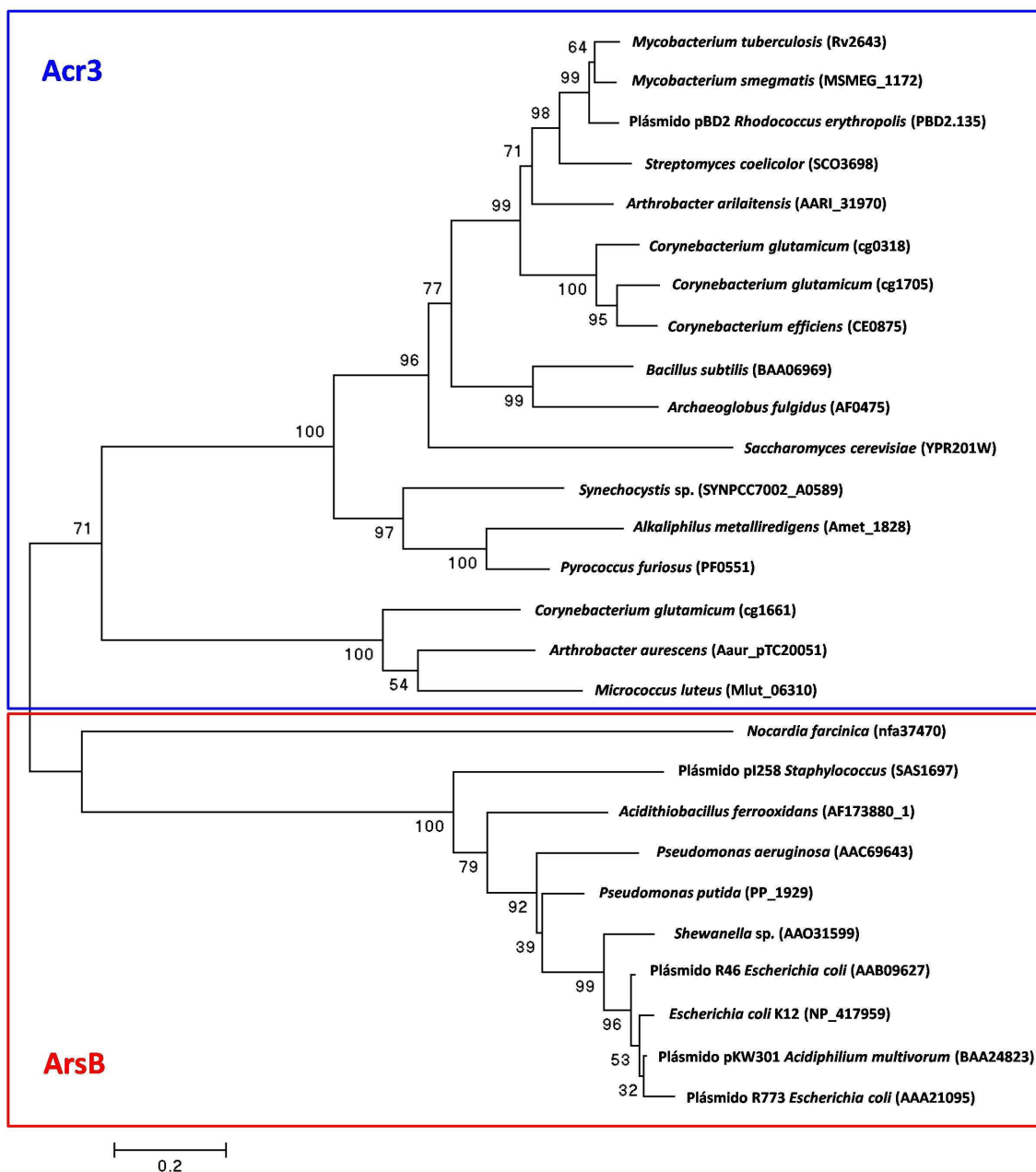


Figura 3.4. Análisis filogenético de las proteínas ArsB y Acr3 de diferentes especies microbianas. Los números representados son porcentajes obtenidos por *bootstapping* (1.000 réplicas). Se muestran los códigos de genes que codifican para estas proteínas.

3.1.2.2. Grado de implicación de las proteínas arsenito permeasas en la resistencia a arsénico de *C. glutamicum*.

Estudios previos asociados a los genes *Cgacr3* de *C. glutamicum* pusieron de manifiesto que la interrupción simple de los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* conducía a la disminución de la resistencia a As(III) y arseniato [As(V)] de *C. glutamicum*; por el contrario, no se observó efecto alguno en la interrupción simple del gen *Cgacr3-3* (Ordóñez *et al.*, 2005).

El análisis del efecto provocado por la interrupción de los genes *Cgacr3-1*, *Cgacr3-2* y *Cgacr3-3* se comprobó siguiendo una estrategia distinta a la utilizada por Ordóñez *et al.*, (2005), para lo cual los ensayos de resistencia se realizaron en medio líquido y mediante seguimiento espectrofotométrico; este último método permite una mayor fiabilidad y reproducibilidad de los resultados que el crecimiento en medio sólido. Los mutantes *C. glutamicum* Acr3-1 y Acr3-2 (cepas interrumpidas en los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2*, respectivamente; Tabla A4.4) mostraron una disminución en los niveles de resistencia a As(III) en comparación con la cepa original *C. glutamicum* RES167 (Figura 3.5), al igual que Ordóñez *et al.* (2005) habían observado en medio sólido; sin embargo, la interrupción del gen *Cgacr3-3* (*C. glutamicum* Acr3-3; Tabla A4.4) no produjo cambios en los niveles de resistencia a As(III) (Figura 3.5), lo que apoya la implicación mayoritaria de las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 en la salida de As(III) de *C. glutamicum*.

El resultado anterior fue confirmado mediante un análisis de resistencia a As(III) en el doble mutante *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2, el cual presenta los dos genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* interrumpidos (Ordóñez *et al.*, 2005; Tabla A4.4), y en el mutante *C. glutamicum* 2Δars, el cual presenta los operones *ars1* y *ars2* delecionados (Ordóñez *et al.*, 2008). Los resultados pusieron de manifiesto que las dos cepas exhiben una gran sensibilidad a As(III), del orden de 0,4 mM, (Figura 3.5). En base a estos resultados se pasó a determinar el grado de participación de cada una de las arsenito permeasa en la resistencia a As(III) en *C. glutamicum* con un mayor detalle.

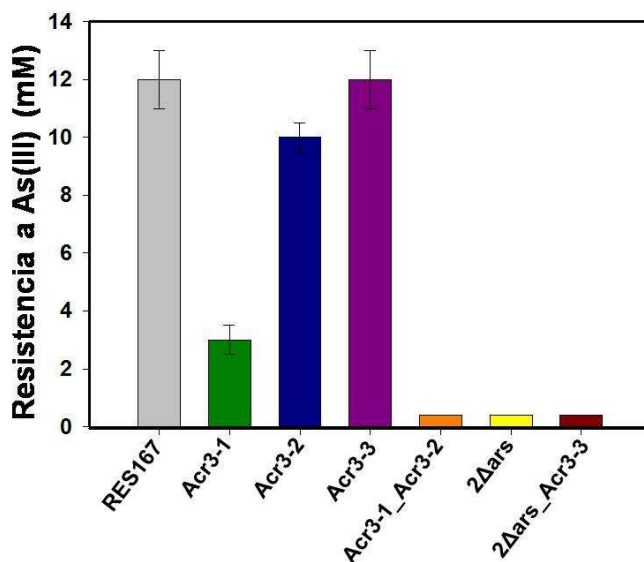


Figura 3.5. Niveles de resistencia a As(III) de diferentes cepas de *C. glutamicum*: *C. glutamicum* RES167 (RES167); *C. glutamicum* Acr3-1 (Acr3-1); *C. glutamicum* Acr3-2 (Acr3-2); *C. glutamicum* Acr3-3 (Acr3-3); *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 (Acr3-1_Acr3-2); *C. glutamicum* 2Δars (2Δars); *C. glutamicum* 2Δars_Acr3-3 (2Δars_Acr3-3). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

3.1.2.2.1. La proteína CgAcr3-3 no está implicada en la resistencia a arsénico en *C. glutamicum*.

Hasta la fecha, no se ha observado participación alguna de la permeasa CgAcr3-3 en la resistencia a As(III) en *C. glutamicum*, no obstante, el bajo nivel de resistencia a As(III) (0,4 mM) de los mutantes *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 y *C. glutamicum* 2Δars podría estar asociado a la actividad de la proteína CgAcr3-3. Por ello decidimos desvelar el hipotético papel de la permeasa CgAcr3-3 en la resistencia a As(III) en *C. glutamicum*.

Un gen equivalente a *Cgacr3-3* ha sido también encontrado en el genoma de otras actinobacterias como *Corynebacterium efficiens*, *Arthrobacter aurescens*, *Nocardioides* sp., *Frankia* sp., *Thermobifida fusca* y *Brevibacterium linens* lo que indica que el gen puede haberse adquirido mediante una transferencia horizontal, como ocurre con muchos genes de resistencia a agentes tóxicos (Dobrindt *et al.*, 2004). Como se comprueba del árbol filogenético de la Figura 3.4, la proteína CgAcr3-3 se encuentra dentro de la familia Acr3 pero está filogenéticamente alejada de las otras dos arsenito permeasas de *C. glutamicum* (CgAcr3-1 y

CgAcr3-2) con las que presenta un grado de homología de 18 y 20%, respectivamente. Además el tamaño de la proteína CgAcr3-3 es de 287 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos menos del tamaño medio de todas las proteínas Acr3 descritas hasta la fecha, aspecto éste que podría cuestionar la funcionalidad de la proteína CgAcr3-3.

Para comprobar la posible implicación de la permeasa CgAcr3-3 en la desintoxicación de As(III) se intentó hacer un mutante triple para las tres arsenito permeasas de *C. glutamicum*. Para ello se clonó un fragmento interno de 310 pb del gen *Cgacr3-3* en el vector suicida y movilizable de corinebacterias pK18mob, obteniéndose el plásmido pKacr3-3int (ver Anexo A3.2 y Tabla A4.3). Este plásmido fue transferido mediante conjugación a *C. glutamicum* 2Δars y se integró en el cromosoma por recombinación homóloga simple a través del fragmento interno a *Cgacr3-3* clonado en pKacr3-3int, obteniéndose una copia del gen *Cgacr3-3* interrumpida (Figura 3.6). Esta estrategia ha sido usada frecuentemente en corinebacterias (Fiuza *et al.*, 2008) y la razón de emplear vectores conjugativos-movilizables en los ensayos de transferencia de ADN a *C. glutamicum* es porque con este sistema se consiguen frecuencias de entrada de ADN exógenos mayores que las obtenidas mediante electroporación (Schäfer *et al.*, 1990).

La interrupción del gen *Cgacr3-3* fue confirmada por PCR usando los oligonucleótidos universales M13 (Tabla A4.1), secuencias presentes a los extremos del lugar de clonación múltiple (MCS) del vector pK18mob. Los transconjugantes obtenidos (*C. glutamicum* 2Δars_Acr3-3; Tabla A4.5) presentaron un nivel de resistencia a As(III) similar al de la cepa receptora *C. glutamicum* 2Δars y al del mutante *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 (Figura 3.5), cepas éstas que presentan la copia original del gen *Cgacr3-3* en su genoma. En estudios previos se demostró la expresión constitutiva del gen *Cgacr3-3* mediante análisis de RT-PCR (Ordóñez *et al.*, 2005) por lo que es posible que la proteína CgAcr3-3 presente un nivel de expresión muy bajo o no detectable *in vivo*.

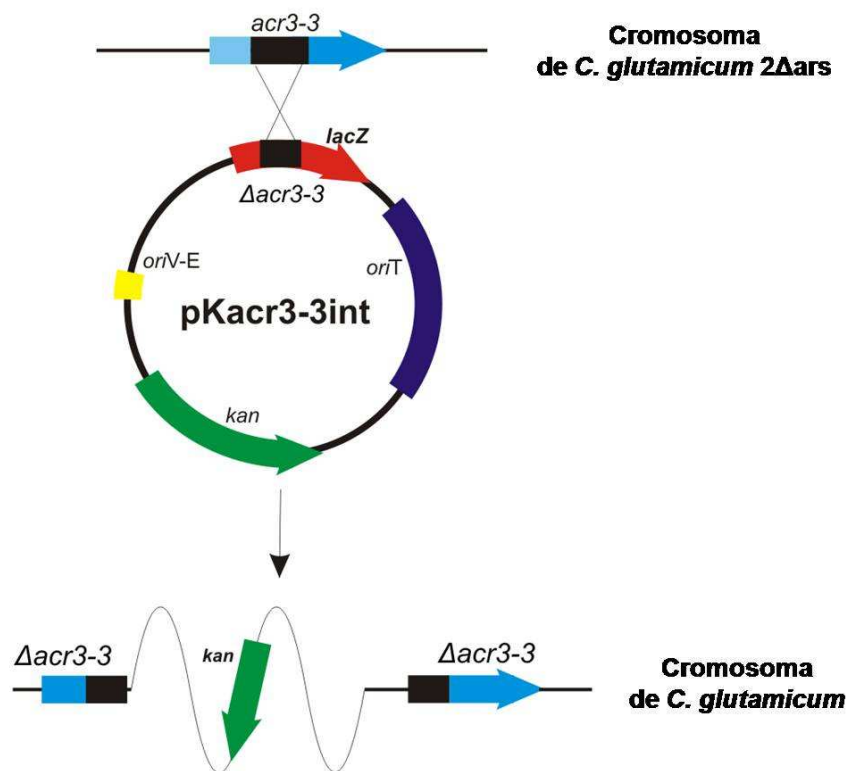


Figura 3.6. Esquema del producto génico obtenido tras la integración del plásmido pKacr3-3int por recombinación simple en el cromosoma de *C. glutamicum* 2Δars.

Para descartar que el problema fuera debido a una baja expresión de la proteína CgAcr3-3, se incrementó la dosis del gen *Cgacr3-3* mediante la generación de un merodiploide que lleve la copia original del gen *Cgacr3-3* en el genoma y otra copia en otro punto del cromosoma bajo su propio promotor. Para ello el gen *Cgacr3-3* bajo su propia secuencia promotora (Figura 3.3) se clonó en el plásmido movilizable pKars1up, que actúa como suicida en corinebacterias. El plásmido obtenido pKacr3-3 (ver Anexo A3.3 y Tabla A4.3) se transfirió a *C. glutamicum* 2Δars, favoreciéndose su integración por la presencia de una región de 500 pb del genoma de *C. glutamicum* procedente del extremo 5' del operón *ars1* (ver Figura 3.9 más adelante). Los transconjugantes obtenidos (*C. glutamicum* pKacr3-3; Tabla A4.5) fueron confirmados por PCR y presentaron un nivel de resistencia a As(III) similar al de la cepa control *C. glutamicum* 2Δars (Figura 3.7A). Otra herramienta útil para analizar el grado de implicación de una proteína en la resistencia a As consiste en cuantificar la cantidad de As que se acumula en las células, aspecto éste que se valoró mediante ICP-MS. Para conocer la cantidad de As acumulado mantuvimos los mutantes en un estado de reposo o no crecimiento (*resting cells*) para posteriormente ser incubadas en presencia de As(III). Muestras de esa mezcla de reacción

fueron tomas a diferentes tiempos y analizadas mediante ICP-MS. Como se observa en la Figura 3.7A el nivel de As acumulado en el mutante *C. glutamicum* pKacr3-3 (presenta dos copias del gen *Cgacr3-3* bajo su propio promotor) es equivalente al de la cepa *C. glutamicum* 2Δars, la cual contiene una única copia del gen *Cgacr3-3*.

Estos resultados nos hicieron considerar la posibilidad de aumentar aún más el número de copias del gen *Cgacr3-3* mediante un ensayo de sobreexpresión homóloga y heteróloga en *C. glutamicum* y en *E. coli*, respectivamente. Para ello un fragmento de ADN de 1.197 pb conteniendo el gen *Cgacr3-3* con su propia región promotora se clonó en el plásmido bifuncional pECM2, obteniéndose el vector pECacr3-3 (ver Anexo A3.3 y Tabla A4.3). Esta construcción se introdujo en *C. glutamicum* 2Δars, para llevar a cabo la sobreexpresión homóloga, y el plásmido pKacr3-3 (descrito arriba) se introdujo en *E. coli* AW3110 (cepa que tiene sustituido el operón *ars* por el gen de resistencia a cloranfenicol; Tabla A4.4), para la sobreexpresión heteróloga. Los transconjugantes (*C. glutamicum* pECacr3-3) y transformantes (*E. coli* pKacr3-3) obtenidos (Tabla A4.5), fueron sometidos a ensayos de resistencia y acumulación de As(III) y todos ellos presentaron el mismo nivel de resistencia y de acumulación de As(III) que las cepas receptoras originales, *C. glutamicum* 2Δars y *E. coli* AW3110, respectivamente (Figura 3.7).

A la vista de los resultados obtenidos *in vivo* parece evidente que la proteína CgAcr3-3 no participa en la resistencia a As en *C. glutamicum*. La arsenito permeasa CgAcr3-3 presenta 83 y 79 aminoácidos menos con respecto a las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2, respectivamente, por lo que es lógico pensar en una pérdida o un cambio drástico de parte de su secuencia y por consiguiente la pérdida de su función.

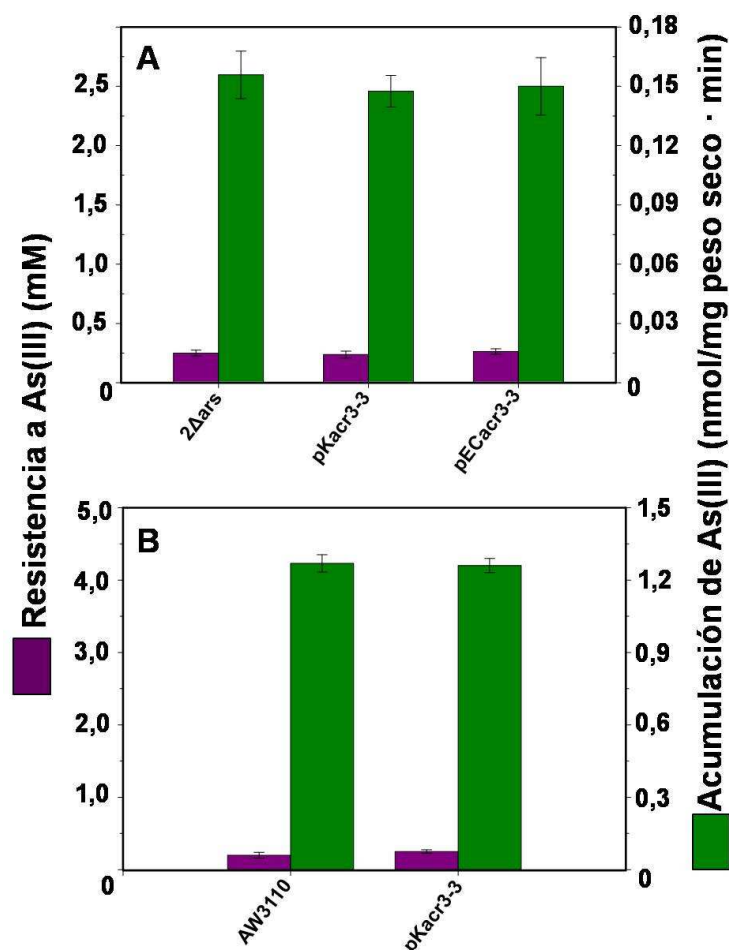


Figura 3.7. Análisis de resistencia (morado) y acumulación (verde) de As(III) por aumento de la dosis génica del gen *Cgacr3-3* en células de *C. glutamicum* (A) y *E. coli* (B). Se comparan los resultados obtenidos en tres experimentos independientes de los mutantes: (A) *C. glutamicum* 2Δars (2Δars), *C. glutamicum* pKacr3-3 (pKacr3-3) y *C. glutamicum* pECacr3-3 (pECacr3-3); y (B) *E. coli* AW3110 (AW3110) y *E. coli* pKacr3-3 (pKacr3-3).

Para comprobar la hipótesis de que la proteína CgAcr3-3 pudiera haber perdido la topología típica de 10 segmentos transmembrana (TM) de las proteínas Acr3, se comparó la predicción topológica de proteína CgAcr3-3 de *C. glutamicum* obtenida a partir de tres programas de análisis topológico diferentes. Como se observa en la Figura 3.8, hay dos propuestas de predicción topológica para la proteína CgAcr3-3, una con siete dominios transmembrana (TopPred2) y las otras con ocho (SOSUI y TMHMM). La posible ausencia de tres o dos segmentos transmembrana en comparación con la topología típica de las proteínas Acr3 (Aaltonen & Silow, 2008) podría explicar la carencia de actividad *in vivo* de CgAcr3-3,

impidiendo la correcta formación del poro a través de la membrana y la posterior translocación de As(III).

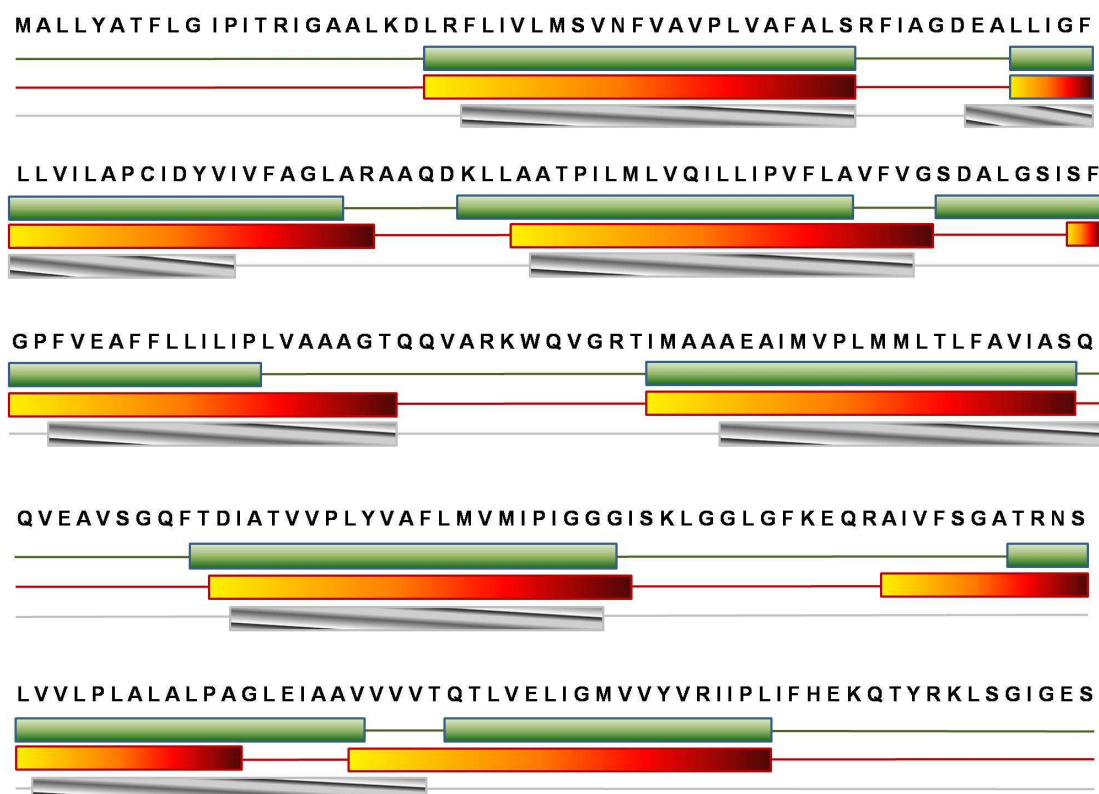


Figura 3.8. Predicción topológica transmembranal de la proteína CgAcr3-3 de *C. glutamicum* obtenida a partir de la secuencia aminoacídica (primera línea) con los programas TMHMM (segunda línea con TMs en cajas verdes), SOSUI (tercera línea con TMs en cajas rojas) y TopPred2 (cuarta línea con TMs en cajas grises).

3.1.2.2.2. Las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 tienen diferente grado de participación en la resistencia a arsénico en *C. glutamicum*.

Para conocer el grado de implicación de las dos arsenito permeasas funcionales de *C. glutamicum*, CgAcr3-1 y CgAcr3-2, se realizaron análisis de complementación homóloga y heteróloga de los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* en las cepas *C. glutamicum* 2 Δ ars y *E. coli* AW3110, respectivamente. Para realizar los análisis de complementación, los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* se clonaron bajo sus respectivas regiones promotoras (Figura 3.3) en el plásmido pKars1up para conseguir niveles de expresión adecuados de dichos genes en los ensayos de complementación. Los plásmidos resultantes pKacr3-1 y pKacr3-2 (ver Anexo A3.3 y Tabla

A4.3) se introdujeron en *C. glutamicum* 2Δars por conjugación y se integraron en el cromosoma mediante recombinación homóloga en una región de 500 pb adyacente al operón *ars1* (Figura 3.9). Los análisis de PCR realizados con los oligonucleótidos universales M13 a los transconjugantes obtenidos confirmaron la integración de los plásmidos pKacr3-1 y pKacr3-2 en el lugar del operón *ars1* de *C. glutamicum* indicado. Cuando se utilizó como cepa receptora *E. coli* AW3110 para los plásmidos pKacr3-1 y pKacr3-2, estos se introdujeron por transformación y no se integraron en el genoma por presentar el origen de replicación de *E. coli*.

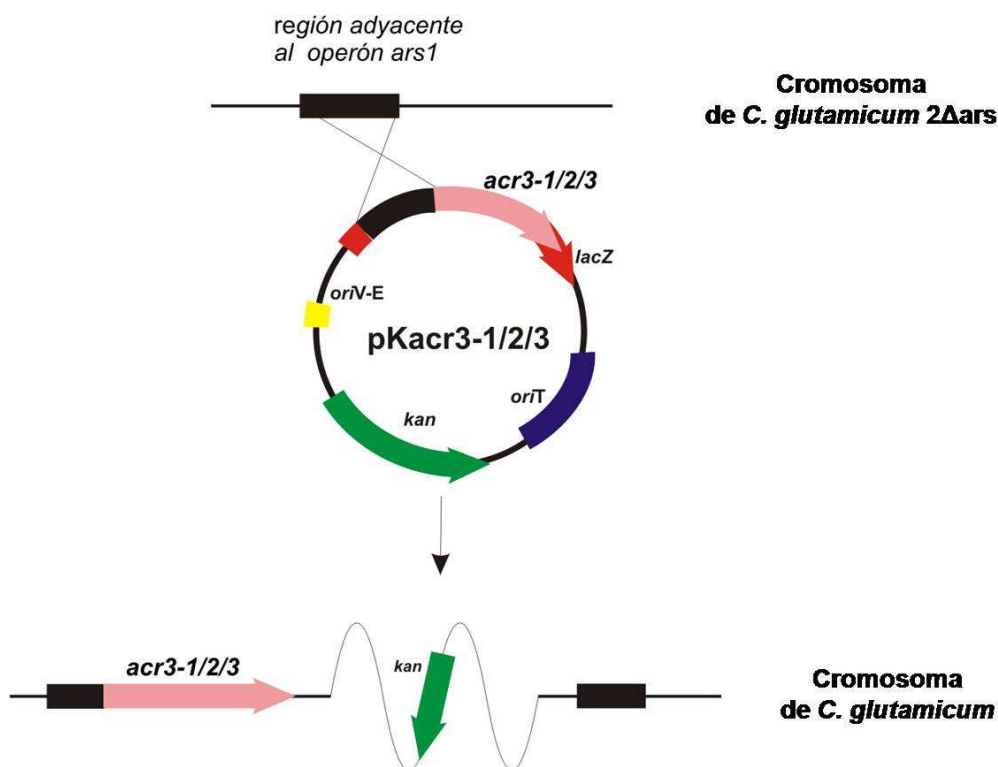


Figura 3.9. Esquema del producto génico obtenido tras la integración de los plásmidos pKacr3-1, pKacr3-2 o pKacr3-3 por recombinación simple en el cromosoma de *C. glutamicum* 2Δars.

Los análisis de los niveles de resistencia a As(III) y de la cantidad de As(III) acumulado tanto en las cepas de *C. glutamicum* 2Δars y *E. coli* AW3110 originales como en las cepas que contienen los genes *Cgacr3-1* (*C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1, respectivamente; Tabla A4.5) y *Cgacr3-2* (*C. glutamicum* pKacr3-2 y *E. coli* pKacr3-2, respectivamente; Tabla A4.5) nos indicaron claramente que las dos permeasas para las que codifican están realmente implicadas en la resistencia a As(III) (Figura 3.10A y B). Sin embargo, parece que el grado de

participación de las dos permeasas en la resistencia a As(III) es diferente; considerando que el 100% de la resistencia se corresponde con la cepa de *C. glutamicum* RES167, la participación de la permeasa CgAcr3-1 se cifra en el 80% aproximadamente y el resto (20%) se debería a la acción de la permeasa CgAcr3-2. Un nivel de participación similar al anterior de las permeasas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 se ve también reflejado en los valores de resistencia obtenidos en *E. coli* AW3110 cuando la cepa contenía los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* de *C. glutamicum* en comparación con la cepa silvestre *E. coli* W3110 (Tabla A4.4 y Figura 3.10B).

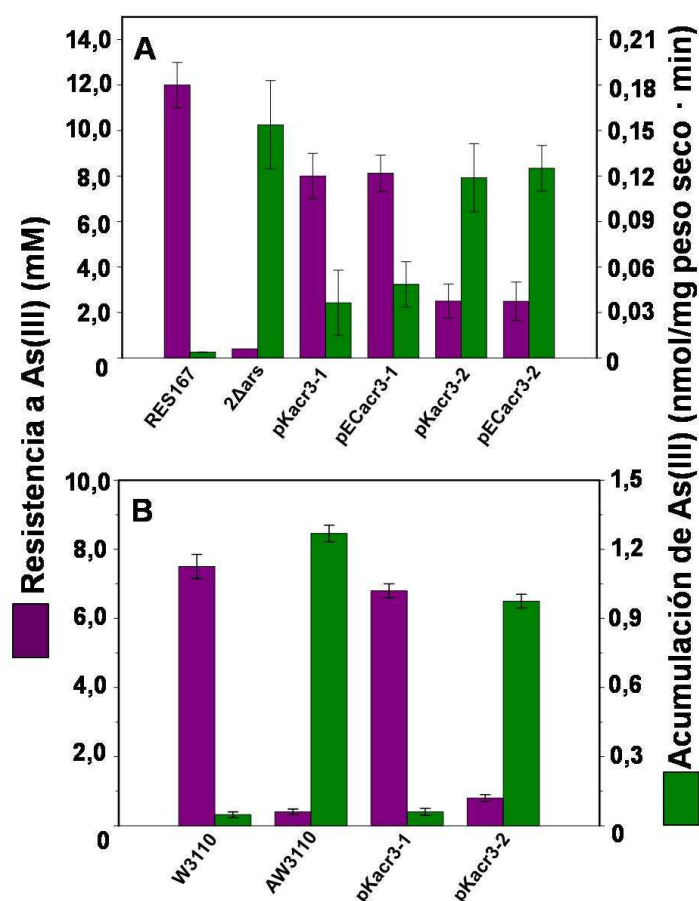


Figura 3.10. Análisis de resistencia (morado) y acumulación (verde) de As(III) en complementaciones génicas de los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* en células de *C. glutamicum* (A) y *E. coli* (B). Se comparan los resultados obtenidos en tres experimentos independientes de las cepas: (A) *C. glutamicum* RES167 (RES167), *C. glutamicum* 2Δars (2Δars), *C. glutamicum* pKacr3-1 (pKacr3-1), *C. glutamicum* pECacr3-1 (pECacr3-1), *C. glutamicum* pKacr3-2 (pKacr3-2) y *C. glutamicum* pECacr3-2 (pECacr3-2); y (B) *E. coli* W3110 (W3110), *E. coli* AW3110 (AW3110), *E. coli* pKacr3-1 (pKacr3-1) y *E. coli* pKacr3-2 (pKacr3-2).

Para completar el análisis de complementación homóloga realizado con las permeasas CgAcr3-1 y CgAcr3-2, los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* fueron sobreexpresados en *C. glutamicum*. Para ello los dos genes se clonaron en el plásmido bifuncional pECM2, bajo sus propias regiones promotoras, obteniendo los vectores pECacr3-1 y pECacr3-2 (ver Anexo A3.3 y Tabla A4.3). Estos vectores son capaces de replicarse autónomamente en corinebacterias en multicopia con lo que se consigue un incremento en la dosis génica de los mismos (sobreexpresión). Al introducir estos plásmidos en *C. glutamicum* 2Δars se obtuvieron los transconjugantes *C. glutamicum* pECacr3-1 y *C. glutamicum* pECacr3-2 (Tabla A4.5) los cuales presentan un nivel de resistencia a As(III) similar al obtenido con los vectores integrativos pKacr3-1 y pKacr3-2, lo que confirma la participación de las dos arsenito permeasas en la resistencia a As en *C. glutamicum* y la mayor implicación de la permeasa CgAcr3-1 en dicha resistencia (Figura 3.10.A). Estos resultados también fueron corroborados mediante el análisis de As acumulado en los mutantes anteriormente indicados, observando una menor cantidad de As(III) en aquellas cepas que resisten más al metaloide y una mayor cantidad de As en las cepas que resisten menos al metaloide (Figura 3.10.A).

Según lo indicado, el grado de participación de la arsenito permeasa CgAcr3-1 en la desintoxicación de As parece ser más importante que el de la proteína CgAcr3-2, a pesar de que las dos arsenito permeasas presentan un elevado grado de homología (72% de identidad) y tienen prácticamente el mismo tamaño (CgAcr3-1 tiene 370 aminoácidos y 367 aminoácidos CgAcr3-2). Por otra parte la complementación de *Cgacr3-1* o *Cgacr3-2* en *C. glutamicum* 2Δars fue equivalente en términos de resistencia y acumulación de As(III), independientemente de si los genes se integraron en el cromosoma (usando vectores suicidas) o estaban incluidos en plásmidos multicopia en el citoplasma (Figura 3.10A). Este aspecto podría sugerir que la membrana plasmática admitiría un número limitado de proteínas arsenito permeasas, saturándose con la complementación de los genes *Cgacr3-1* y *Cgacr3-2* en monocopia, como ocurre con la complementación de la proteína EcZitB de *E. coli* implicada en la salida de zinc en *E. coli* (Chao & Fu, 2004).

Con el fin de comprobar la hipótesis de que la membrana plasmática pudiera constituir un espacio físico limitado para las arsenito permeasas, se identificó el nivel de expresión de la arsenito permeasa CgAcr3-1 en mutantes de *C. glutamicum* donde la proteína es expresada en monocopia o multicopia mediante análisis de *Western blot*, usando anticuerpos anti-CgAcr3-1 o anticuerpos anti-histidinas. Los anticuerpos específicos de la proteína CgAcr3-1 fueron obtenidos a partir de un péptido sintético de la proteína CgAcr3-1 el cual fue inyectado en un conejo siguiendo el protocolo de inmunización indicado en el apartado 2.4.13. de Materiales y

métodos. Para poder utilizar los anticuerpos anti-histidinas el gen que codifica la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* fue fusionado a una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal y clonado bajo su propio promotor en los plásmidos pKars1up (vector suicida e integrativo para corinebacterias) y pECM2 (vector bifuncional). Estas dos construcciones fueron denominadas pKacr3His y pECacr3His, respectivamente, (Anexo A3.4 y Tabla A4.3) e introducidas en *C. glutamicum* 2Δars por conjugación; a partir de los transconjugantes obtenidos (*C. glutamicum* pKacr3His y *C. glutamicum* pECacr3His; Tabla A4.5) se concentró la proteína CgAcr3-1 tal y como se describe en el apartado 2.4.9.1. de Materiales y métodos. Con las muestras de la proteína CgAcr3-1 concentrada procedentes de diferentes mutantes se realizó un análisis de *Western blot*, usando como control negativo la cepa *C. glutamicum* 2Δars_Acr3-3, la cual carece de arsenito permeasas. Como se observa en la Figura 3.11, la proteína CgAcr3-1 concentrada (peso molecular deducido de 42 kDa con la cola de seis histidinas) reacciona con anticuerpos anti-CgAcr3-1 y con anticuerpos anti-histidinas prácticamente con la misma intensidad, y como era de esperar no se observa reacción con proteínas inespecíficas como se deduce por la ausencia de señal en el control negativo (*C. glutamicum* 2Δars_Acr3-3). Los niveles proteicos observados para la proteína CgAcr3-1 fueron equivalentes, independientemente de si el gen *Cgacr3-1* se expresó en monocopia (vector pKars1up) o multicopia (vector pECM2). De forma similar a lo observado en *C. glutamicum*, la proteína CgAcr3-1 expresada en la cepa *E. coli* AW3110 a partir de los plásmidos pKacr3-1 o pKacr3His fue también detectada con los anticuerpos anti-CgAcr3-1 y anti-histidinas (Figura 3.11). Estos resultados vienen a corroborar que la cantidad de proteína CgAcr3-1 que se localiza en la membrana sería similar tanto en el mutante que contiene el vector bifuncional (pECacr3His) como en el que tiene la construcción del vector integrativo (pKacr3His), y por tanto que la membrana plasmática podría ser considerada un espacio físico limitado.

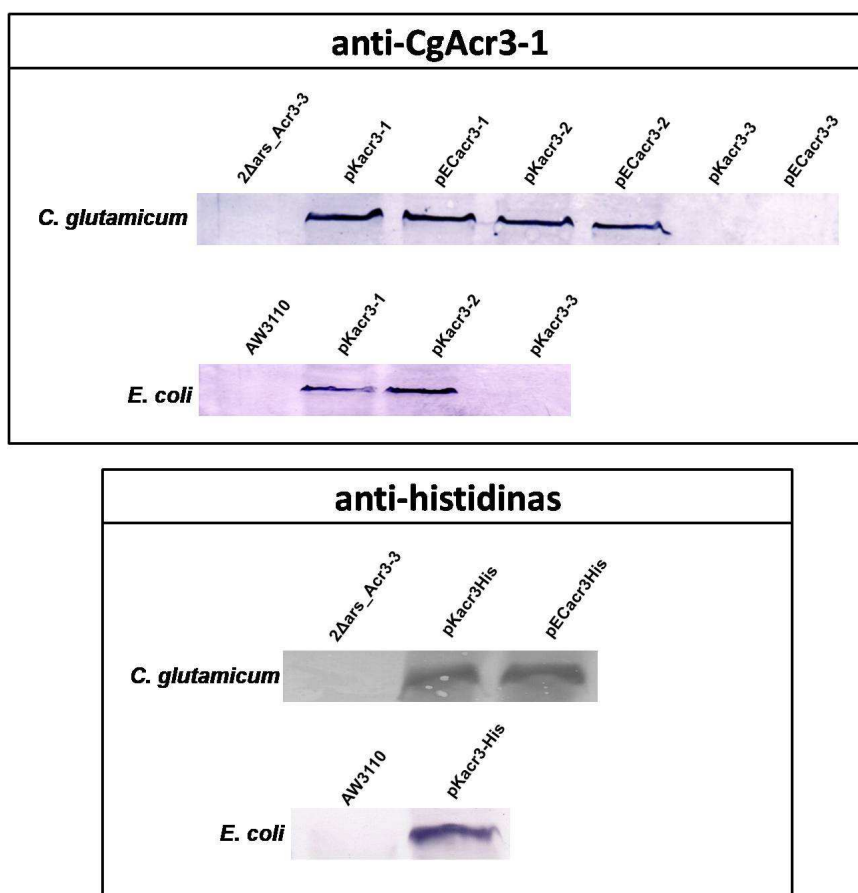


Figura 3.11. Análisis de *Western blot* de las proteínas CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3 de *C. glutamicum* expresadas en diferentes cepas de *C. glutamicum* y *E. coli* con anticuerpos anti-CgAcr3-1 y anti-histidinas. Los mutantes de *C. glutamicum* utilizados son: *C. glutamicum* 2Δars_Acr3-3 (2Δars_Acr3-3; control negativo), *C. glutamicum* pKacr3-1 (pKacr3-1), *C. glutamicum* pECacr3-1 (pECacr3-1), *C. glutamicum* pKacr3-2 (pKacr3-2), *C. glutamicum* pECacr3-2 (pECacr3-2), *C. glutamicum* pKacr3-3 (pKacr3-3), *C. glutamicum* pECacr3-3 (pECacr3-3), *C. glutamicum* pKacr3His (pKacr3His), *C. glutamicum* pECacr3His (pECacr3His). Los mutantes de *E. coli* utilizados son: *E. coli* AW3110 (AW3110; control negativo), *E. coli* pKacr3-1 (pKacr3-1), *E. coli* pKacr3-2 (pKacr3-2), *E. coli* pKacr3-3 (pKacr3-3) y *E. coli* pKacr3His (pKacr3His).

Dada la homología existente entre las permeasas CgAcr3-1 y CgAcr3-2, se planteó la posibilidad de identificar la proteína CgAcr3-2 expresada en mutantes de *C. glutamicum* mediante análisis de *Western blot* usando anticuerpos anti-CgAcr3-1. Las cepas *C. glutamicum* pKacr3-2 (monocopia) y *C. glutamicum* pECacr3-2 (multicopia) (ver Tabla A4.5) mostraron unos niveles de expresión de la proteína CgAcr3-2 equivalentes entre sí y similares a los observados para CgAcr3-1 en las mismas condiciones (Figura 3.11). Estos resultados confirman que la expresión del gen *Cgacr3-2* en el vector multicopia no provoca un aumento de la incorporación de la proteína en la membrana celular, de la misma manera que ocurre con la arsenito

permeasa CgAcr3-1. Además los resultados nos permiten constatar la existencia de una reacción serológica cruzada entre las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 cuando se usaron los anticuerpos anti-CgAcr3-1, debido a su elevado grado de homología y sobre todo al determinante antigénico (epitopo) usado en la inmunización. No ocurrió lo mismo con la proteína CgAcr3-3, la cual no fue detectada en *C. glutamicum* ni en *E. coli*, bien por un bajo nivel de expresión, bien por falta de posicionamiento en la membrana o por falta de reacción serológica cruzada, ya que en los ensayos se usaron anticuerpos anti-CgAcr3-1 y el porcentaje de homología entre las proteínas es bajo (18%) (Figura 3.11).

Estos resultados indican que la sobreexpresión del gen que codifica para cada una de las arsenito permeasas de *C. glutamicum* no repercute en una mayor presencia proteica en la membrana y por tanto no incrementa el grado de resistencia al metaloide. Por otra parte el gen *Cgacr3-1* que codifica para la proteína CgAcr3-1 parece ser la proteína más importante en el proceso de desintoxicación de As en *C. glutamicum*. Este resultado es consistente con los datos de transcripción y de resistencia a As donde se vio que el operón *ars1* es el más importante (Ordóñez *et al.*, 2005).

Por lo indicado anteriormente, los posteriores estudios de las arsenito permeasas se centraron en el análisis de la proteína CgAcr3-1, utilizando los mutantes *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1, los cuales carecen que los operones *ars* y presentan el gen *Cgacr3-1* en monocopia (integrado en el cromosoma) o multicopia, respectivamente, bajo su propia región promotora.

3.1.2.3. Identificación de la fuente de energía asociada a la proteína CgAcr3-1.

Todas las arsenito permeasas requieren energía para el transporte de As(III) a través de la membrana. Las proteínas de membrana en las células pueden utilizar dos tipos de energía: (i) una energía química dependiente de nucleótidos trifosfato, principalmente ATP, o (ii) una energía dependiente del gradiente electroquímico de protones (Δp o motivo de fuerza protónica). El gradiente electroquímico de protones está formado por dos componentes: el potencial de membrana ($\Delta\psi$) y el gradiente de protones o de pH (ΔpH), los cuales derivan de la liberación de protones al exterior de la célula debido al transporte de electrones a través de la cadena respiratoria presente en la membrana plasmática (Harold, 1972; Mitchell, 1966; Nikaido & Saier, 1992). La enzima arsenito permeasa EcArsB de *E. coli* puede utilizar dos tipos de

energía, ATP o motivo de fuerza protónica, dependiendo de si se encuentra acoplada a la proteína EcArsA (formando el complejo ArsAB) o si se encuentra la proteína EcArsB sólo anclada a la membrana, respectivamente (Dey & Rosen, 1995).

Células completas han sido usadas para la determinación *in vivo* del mecanismo energético que utiliza la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* para llevar a cabo el transporte de As(III) a través de la membrana siguiendo descripciones previas (Dey & Rosen, 1995; Kashket & Wilson, 1978; Houssin *et al.*, 2002). Para ello, tres diferentes cepas de *C. glutamicum* fueron ensayadas con As(III) en presencia o ausencia del ionóforo carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP), el cual disipa el motivo de fuerza protónica; la cantidad de As(III) acumulado en las cepas fue analizada mediante ICP-MS. Como se observa en la Figura 3.12A y C, las cepas *C. glutamicum* RES167 (cepa que contiene las dos arsenito permeasas funcionales, CgAcr3-1 y CgAcr3-2) y *C. glutamicum* pKacr3-1 (cepa que contiene CgAcr3-1 como única arsenito permeasa funcional), presentan un pequeño nivel de acumulación de As, presumiblemente como resultado de la salida del metaloide a través de CgAcr3-1 (y CgAcr3-2, en el caso de *C. glutamicum* RES167). Sin embargo en presencia del desacoplador CCCP, las dos cepas incrementan la acumulación de As(III) hasta valores de 12-14 nmoles de As/mg de peso seco. El mutante *C. glutamicum* 2Δars (cepa que carece de las arsenito permeasas funcionales) no ve afectada la cantidad de As(III) acumulada en presencia del ionóforo CCCP (Figura 3.12B). Estos resultados demuestran que la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* (y probablemente CgAcr3-2) utiliza el motivo de fuerza protónica como energía para transportar As(III) al exterior de la célula. No se han encontrado en el genoma de *C. glutamicum* genes que codifiquen para una proteína ATPasa ArsA, evidencia ésta que nos hizo pensar que probablemente el motivo de fuerza protónica fuera el mecanismo energético necesario y suficiente para el transporte de As(III) a través de CgAcr3-1 en *C. glutamicum*.

Aunque diversos estudios de transporte energético de proteínas de membrana han sido llevados a cabo en células completas, muchas veces los resultados obtenidos en estas células son difíciles de interpretar debido a la falta de controles sobre el complejo metabolismo endógeno de la célula. Para solventar algunos de estos problemas se han utilizado vesículas invertidas de membranas citoplasmáticas obtenidas mediante tratamientos físicos a partir de esferoplastos o protoplastos; estas vesículas constituyen un modelo útil para estudiar *in vitro* el mecanismo molecular de transporte activo de determinadas proteínas de membrana (Schrempp *et al.*, 1994). Las vesículas invertidas presentan un tamaño menor que las células de donde proceden y una lateralidad de membrana opuesta a la que presentan las células, por lo que su comportamiento metabólico es contrario al de las células completas (Kaback, 1974);

la acumulación de As(III) en las vesículas invertidas (análisis *in vitro*) reflejaría una liberación activa de As(III) de las células completas (análisis *in vivo*). Para examinar en mayor detalle la fuente de energía implicada en la salida de As(III) a través de proteínas CgAcr3 usamos vesículas invertidas de membrana de células de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1, y de *C. glutamicum* Δ Ars y *E. coli* AW3110, como controles negativos. Las vesículas invertidas de *C. glutamicum* y *E. coli* fueron obtenidas siguiendo el método descrito en el apartado 2.4.10.1. de Materiales y métodos, utilizando el protocolo de sonicación como método de rotura e inversión.

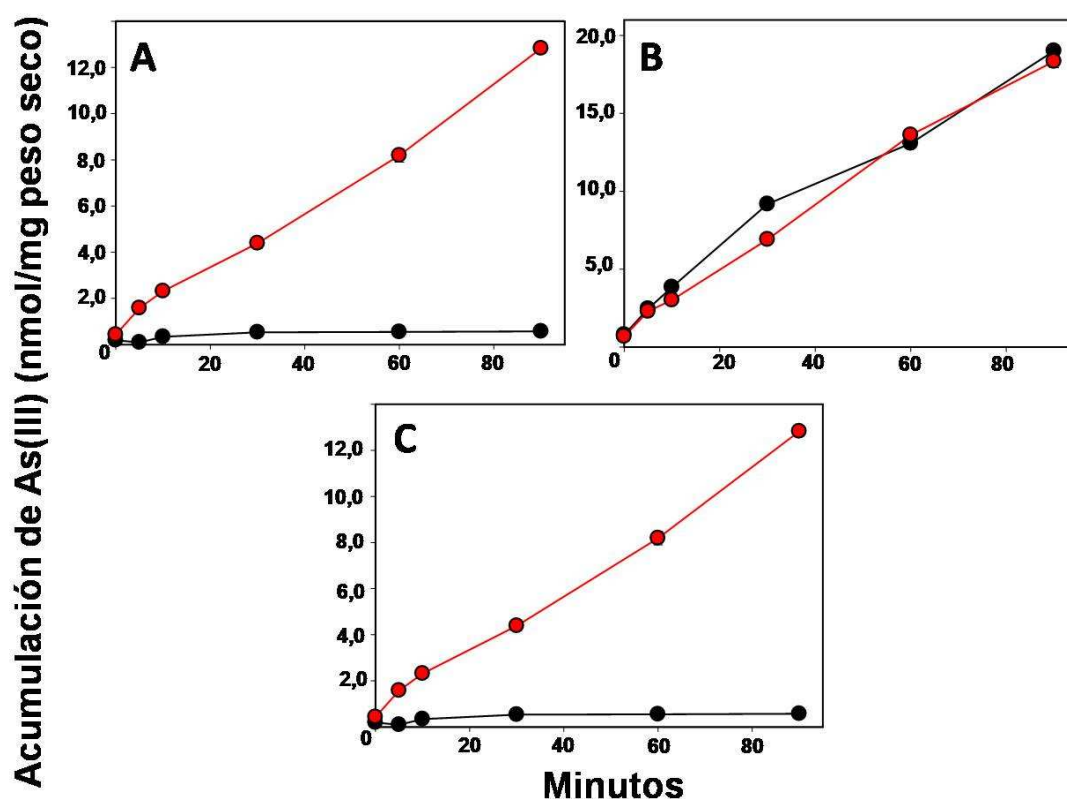


Figura 3.12. Efecto del desacoplador CCCP en el transporte de As(III) en células de *C. glutamicum*: **(A)** *C. glutamicum* RES167, **(B)** *C. glutamicum* Δ Ars y **(C)** *C. glutamicum* pKacr3-1. La reacción comenzó con la adición de As(III) a una concentración final de 1 mM. El desacoplador CCCP se añadió (línea roja) justo antes de comenzar la reacción, a una concentración final de 10 μ M.

Las vesículas invertidas de *C. glutamicum* y *E. coli* se analizaron en presencia de As(III) y usando NADH como fuente de energía exógena. La oxidación del NADH por la enzima NADH deshidrogenasa provoca un transporte de electrones a lo largo de la membrana citoplasmática

de las vesículas, que conlleva la formación de un gradiente $\Delta\psi$, y un movimiento de protones al interior de las vesículas, que implica la formación de un gradiente ΔpH , generando finalmente un ambiente positivo y ácido en el interior de las vesículas invertidas, y por tanto haciendo a las vesículas energéticamente funcionales (Schrempp *et al.*, 1994). La acumulación de As(III) en el interior de las vesículas mediado por la proteína CgAcr3-1 fue valorada por ICP-MS, iniciando la reacción con la adición de NADH. Como se observa en la Figura 3.13A y B, las vesículas de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1 en presencia de NADH acumularon aproximadamente la misma cantidad de As(III), con valores de entre 4 y 5 nmoles de As/mg de proteína. Sin embargo no se vio acumulación de As(III) en vesículas procedentes de células de *C. glutamicum* 2 Δ ars y *E. coli* AW3110 o en ausencia de NADH. Las vesículas invertidas de membrana procedentes de células de *C. glutamicum* pKacr3-1 o de *E. coli* pKacr3-1 obtenidas mediante otros métodos de rotura como “prensa francesa” (Figura 3.13C y D) o *FastPrep* (Figura 3.13E y F) no acumularon As(III) en presencia de NADH.

A la conclusión que podemos llegar es que el método de obtención de vesículas invertidas afecta al transporte de As(III) a través de la proteína CgAcr3-1. La rotura de las células y posterior inversión de las vesículas por “prensa francesa” o *FastPrep* no permite que la proteína CgAcr3-1 sea funcional [no se observa acumulación de As(III) en las vesículas invertidas], y sólo cuando las vesículas invertidas fueron obtenidas por el protocolo de sonicación la proteína CgAcr3-1 fue activa [se observa acumulación de As(III) en las vesículas invertidas]. Estas diferencias en la actividad de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* nos hicieron pensar que probablemente los tratamientos con “prensa francesa” y *FastPrep* afectarían a la integridad de la proteína y a su localización en la membrana. Diferencias en la incorporación de otros compuestos (prolina y calcio) en vesículas invertidas obtenidas mediante diferentes métodos de rotura también se han descrito para otros microorganismos como *E. coli* (Rosen & McClees, 1974).

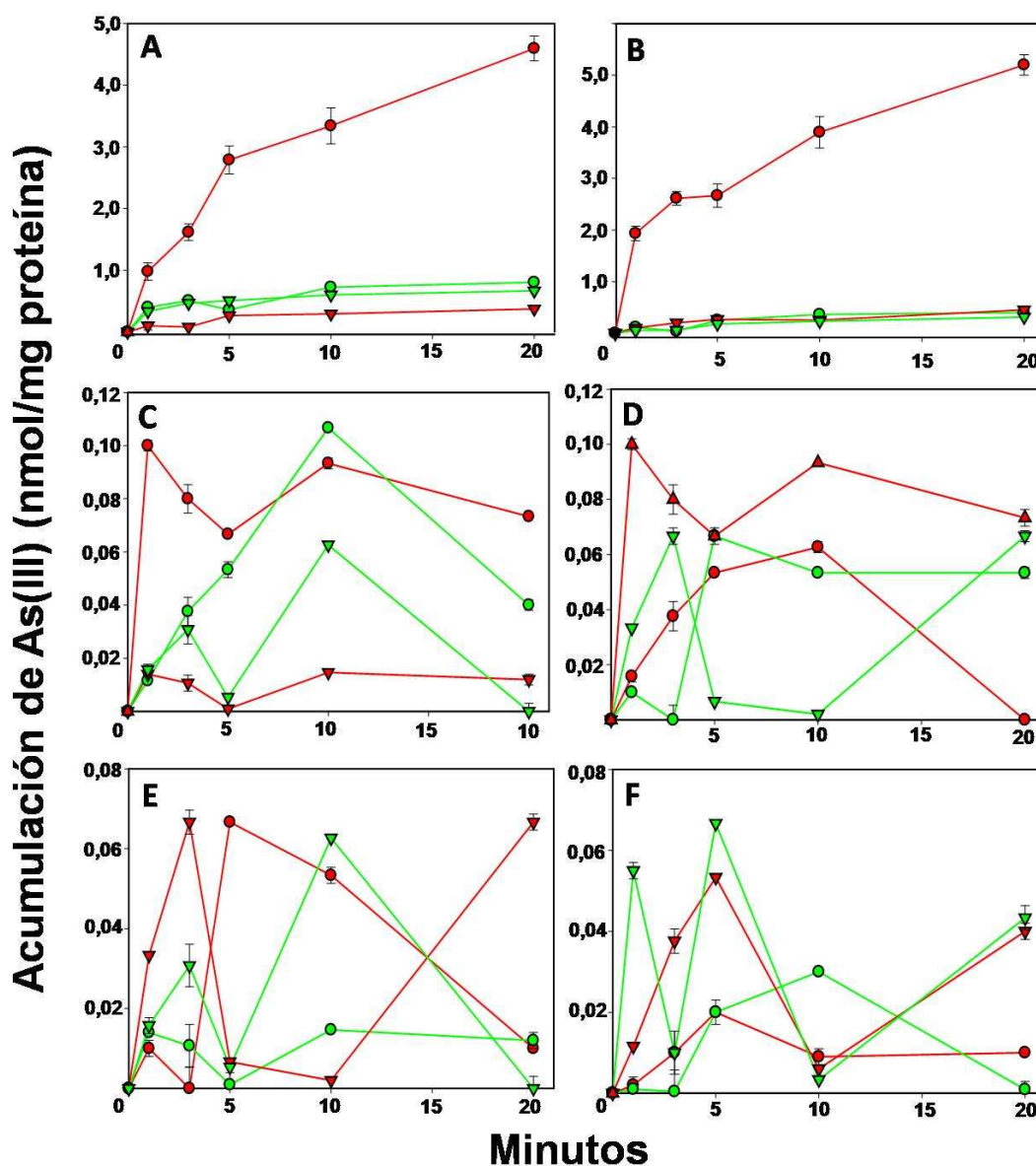


Figura 3.13. Acumulación de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* (A, C y E), o *E. coli* (B, D y F) obtenidas por tres métodos de rotura diferentes: (A y B) sonicación; (C y D) “prensa francesa” y (E y F) FastPrep. Las vesículas invertidas se obtuvieron de células de *C. glutamicum* Δ Dars o *E. coli* AW3110 (representadas en verde) o de los mutantes de *C. glutamicum* pKacr3-1 o *E. coli* pKacr3-1 (representadas en rojo). Los resultados proceden de tres experimentos diferentes en presencia (círculos) o ausencia (triángulos) de NADH.

Para corroborar que la proteína CgAcr3-1 utiliza el gradiente electroquímico de protones como fuente de energía para transportar As(III) al exterior de la célula, se realizaron análisis de incorporación de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli*

pKacr3-1 (preparadas mediante el protocolo de sonicación) en presencia del ionóforo CCCP. La incorporación de As(III) en las vesículas fue iniciada por la adición de NADH (minuto 0); varias muestras de la reacción fueron tomadas a lo largo de 20 minutos y la cantidad de As acumulado en las vesículas fue analizada mediante ICP-MS. Como se observa en la Figura 3.14A y B, la adición del ionóforo CCCP en el minuto 5 de la reacción produce una rápida pérdida del As acumulado en las vesículas de *C. glutamicum* pKacr3-1 y de *E. coli* pKacr3-1. Estos resultados y los mostrados en células completas (Figura 3.12) indican claramente que la proteína CgAcr3-1 utiliza el motivo de fuerza protónica como fuente de energía para el transporte de As(III) a través de la membrana citoplasmática en *C. glutamicum*; esto está en concordancia con lo descrito para la proteína EcArsB de *E. coli* que participa en el transporte de metaloides trivalentes como As(III) o antimonio [Sb(III)] en ausencia de la enzima EcArsA (Meng *et al.*, 2004).

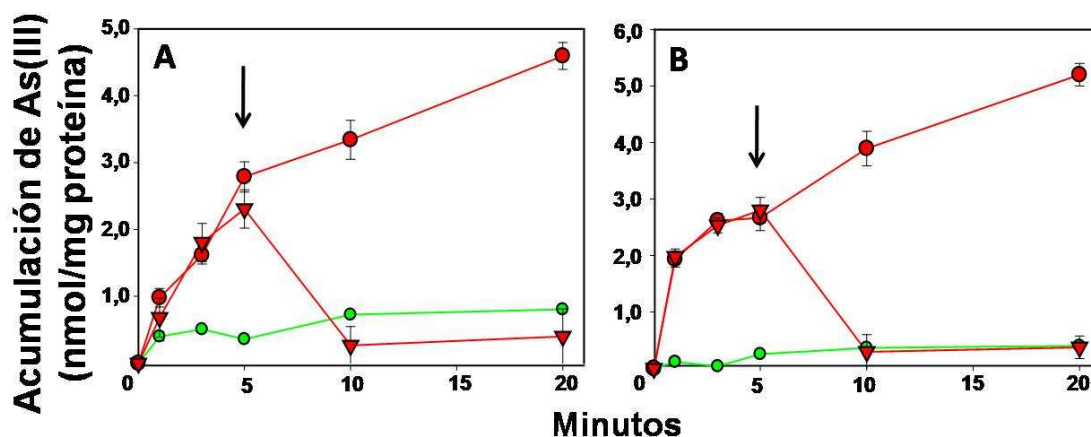


Figura 3.14. Efecto del desacoplador CCCP en el transporte de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* (A) o *E. coli* (B) obtenidas por sonicación. Las vesículas invertidas se obtuvieron de células de *C. glutamicum* 2Δars o *E. coli* AW3110 (representadas en verde) o de los mutantes de *C. glutamicum* pKacr3-1 o *E. coli* pKacr3-1 (representadas en rojo). Los resultados proceden de tres experimentos diferentes en presencia de NADH (activador de la reacción). El desacoplador CCCP se añadió (representación en triangulo) en el minuto 5 (flecha) a una concentración final de 10 μM.

A la vista de estos resultados parece claro que las vesículas invertidas obtenidas por sonicación y utilizando NADH como fuente de energía exógena constituyen un buen sistema para estudiar *in vitro* el mecanismo de transporte de As(III) a través de la proteína CgAcr3-1. A continuación nos preguntamos si otros tipos de fuentes de energía harían a las membranas invertidas energéticamente funcionales para incorporar As(III) mediante la proteína CgAcr3-1.

Para ello, membranas invertidas procedentes de *C. glutamicum* pKacr3-1 obtenidas por sonicación, se ensayaron en presencia de As(III) y con diferentes fuentes de energía: lactato, acetato, prolina, succinato y ascorbato/fenazina metosulfato (PMS) (ver apartado 2.4.10. de Materiales y métodos); el As(III) acumulado fue medido mediante ICP-MS (Figura 3.15). Tres experimentos independientes revelaron que en presencia de NADH se vio una acumulación de As(III) de 3,76 nmoles/min-mg de proteína en las vesículas invertidas, atribuyendo a este valor un 100% de acumulación, mientras que la acumulación en presencia de lactato, acetato, prolina, succinato y ascorbato/PMS fue de 0,07; 0,05; 0,08; 0,06 y 1,16 nmoles/min-mg de proteína, respectivamente. Como se observa en la Figura 3.15 el efecto generado por el ascorbato/PMS representa una reducción de la acumulación de As al 31% respecto de la acumulación producida por el NADH; en el resto de las fuentes de energía la acumulación fue prácticamente inexistente.

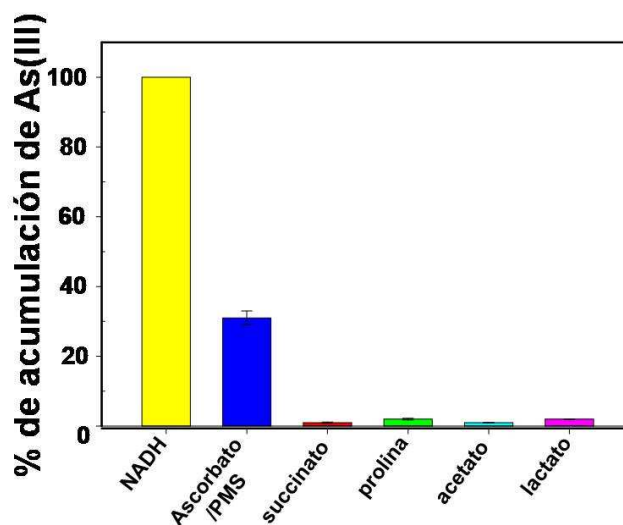


Figura 3.15. Acumulación de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* pKacr3-1. Los resultados proceden de tres experimentos independientes en presencia de diferentes fuentes de energía: NADH; ascorbato/PMS; succinato; prolina; acetato y lactato. A la acumulación de As(III) en presencia de NADH se le atribuye un 100% de acumulación.

Las diferentes respuestas de las vesículas invertidas ante diferentes fuentes de energía exógena podrían deberse a que las membranas invertidas de *C. glutamicum* no adquieren la suficiente energía como para permitir la incorporación de As(III) a través de la proteína CgAcr3-1. Para confirmar la hipótesis de que fuentes de energía diferentes al NADH no producen suficiente motivo de fuerza protónica (Δp) como para permitir que la proteína CgAcr3-1 sea

activa, se determinó el grado de funcionalidad de las membranas invertidas en presencia de las diferentes fuentes de energía. Para ello se midió la generación del Δp a través de sus dos componentes, ΔpH y $\Delta \psi$. La generación de ΔpH (ácido en el interior de las vesículas) y $\Delta \psi$ (positivo en el interior de las vesículas) puede ser determinada por el seguimiento de la fluorescencia emitida por dos diferentes fluorocromos: naranja de quinacrina y oxonol-V, respectivamente. Para ello se pusieron en contacto las membranas invertidas de *C. glutamicum* pKacr3-1 obtenidas por sonicación con el fluorocromo correspondiente en una cubeta de cuarzo y se incorporó al fluorímetro, monitorizando la fluorescencia en función del tiempo (ver apartado 2.4.10.2. de Materiales y métodos). La adición de NADH (u otra fuente de energía) en la cubeta resultó en una inmediata disminución (*quenching*) de la fluorescencia de naranja de quinacrina (Figura 3.16A) o de oxonol-V (Figura 3.16B). El *quenching* fue abolido por la adición de $(NH_4)_2SO_4$ (en la fluorescencia de naranja de quinacrina; Figura 3.16A) o por la adición de KSCN (en la fluorescencia de oxonol-V; Figura 3.16B).

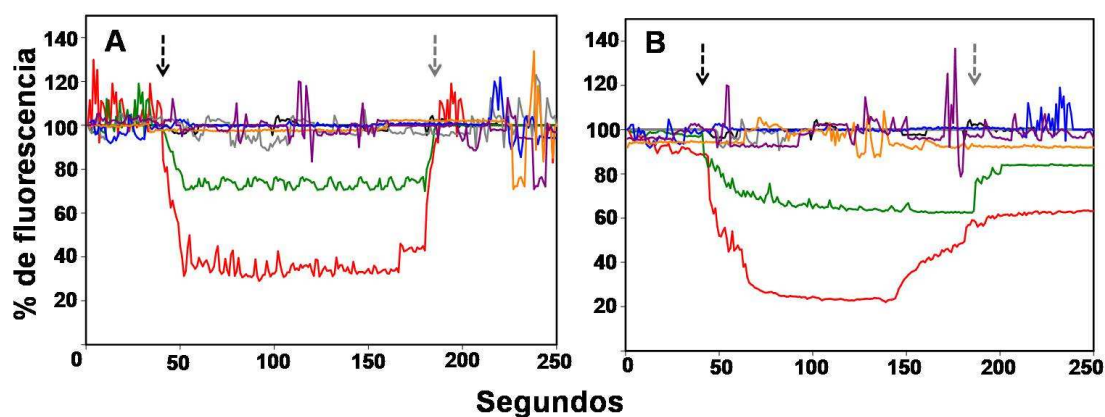


Figura 3.16. Formación de ΔpH y $\Delta \psi$. El gradiente ΔpH y el gradiente $\Delta \psi$ fueron estimados a partir del *quenching* de la fluorescencia de naranja de quinacrina (**A**) u oxonol-V (**B**), respectivamente, en vesículas invertidas de *C. glutamicum* pKacr3-1 obtenidas por sonicación. La formación de ΔpH y $\Delta \psi$ fue iniciada por la adición (flecha negra) de NADH (línea roja), ascorbato/PMS (línea verde), lactato (línea azul), acetato (línea gris), prolina (línea morada) o succinato (línea naranja). Los compuestos $(NH_4)_2SO_4$ (**A**) o KSCN (**B**) fueron añadidos (flecha gris) para abolir los gradientes ΔpH o $\Delta \psi$, respectivamente. La línea negra corresponde al control negativo sin adición de energía.

Como se observa en la Figura 3.16A y B sólo los donadores de energía NADH y ascorbato/PMS provocan una disminución en el nivel de fluorescencia de los agentes naranja de quinacrina y oxonol-V; sin embargo, no se observó cambio en la fluorescencia en presencia de cualquiera de las otras fuentes de energía. Aunque la disminución de la fluorescencia de la naranja de quinacrina y del oxonol-V es un método indirecto y cualitativo para medir la

formación de ΔpH y $\Delta\psi$ (respectivamente), podemos establecer que los gradientes ΔpH y $\Delta\psi$ generados en presencia de ascorbato/PMS (o lactato, acetato, prolina, succinato) son menores que los generados por NADH, y que por tanto a este hecho se podría deber la menor (o nula) actividad de incorporación de As(III) en vesículas invertidas de la proteína CgAcr3-1, con fuentes de energía diferentes al NADH. Este resultado permite deducir que el NADH es la fuente de energía más eficiente en el transporte de As(III) a través de la proteína CgAcr3-1 en vesículas invertidas preparadas por sonicación, a pesar de que se había considerado que el NADH era una fuente de energía pobre y peor que el lactato en el transporte de vesículas de *E. coli* preparadas por “prensa francesa” (Kaback, 1974). Por ello a partir de ahora todos los estudios *in vitro* de transporte se realizaron con vesículas invertidas obtenidas por sonicación y con NADH como fuente de energía, siempre que no se indique lo contrario.

3.1.2.4. La proteína CgAcr3-1 actúa como un antiportador de arsenito y protones.

Una vez identificada la fuente de energía que utiliza la arsenito permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum* para transportar As(III), pasamos a identificar cómo se produce el mecanismo de translocación del metaloide a través de la proteína. La estructura química de compuestos arsenicales en soluciones acuosas, como ocurre en el interior de las células, no está del todo clara, pero las últimas investigaciones parecen indicar que a pH fisiológico (pH 7,0) el As(III) se encuentra totalmente protonado y sin carga $[\text{As}(\text{OH})_3]$ (Meng *et al.*, 2004). Así, la liberación de una molécula neutra como $\text{As}(\text{OH})_3$ de las células (ambiente básico y negativo) hacia el exterior (ambiente ácido y positivo) podría llevarse a cabo por un movimiento del As(III) acoplado al intercambio de un catión (Meng *et al.*, 2004). Por ello analizamos una posible dependencia de cationes en el transporte de As(III) a través de la arsenito permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum*.

Para comprobar el acoplamiento del transporte de As(III) con un catión inorgánico en sentido contrario (antiportador), se obtuvieron vesículas invertidas de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1, (usando vesículas invertidas de *C. glutamicum* $2\Delta\text{ars}$ y *E. coli* AW3110, como controles negativos) con imposición de gradientes artificiales de pH (ΔpH ; ácido o positivo en el interior de las vesículas) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.10.1.4. de Materiales y métodos. De esta forma se obtuvieron dos tipos de vesículas invertidas para cada tipo de células: (i) unas cargadas en su interior con iones potasio (K^+) y (ii) otras con iones sodio (Na^+). Los dos tipos de vesículas fueron resuspendidas en un buffer con pH básico (pH 8-

9) y sin potasio o sodio, respectivamente. La generación del gradiente ΔpH artificial fue creado por la adición del ionóforo nigericina, el cual inhibe la salida de K^+ o Na^+ que se está produciendo pasivamente de las vesículas al exterior (Nakamura *et al.*, 1986), obteniendo un ambiente positivo en el interior de las vesículas. Los dos tipos de vesículas invertidas de *C. glutamicum* pKacr3-1 y de *E. coli* pKacr3-1 fueron sometidas a análisis de incorporación de As(III) mediante ICP-MS siguiendo el protocolo indicado en el apartado 2.4.10.3.1 de Materiales y métodos. En ninguno de los tipos de vesículas invertidas se observó acumulación de As(III) y presentaron un comportamiento equivalente a las vesículas procedentes de células de *C. glutamicum* $2\Delta\text{ars}$ (Figura 3.17A y B) y *E. coli* AW3110 (Figura 3.17C y D) o de *C. glutamicum* pKacr3-1 y de *E. coli* pKacr3-1 en ausencia de nigericina; esto parece indicar que la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* no actúa como un antiportador de cationes inorgánicos (K^+ o Na^+).

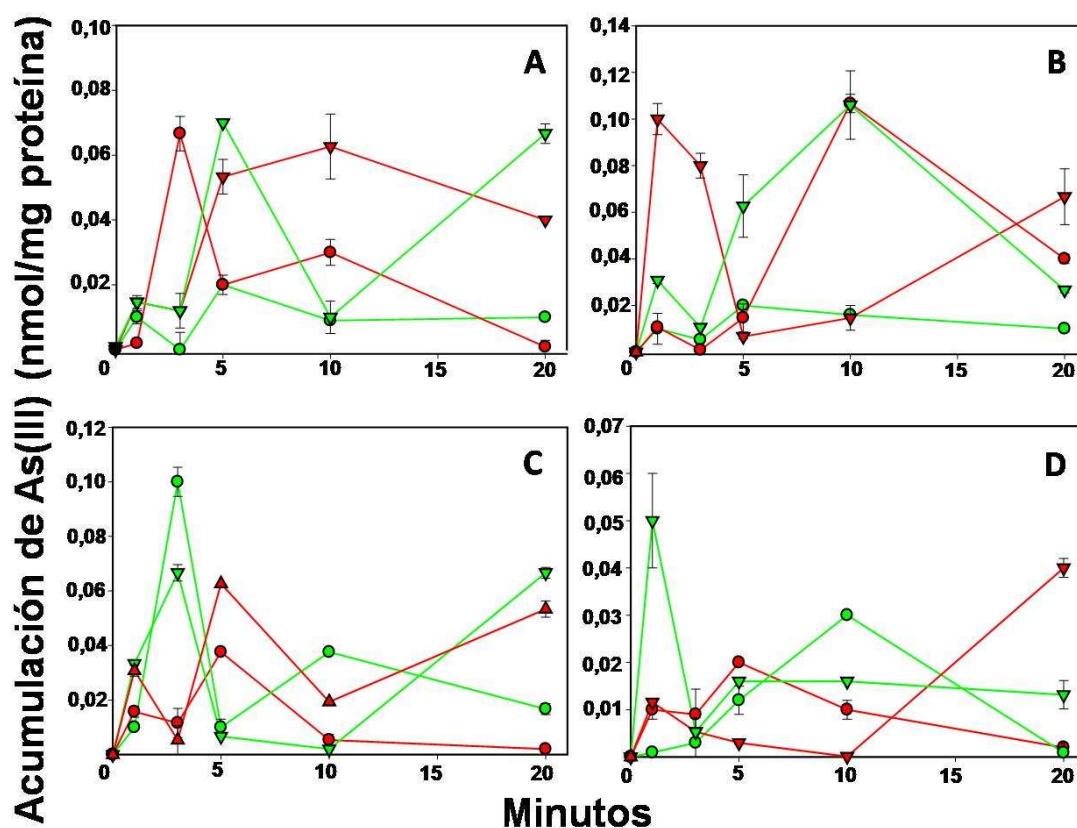


Figura 3.17. Acumulación de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* (A y B) o *E. coli* (C y D) con gradientes artificiales de K⁺ (A y C) o Na⁺ (B y D). Las vesículas invertidas se obtuvieron de células de *C. glutamicum* 2Δars o *E. coli* AW3110 (representadas en verde) o de los mutantes de *C. glutamicum* pKacr3-1 o *E. coli* pKacr3-1 (representadas en rojo). Los resultados proceden de tres experimentos diferentes en presencia (círculos) o ausencia (triángulos) de nigericina como generador del gradiente ΔpH.

Una posible alternativa es que la proteína CgAcr3-1 actúe como un antiportador de arsenito y protones como se ha observado con la proteína EcArsB en el transporte de Sb(III) (Meng *et al.*, 2004). Para comprobar la hipótesis de que el transporte de As(III) a través de CgAcr3-1 pudiera estar acoplado a un movimiento de protones en sentido contrario, se realizaron análisis de incorporación de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1 en presencia de los inhibidores (NH₄)₂SO₄ o KSCN (sulfocianato de potasio); estos compuestos disipan respectivamente el gradiente de protones (ΔpH) o el potencial de membrana (Δψ). La incorporación de As(III) en las vesículas fue iniciada por la adición de NADH (minuto 0), tomando varias muestras de la reacción a lo largo de 20 minutos y determinando el As acumulado en las vesículas mediante ICP-MS. Como se observa en la

Figura 3.18A y B la adición conjunta de los inhibidores $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KSCN en el minuto 5 de la reacción produce una rápida pérdida del As acumulado en las vesículas de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKaAcr3-1, similar a la que se producía en presencia del desacoplador CCCP (Figura 3.14). Sin embargo la adición por separado de estos inhibidores tiene un efecto diferente; la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólo (compuesto que disipa el gradiente ΔpH pero no $\Delta\psi$), o la adición de KSCN sólo (compuesto que disipa el gradiente $\Delta\psi$ pero no ΔpH) no produjo cambios en el nivel de acumulación de As(III) en las membranas invertidas (Figura 3.18A y B).

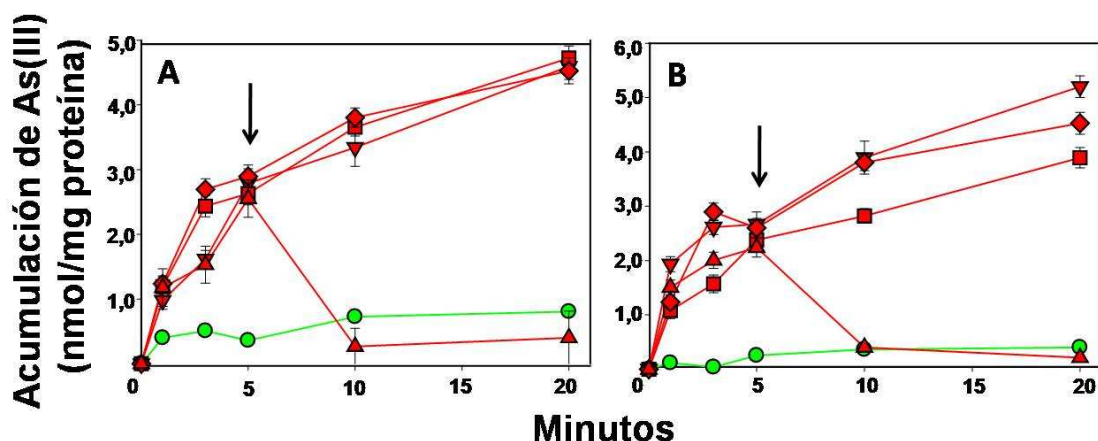


Figura 3.18. Efecto de los inhibidores $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KSCN en el transporte de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* (A) o *E. coli* (B). Las vesículas invertidas se obtuvieron de células de *C. glutamicum* 2 Δ ars o *E. coli* AW3110 (verde) o de los mutantes de *C. glutamicum* pKacr3-1 o *E. coli* pKaAcr3-1 (rojo). Los resultados proceden de tres experimentos diferentes en presencia de NADH (activador de la reacción). Las adiciones se realizaron en el minuto 5 (flecha): (● y ▼) no adición; (■) KSCN; (◆) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y (▲) KSCN y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Estos resultados claramente indican que cualquiera de los dos componentes del motivo de fuerza protónica, ΔpH o $\Delta\psi$, es capaz por sí solo de proporcionar la energía suficiente para permitir que la proteína CgAcr3-1 realice el transporte de As(III) a través de la membrana. En consecuencia y debido a que se cree que a pH fisiológico el As(III) predomina en un estado neutro y protonado (Meng *et al.*, 2004), también parece razonable que la proteína CgAcr3-1 actúe como una proteína antiportadora de moléculas neutras $\text{As}(\text{OH})_3$ y protones, en vez de actuar como un uniportador de aniones AsO_2^- ya que en este último caso sólo se necesitaría el potencial de membrana y no el gradiente de pH para llevar a cabo el transporte de As(III) (Meng *et al.*, 2004). Estos resultados son concordantes con los obtenidos para el transporte de Sb(III) por la permeasa EcArsB de *E. coli* en ausencia de la proteína EcArsA (Meng *et al.*, 2004).

3.1.2.5. La arsenito permeasa CgAcr3-1 es específica de arsenito.

En estudios previos se observó que la proteína ScAcr3p de *Saccharomyces cerevisiae* participa no sólo en la salida y resistencia de As(III) sino que también participa en la tolerancia a Sb(III) (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010). El As(III) y Sb(III) son dos metaloides que pertenecen al grupo XV de la tabla periódica y que presentan estructuras químicas similares. Puesto que la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* comparte una homología del 35% con la permeasa ScAcr3p de *S. cerevisiae*, pasamos a analizar si el Sb(III) pudiera ser sustrato de la proteína CgAcr3-1. Para ello tres cepas diferentes de *C. glutamicum*: *C. glutamicum* RES167, *C. glutamicum* 2Δars y *C. glutamicum* pKacr3-1 fueron crecidas en presencia de diferentes concentraciones de Sb(III). Como se observa en la Figura 3.19A, las tres cepas presentan un nivel de resistencia a Sb(III) de en torno a 25 μM, uno de los niveles más bajos descritos hasta el momento (Achour *et al.*, 2007). Este nivel tan bajo de resistencia podría deberse a la existencia en *C. glutamicum* de un sistema poco eficiente para la entrada de Sb(III), o bien por la carencia de un sistema de salida de Sb(III) celular; la segunda de las hipótesis se confirmó posteriormente analizando la cantidad de Sb(III) acumulado en cada cepa mediante ICP-MS. Las tres cepas de *C. glutamicum* indicadas acumularon cantidades similares de Sb(III) (Figura 3.19B), aproximadamente 0,15 nmoles de Sb(III)/mg de peso seco, resultado que pone de manifiesto que ni la proteína CgAcr3-1 ni el resto de las arsenito permeasas de *C. glutamicum* son capaces de liberar Sb(III) al exterior de la célula.

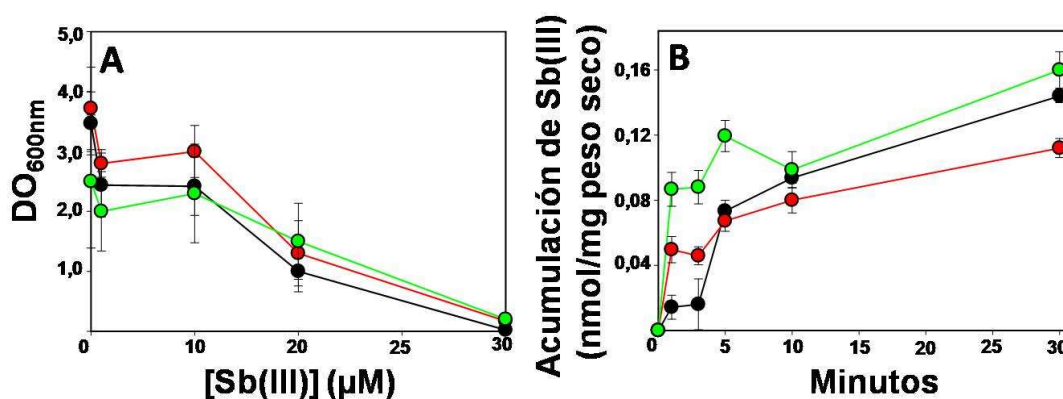


Figura 3.19. Resistencia (A) y acumulación (B) de Sb(III) en *C. glutamicum* RES167 (negra), *C. glutamicum* 2Δars (roja) y *C. glutamicum* pKacr3-1 (verde). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

Para comprobar estos resultados se realizaron análisis de incorporación de Sb(III) en vesículas invertidas de *C. glutamicum* pKacr3-1 y *E. coli* pKacr3-1. La incorporación de Sb(III) en las vesículas fue iniciada por la adición de NADH y la cantidad de Sb(III) acumulado fue analizada mediante ICP-MS. Como se observa en la Figura 3.20A y B las vesículas invertidas que contienen la proteína CgAcr3-1 presentaron valores de entorno a 0,15-0,03 nmoles de Sb(III)/mg de proteína, una cantidad de Sb(III) equivalente a lo obtenido en las vesículas invertidas carentes de fuente de energía NADH o carentes de la proteína CgAcr3-1 (Figura 3.20A y B). La comparación de estos resultados con los referidos a la cantidad de As(III) acumulado en vesículas invertidas (Figura 3.13A y B) junto con los resultados obtenidos anteriormente con células completas (Figura 3.19), corroboran que la proteína CgAcr3-1 no está implicada en el transporte de Sb(III), como se ha descrito también en otras proteínas de la familia Acr3 de *B. subtilis* (Sato & Kobayashi, 1998) y de *Saccharomyces douglasii* (Maciaszczyk *et al.*, 2004).

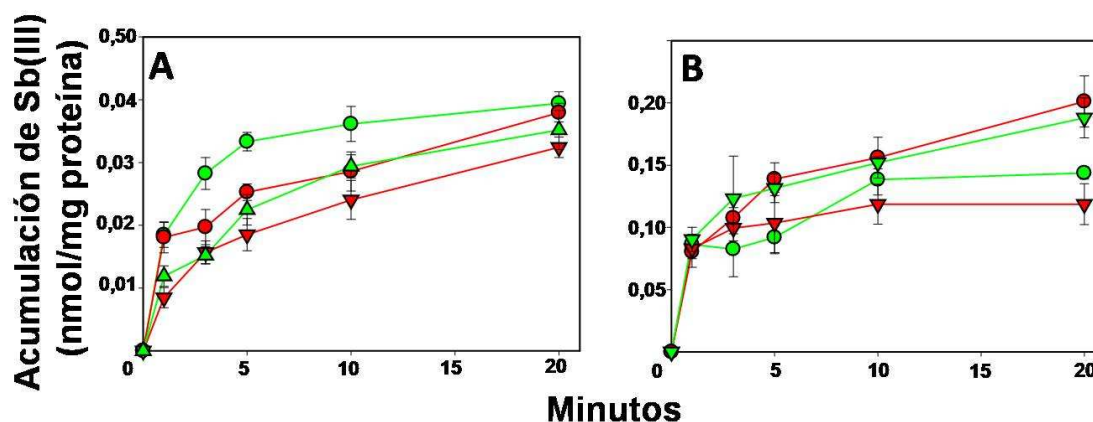


Figura 3.20. Acumulación de Sb(III) en vesículas invertidas de *C. glutamicum* (A) y *E. coli* (B). Las vesículas invertidas se obtuvieron de células de *C. glutamicum* 2Δars o *E. coli* AW3110 (representadas en verde) o de los mutantes de *C. glutamicum* pKacr3-1 o *E. coli* pKacr3-1 (representadas en rojo). Los resultados proceden de tres experimentos independientes en presencia (círculos) o ausencia (triángulos) de NADH.

Para determinar otros posibles sustratos de la permeasa CgAcr3-1, se analizó el efecto de otros oxianiones relacionados con el As en el transporte de As(III) a partir de membranas invertidas de *C. glutamicum* pKacr3-1. Compuestos como AsO_4^{3-} (Na_2HAsO_4), SbCl_3 , tartrato potásico de antimonio [$\text{KSb}(\text{OH})_3$], SO_3^{2-} (Na_2SO_3), NO_3^- (KNO_3), NO_2^- (NaNO_2), PO_4^{2-} (K_2PO_4) o BO_3^{3-} (H_3BO_3) fueron individualmente añadidos a la vez que el As(III) a las vesículas invertidas, justo antes del comienzo de la reacción que tuvo lugar por adición de NADH. Tres experimentos independientes revelaron que la acumulación de As(III) en ausencia de

oxianiones era de 3,76 nmoles/min-mg de proteína valor al que se le atribuyó un 100% de acumulación, mientras que la acumulación de As(III) en presencia de Na_2HAsO_4 , SbCl_3 , tartrato potásico de antimonio, Na_2SO_3 , KNO_3 , NaNO_2 , K_2PO_4 o H_3BO_3 fue de 3,48; 3,38; 3,33; 2,69; 3,62; 2,70; 3,02 y 2,67 nmoles/min-mg de proteína, respectivamente. Como se observa en la Figura 3.21 el efecto generado por Na_2HAsO_4 , SbCl_3 , tartrato potásico de antimonio o KNO_3 representa una reducción de la acumulación de As(III) del 96 al 89% respecto de la acumulación de As(III) en ausencia de otros oxianiones, y en presencia de Na_2SO_3 , NaNO_2 , K_2PO_4 o H_3BO_3 la acumulación de As(III) se vio algo más afectada, pero sin ser considerada una disminución significativa.

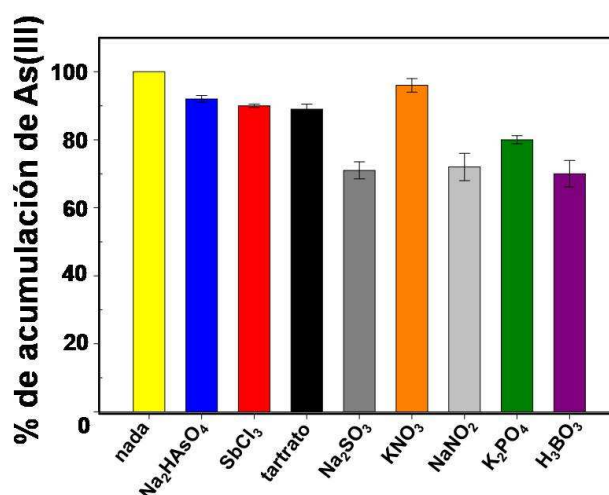


Figura 3.21. Acumulación de As(III) en vesículas invertidas de células de *C. glutamicum* pKacr3-1 en ausencia (nada) o presencia de los siguientes oxianiones en forma de sales a una concentración final de 10 mM: Na_2HAsO_4 [As(V)], SbCl_3 [Sb(III)], tartrato potásico de antimonio [$\text{KSb}(\text{OH})_3$; Sb(V)], Na_2SO_3 , KNO_3 , NaNO_2 , K_2PO_4 o H_3BO_3 . El As(III) fue añadido a una concentración final de 100 μM . Al valor obtenido para la acumulación de As(III) en ausencia de otros oxianiones se le atribuye un 100% de acumulación.

Estos resultados confirmarían que la arsenito permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum* parece presentar especificidad de sustrato y que sólo participa en el transporte de As(III). Las diferencias en la acumulación de As(III) en presencia de SO_3^{2-} , NO_2^- , PO_4^{2-} o BO_3^{3-} no parecen ser atribuibles a un proceso de competencia entre esos elementos y el As(III), como se ha podido constatar con el efecto que producen estos mismos oxianiones sobre el transporte de Sb(III) a través de la arsenito permeasa EcArsB de *E. coli* (Meng *et al.*, 2004).

3.1.2.6. Modelo topológico transmembranal de la proteína CgAcr3-1.

Para conocer el verdadero mecanismo de transporte de As(III) a través de la arsenito permeasa CgAcr3-1 intentamos purificar la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* para su posterior cristalización y análisis estructural sin éxito (ver Anexo 1). Dados los problemas de purificación de CgAcr3-1 y la carencia de datos estructurales de proteínas similares de la familia BART (familia a la que pertenece CgAcr3-1), se propuso como alternativa la realización de un modelo topológico para la proteína CgAcr3-1.

El gen *Cgacr3-1* de *C. glutamicum* codifica para una proteína que tiene un porcentaje de homología de entre 62% y 28% con otras proteínas de la familia de Acr3 de bacterias, arqueas, plantas y animales (Figura 3.22A). El perfil hidrofóbico de la arsenito permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum* obtenido por tres programas informáticos (SOSUI, TopPred2, TMHMM) ha revelado la presencia de nueve o diez segmentos transmembrana (TM) con el dominio amino terminal localizado en la región intracelular y el carboxilo en la región extracelular o intracelular. De las tres predicciones obtenidas se consiguieron unos segmentos TM de unos 23 aminoácidos de longitud, y la principal diferencia entre ellas reside en los 85 últimos aminoácidos de la proteína CgAcr3-1 donde los programas difieren en uno o dos segmentos TM; para los 285 aminoácidos primeros de la proteína CgAcr3-1 todos los programas predicen ocho segmentos TM. Este comportamiento también se mantiene con la permeasa CgAcr3-2 de *C. glutamicum*.

A partir de los datos informáticos obtenidos y del modelo topológico experimental de la proteína AmAcr3 de *Alkaliphilus metalliredigens*, proteína con la que CgAcr3 comparte un 30% de homología, obtuvimos un hipotético perfil topológico transmembranal para la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum*, en el que se identifican diez segmentos TM y el dominio amino y carboxilo terminal de la proteína localizados hacia la región intracelular (Figura 3.22B). Un análisis experimental equivalente al de la proteína AmAcr3 también ha sido realizado con la proteína BsAcr3 de *B. subtilis*, con la que CgAcr3-1 de *C. glutamicum* tiene un 49% de homología (19% más de homología que con AmAcr3), sin embargo el análisis experimental utilizado con la proteína BsAcr3 está basado en fusiones de segmentos génicos, mientras que en *A. metalliredigens* está basado en análisis de SCAM (*Scanning Cysteine Accessibility Method*), el cual permite identificar claramente los 10 dominios TMs (Fu *et al.*, 2009; Aaltonen & Silow, 2008).

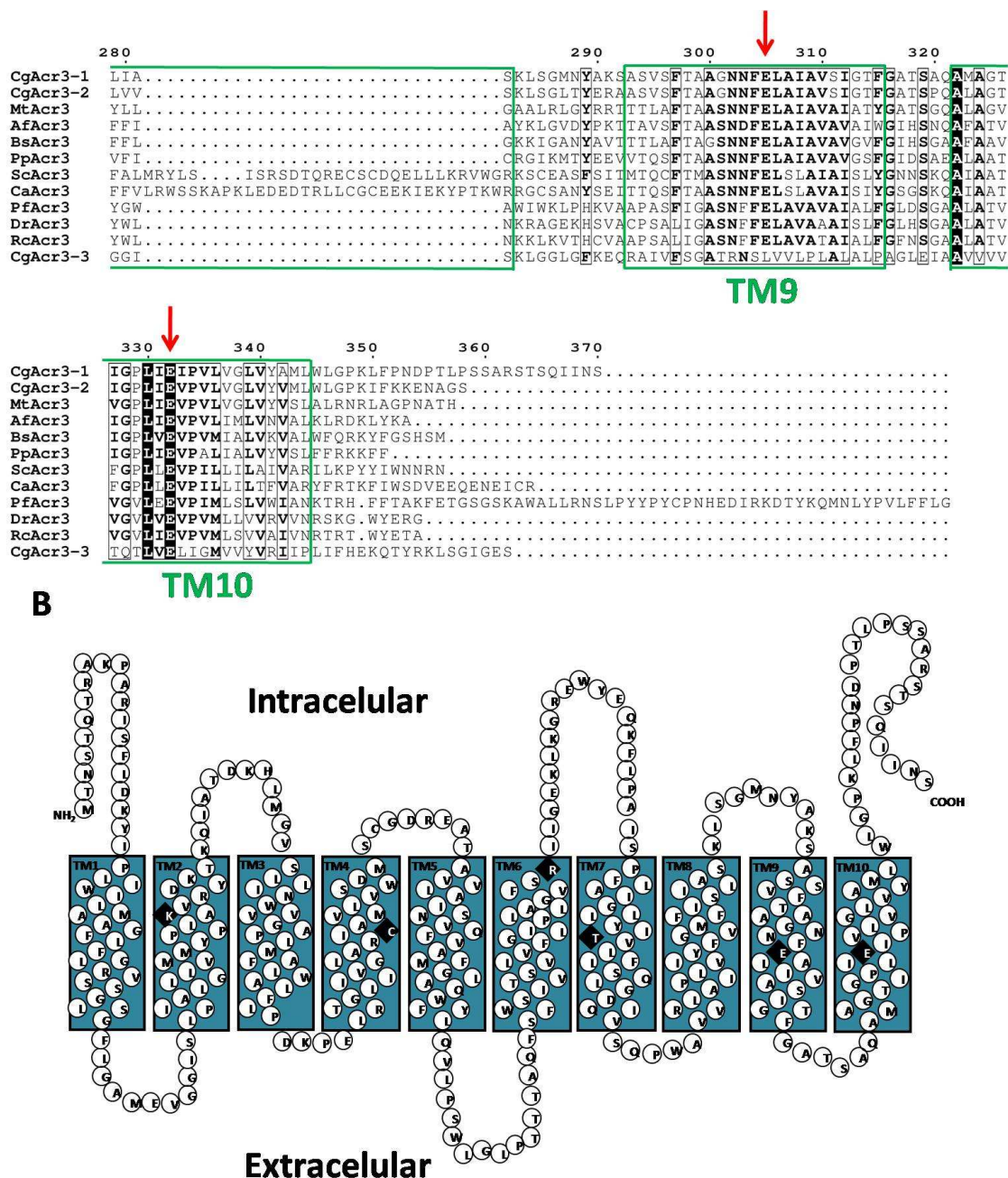


Figura 3.22. (A) Alineamiento de las proteínas Acr3 de *C. glutamicum* (CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3), *M. tuberculosis* (MtAcr3), *Archaeoglobus fulgidus* (AfAcr3), *B. subtilis* (BsAcr3), *Physcomitrella patens* (PpAcr3; helecho), *S. cerevisiae* (ScAcr3), *Candida albicans* (CaAcr3), *Pyrococcus furiosus* (PfAcr3), *Danio rerio* (DrAcr3; pez cebra), *Ricinus communis* (RcAcr3; planta). Las flechas rojas indican los residuos que se estudiarán en detalle. Se indican los segmentos TM en verde obtenidos a partir del modelo topológico de la proteína AmAcr3-1 de *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF (Fu et al., 2009). **(B)** Modelo topológico de la proteína CgAcr3-1 basado en el modelo experimental de la proteína AmAcr3 de *A. metalliredigens* QYMF. Los residuos marcados con rhombos negros serán reemplazados y estudiados en detalle en los dos apartados siguientes.

La principal diferencia entre la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* y otras enzimas de la familia Acr3 reside en el extremo amino terminal citoplasmático, el cual varía desde 21 residuos en la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* a 81 residuos en proteínas Acr3 de algunas plantas. Los *loops* citoplasmáticos y extracelulares de la proteína CgAcr3-1 son similares en tamaño a los *loops* de otras enzimas Acr3 con excepción de la arsenito permeasa ScAcr3p de *S. cerevisiae* cuyos *loops* son mucho más largos (Wysocki *et al.*, 1997); sin embargo, los *loops* citoplasmáticos en comparación con los extracelulares son claramente más largos lo cual parece estar acorde con la función de la proteína de captar el As(III) presente en el interior de la célula y liberarlo al exterior. Otra excepción de la proteína CgAcr3-1 es el *loop* extracelular de entre los dominios TM3 y TM4 el cual es mucho más corto que el de otras proteínas Acr3 homólogas (Figura 3.22).

Un análisis de la secuencia primaria de diferentes proteínas Acr3 nos ha revelado que la mayoría de los residuos aminoacídicos conservados en las proteínas de la familia Acr3 se encuentran en los segmentos transmembrana, siendo los dominios TM2, TM3, TM4, TM9 y TM10 los que más residuos conservados presentan (Figura 3.22A). Un estudio más exhaustivo de la secuencia aminoacídica y de su relación con la actividad de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* se detalla en el siguiente apartado.

3.1.2.7. Identificación de residuos de CgAcr3-1 implicados en el transporte de arsenito.

La caracterización de residuos conservados en proteínas de membrana localizados principalmente en segmentos transmembrana proporciona una herramienta útil para analizar el mecanismo de translocación de los sustratos a través de las proteínas. A partir de la predicción topológica de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* se analizaron posibles residuos aminoacídicos implicados en el proceso de translocación de As(III). Los análisis de hidrofobicidad de los diez segmentos transmembrana de la proteína CgAcr3-1 mediante programas informáticos permitieron desvelar que los dominios TM3 y TM5 son considerados los más hidrofílicos, con una serina en cada dominio (serina 91 y 155 respectivamente) como único residuo hidrofóbico aunque éste residuo no está presente en todas las proteínas Acr3 analizadas (Figura 3.22A y 3.23). En el resto de los segmentos transmembrana de la proteína CgAcr3-1 encontramos más de dos aminoácidos de perfil hidrofóbico en cada segmento (Figura 3.23), sin embargo sólo seis de ellos están conservados en todas las proteínas Acr3 analizadas (Figura 3.22A): lisina 72 (K72), cisteína 129 (C129), arginina 210 (R210), treonina

241 (T241), glutámico 305 (E305) y glutámico 332 (E332), localizados respectivamente en los segmentos transmembrana TM2, TM4, TM6, TM7, TM9 y TM10 (Figura 3.22B).

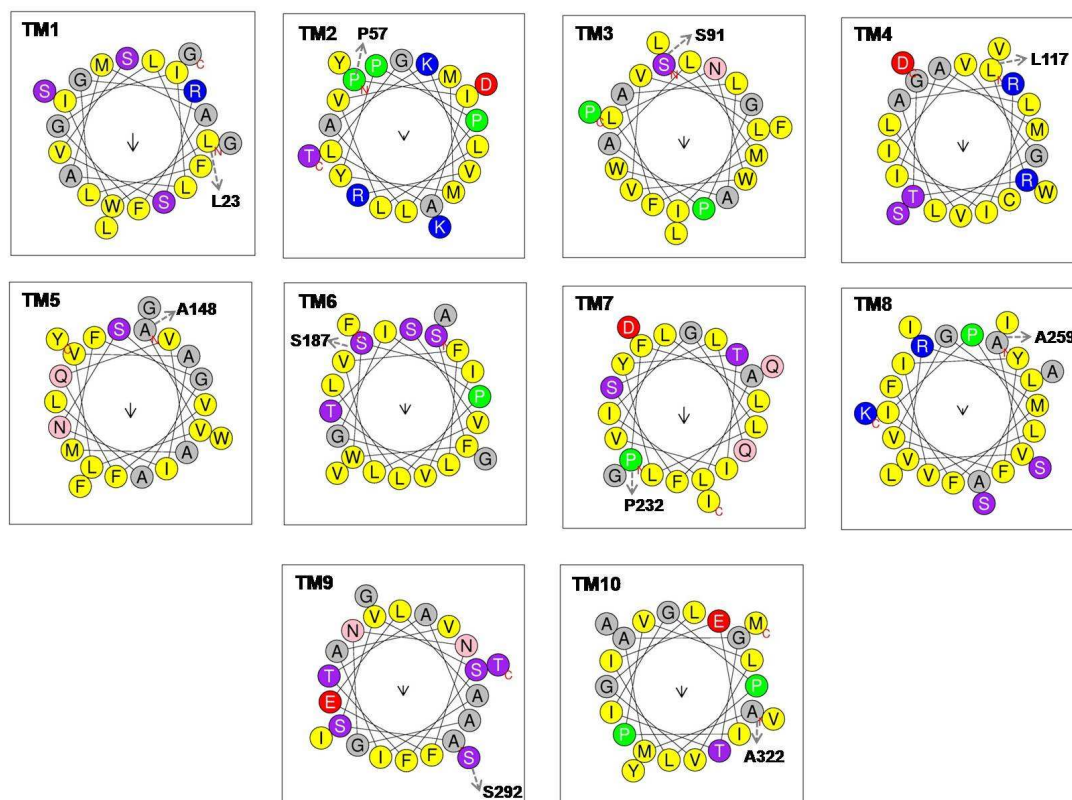


Figura 3.23. Perfil hidrofóbico de cada uno de los diez segmentos TM de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* obtenido mediante el programa HeliQuest (ver apartado 2.3.7. de Materiales y métodos). Se indica el primero o segundo aminoácido de cada segmento TM.

Para analizar la contribución individual de cada uno de los seis aminoácidos hidrofóbicos en la actividad de la proteína CgAcr3-1, se realizaron ensayos de mutagénesis dirigida (ver apartado 2.3.5. de Materiales y métodos) para reemplazar los residuos K72, C129, R210, T241, E305 y E332 a alanina; la mutación a alanina de estos residuos provoca una pérdida de su hipotética función en el transporte de As(III). Para ello usamos como molde el plásmido pKacr3-1 (Tabla A4.3; descrito en el apartado 3.1.2.2.2. de Resultados y discusión) y como resultado se obtuvieron los plásmidos pKacr3-1K72A, pKacr3-1C129A, pKacr3-1R210A, pKacr3-1T241A, pKacr3-1E305A y pKacr3-1E332A (Tabla A4.3). Los plásmidos generados fueron transferidos a la cepa *C. glutamicum* 2Δars por conjugación y a *E. coli* AW3110 por transformación. En *C. glutamicum* los plásmidos se integraron en el cromosoma mediante recombinación homóloga y

los transconjugantes fueron posteriormente analizados por PCR. Los mutantes obtenidos fueron caracterizados *in vivo* por resistencia a As(III) en medio líquido y por cuantificación del As(III) acumulado mediante ICP-MS. Como resultado se observó que el nivel de resistencia a As(III) de dos de los seis mutantes de CgAcr3-1 en *C. glutamicum* (*C. glutamicum* C129A y *C. glutamicum* E305A; Tabla A4.5) y en *E. coli* (*E. coli* C129A y *E. coli* E305A; Tabla A4.5), fue de 0,5 mM (Figura 3.24A), similar al de las cepas de *C. glutamicum* 2Δars y *E. coli* AW3110 carentes de los operones *ars*; para el resto de los mutantes (K72A, R210A, T241A y E332A Tabla A4.5) la resistencia fue de 7-8 mM similar a las cepas que presentan la proteína CgAcr3-1 silvestre. Este resultado es apoyado con los datos de incorporación de As(III) en los clones de *E. coli* conteniendo los mutantes de la proteína CgAcr3-1, donde los mutantes *E. coli* C129A y *E. coli* E305A acumularon 10 veces más cantidad de As(III) que los otros mutantes o que *E. coli* con la proteína silvestre (Figura 3.24B).

Los estudios anteriores se corroboraron mediante análisis de incorporación de As(III) en vesículas invertidas de membrana procedentes de células de *E. coli* AW3110 expresando la proteína CgAcr3-1 silvestre o los seis mutantes de CgAcr3-1 presentes en los vectores derivados de pKars1up. Las vesículas invertidas procedentes de la cepa carente de la permeasa CgAcr3-1 (control negativo) y de las cepas con las versiones mutantes C129A y E305A de CgAcr3-1 en presencia de NADH como fuente de energía presentaron valores de acumulación de As(III) similares entre ellos, siendo estos valores mucho menores que los obtenidos para las vesículas que presentan la arsenito permeasa silvestre y el resto de los mutantes (Figura 3.24C).

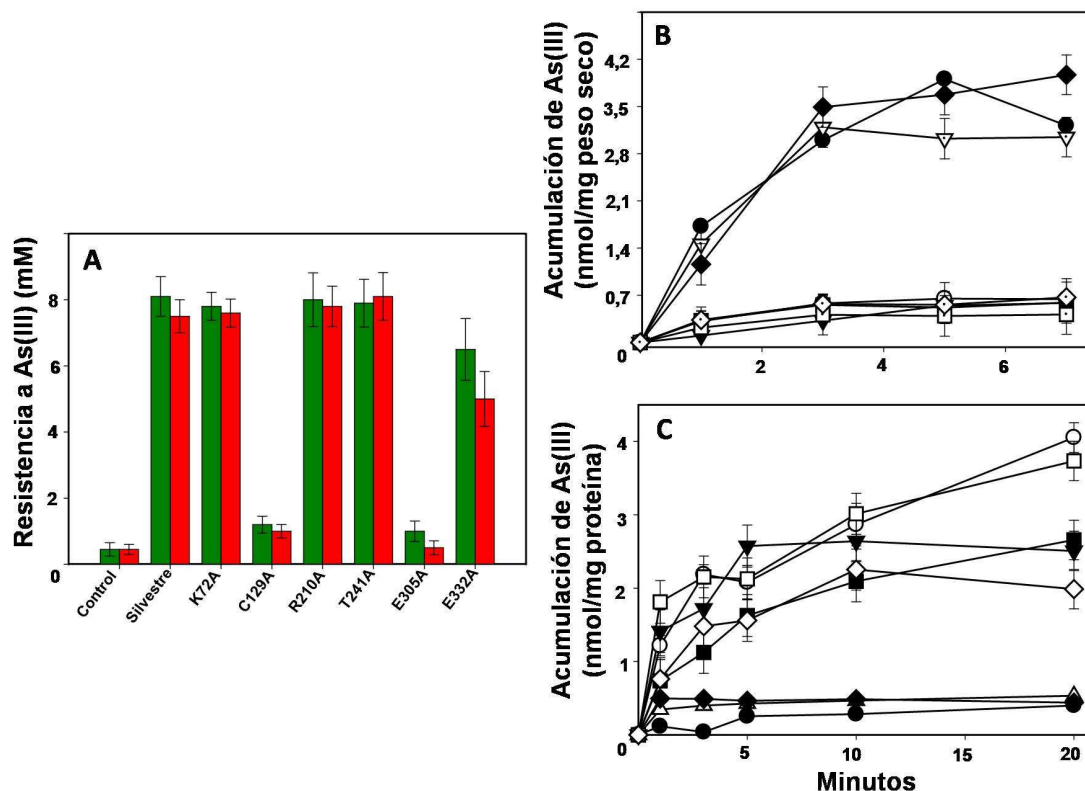


Figura 3.24. (A) Resistencia a As(III) en células de *C. glutamicum* (verde) y *E. coli* (rojo) careciendo de la permeasa CgAcr3-1 (*C. glutamicum* 2Δars o *E. coli* AW3110; Control) o conteniendo la proteína CgAcr3-1 silvestre (Silvestre) o mutada: K72A, C129A, R210A, T241A, E305A y E332A. Acumulación de As(III) en células (B) y acumulación de As(III) en vesículas invertidas (C) de *E. coli* AW3110 (careciendo de la permeasa CgAcr3-1; ●) o conteniendo la proteína CgAcr3-1 silvestre (○) o mutada: K72A (▼), C129A (▽ o △), R210A (◇), T241A (□), E305A (◆) y E332A (■). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

Esta diferencia en los valores de resistencia y acumulación de As(III) en células completas de los mutantes C129A y E305A podría indicar una carencia de funcionalidad de la proteína CgAcr3-1, pero también podría deberse a que las proteínas con los residuos mutados C129A y E305A se expresaran a un nivel inferior que el resto de las proteínas mutadas. Para ello se realizaron análisis de expresión *in vivo* de las proteínas mediante *Western blot*. El gen que codifica para la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* fue fusionado a una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal y clonado en el vector pKars1up bajo su propio promotor. El plásmido resultante pKacr3His (ver Anexo A3.4 y Tabla A4.3) se utilizó como molde en ensayos de mutagénesis dirigida para obtener las seis versiones mutantes del gen *Cgacr3-1* (Tabla A4.3): pKacr3-1K72AHis, pKacr3-1C129AHis, pKacr3-1R210AHis, pKacr3-1T241AHis, pKacr3-1E305AHis y pKacr3-1E332AHis, pero en este caso conteniendo la cola de histidinas.

Las seis versiones de proteína con los residuos mutados a alanina y la proteína silvestre se introdujeron en la cepa *C. glutamicum* 2Δars por conjugación y en *E. coli* AW3110 por transformación; los transconjugantes obtenidos se analizaron por PCR. De cada uno de los mutantes de *C. glutamicum* y *E. coli* se concentró la proteína CgAcr3-1 mediante el sistema de bolas de níquel (ver apartado 2.4.9.1. de Materiales y métodos). Con estas muestras se realizaron análisis de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti-CgAcr3-1 y anticuerpos anti-histidinas. Como se observa en la Figura 3.25 tanto la proteína CgAcr3-1 silvestre como las proteínas mutantes presentaron niveles de expresión similares, independientemente del tipo de anticuerpo utilizado para la detección y del microorganismo en el que se expresen.

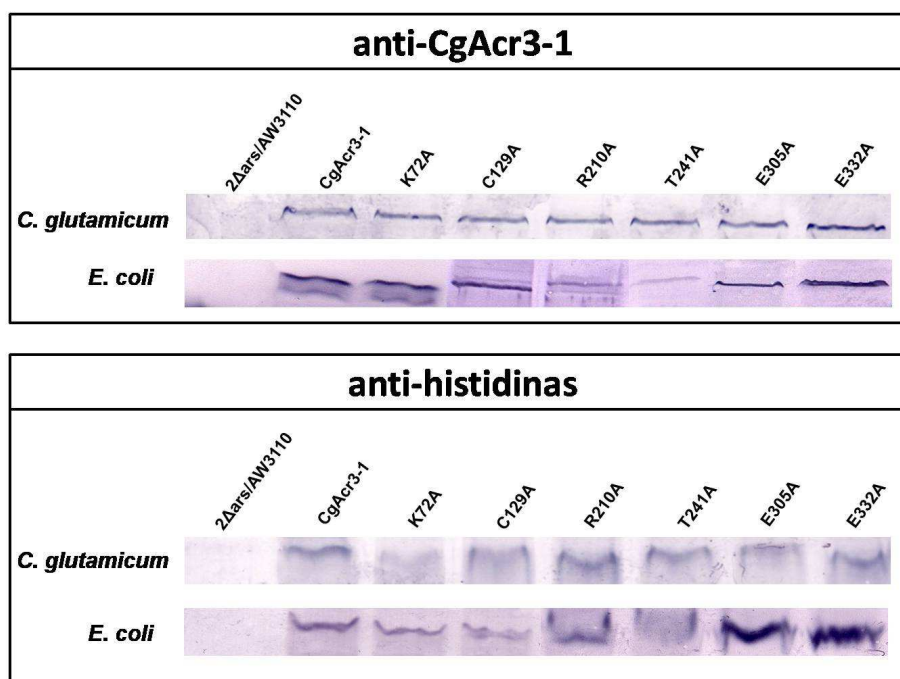


Figura 3.25. Análisis de *Western blot* de la proteína silvestre CgAcr3-1 de *C. glutamicum* y sus variantes (K72A, C129A, R210A, T241A, E305A y E332A) expresadas en *C. glutamicum* y *E. coli* y con una cola de seis histidinas siendo detectadas con anticuerpos anti-CgAcr3-1 y anti-histidinas. Como control negativo hemos utilizado las cepas *C. glutamicum* 2Δars y *E. coli* AW3110.

Con los resultados obtenidos podemos establecer una perfecta correlación entre el análisis de la actividad *in vivo* e *in vitro* de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* silvestre y de sus mutantes, y se deduce que los residuos C129 y E305 están implicados en la translocación de As(III) a través de la arsenito permeasa CgAcr3-1; de la misma forma los residuos K72, R210, T241 o E332 no parecen tener un papel importante en el proceso de translocación del metaloide.

3.1.2.8. Implicación de los residuos C129 y E305 en el transporte de arsenito a través de la proteína CgAcr3-1.

Para conocer la importancia de los residuos C129 y E305 de la permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum* en el transporte de As(III), los aminoácidos C129 y E305 fueron analizados en mayor detalle. Para comprobar si el residuo C129 de la permeasa CgAcr3-1 es importante para el transporte de As(III), se analizó la actividad catalítica de la proteína silvestre expresada en *C. glutamicum* 2Δars y en *E. coli* AW3110 mediante la incorporación de As(III) en vesículas invertidas obtenidas siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 2.4.10.1.3. de Materiales y métodos y ensayadas en presencia de diferentes agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo (DNTB, NEM o IAA); como control negativo de este experimento se utilizaron vesículas invertidas obtenidas de *C. glutamicum* 2Δars y *E. coli* AW3110 sin permeasa y con la proteína CgAcr3-1 mutada en el residuo C129 (*C. glutamicum* C129A y *E. coli* C129A; Tabla A4.5), para comprobar que los efectos que se producen en la actividad de la proteína son realmente consecuencia del bloqueo de la cisteína por los agentes. Los valores de As acumulado reflejan que las vesículas tratadas con los agentes bloqueantes permeables a la membrana, NEM o IAA, son incapaces de incorporar As y presentaron niveles similares a los obtenidos por las vesículas carentes de arsenito permeasa o con la permeasa mutada en el residuo C129 (Figura 3.26A y B); no ocurrió lo mismo cuando se añadió el agente impermeable de membrana DTNB, el cual permite la incorporación de As(III) en las vesículas invertidas de forma similar a las vesículas invertidas con la arsenito permeasa silvestre sin tratar (Figura 3.26 A y B).

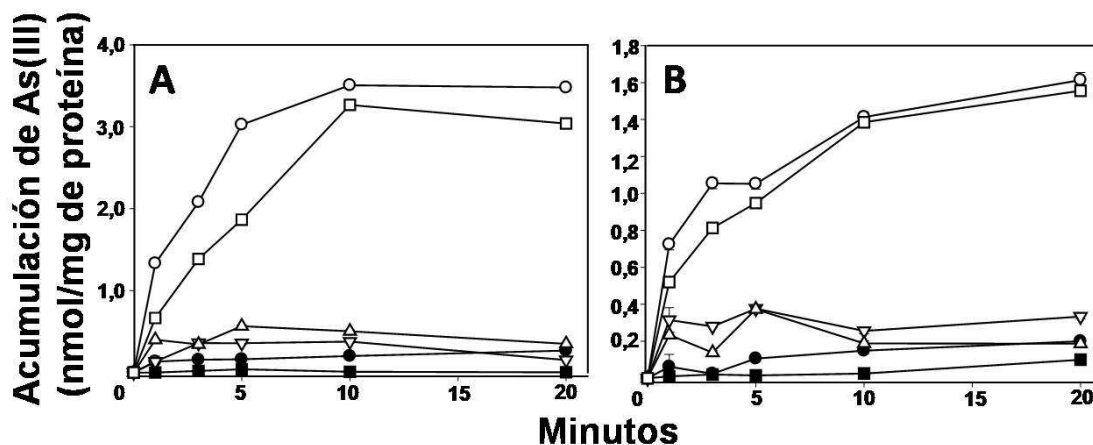


Figura 3.26. Estudios de acumulación de As(III) en vesículas invertidas tratadas con diferentes agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo. Las vesículas fueron obtenidas a partir de células *C. glutamicum* 2Δars (A) o *E. coli* AW3110 (B) sin permeasa CgAcr3-1 (●), expresando la permeasa con el residuo C129 mutado a alanina (■) o la permeasa silvestre (resto). Las vesículas con la permeasa CgAcr3-1 silvestre fueron tratadas con los agentes bloqueantes (▽) NEM, (△) IAA o (□) DTNB o no fueron tratadas (○). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

Por lo tanto parece claro que la cisteína C129 de la proteína CgAcr3-1 es esencial para el mecanismo de translocación del As(III) a través de la membrana. Además, este resultado apoya la localización transmembranal del residuo C129 en la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* y verifica el hipotético modelo topológico de CgAcr3-1 propuesto anteriormente (Figura 3.22B).

Para analizar el papel del residuo E305 de la arsenito permeasa CgAcr3-1 en la translocación de As(III), se realizaron mutaciones dirigidas de este residuo a aminoácidos de diferentes tamaños (fenilalanina) y carga (lisina o aspártico), usando los plásmidos pKacr3-1 (Tabla A4.3 y apartado 3.1.2.2.2. de Resultados y discusión) y pKacr3His (Tabla A4.3 y apartado 3.1.2.2.2. de Resultados y discusión) como moldes. Los plásmidos generados derivados de pKacr3-1: pKacr3-1E305D, pKacr3-1E305F y pKacr3-1E305K y los derivados de pKacr3-1His: pKacr3-1E305DHis, pKacr3-1E305FHis y pKacr3-1E305KHis, junto con los vectores pKacr3-1E305A y pKacr3-1E305AHis obtenidos en el apartado anterior, fueron usados para transformar la cepa *E. coli* AW3110. Los mutantes obtenidos a partir del vector pKacr3His codifican para una proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* fusionada a una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal. La proteína CgAcr3-1 expresada en los transformantes derivados del plásmido pKacr3His se concentró mediante bolas de níquel y se

analizó su expresión *in vivo* mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-CgAcr3-1 y anticuerpos anti-histidinas. Como se observa en la Figura 3.27 tanto la proteína CgAcr3-1 silvestre como las proteínas mutantes presentaron niveles de expresión equivalentes independientemente del tipo de anticuerpo utilizado.

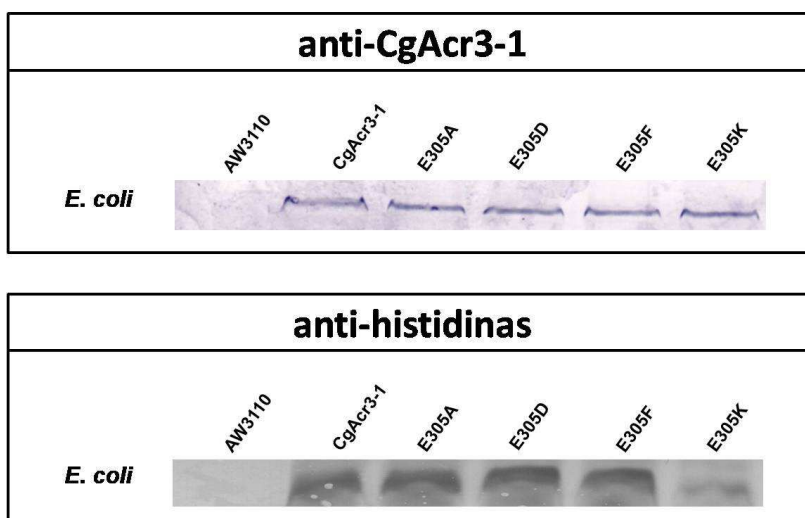


Figura 3.27. Análisis de *Western blot* de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* con el residuo E305 mutado a alanina (E305A), a aspártico (E305D), a fenilalanina (E305F) o a lisina (E305K), en comparación con la expresión de la proteína CgAcr3-1 silvestre (CgAcr3-1) expresadas en *E. coli* AW3110 y usando para la detección anticuerpos anti-CgAcr3-1 y anti-histidinas. Como control negativo hemos utilizado la cepa *E. coli* AW3110.

Los transformantes obtenidos derivados de pKacr3-1 se caracterizaron *in vivo* por resistencia a As(III) en medio líquido y por cuantificación de As(III) acumulado. El residuo E305 es un aminoácido polar, de tamaño grande y con carga negativa que está localizado en el segmento transmembrana TM9 (Figura 3.22). El aminoácido E305 se sustituyó por un aminoácido de menor tamaño y no polar como la alanina (E305A), por un residuo cargado positivamente como la lisina (E305K), por un residuo no polar y de gran tamaño como la fenilalanina (E305F) o por un residuo de su misma carga pero de menor tamaño como el aspártico (E305D); en todos los casos esa sustitución provocó una disminución del nivel de resistencia y un incremento en la acumulación de As(III) en comparación a la proteína CgAcr3-1 silvestre (Figura 3.28A y B).

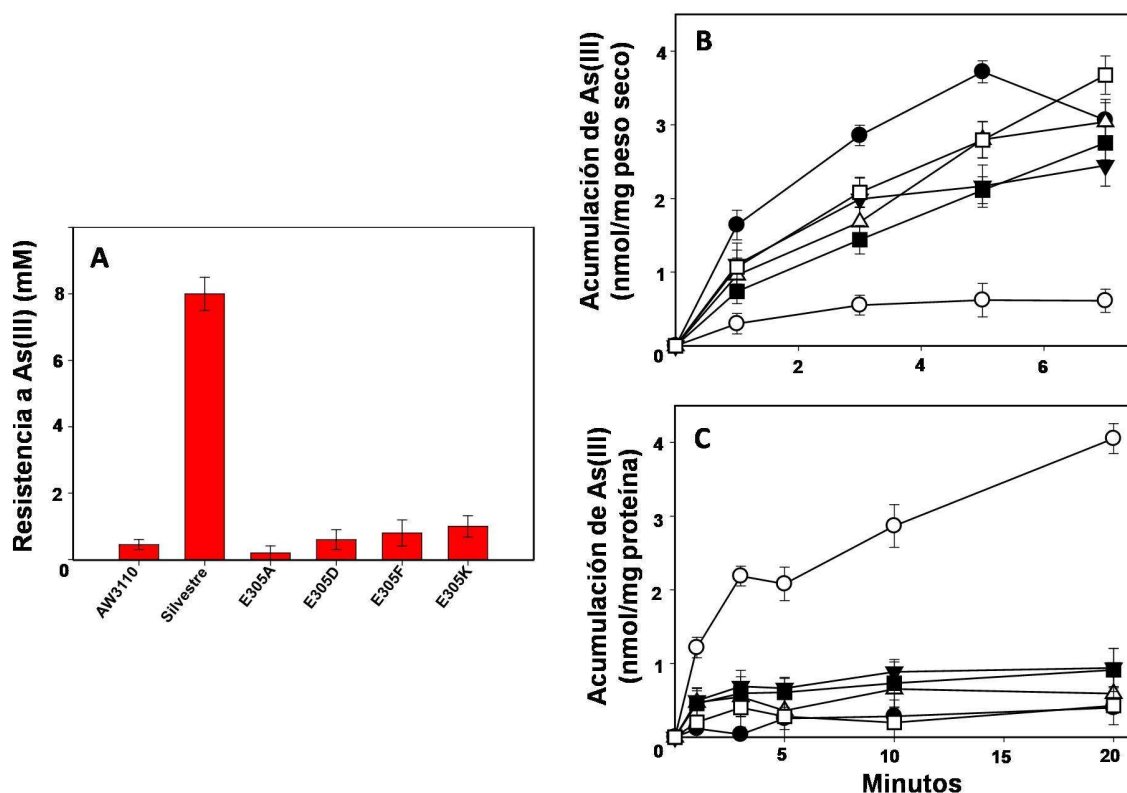


Figura 3.28. Efecto de las mutaciones en el residuo E305 de la proteína CgAcr3-1 en el transporte de As(III). **(A)** Resistencia a As(III) en células de *E. coli* AW3110 (carente de la permeasa CgAcr3-1; AW3110), conteniendo la proteína CgAcr3-1 silvestre (Silvestre) o mutada: E305A, E305D, E305F o E305K. Acumulación de As(III) en células **(B)** y acumulación de As(III) en vesículas invertidas **(C)** de *E. coli* AW3110 (●), conteniendo la proteína CgAcr3-1 silvestre (○) o mutada: E305A (▼), E305D (△), E305F (□) y E305K (■). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

Para corroborar estos resultados, se analizó la actividad del residuo E305 de la proteína CgAcr3-1 *in vitro*. Para ello se realizaron análisis de entrada de As(III) en vesículas invertidas de membrana de células de *E. coli* AW3110 expresando la proteína CgAcr3-1 silvestre y las cuatro variantes del residuo E305. Las vesículas invertidas de todos los mutantes del residuo E305 en presencia de NADH como fuente de energía presentaron niveles de acumulación de As(III) similares y mucho menores que las vesículas invertidas que contenían la copia silvestre para la arsenito permeasa (Figura 3.28C). Estos resultados indican que el ambiente hidrofóbico y la carga negativa proporcionada por el residuo E305 son importantes para el mecanismo de translocación de As(III) a través de la permeasa y que los cambios realizados en el aminoácido E305 provocan una inhibición del transporte de As(III).

El hecho de que *C. glutamicum* incorpore As(III) a pesar de no tener genes para aguaglicerolporinas en su genoma, y expresar dos arsenito permeasas funcionales de la familia Acr3 que no utilizan ATP como fuente de energía para la liberación del As(III) celular, permite a esta actinobacteria vivir en ambientes conteniendo más de 12 mM de As(III) y sugiere que *C. glutamicum* podría ser utilizada en procesos de biorremediación como una biocontenedor de As(III) para posteriormente eliminar el metaloide del ambiente.

3.1.3. Incremento de la entrada de arsenito en *C. glutamicum* y su aplicación en procesos de biorremediación.

Dada la dificultad en la identificación del verdadero mecanismo de entrada de As(III) en *C. glutamicum*, se trataron de localizar posibles proteínas implicadas en la entrada de As(III) en microorganismos filogenéticamente relacionados. Se realizaron análisis de homología de proteínas GlpF en otras actinobacterias, observando que genes que codifican para aguaglicerolporinas están presentes en varios géneros de actinobacterias (Figura 3.29). En el género *Corynebacterium* se identificó una única aguaglicerolporina en la corinebacteria patógena *Corynebacterium diphtheriae*, cuyo gen forma parte de un operón con una estructura *CdglpD* (DIP2237), *CdglpK* (DIP2235) y *CdglpF* (DIP2236).

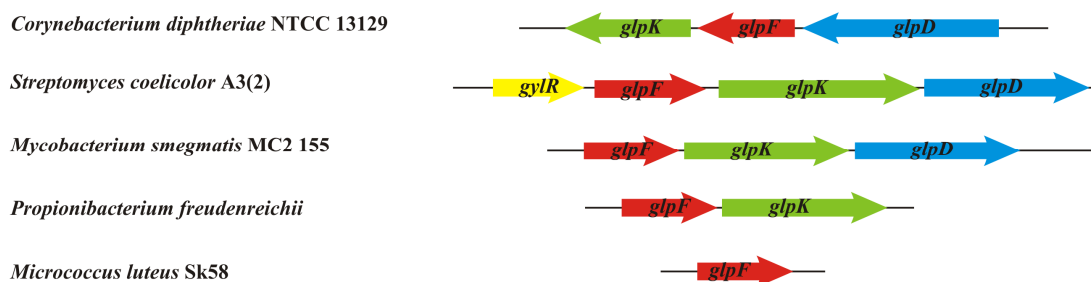


Figura 3.29. Localización de los genes que codifican para aguaglicerolporinas GlpF en el genoma de diferentes actinobacterias.

Para analizar la participación de las proteínas GlpF de actinomicetos en la entrada de As(III) e incrementar la entrada de As(III) en *C. glutamicum* se procedió a la clonación y expresión heteróloga de los genes *glpF* procedentes de *C. diphtheriae* (*CdglpF*) y *S. coelicolor* A3(2) (*ScglpF*; SCO1659) en *C. glutamicum*. Para ello los genes se clonaron en el plásmido bifuncional pECM2 siendo expresados bajo el promotor P_{kan} , obteniendo de esta forma los vectores pECd y pESc (Anexo A3.3 y Tabla A4.3). Al introducir estos plásmidos en *C.*

glutamicum RES167 se observó una disminución de la resistencia a As(III) (Figura 3.30) indicando la funcionalidad de los genes para aguaglicerolporinas y su posible implicación en la entrada de As(III). Los análisis de incorporación de As(III) mediante ICP-MS mostraron un incremento en la entrada de As(III) en los dos mutantes (*C. glutamicum* CdglpF y *C. glutamicum* ScglpF; Tabla A4.5) en comparación con los valores obtenidos para la cepa original *C. glutamicum* RES167 (Figura 3.30), siendo este incremento más evidente en el caso de la expresión de las aguaglicerolporinas CdGlpF. Estos resultados corroboran que las proteínas GlpF de *C. diphtheriae* y *S. coelicolor* A3(2) participan en la entrada de As(III) y demuestran una perfecta expresión heteróloga de los genes *CdglpF* y *ScglpF* en *C. glutamicum*.

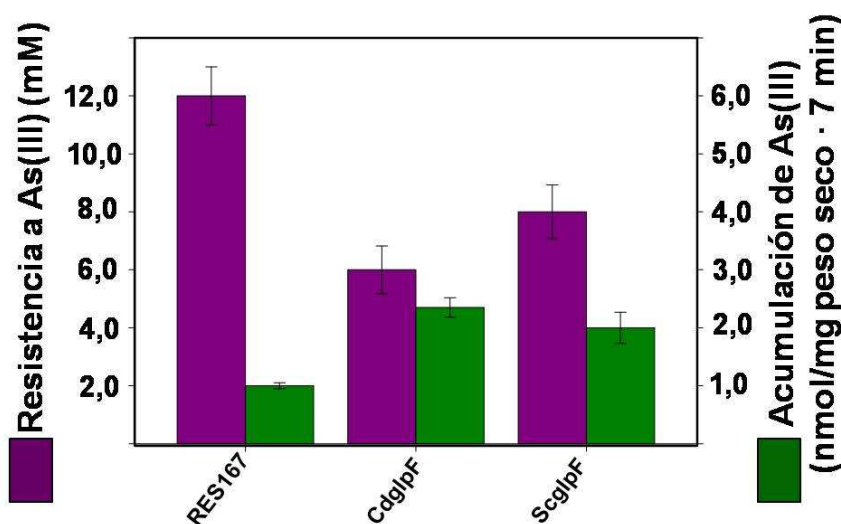


Figura 3.30. Análisis de resistencia (morado) y acumulación (verde) de As(III) en los ensayos de expresión heteróloga de los genes *glpF* procedentes de *C. diphtheriae* y *S. coelicolor* A3(2) en *C. glutamicum*. Se comparan los resultados obtenidos en tres experimentos independientes de las cepas: *C. glutamicum* RES167 (RES167), *C. glutamicum* CdglpF (CdglpF) y *C. glutamicum* ScglpF (ScglpF). El ensayo de acumulación de As(III) se presenta a los 7 minutos y en presencia de 1 mM de As(III).

Debido a la elevada resistencia a As(III) de *C. glutamicum* se pasó a analizar la posibilidad de que *C. glutamicum* pudiera ser utilizada en procesos de biorremediación de As. Para ello cepas mutantes de *C. glutamicum* carentes de las arsenito permeasas funcionales (*C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 y *C. glutamicum* 2Δars; Tabla A4.4) fueron analizadas en ensayos de acumulación de As(III) a lo largo de 2 horas. Muestras de las células en un estado de reposo o no crecimiento (*resting cells*) en contacto con As(III) fueron tomadas a lo largo de ese tiempo y analizadas mediante ICP-MS. Como se observa en la Figura 3.31A el mutante *C.*

glutamicum Acr3-1_Acr3-2, carente de las dos arsenito permeasas funcionales, acumula 4 veces más cantidad de As(III) que la cepa *C. glutamicum* RES167 a las 2 horas de incubación con As(III); cuando los análisis de retención se realizaron con el mutante *C. glutamicum* 2Δars, el cual carece de los dos operones *ars*, la cantidad de As(III) acumulada fue similar a la observada en el mutante *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 (Figura 3.31B). Estos resultados confirman que las arsenito permeasas realizan procesos de desintoxicación de As(III) de manera muy eficaz en *C. glutamicum* y sugiere que los mutantes *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 y 2Δars podrían ser utilizados en procesos de eliminación de As(III) de ambientes contaminados.

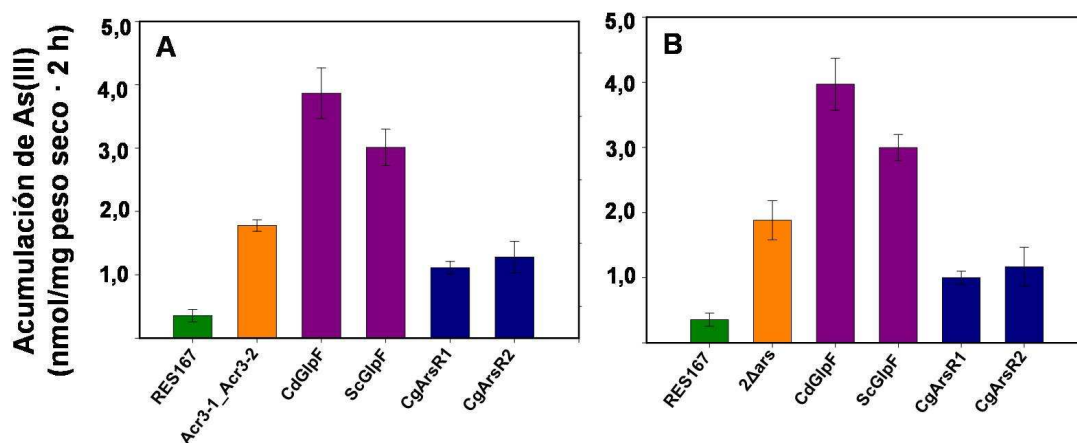


Figura 3.31. Acumulación de As(III) en células de *C. glutamicum* a las 2 horas de incubación en presencia de As(III) 1 mM en *C. glutamicum* RES167 (RES167; verde), *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 (Acr3-1_Acr3-2; naranja) y mutantes derivados **(A)**, y en *C. glutamicum* 2Δars (2Δars; naranja) y mutantes derivados **(B)**. Ensayos de expresión heteróloga de los genes *CdglpF* y *ScglpF* (CdGlpF y ScGlpF, respectivamente; columnas moradas) en *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 **(A)** y *C. glutamicum* 2Δars **(B)**. Ensayos de expresión de los genes *CgarsR1* y *CgarsR2* (CgArsR1 y CgArsR2, respectivamente; columnas azules) en *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 **(A)** y *C. glutamicum* 2Δars **(B)**. Los resultados son obtenidos de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de obtener un incremento de la acumulación de As(III) en *C. glutamicum*, se expresaron los genes *glpF* para las aguaglicerolporinas de *C. diphtheriae* y *S. coelicolor* analizados arriba en los mutantes *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 y *C. glutamicum* 2Δars. Para ello los vectores pECd y pESc (Anexo A3.3 y Tabla A4.3) fueron introducidos por conjugación en *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 y *C. glutamicum* 2Δars; los transconjugantes obtenidos se incubaron en presencia de As(III) y se determinó la cantidad de As acumulado a lo largo de 2 horas. Como se pone de manifiesto en la Figura 3.31A y B, las dos cepas *C. glutamicum* Acr3-

1_Acr3-2 y *C. glutamicum* 2 Δ ars aumentan la acumulación de As(III) entre 1,5 y 2 veces en comparación con las cepas originales o con las cepas originales transformadas con los plásmidos sin inserto (*CdglpF* o *ScglpF*), pasando de 1,8 nmol de As/mg de peso seco a 2,9 o 3,9 nmol de As/mg de peso en los mutantes con las aguaglicerolporinas; el mayor incremento se consiguió utilizando el gen *CdglpF* de *C. diphtheriae*. Estos incrementos son equivalentes a los observados anteriormente en la entrada de As(III) en la cepa *C. glutamicum* RES167 comparándola con la que tiene las aguaglicerolporinas CdGlpF y ScGlpF (Figura 3.30). Estudios de sobreexpresión del gen para la aguaglicerolporina EcGlpF de *E. coli*, también han producido incrementos en la acumulación de As(III) de hasta 2 veces más que en la cepa control (Singh *et al.*, 2008b).

Otra estrategia desarrollada para obtener un mayor incremento de la acumulación de As(III) en células de *C. glutamicum* fue la sobreexpresión de las proteínas ArsRs de *C. glutamicum* (CgArsR1 y CgArsR2), ya que las proteínas ArsRs se ha descrito que contienen una especificidad de unión a As(III) (Scott *et al.*, 1997). Para ello los genes *CgarsR1* y *CgarsR2* de los operones *ars1* y *ars2*, respectivamente, de *C. glutamicum* fueron clonados bajo el promotor P_{kan} en el vector bifuncional pECM2, de forma similar a lo descrito para los genes de las aguaglicerolporinas, obteniendo los plásmidos pER1 y pER2 (Anexo A3.3 y Tabla A4.3); estos plásmidos se transfirieron por conjugación a las cepas *C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 y *C. glutamicum* 2 Δ ars. Los clones transconjugantes obtenidos se incubaron en presencia de As(III) y se determinó la cantidad de As acumulado a lo largo de 2 horas mediante ICP-MS. Como resultado se observó que los mutantes que sobreexpresaron las proteínas reguladoras CgArsR1 o CgArsR2, acumularon cantidades inferiores de As(III) que las cepas originales o que las cepas originales (*C. glutamicum* Acr3-1_Acr3-2 o *C. glutamicum* 2 Δ ars) conteniendo únicamente el vector pECM2 sin los genes *CgarsR* (Figura 3.31A y B). Esto confirma que la sobreexpresión del metalorregulador no provoca un incremento de la acumulación de As(III) en *C. glutamicum*, quizás debido a un efecto tóxico para las células como ha sido descrito en la sobreexpresión del metalorregulador EcArsR en *E. coli* (Kostal *et al.*, 2004).

3.2. Mecanismos de reducción de arseniato en *C. glutamicum*.

3.2.1. Análisis de las arseniato reductasas CgArsC1' y CgArsC4 de *C. glutamicum*.

La presencia de varios operones de resistencia a arsénico en el genoma de una misma bacteria no es muy común a tenor de lo descrito hasta estos momentos en la literatura científica. Sin embargo sí es más frecuente la presencia en el mismo microorganismo de un operón convencional *ars* y genes adicionales de resistencia a arsénico dispersos en su genoma. El análisis del genoma de *C. glutamicum* ha revelado la presencia de cuatro genes que codifican para enzimas arseniato reductasas: CgArsC1, CgArsC2, CgArsC1' y CgArsC4 (Figura 3.3). Los genes *CgarsC1* y *CgarsC1'* están presentes en el operón *ars1*, y codifican para proteínas de 141 y 241 aminoácidos, con unas masas moleculares de 15 y 23 kDa, respectivamente; el gen *CgarsC2* está presente en el operón *ars2* y codifica para una proteína de 129 aminoácidos, con una masa molecular de 14 kDa. El gen *CgarsC4* se encuentra de forma independiente en el cromosoma y codifica para una proteína de 145 aminoácidos y 13 kDa. Hasta la fecha únicamente las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 de *C. glutamicum* han sido caracterizadas *in vivo* e *in vitro*, agrupándolas dentro de una nueva familia de arseniato reductasas dependientes de micotiol (MSH) y micorredoxina 1 (CgMrx1) como mecanismo de reducción (Ordóñez *et al.*, 2009). En la presente memoria se ha identificado una nueva micorredoxina en el genoma de *C. glutamicum*, la micorredoxina 3 (*Cgmr3*; cg0496); ensayos *in vivo* parecen indicar que la proteína CgMrx3 es la micorredoxina más importante en el proceso de reducción de As(V) *in vivo* en *C. glutamicum* (ver Anexo 2).

Dado que *C. glutamicum* actualmente es uno de los pocos microorganismos donde se han identificado cuatro arseniato reductasas y que los análisis filogenéticos preliminares de las arseniato reductasa de *C. glutamicum* hacían prever que algunas de estas enzimas pertenecerían filogenéticamente a diferentes familias de reductasas (Figura 3.32), decidimos analizar en mayor detalle la actividad *in vivo* e *in vitro* de las reductasas CgArsC1' y CgArsC4.

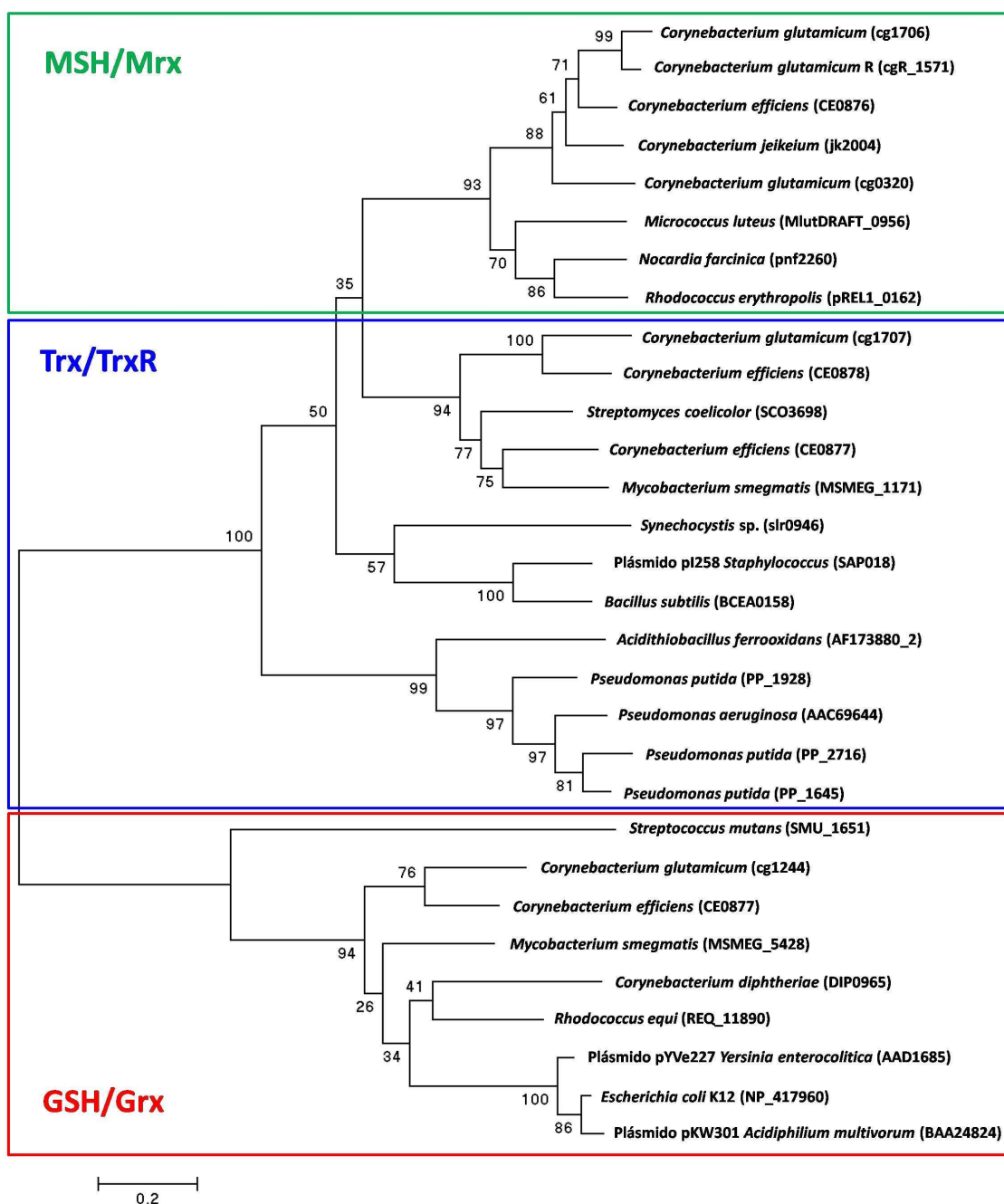


Figura 3.32. Análisis filogenético de las proteínas ArsC de diferentes especies. Los números representados son porcentajes obtenidos por *bootstapping* (1.000 réplicas). Se muestran los códigos de genes que codifican para estas proteínas.

La arsenito reductasa CgArsC4 de *C. glutamicum* está relacionada filogenéticamente con las reductasas dependientes de glutatión (GSH) y glutarredoxina (Grx), al igual que lo está la arseniato reductasa EcArsC de *E. coli* (Figura 3.32). En otras especies de actinobacterias como *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium efficiens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Rhodococcus equi*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) y *Nocardia farcinica* han sido también identificadas reductasas pertenecientes a esta familia, a pesar de que la presencia de GSH constituye una excepción en la mayoría de las actinobacterias (Johnson *et al.*, 2009).

El análisis de la secuencia primaria de la arseniato reductasa CgArsC4 de *C. glutamicum* y el alineamiento de proteínas de actinobacterias relacionadas filogenéticamente con la reductasa EcArsC de *E. coli* (Figura 3.33) ha revelado la presencia de aminoácidos y dominios peptídicos esenciales de las arseniato reductasas de la familia GSH/Grx. La enzima EcArsC de *E. coli* presenta cinco residuos críticos: histidina 8 (H8), cisteína 12 (C12), serina 15 (S15), arginina 60 (R60) y arginina 94 (R94) que son coincidentes con los residuos de CgArsC4: histidina 7 (H7), cisteína 11 (C11), serina 14 (S14), arginina 59 (R59) y arginina 92 (R92) (Figura 3.33). Además en la proteína CgArsC4 se encuentran los cinco residuos básicos que rodean estéricamente a la cisteína 12 (C12) de EcArsC y que ejercen un importante papel en la disminución del valor del pK_a de la enzima. En CgArsC4 estos residuos se corresponden con la histidina 7 (H7), arginina 15 (R15), arginina 59 (R59), arginina 92 (R92) y arginina 105 (R105) (Figura 3.33). Sin embargo no se ha detectado en CgArsC4 la presencia de la cisteína del extremo carboxilo terminal presente en EcArsC (cisteína que por otra parte no interviene en el mecanismo de reducción) y de la región carboxilo terminal presente en EcArsC de *E. coli* (Figura 3.33). Una cisteína equivalente a la indicada así como el dominio carboxilo terminal están también ausentes en otras arseniato reductasas de actinobacterias que pertenecen a esta familia. Con los datos reseñados anteriormente se podría hipotetizar sobre la funcionalidad de la enzima CgArsC4 en *C. glutamicum*, aunque se necesitan estudios adicionales *in vivo* e *in vitro* para corroborar esta posibilidad.

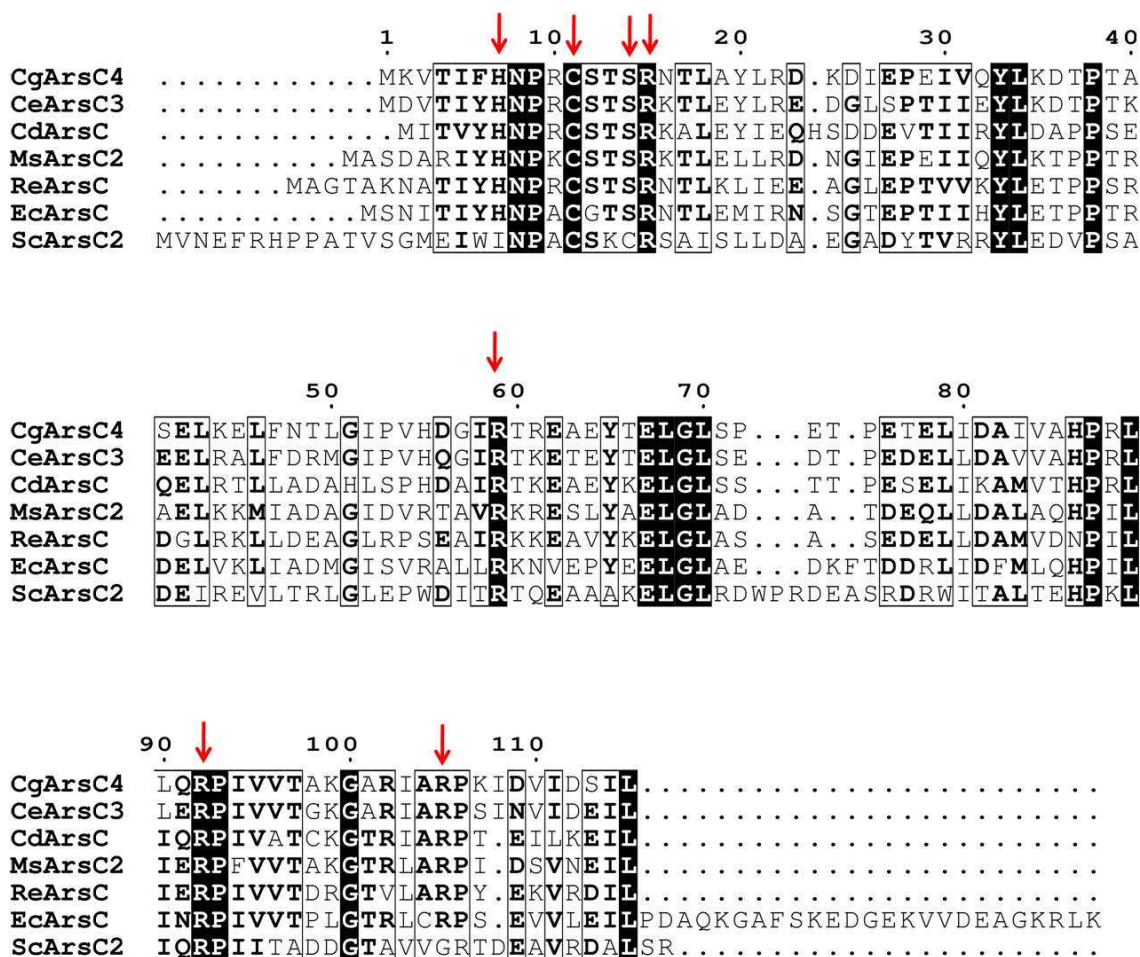


Figura 3.33. Alineamiento de las enzimas arseniato reductasas relacionadas filogenéticamente con GSH y Grx de *C. glutamicum* (CgArsC4), *C. efficiens* (CeArsC3), *C. diphtheriae* (CdArsC), *M. smegmatis* (MsArsC2), *R. equi* (ReArsC), *E. coli* (EcArsC) y *S. coelicolor* (ScArsC2). Las flechas indican los residuos importantes en el proceso catalítico. La numeración de las secuencias se realizó con respecto a la proteína CgArsC4.

La arseniato reductasa CgArsC1' está relacionada filogenéticamente con la arseniato reductasa SaArsC de *Staphylococcus aureus* (Figura 3.32). En *C. glutamicum* el gen *CgarsC1'* se transcribe principalmente como dos ARN mensajeros: uno policistrónico de 2,4 kb, que incluye los genes *Cgacr3-1*, *CgarsC1* y *CgarsC1'*, y otro bicistrónico de 1,1 kb, que incluye los genes *CgarsC1* y *CgarsC1'* (Ordóñez *et al.*, 2005). Un análisis filogenético de las enzimas arseniato reductasas ha puesto de manifiesto que las enzimas pertenecientes al grupo ArsC1' presente en *C. glutamicum*, también se encuentran en algunos representantes del grupo de las actinobacterias como *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *C. efficiens*, *Rhodococcus erythropolis*, *N. farcinica*, *S. coelicolor* y en *Brevibacterium linens*. En una comparativa más global, las reductasas ArsC1' indicadas presentan tres cisteínas que podrían estar implicadas en procesos catalíticos ligados al par tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR), y cuyo ejemplo más significativo es la enzima SaArsC de *S. aureus*. En este último caso se ha establecido la existencia de tres cisteínas esenciales para su actividad: cisteína 10 (C10), cisteína 82 (C82) y cisteína 89 (C89), y que haciendo una comparativa del modelo para CgArsC1' de *C. glutamicum* se corresponderían con la cisteína 88 (C88), cisteína 162 (C162) y cisteína 166 (C166) (Figura 3.34). Los aminoácidos integrantes del P-loop de SaArsC de *S. aureus*, serían asparagina 13 (N13), arginina 16 (R16) y serina 17 (S17) y resultan necesarios para la catálisis de SaArsC; estos residuos aparecen conservados en todas las secuencias alineadas en la Figura 3.34, lo que confirma que la proteína CgArsC1' de *C. glutamicum* contiene la mayoría de los residuos característicos de las arseniato reductasas dependientes de Trx/TrxR.

A partir del alineamiento de la Figura 3.34 se identificó un claro dominio amino terminal (N-terminal) presente en la proteína CgArsC1' de *C. glutamicum*, y en otras proteínas de actinobacterias como CeArsC1' de *C. efficiens*, ReArsC1' de *R. erythropolis*, NfArsC1' de *N. farcinica* y BIArsC1' de *B. linens* y no compartido en otras arseniato reductasas. Las proteínas ArsC1' carentes del extremo N-terminal se denominaron ArsC1'T, donde T indica una hipotética secuencia truncada.

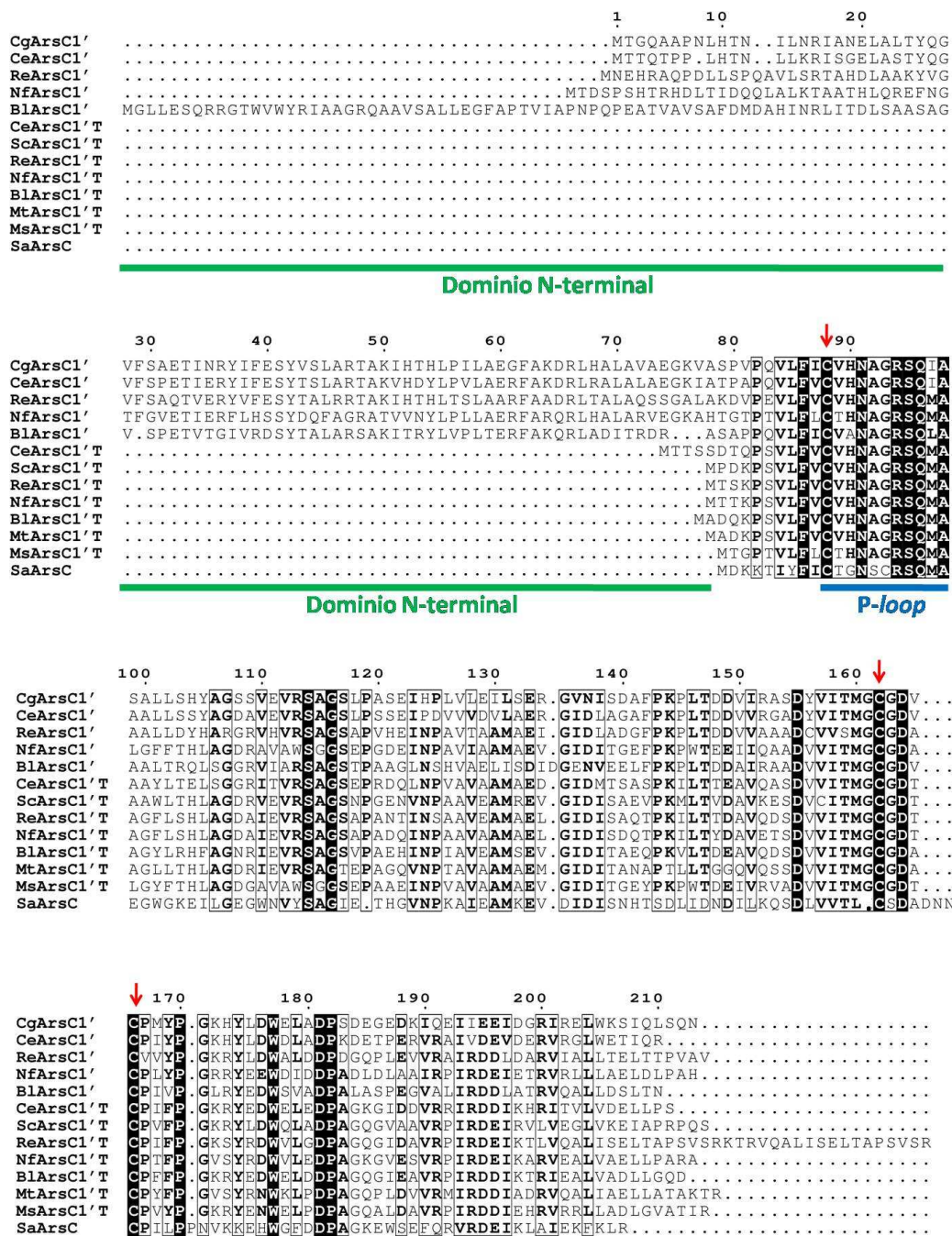


Figura 3.34. Alineamiento de las arseniato reductasas relacionadas filogenéticamente con Trx y TrxR de *C. glutamicum* (CgArsC1'), *C. efficiens* (CeArsC1'), *R. erythropolis* (ReArsC1'), *N. farcinica* (NfArsC1'), *B. linens* (BlArsC1') y *S. aureus* (SaArsC) y con las proteínas ArsC1'T de *M. tuberculosis* (MtArsC1'T), *M. smegmatis* (MsArsC1'T), *S. coelicolor* (ScArsC1'T), *R. erythropolis* (ReArsC1'T), *N. farcinica* (NfArsC1'T), *B. linens* (BlArsC1'T) y *C. efficiens* (CeArsC1'T). Las flechas rojas indican los cisteínas esenciales implicados en el proceso catalítico. Se señala el dominio N-terminal de las enzimas ArsC1' con versión larga en verde y el dominio P-loop en azul. La numeración de las secuencias se realizó con respecto a la proteína CgArsC1' de *C. glutamicum*.

3.2.1.1. Identificación *in vivo* de las arseniato reductasas en *C. glutamicum* mediante *Western blot*.

Con el fin de comprobar la presencia y función de las arseniato reductasas CgArsC1' y CgArsC4 de *C. glutamicum*, decidimos realizar análisis de *Western blot* de todas las reductasas de *C. glutamicum* en diferentes cepas y condiciones de cultivo. Para ello, los genes *CgarsC1*, *CgarsC2* (Ordóñez *et al.*, 2009), *CgarsC1'* y *CgarsC4* se clonaron en el plásmido de expresión pET28a(+) de forma que las proteínas CgArsC1, CgArsC2, CgArsC1' y CgArsC4 resultan fusionadas a una cola de histidinas en el extremo N-terminal (ver Anexo A3.1 y Tablas A4.2 y A4.3). Las proteínas CgArsC2, CgArsC1' y CgArsC4 purificadas a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3) (Tabla A4.4) se usaron para inmunizar tres conejos (ver apartado 2.4.13. de Materiales y métodos). Los anticuerpos obtenidos después de los sangrados fueron purificados y chequeados frente a sus propios antígenos purificados (arseniato reductasas) y de forma cruzada frente a las otras proteínas arseniato reductasas. Como se observa en la Figura 3.35 los anticuerpos anti-CgArsC2 reconocen la proteína CgArsC2, pero también la proteína CgArsC1 (con la que tiene un grado de homología del 66%) y CgArsC1'. Los anticuerpos anti-CgArsC1' reconocen específicamente CgArsC1' y por reacción cruzada CgArsC2 (con la que tiene un grado de homología del 31%); los anticuerpos anti-CgArsC4 son específicos de la proteína CgArsC4.

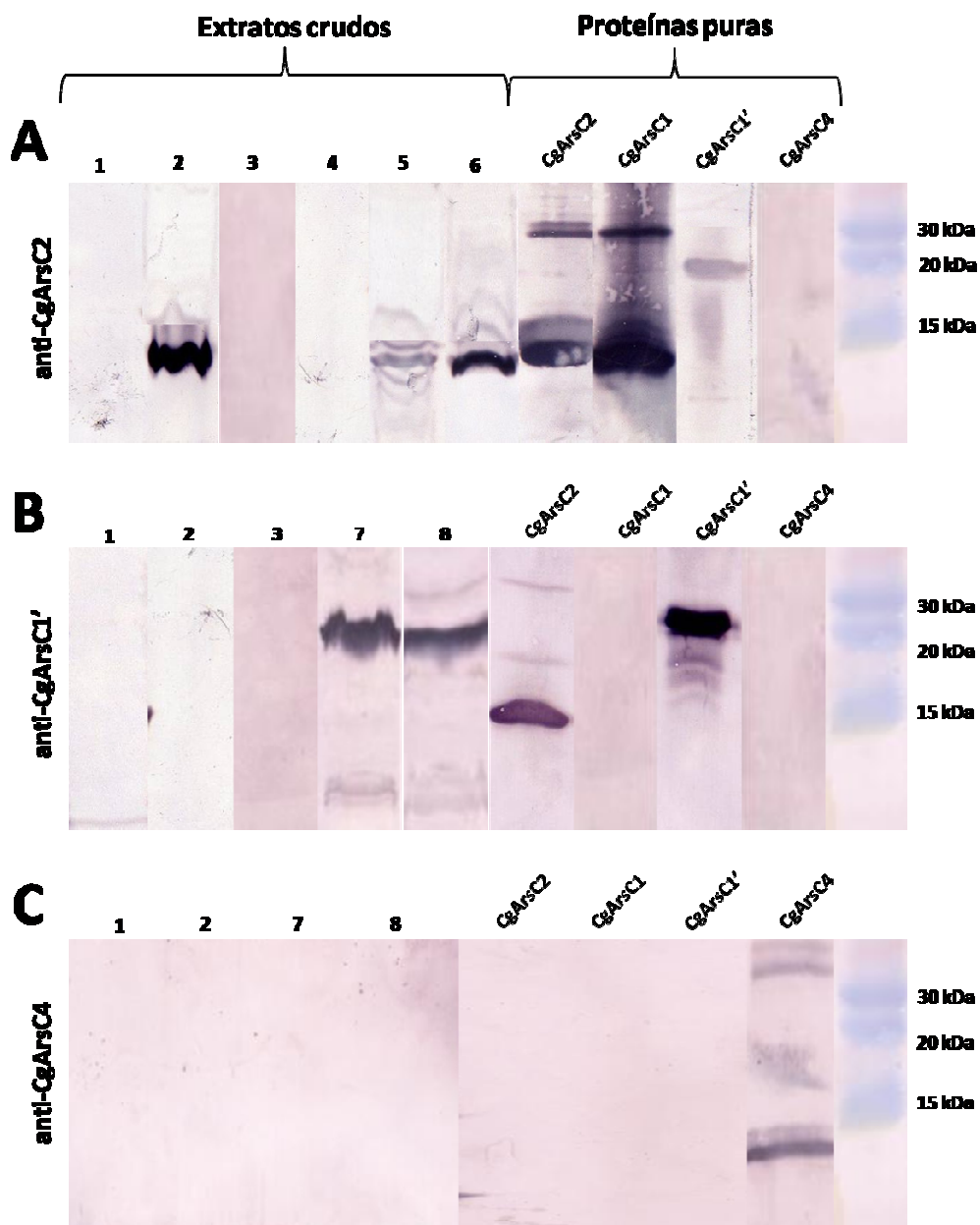


Figura 3.35. Ensayos de *Western blot* usando anticuerpos: anti-CgArsC2 (A), anti-CgArsC1' (B) o anti-CgArsC4 (C). Las proteínas puras CgArsC2, CgArsC1, CgArsC1' y CgArsC4 están incluidas en los carriles con sus nombres. La inducción de las cepas con As(III) o As(V) dio el mismo patrón de bandas. *Carril 1*: extracto crudo de *C. glutamicum* RES167 no inducido; *carril 2*: extracto crudo de *C. glutamicum* RES167 inducido; *carril 3*: extracto crudo de *C. glutamicum* 2 Δ ars inducido; *carril 4*: extracto crudo de *C. glutamicum* ArsC1-C2 inducido; *carril 5*: extracto crudo de *C. glutamicum* ArsC1 inducido; *carril 6*: extracto crudo de *C. glutamicum* ArsC2 inducido; *carril 7*: extracto crudo de *C. glutamicum* ArsC1'His (B) o *C. glutamicum* ArsC4His (C) no inducido y concentrado con bolas de níquel; *carril 8*: extracto crudo de *C. glutamicum* ArsC1'His (B) o *C. glutamicum* ArsC4His (C) inducido y concentrado con bolas de níquel.

Para los análisis *in vivo* de las arseniato reductasas de *C. glutamicum* se obtuvieron extractos crudos en condiciones de inducción con As(III) y con As(V) de la cepa *C. glutamicum* RES167, se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a ensayos de *Western blot*. Una banda correspondiente a la proteína CgArsC2, y probablemente también de CgArsC1 por reacción cruzada, fue observada en condiciones de inducción por los anticuerpos anti-CgArsC2 (Figura 3.35A carril 2); en cambio las proteínas CgArsC1' y CgArsC4 no fueron detectadas por sus anticuerpos específicos, como se deduce por la ausencia de banda a la altura de la masa molecular esperada para estas proteínas (Figura 3.35B y C carril 2). En los extractos crudos de *C. glutamicum* RES167 en condiciones de no inducción, no se detectaron bandas correspondientes a las reductasas, independientemente del anticuerpo utilizado (Figura 3.35 carril 1). Además las proteínas CgArsC2 y CgArsC1 no se detectaron en cepas de *C. glutamicum* que carecen o tienen interrumpidos los correspondientes genes como en *C. glutamicum* Δ ars (operones *ars1* y *ars2* están deletados; Tabla A4.4) o en *C. glutamicum* ArsC1-C2 (genes *CgarsC1* y *CgarsC2* están interrumpidos; Tabla A4.4) (Figura 3.35A carriles 3 y 4); tampoco se observó señal para la proteína CgArsC1' a partir de extractos crudos de la cepa *C. glutamicum* Δ ars (Figura 3.35B carril 3) Sin embargo, la reductasa CgArsC2 fue identificada en el mutante interrumpido simple para el gen *CgarsC1* (*C. glutamicum* ArsC1; Tabla A4.4) (Figura 3.35A carril 5) y por reacción cruzada la proteína CgArsC1 fue detectada en el mutante interrumpido simple en el gen *CgarsC2* (*C. glutamicum* ArsC2; Tabla A4.4) (Figura 3.35A carril 6). Estos resultados confirman que las proteínas CgArsC1 y CgArsC2 en condiciones de inducción presentan un nivel de expresión elevado, aspecto que no se observa en condiciones de no inducción.

La ausencia de detección de las reductasas CgArsC1' y CgArsC4 en todas las condiciones probadas podría deberse a una carencia total de la expresión de las proteínas o a una expresión muy baja de las mismas, razón por la cual no se detectaban en las condiciones ensayadas.

Para comprobar si las reductasas CgArsC1' y CgArsC4 se expresan a un bajo nivel en *C. glutamicum*, se realizó un proceso de concentración de las proteínas. Para ello, se realizaron fusiones génicas de forma que las proteínas CgArsC1' y CgArsC4 se acoplaron a una cola de ocho histidinas en el extremo C-terminal; estas construcciones se clonaron en el plásmido suicida pK18mob y los plásmidos generados pKarsC1'His y pKarsC4His (ver Anexo A3.4 y Tabla A4.3) fueron transferidos por conjugación a *C. glutamicum* RES167. Los transconjugantes obtenidos (*C. glutamicum* ArsC1'His y *C. glutamicum* ArsC4His; Tabla A4.5) presentaron una copia del gen *CgarsC1'* o *CgarsC4* fusionada a ocho codones de histidinas

expresado bajo su propio promotor y generada mediante recombinación homóloga con el cromosoma (Figura 3.36); la integración fue confirmada por análisis de PCR.

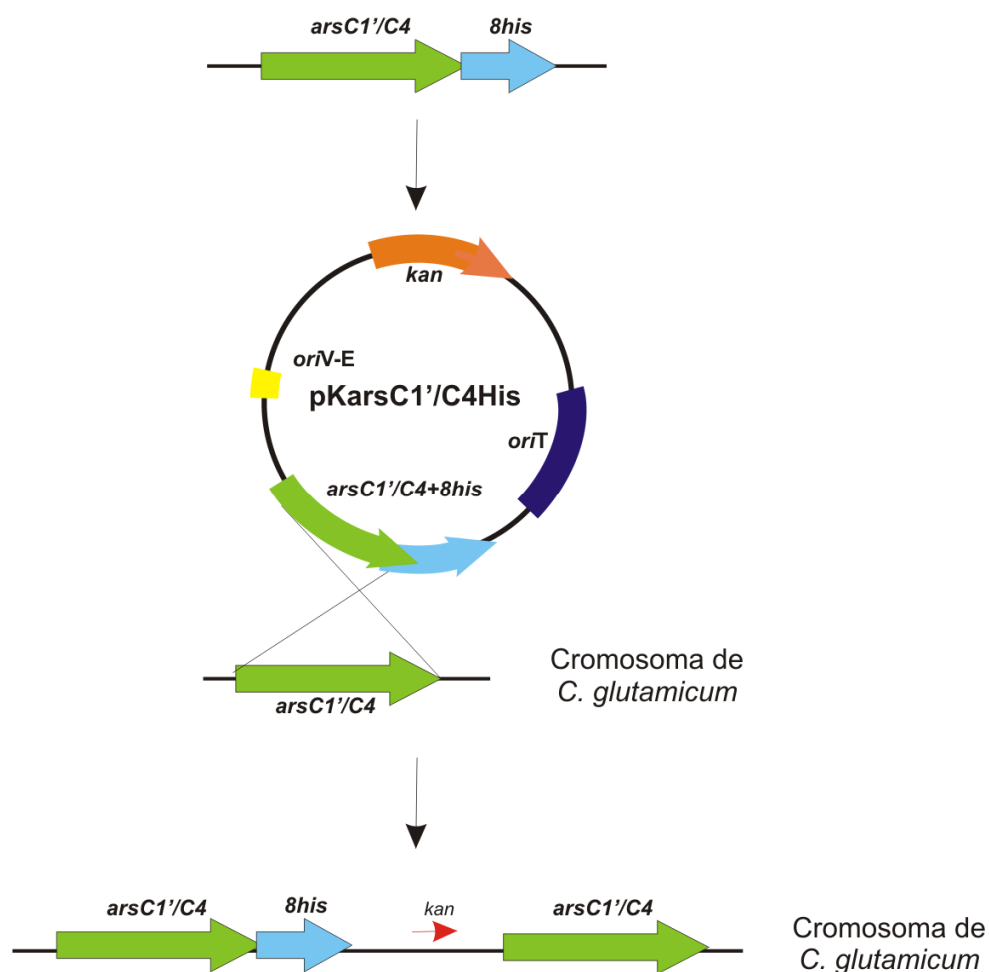


Figura 3.36. Esquema del producto génico obtenido tras la integración de los plásmidos *pKarsC1'His* o *pKarsC4His* por recombinación simple en el cromosoma de *C. glutamicum*.

Varios de los transconjugantes fueron usados de forma individual para el proceso de purificación y concentración de las proteínas *CgArsC1'His* o *CgArsC4His* mediante bolas de níquel (ver apartado 2.4.9.1. de Materiales y métodos); estas proteínas fueron utilizadas para análisis de *Western blot*, usando como controles las proteínas *CgArsC1'* o *CgArsC4* de *C. glutamicum* purificadas de *E. coli* BL21(DE3). Los resultados de este protocolo tanto en condiciones de inducción con As(III) o As(V) como de no inducción, mostrados en los carriles 7

y 8 de la Figura 3.35C, indican que la proteína CgArsC1' está presente en *C. glutamicum*, siendo expresada de forma equivalente tanto en condiciones de inducción como de no inducción. Sin embargo, la proteína CgArsC4 no se detectó en cualquiera de las condiciones ensayadas (Figura 3.35C carriles 7 y 8). Estos resultados confirman que la proteína CgArsC1' se expresa constitutivamente y a un nivel muy basal en *C. glutamicum*, mientras que la proteína CgArsC4 no está presente en la célula, aunque el gen *CgarsC4* parece expresarse constitutivamente (Ordóñez *et al.*, 2005).

3.2.1.2. Análisis *in vivo* de la actividad arseniato reductasa de la proteína CgArsC1' en *C. glutamicum*.

Hasta la fecha no se ha identificado una actividad enzimática *in vivo* asociada a la proteína CgArsC1' en *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2009). Sin embargo, dado que conocemos que la proteína CgArsC1' está presente en *C. glutamicum*, se realizaron análisis adicionales para determinar el grado de implicación de CgArsC1' en la reducción de As(V) en *C. glutamicum*. Una de las posibilidades consiste en la realización de un análisis de interrupción génica del gen *CgarsC1'*, para ello un fragmento interno del gen *CgarsC1'* se clonó en el vector suicida para corinebacterias pK18mob, obteniendo el plásmido pKarsC1'int (ver Anexo A3.2 y Tabla A4.3). Éste plásmido fue transferido por conjugación a *C. glutamicum* RES167 y se integró en el cromosoma por recombinación homóloga a través del fragmento interno clonado en el vector (Figura 3.37A). La interrupción de *CgarsC1'* fue confirmada mediante análisis de PCR; se constató que los transconjugantes obtenidos (*C. glutamicum* ArsC1'; Tabla A4.5) presentaron un nivel de resistencia a As(V) similar a la cepa original *C. glutamicum* RES167 (Figura 3.37B), por lo que la resistencia a As(V) mediada por CgArsC1' no parece muy relevante.

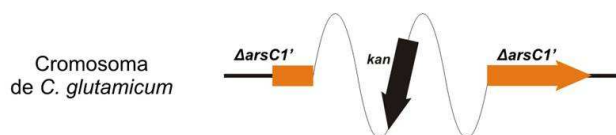
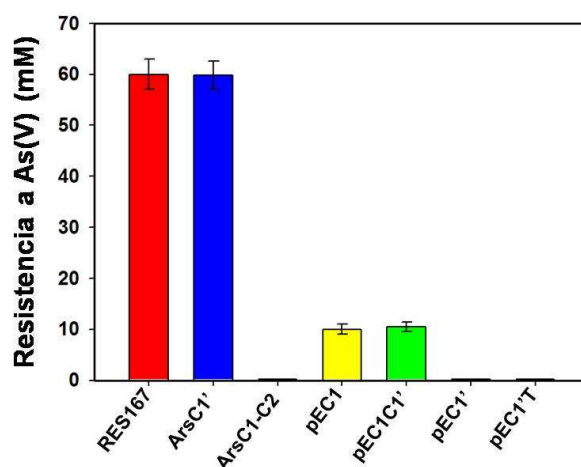
A Interrupción *CgarsC1'***B**

Figura 3.37. (A) Esquema resumido de la interrupción génica de *CgarsC1'*. **(B)** Análisis de resistencia a As(V) en las cepas: *C. glutamicum* RES167 (RES167); *C. glutamicum* ArsC1' (ArsC1'); *C. glutamicum* ArsC1-C2 (ArsC1-C2); *C. glutamicum* ArsC1-C2 con el vector pEC1 (pEC1); *C. glutamicum* ArsC1-C2 con el vector pEC1C1' (pEC1C1'); *C. glutamicum* ArsC1-C2 con el vector pEC1' (pEC1') y *C. glutamicum* ArsC1-C2 con el vector pEC1'T (pEC1'T). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

Para completar el análisis de las alteraciones producidas por modificaciones en los niveles de expresión de *CgarsC1'*, este gen se sobreexpresó en combinación con el gen *CgarsC1*, el cual se localiza inmediatamente aguas arriba en el operón *ars1* (Figura 3.3). Para ello los genes *CgarsC1-CgarsC1'* se clonaron como un *cassette* en el plásmido pHXisNpro bajo el promotor P_{kan} , y a continuación se subclonó el fragmento *BglI-BglI* (conteniendo P_{kan} -*CgarsC1-CgarsC1'* flanqueado por dos terminadores) en el lugar *Bam*HI del vector pECM2, obteniendo el plásmido pEC1C1' (ver Anexo A3.3 y Tabla A4.3). Al introducir el plásmido pEC1C1' en la cepa doble interrumpida para los genes *CgarsC1* y *CgarsC2* de las arseniato reductasas (*C. glutamicum* ArsC1-C2; Ordóñez *et al.* 2009) se observó un nivel de resistencia a As(V) similar al que observaron Ordóñez *et al.*, (2009) para la cepa *C. glutamicum* ArsC1-C2 conteniendo el vector bifuncional pEC1 (el gen *CgarsC1* está expresado bajo el P_{kan} ; Tabla A4.2) (Figura 3.37B). Estos resultados nos hicieron pensar si el extremo N-terminal de 78 residuos presente

en la proteína CgArsC1', pero ausente en la mayoría de las proteínas homólogas a la reductasa SaArsC, podría causar un efecto negativo en la actividad arseniato reductasa de la proteína CgArsC1'.

Por lo tanto, para determinar si el extremo N-terminal presente en la proteína CgArsC1' de *C. glutamicum* pudiera ser el causante de la aparente carencia de actividad por parte de CgArsC1', se clonó y sobreexpresó la versión truncada del gen *CgarsC1'* (*CgarsC1'T*; sin los 234 nucleótidos del extremo 5' que codifican para los 78 residuos del extremo N-terminal de la proteína CgArsC1'T) bajo el promotor P_{kan} siguiendo un protocolo equivalente al descrito previamente. El plásmido bifuncional obtenido pEC1'T (ver Anexo A3.3 y Tabla A4.3) se introdujo en la cepa *C. glutamicum* ArsC1-C2; la cepa recombinante presentó niveles de resistencia a As(V) similares a los de la cepa original *C. glutamicum* ArsC1-C2 y a los del mutante *C. glutamicum* ArsC1-C2 conteniendo el vector bifuncional pEC1' (el gen *CgarsC1'* se encuentra bajo el P_{kan} ; Tabla A4.2) que observaron Ordóñez *et al.*, (2009) (Figura 3.37B). Con estos resultados se deduce que el extremo N-terminal no parece tener un efecto directo en la actividad arseniato reductasa de la proteína CgArsC1' en *C. glutamicum*; la presencia o ausencia del extremo N-terminal no modificó los niveles de resistencia a As(V).

Dado que los resultados de interrupción y sobreexpresión anteriores no dan evidencia de una participación de la proteína CgArsC1' en la resistencia a As(V), se realizaron análisis más precisos de identificación de la actividad arseniato reductasa en la proteína CgArsC1'. Para ello, se realizaron estudios de acumulación de As total mediante análisis de ICP-MS a lo largo del tiempo en presencia de bajas cantidades de As(V) en los siguientes mutantes de *C. glutamicum*: *C. glutamicum* ArsC1-C2 (mutante carente de las proteínas CgArsC1 y CgArsC2), *C. glutamicum* MshC [mutante incapaz de sintetizar micotiol (MSH), Tabla A4.4], y *C. glutamicum* Δ Ars (mutante deleciónado en los operones *ars1* y *ars2* que por tanto carece de los genes *CgarsC1*, *CgarsC2* y *CgarsC1'*). Como se observa en la Figura 3.38A el nivel de As acumulado en los mutantes incrementó a lo largo de 180 minutos en comparación con la cepa original *C. glutamicum* RES167, donde la cantidad de As acumulada es muy baja. Sin embargo, en las cepas *C. glutamicum* ArsC1-C2 y MshC, las cuales presentan el gen *CgarsC1'* y todas las arsenito permeasas, se observó una pequeña disminución de la cantidad de As acumulado a lo largo del tiempo cuando las concentraciones de As(V) añadidas en la mezcla de reacción fueron bajas (menores de 25 μ M), efecto que no se observó en el mutante *C. glutamicum* Δ Ars. Estos resultados parecen indicar que en ausencia de las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 (las dos dependientes de MSH) o en ausencia de MSH el cual impide el reciclaje de las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 y la reducción del As(V), un

cierto porcentaje del As(V) incorporado en la célula parece ser reducido a As(III) y este As(III) recién formado podría liberarse al exterior de la célula a través de las arsenito permeasas presentes en las cepas *C. glutamicum* ArsC1-C2 y MshC. En cambio en el mutante *C. glutamicum* 2Δars la ausencia de arseniato reductasas y de arsenito permeasas funcionales impediría en primer lugar la reducción del As(V) y su posterior salida del As(III) formado.

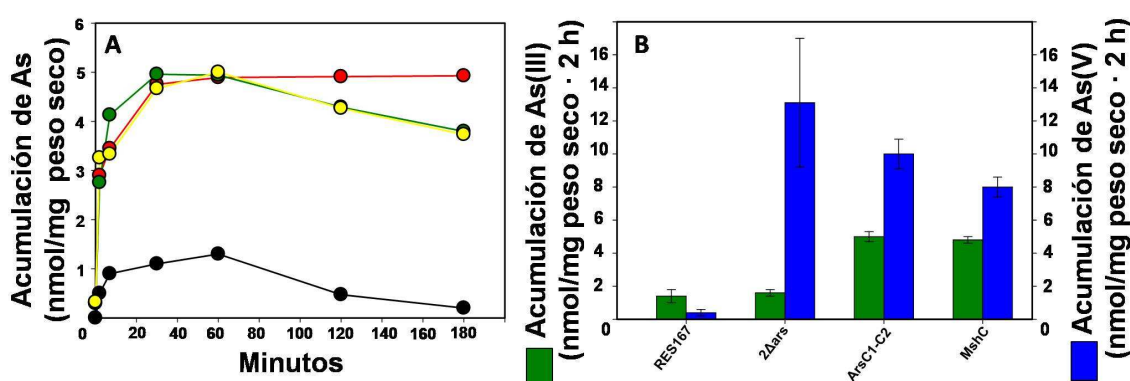


Figura 3.38. (A) Acumulación de As total en presencia de As(V) 10 μ M a lo largo de 180 minutos. **(B)** Cantidad de As(III) (verde) y As(V) (azul) acumulada en presencia de As(V) 10 μ M a las 2 horas de incubación. Las cepas utilizadas en A y B son: *C. glutamicum* RES167 (negra; RES167); *C. glutamicum* 2Δars (roja; 2Δars); *C. glutamicum* ArsC1-C2 (verde; ArsC1-C2); *C. glutamicum* MshC (amarilla; MshC).

Para comprobar esta hipótesis, se midió la cantidad de As(III) y As(V) en los tres mutantes de *C. glutamicum* indicados anteriormente a baja concentración de As(V) y a tiempos largos mediante técnicas de espectrometría de absorción atómica. En la cepa *C. glutamicum* RES167 la cantidad de As(V) presente fue mucho menor que en los mutantes *C. glutamicum* ArsC1-C2, MshC o 2Δars (Figura 3.38B), lo que refleja el perfecto funcionamiento de las arseniato reductasas y arsenito permeasas en *C. glutamicum* RES167. En cuanto a la cantidad de As(III), el mutante *C. glutamicum* 2Δars acumuló similares cantidades de As(III) que la cepa original *C. glutamicum* RES167, lo que significa que el As en *C. glutamicum* 2Δars se acumula principalmente en forma de As(V) (Figura 3.38B); sin embargo en los mutantes *C. glutamicum* ArsC1-C2 y MshC la cantidad de As(III) acumulada fue 3-4 veces mayor que en la cepa original (Figura 3.38B), y el nivel de As(V) retenido se vio disminuido en comparación con la cantidad de As(V) acumulado en el mutante *C. glutamicum* 2Δars. Esto parece confirmar que en los mutantes *C. glutamicum* ArsC1-C2 y MshC algo de As(V) se está reduciendo a As(III) y esa producción de As(III) podría ser atribuida a la arseniato reductasa CgArsC1' presente en ambos mutantes. En todo caso la actividad reductasa asociada a la enzima CgArsC1' *in vivo* sería

residual y no seríamos capaces de detectarla mediante ensayos de resistencia/sensibilidad en medios de cultivo líquido.

3.2.1.3. La arseniato reductasa CgArsC1' esta acoplada al sistema redox Trx/TrxR.

Los análisis filogenéticos realizados relacionan a la proteína CgArsC1' de *C. glutamicum* con la arseniato reductasa SaArsC del plásmido pl258 de *S. aureus* (Figura 3.32). Además, la identificación en el genoma de *C. glutamicum* de un par redox Trx/TrxR funcional (Ordóñez *et al.*, 2009) y la conservación de las tres cisteínas críticas del proceso de catálisis, hacen pensar que la reductasa CgArsC1' podría estar acoplada al sistema Trx/TrxR indicado de transferencia de electrones.

Para corroborar esta hipótesis se reprodujo *in vitro* el modelo establecido por Messens *et al.* (2002a) donde la reductasa SaArsC de *S. aureus* cataliza la reducción de As(V) a As(III); en esta reacción el As(V) actúa como aceptor final de electrones mientras que la reductasa SaArsC y los componentes del par Trx/TrxR son intermediarios de una cascada redox en la que el NADPH es el donador inicial de electrones. Para ello el gen *CgarsC1'* de *C. glutamicum* y la versión truncada *CgarsC1'T* (careciendo del fragmento génico que codifica para los primeros 78 aminoácidos) se clonaron en el plásmido pET28a(+) quedando las proteínas fusionadas a una cola de histidinas en el extremo amino terminal obteniendo los plásmidos pETarsC1' y pETarsC1'T, respectivamente (Anexo A3.1). A partir de estas construcciones las reductasas CgArsC1' y CgArsC1'T se sobreexpresaron y purificaron de *E. coli* BL21(DE3); las enzimas CgTrx y CgTrxR de *C. glutamicum* fueron purificadas según se describió anteriormente (Ordóñez *et al.*, 2009). En la mezcla de reacción las proteínas CgArsC1' y CgArsC1'T se incubaron por separado en presencia de CgTrx, CgTrxR, NADPH y adicionando As(V) como activador y último componente de la reacción. La monitorización de la reacción se llevó a cabo mediante el seguimiento del consumo de NADPH y valorado por la disminución de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro. Como se observa en la Figura 3.39A las proteínas CgArsC1' y CgArsC1'T de *C. glutamicum* son capaces de recibir electrones del par redox Trx/TrxR, al observarse disminución de la absorbancia. Esto confirma que la proteína CgArsC1' y su versión truncada CgArsC1'T se acoplan al mecanismo de acción dependiente de Trx/TrxR, de forma similar a lo descrito para la proteína SaArsC (Messens *et al.*, 2002a) y que el dominio N-terminal no es esencial para la actividad catalítica de la enzima.

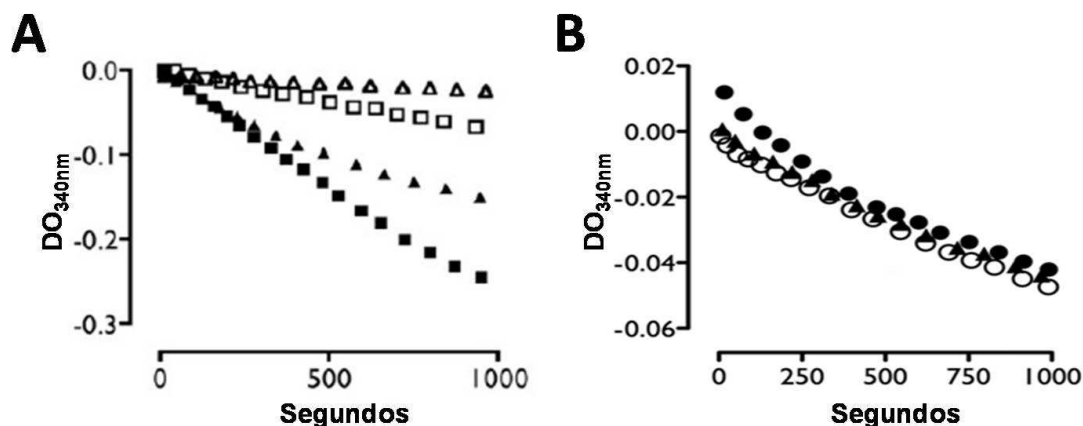


Figura 3.39. Análisis de acoplamiento de la proteína CgArsC1' y la versión truncada CgArsC1'T a los sistemas redox Trx/TrxR (A) y MSH/Mrx1 (B), en presencia de As(V) 100 mM. El acoplamiento se siguió observando el consumo de NADPH mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm. Los símbolos blancos representan las reacciones en ausencia de arseniato reductasa (controles negativos; ○, △ y □) y los símbolos negros representan las reacciones en presencia de arseniato reductasa: (■ ó ●) CgArsC1' y (▲) CgArsC1'T.

Recientemente se ha identificado en *C. glutamicum* un sistema redox formado por micotiol (MSH) y micorredoxina 1 (CgMrx1) (Ordóñez *et al.*, 2009) que se asocia con la reducción de As(V) a As(III) mediante las reductasas CgArsC1 y CgArsC2. Para descartar que la enzima CgArsC1' de *C. glutamicum* y su versión truncada CgArsC1'T pudieran actuar con un sistema diferente al mecanismo redox Trx/TrxR, las reductasas CgArsC1' y CgArsC1'T fueron acopladas *in vitro* al sistema MSH/Mrx1 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.11.3. de Materiales y métodos. Sin embargo no se observó acoplamiento alguno entre las proteínas CgArsC1' y CgArsC1'T y el sistema MSH/Mrx1, como se constata por la no diferencia de consumo de NADPH en presencia y ausencia de arseniato reductasa CgArsC1' o CgArsC1'T en la mezcla de reacción (Figura 3.39B).

3.2.1.4. La proteína CgArsC4 no está implicada en la resistencia a arseniato en *C. glutamicum*.

Hasta la fecha no hemos detectado ni la actividad arseniato reductasa ligada a la enzima CgArsC4 (Ordóñez *et al.*, 2009) ni la presencia de la proteína en ensayos *in vivo*. Puesto que filogenéticamente CgArsC4 parece tener un mecanismo de acción diferente al resto de las arseniato reductasas de *C. glutamicum* se pasó a analizar la proteína CgArsC4 *in vitro* e *in vivo* en mayor detalle.

Para evaluar la actividad arseniato reductasa de la proteína CgArsC4 *in vitro* mediante acoplamiento enzimático ligado a los dos sistemas redox presentes en *C. glutamicum* MSH/Mrx1 (Ordóñez *et al.*, 2009) y Trx/TrxR (Fanous *et al.*, 2008), inicialmente se purificaron los diferentes componentes para cada uno de los dos sistemas redox; la proteína CgArsC4 fusionada a la cola de histidinas procedente de la expresión del plásmido pETarsC4 (ver Anexo A3.1 y Tabla A4.3) en la cepa *E. coli* BL21(DE3) fue purificada, las proteínas CgTrx, CgTrxR, CgMrx1 y micotona reductasa (CgMTR) y el compuesto micotiol (MSH) fueron purificados como se ha descrito previamente (Ordóñez *et al.*, 2009). En la mezcla de reacción la proteína CgArsC4 se incubó en presencia de CgMrx1, CgMTR y MSH (para el sistema MSH/Mrx1) o en presencia de CgTrx y CgTrxR de *C. glutamicum* (para el sistema Trx/TrxR), junto con NADPH y As(V). Las dos reacciones se siguieron por la disminución de la absorbancia a 340 nm, disminución que está acoplada al consumo de NADPH (Figura 3.40A y B). Ninguna de estas dos reacciones generó transferencia de electrones, por lo que parece que la proteína CgArsC4 no se acopla a cualquiera de estos sistemas de reducción indicados.

Dado que la proteína CgArsC4 se encuentra filogenéticamente relacionada con la arseniato reductasa EcArsC del plásmido R773 de *E. coli* (Figura 3.32), esta enzima podría estar acoplada al sistema glutatión (GSH)/glutarredoxina (Grx) de transferencia de electrones. Debido a ello nos propusimos evaluar esta posibilidad mediante acoplamiento de la proteína CgArsC4 al sistema redox GSH/Grx. Para ello seguimos el consumo de NADPH de una mezcla de reacción formada por glutarredoxina 2 de *E. coli* (EcGrx2), glutatión reductasa (EcGTR) de *E. coli*, CgArsC4, NADPH y As(V). La mezcla de reacción de todos los componentes excepto la reductasa CgArsC4 provocó una importante disminución de la absorbancia a 340 nm, sin embargo esa disminución no se vio modificada al añadir la proteína CgArsC4, lo que implicaría una carencia de acoplamiento de la enzima CgArsC4 al sistema redox GSH/Grx (Figura 3.40C). El resultado obtenido es coherente dado que en general las actinobacterias carecen de GSH (Johnson *et al.*, 2009), lo que en sentido estricto imposibilitaría un mecanismo de reacción de este tipo para sus representantes. Estos resultados abundarían en la posibilidad de que la reductasa CgArsC4 no sea funcional.

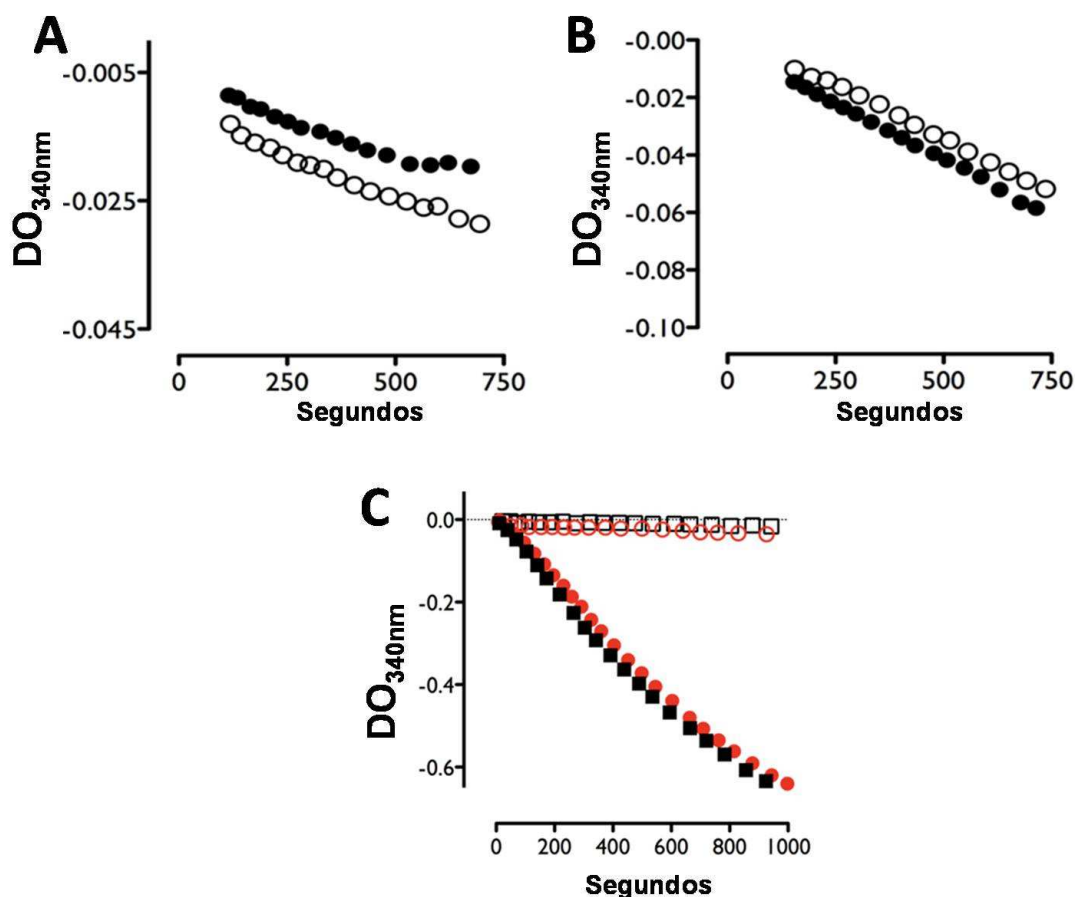


Figura 3.40. Análisis de acoplamiento de la proteína CgArsC4 a los sistemas redox MSH/Mrx1 (**A**), Trx/TrxR (**B**) y GSH/Grx (**C**), en presencia de As(V). El acoplamiento se siguió observando el consumo de NADPH mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm. En los paneles (**A**) y (**B**) los círculos blancos representan las reacciones en ausencia de arseniato reductasa (controles negativos) y los círculos negros representan las reacciones en presencia de arseniato reductasa. En el panel (**C**) los símbolos contienen los siguientes componentes en la mezcla de reacción además de As(V) y NADPH: (□) EcGTR; (○) EcGTR y EcGrx2; (●) EcGTR, EcGrx2 y GSH y (■) EcGTR, EcGrx2, GSH y CgArsC4.

También se analizó en mayor detalle la funcionalidad de la proteína CgArsC4 *in vivo*. Para ello se pasó a interrumpir el gen *CgarsC4*; un fragmento interno del gen *CgarsC4* fue clonado en el plásmido movilizable y suicida de corinebacterias pOJ260 (ver Anexo A3.2 y Tabla A4.2). El plásmido obtenido (pOarsC4int; Tabla A4.3) fue transferido mediante conjugación a las cepas *C. glutamicum* RES167 y a *C. glutamicum* 2 Δ ars donde se integra mediante recombinación homóloga, obteniendo la copia del gen *CgarsC4* interrumpida (Figura 3.41A). Tras este proceso, los transconjugantes obtenidos carentes de la proteína CgArsC4 (*C. glutamicum* ArsC4; Tabla A4.5) o carentes de las cuatro arseniato reductasas (*C. glutamicum*

2 Δ ars_ArsC4; Tabla A4.5) presentan el mismo nivel de resistencia a As(V) que sus respectivas cepas originales (Figura 3.41B); tampoco se observaron variaciones en los niveles de resistencia a As(V) de aquellos clones que fueron complementados homóloga y heterológamente en *E. coli* con el gen *CgarsC4* (Ordóñez *et al.*, 2009). La combinación de todos los resultados *in vivo* e *in vitro*, sugieren que la proteína CgArsC4, no tiene actividad arseniato reductasa en *C. glutamicum*.

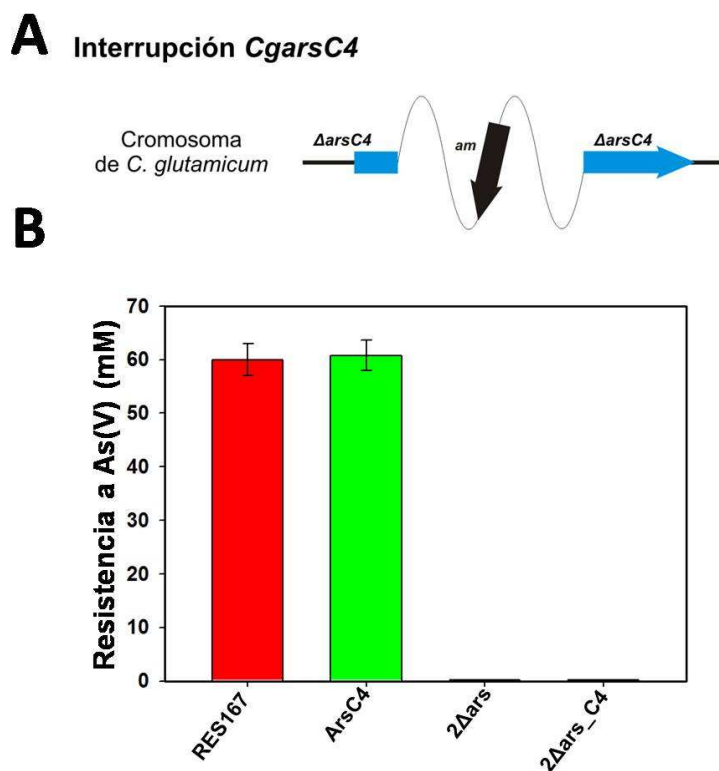


Figura 3.41. (A) Esquema resumido de la interrupción génica de *CgarsC4*. **(B)** Análisis de resistencia a As(V) en las cepas: *C. glutamicum* RES167 (RES167); *C. glutamicum* ArsC4 (ArsC4); *C. glutamicum* 2 Δ ars (2 Δ ars); *C. glutamicum* 2 Δ ars_ArsC4 (2 Δ ars_C4). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

3.2.2. Análisis de acumulación de arseniato en *C. glutamicum* y su aplicación en procesos de biorremediación.

El As(V) es la forma más oxidada de As y la especie dominante en ambientes aeróbicos y con valores de pH próximos a la neutralidad. Por lo tanto el As(V) es quizás la especie de As con mayor interés para conseguir su inmovilización o eliminación de ambientes acuáticos o del suelo.

Feo *et al.* (2007) determinaron que la entrada de arseniato en *C. glutamicum* se realiza a través de los sistemas de incorporación de fosfato, y que se observa una inhibición de la entrada de arseniato en *C. glutamicum* en presencia de concentraciones de fosfato superiores a 1 mM. Al igual que el fosfato, también se ha observado que los nitratos producen interferencias en la entrada de arseniato en *C. glutamicum* (Figura 3.42A). Concentraciones superiores a 10 mM de nitrato disminuyen drásticamente la incorporación de arseniato; es posible que exista igualmente una competencia en la entrada entre el arseniato y el nitrato dado que el nitrógeno pertenece al mismo grupo de la tabla periódica que el arsénico. En cambio el antimoniato no influye en la incorporación de arseniato en *C. glutamicum* (Figura 3.42B) incluso en presencia de mil veces más cantidad de antimoniato, elemento éste que pertenece también al mismo grupo de la tabla periódica y que presenta una estructura química muy parecida al fosfato y al arseniato (Bienert *et al.*, 2008).

Hasta la fecha no se han descrito sistemas de expulsión de arseniato en las células. La existencia de posibles transportadores para la salida de arseniato correría el riesgo de una expulsión también del fosfato (por su homología estructural), de forma similar a lo que ocurre en los sistemas de entrada, y esta situación no sería nada ventajosa para la célula dado que el fosfato es un elemento esencial y escaso. De esta forma los mutantes de *C. glutamicum* incapaces de transformar As(V) a As(III) constituirían un buen sistema de retención de As(V).

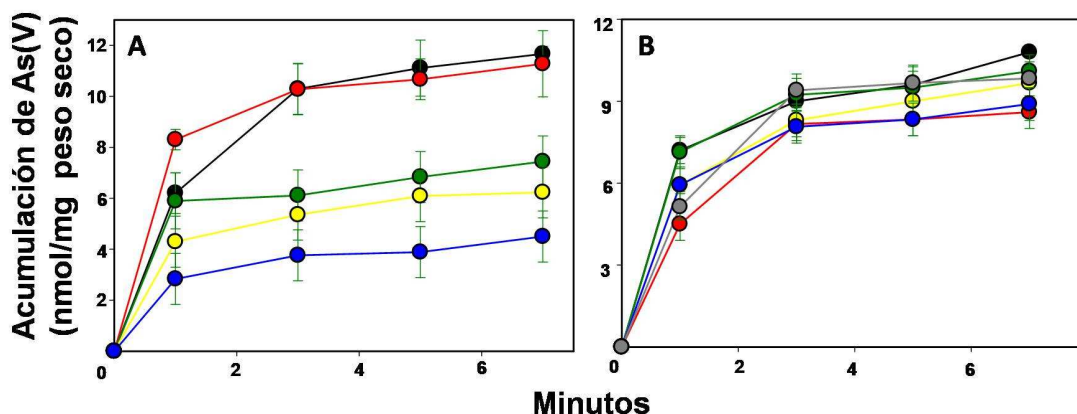


Figura 3.42. Competencia de incorporación de arseniato en *C. glutamicum* en presencia de diferentes concentraciones de nitrato **(A)**: 0 mM (negra); 1 mM (roja); 10 mM (verde); 2 M (amarilla) o 5 M (azul) o antimonio **(B)**: 0 mM (negra); 5 mM (amarilla); 15 mM (azul); 40 mM (roja); 80 mM (gris) o 100 mM (verde). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes y en presencia de 100 μ M de As(V) total.

Para comprobar la hipótesis de que mutantes de *C. glutamicum* incapaces de llevar a cabo la reducción de As(V) a As(III) pudieran ser capaces de acumular As(V), se utilizaron células en reposo (*resting cells*) de diferentes mutantes de *C. glutamicum* en ensayos de incorporación de As(V) bajo condiciones óptimas de incorporación a lo largo de 2 horas. La acumulación de As(V) en diferentes microorganismos se ha visto afectada por parámetros físicos como el pH y la temperatura y por factores químicos como la concentración de fosfato y de arseniato presente en el medio (Partey *et al.*, 2008). Por ello se realizaron análisis para optimizar los ensayos de acumulación de As(V) en la cepa *C. glutamicum* ATCC 13032 variando los factores anteriormente mencionados; como condiciones óptimas de acumulación de As(V) en *C. glutamicum* se establecieron las siguientes: pH 7,3; temperatura 37°C; 100 μ M de arseniato; en ausencia de fosfato y a dos horas de incubación. Como se observa en la Figura 3.43 el mutante que carece de las reductasas CgArsC1 y CgArsC2 (*C. glutamicum* ArsC1-C2) acumula 30 veces más cantidad de As(V) que la cepa silvestre (*C. glutamicum* ATCC 13032). Por el contrario, en los mutantes interrumpidos simple de los genes para las arseniato reductasas *CgarsC1* (*C. glutamicum* ArsC1; Tabla A4.4) o *CgarsC2* (*C. glutamicum* ArsC2; Tabla A4.4) retienen la misma cantidad de As(V) que la cepa silvestre (Figura 3.43); esto indicaría que las dos arseniato reductasas tienen un grado de participación equivalente en la resistencia a As(V) y la ausencia de una de las reductasas es contrarrestada con la actividad de la otra. Cuando los análisis de retención se realizaron con el mutante *C. glutamicum* 2 Δ ars (cepa que carece de los dos operones *ars*), la cantidad de As(V) acumulada fue similar a la observada en la cepa *C.*

glutamicum ArsC1-C2 (Figura 3.43). De igual manera, los ensayos de resistencia a As(V) corroboraron estos resultados; una mayor acumulación del metaloide en la célula conlleva una mayor sensibilidad a arseniato, ya que el arseniato presente en la célula ejerce efectos tóxicos por sustitución del fosfato por el arseniato en muchos procesos metabólicos (Rosen *et al.*, 2011).

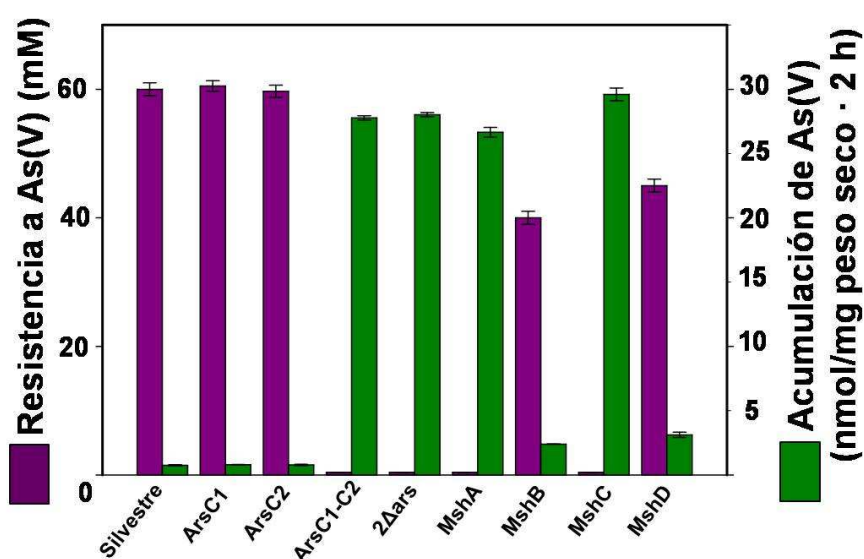


Figura 3.43. Análisis de resistencia (morado) y acumulación de As(V) (verde) en diferentes mutantes de *C. glutamicum*. Se comparan los resultados obtenidos en tres experimentos independientes de las cepas: *C. glutamicum* ATCC 13032 (Silvestre), *C. glutamicum* ArsC1 (ArsC1), *C. glutamicum* ArsC2 (ArsC2), *C. glutamicum* ArsC1-C2 (ArsC1-C2), *C. glutamicum* 2Δars (2Δars), *C. glutamicum* MshA (MshA), *C. glutamicum* MshB (MshB), *C. glutamicum* MshC (MshC) y *C. glutamicum* MshD (MshD). El ensayo de acumulación de As(V) se presenta a las 2 horas y en presencia de 100 μM de As(V) total.

Las enzimas arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 de *C. glutamicum* necesitan micotiol (MSH) para realizar su proceso catalítico. Debido a la implicación del MSH en la reducción de As(V) en *C. glutamicum*, se pensó que la utilización de mutantes afectados en los genes de la síntesis de MSH de *C. glutamicum* podrían ser capaces de acumular As(V). Para comprobar esta hipótesis los diferentes mutantes afectados en la síntesis de MSH (*C. glutamicum* MshA, MshB, MshC, MshD; Tabla A4.4) fueron analizados en ensayos de retención de As(V) y valorados mediante ICP-MS. Como era de esperar los mutantes *C. glutamicum* MshA y *C. glutamicum* MshC fueron los clones con mayor capacidad para retener As(V) (Figura 3.43), al tener bloqueada prácticamente por completo la síntesis de MSH (Feng *et al.*, 2006). El resto de

los mutantes afectados en los genes de la síntesis de MSH (*C. glutamicum* MshB y *C. glutamicum* MshD) mantienen cierta capacidad para sintetizar MSH aunque en niveles inferiores a la cepa silvestre y presentan un nivel de resistencia y acumulación de As(V) más similares a la cepa silvestre *C. glutamicum* ATCC 13032 (Figura 3.43).

Se han desarrollado diferentes estrategias en bacterias para aumentar la acumulación de As(III), como la sobreexpresión de metalotioneinas o fitoquelatinas (Singh *et al.*, 2008a; Singh *et al.*, 2010), sin embargo, la utilización de secuestradores intracelulares con capacidad quelante de As(V) no han sido suficientemente investigados. La especie *C. glutamicum* presenta la capacidad de sintetizar gránulos de polifosfato inorgánicos (gránulos de volutina) mediante la acción de las enzimas polifosfato kinasas (CgPPKs), existiendo dos en *C. glutamicum*, CgPPK2A y CgPPK2B (Lindner *et al.*, 2007). Debido a la similitud estructural entre el fosfato y el arseniato, decidimos investigar si la sobreexpresión de CgPPKs en *C. glutamicum* provocaría un incremento en la acumulación de As(V) como una posible generación de estructuras inertes de arseno-volutina. Para ello los genes *Cgppk2A* y *Cgppk2B* fueron clonados en el plásmido pHXisNpro, para ponerlos bajo el promotor P_{kan} , y posteriormente fueron subclonados en el vector pECM2, obteniendo los plásmidos pEPPK2A y pEPPK2B (ver Anexo A3.3 y Tabla A4.3); estos plásmidos se transfirieron mediante conjugación a los mutantes *C. glutamicum* ArsC1-C2 y *C. glutamicum* 2 Δ ars. Los transconjugantes obtenidos se incubaron en presencia de As(V) y se determinó la cantidad de As(V) acumulado a lo largo de 2 horas mediante análisis de ICP-MS. Como resultado de los ensayos se observó que los mutantes que sobreexpresan las enzimas polifosfato kinasas CgPPK2A y CgPPK2B acumulan cantidades de As(V) similares a las cepas originales (*C. glutamicum* ArsC1-C2 o 2 Δ ars) o a las cepas originales con el vector pECM2 sin los genes *Cgppk2s* (Figura 3.44).

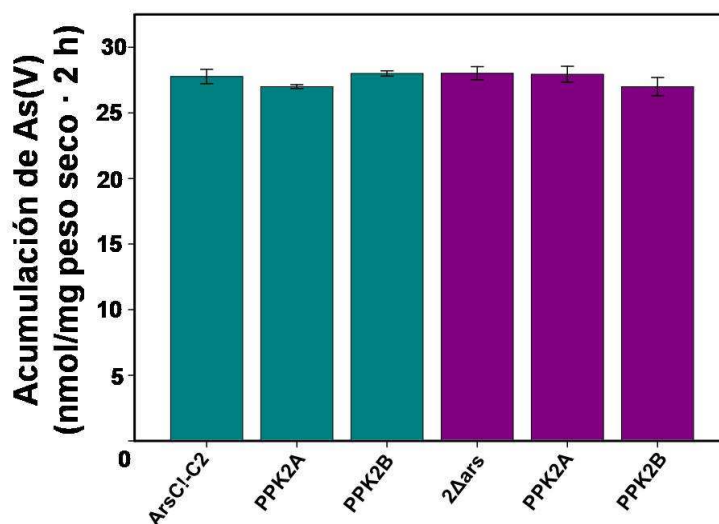


Figura 3.44. Acumulación de As(V) en células de *C. glutamicum* a las 2 horas de incubación en presencia de As(V) 100 μ M: *C. glutamicum* ArsC1-C2 (ArsC1-C2) y *C. glutamicum* 2Δars (2Δars). Ensayos de expresión de los genes *Cgppk2A* (PPK2A) y *Cgppk2B* (PPK2B) en *C. glutamicum* ArsC1-C2 (azul) y en *C. glutamicum* 2Δars (morado). Los resultados son obtenidos de tres experimentos independientes.

Los resultados mostrados anteriormente, sugieren que los mutantes *C. glutamicum* ArsC1-C2, *C. glutamicum* 2Δars, *C. glutamicum* MshA y *C. glutamicum* MshC podrían ser utilizados en procesos de bioacumulación de As(V) de ambientes contaminados.

3.3. Discusión general.

Los mecanismos de resistencia a As han sido estudiados en una gran variedad de organismos: bacterias, hongos, arqueas, plantas e incluso animales. Los análisis genético-moleculares de los sistemas de resistencia a As han sido realizados en muchos microorganismos, y los genes que participan en esa resistencia se encuentran ampliamente distribuidos, incluso con mayor frecuencia que los genes implicados en la vía de biosíntesis de aminoácidos como el triptófano (Silver & Phung, 2005b). En la especie saprófita *Corynebacterium glutamicum* se han identificado dos operones *ars* de resistencia a arsénico funcionales (*ars1* y *ars2*) y dos genes adicionales dispersos por el cromosoma (*Cgacr3-3* y *CgarsC4*) (Ordóñez *et al.*, 2005). Otros miembros saprófitos del grupo de las corinebacterias como *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium efficiens* y otras especies filogenéticamente relacionadas como *Brevibacterium linens* y *Microbacterium* sp. (Achour-Rokbani *et al.*, 2010) también presentan al menos un operón *ars* y genes *ars* adicionales en su genoma (Figura 3.45). Por otro lado, especies patógenas como *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum* o la micobacteria *Mycobacterium tuberculosis* tienen un único operón *ars* con una estructura de tres componentes *arsRBC*; en la corinebacteria patógena *Corynebacterium diphtheriae*, sin embargo, se han identificado dos genes *ars*, *CdarsC* y *CdarsR*, distantes el uno del otro en el cromosoma (Figura 3.45). Por lo tanto parece que una presión evolutiva podría conducir a una mayor o menor presencia de genes y operones de resistencia a arsénico en el genoma de los microorganismos dependiendo del hábitat en el que se encuentren. Las bacterias saprófitas pueden encontrarse con mayor frecuencia en contacto con As, lo que condicionaría la presencia de un mayor número de genes *ars* en sus genomas, mientras que las ocasiones en las que se pueden encontrar las especies patógenas con el As son más bien escasas conllevando a la presencia de un menor número de genes *ars*.

La existencia de varios operones de resistencia a As en el genoma de la misma bacteria como se observa en *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2005) no es un hecho frecuente, aunque se han encontrado también en bacterias como *Pseudomonas putida* (Cánovas *et al.*, 2003), *Ochrobactrum tritici* (Branco *et al.*, 2008) y *Herminiimonas arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007), entre otros (Figura 1.9). Sin embargo se han realizado pocos análisis de caracterización detallada del papel de cada uno de los genes en los respectivos operones *ars*.

El primer paso de la desintoxicación de As consiste en la transformación de As(V) a As(III). La ubicuidad de la especie oxidada As(V) en un ambiente mayoritariamente aeróbico ha permitido la evolución convergente de las enzimas arseniato reductasas (Messens & Silver, 2006). Actualmente se han identificado tres familias de arseniato reductasas en función de su mecanismo de acción: (i) las arseniato reductasas dependientes de tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TrxR); (ii) las dependientes de glutatión (GSH) y glutarredoxina (Grx) y (iii) las dependientes de micotiol (MSH) y micorredoxina (Mrx) (Ordóñez *et al.*, 2009). Según la bibliografía científica, hasta la fecha todas las enzimas arseniato reductasas presentes en el mismo microorganismo se acoplaban al mismo sistema redox. Sin embargo, recientemente en el genoma de *Ochrobactrum tritici* se han identificado arseniato reductasas que aparentemente pertenecen a dos familias diferentes, aunque el mecanismo redox de estas proteínas no ha sido desvelado (Branco *et al.*, 2008). El análisis de homología de secuencias en diferentes especies de actinobacterias como *B. linens*, *Rhodococcus erythropolis* y *Mycobacterium smegmatis* ha desvelado la presencia de genes pertenecientes a dos familias de arseniato reductasas en el mismo microorganismo (Figura 3.45), pero también se han identificado miembros de actinobacterias con genes pertenecientes a tres familias de arseniato reductasas como *C. efficiens*, *Nocardia farcinica* y *C. glutamicum* (Figura 3.45).

C. glutamicum es uno de los pocos microorganismos donde se han identificado cuatro genes que codifican para cuatro hipotéticas arseniato reductasas y donde se ha desvelado el mecanismo redox de todas ellas. Dos de las arseniato reductasas, CgArsC1 y CgArsC2, han sido recientemente caracterizadas *in vivo* e *in vitro*, estando asociadas al sistema redox de MSH/Mrx1 (Ordóñez *et al.* 2009); durante el desarrollo de la presente memoria hemos analizado las otras dos arseniato reductasas de *C. glutamicum*, CgArsC4 y CgArsC1'.

La proteína CgArsC4 está relacionada filogenéticamente con las arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx, sin embargo no ha podido ser detecta *in vivo* en *C. glutamicum* (Figura 3.35C). Este resultado se ha visto corroborado con la carencia de funcionalidad de la enzima CgArsC4 en los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados (Figuras 3.40 y 3.41). En general las actinobacterias carecen de GSH (Johnson *et al.*, 2009), por lo cual no parecería normal la presencia de estas arseniato reductasas en diferentes especies de actinobacterias (Figuras 3.32 y 3.45); pero por otra parte parece coherente que la proteína CgArsC4 no se exprese en *C. glutamicum* y que haya perdido la capacidad de reducción de As(V) *in vitro* o que simplemente nunca la haya adquirido.

La enzima arseniato reductasa CgArsC1' está relacionada filogenéticamente con las arseniato reductasas dependientes de Trx/TrxR (Figura 3.32) y presenta un funcionamiento residual *in vivo* (Figura 3.38), quizás debido a su bajo nivel de expresión en comparación con las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 (Figura 3.35). Sin embargo, los análisis *in vitro* permiten acoplar la proteína CgArsC1' con el sistema redox de Trx/TrxR (Figura 3.39), con una constante específica (K_M) de $3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Messens, comunicación personal); valor de tres órdenes de magnitud superior al identificado para las otras arseniato reductasas funcionales CgArsC1 y CgArsC2 de *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2009). Así, su bajo nivel de expresión se contrarrestaría con una elevada velocidad enzimática, similar a la de la proteína SaArsC de *S. aureus* (Zeger *et al.*, 2001), liberando As(III) a partir de As(V) antes de que CgArsC1' sea regenerada por la Trx.

El alineamiento de las diferentes proteínas ArsC1' nos ha permitido identificar un claro dominio amino terminal (N-terminal) presente en las proteínas ArsC1' de *C. glutamicum* (CgArsC1'), de *C. efficiens* (CeArsC1'), de *R. erythropolis* (ReArsC1'), de *N. farcinica* (NfArsC1') y de *B. linens* (BlArsC1') y no compartido por otras arseniato reductasas de actinobacterias (Figura 3.34). Todos los microorganismos que tienen el gen para la proteína ArsC1' (con el dominio N-terminal), presentan además otro gen que codifica para una arseniato reductasa truncada ArsC1'T (sin el dominio N-terminal) (Figura 3.45), excepto la especie *C. glutamicum* que sólo tiene la versión CgArsC1' con un extremo N-terminal de 78 aminoácidos. Por otra parte las especies *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *S. coelicolor* presentan sólo la versión truncada de la proteína ArsC1' (ArsC1'T) (Figura 3.34 y 3.45). La eliminación del extremo N-terminal de la proteína CgArsC1' de *C. glutamicum* ha provocado una disminución de la actividad reductasa *in vitro* (Figura 3.39). Se ha observado que la proteína CgArsC1' actúa como un homodímero y presenta actividad tirosina fosfatasa (PTPasa) en presencia de pNpp (p-nitrofenil fosfato) (Messens, comunicación personal), al igual que la proteína SaArsC de *S. aureus* (Zeger *et al.*, 2001); la actividad fosfatasa de la proteína CgArsC1' desaparece en la versión truncada CgArsC1'T (Messens, comunicación personal). Por lo tanto parece que el extremo N-terminal de CgArsC1' es importante para la dimerización, la funcionalidad y la actividad fosfatasa de la proteína CgArsC1'.

Durante el desarrollo de esta memoria también se han caracterizado las arsenito permeasas de *C. glutamicum* implicadas en la liberación del As(III) formado o recién incorporado. La especie *C. glutamicum* es uno de los pocos microorganismos donde se han identificado tres arsenito permeasas (CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3) y pertenecientes a la misma familia. La familia Acr3 es el grupo de arsenito permeasas más extenso y cuyos miembros se encuentran

presentes tanto en eucariotas como en procariotas (Achour *et al.*, 2007). Sin embargo, solamente las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 son funcionales en *C. glutamicum*; el 80% de la resistencia a As(III) de *C. glutamicum* es proporcionada por la arsenito permeasa CgAcr3-1, mientras que el 20% restante es aportado por la proteína CgAcr3-2 (Figura 3.10). El diferente nivel de participación de las dos proteínas podría ser causado por una mayor expresión de la proteína CgAcr3-1 debido a una mayor eficiencia transcripcional del operón *ars1* (Ordóñez *et al.*, 2005), sin embargo la cantidad de proteína CgAcr3-1 y CgAcr3-2 en la fracción de membrana en *C. glutamicum* ha resultado ser equivalente (Figura 3.11). Las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 presentan un elevado grado de homología (72%), siendo esta homología más elevada en las regiones transmembrana y no tanto en los *loops* intra y extracelulares (Figura 3.22A). Un menor grado de homología de los *loops* intracelulares entre las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 podría estar relacionado con una menor capacidad de captación inicial del As(III) citoplasmático por parte de la proteína CgAcr3-2, justificando así su menor grado de participación en la resistencia a As(III).

La permeasa CgAcr3-3, a diferencia de las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2, no participa en la resistencia a As(III) en *C. glutamicum* (Figura 3.5 y 3.7), quizás debido a la ausencia de dos o tres segmentos transmembrana (Figura 3.8) que provocarían una localización anormal de la proteína en la membrana, o por la ausencia de diferentes aminoácidos hidrofóbicos transmembranales conservados en otras proteínas Acr3 (Figura 3.22A; K72, R210 o E305 en la proteína CgAcr3-1) que podrían estar participando en la formación del poro. Por otra parte, la expresión constitutiva del gen *Cgacr3-3* a unos niveles considerados basales (Ordóñez *et al.*, 2005) y su alejada relación filogenética con el resto de las arsenito permeasas de *C. glutamicum* (Figura 3.4) ya hacía pensar en un papel poco importante de la proteína CgAcr3-3 en la resistencia a As(III).

Uno de los aspectos importantes del transporte activo de solutos a través de la membrana es el mecanismo energético que utilizan las proteínas de membrana. Una de las hipótesis sugeridas para explicar la energía que utiliza la proteína CgAcr3-1 se basa en la hidrólisis de ATP. El análisis de la estructura primaria de la proteína CgAcr3-1 no nos ha permitido identificar sitios de unión a nucleótidos en su secuencia, lo que sugiere que la proteína CgAcr3-1 actuaría como un transportador secundario de As(III), sin estar implicado el ATP como fuente de energía; sin embargo recientemente se han identificado microorganismos con proteínas Acr3s asociadas a enzimas ArsA (Castillo & Saier, 2010) elucidando un posible mecanismo de salida de As(III) similar al complejo ArsAB de *E. coli* (Dey *et al.*, 1994).

Otra hipótesis sugerida para explicar el mecanismo energético de CgAcr3-1 en *C. glutamicum* se basa en la acción de los componentes del motivo de fuerza protónica (ΔpH o $\Delta\psi$). El análisis de la proteína CgAcr3-1 *in vivo* e *in vitro* tanto en *C. glutamicum* como en *E. coli* nos ha proporcionado la primera evidencia de que la permeasa CgAcr3-1 utiliza cualquiera de los componentes del gradiente electroquímico (ΔpH o $\Delta\psi$) para el transporte de As(III) a través de la membrana (Figuras 3.12 y 3.14), de una forma análoga a lo que ocurre con la proteína EcArsB de *E. coli* cuando transporta Sb(III) (Meng *et al.*, 2004). Dado que a pH fisiológico el As(III) se encuentra en forma polihidroxilada $[\text{As}(\text{OH})_3]$ (Meng *et al.*, 2004), los estudios realizados *in vitro* con membranas invertidas conteniendo la permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum* desvelaron que esta proteína se comporta como un antiportador de arsenito y protones (Figura 3.18); un mecanismo equivalente ha sido descrito muy recientemente para la proteína ScAcr3p de *S. cerevisiae* que pertenece a la misma familia de arsenito permeasas (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2011).

Las dos grandes familias de arsenito permeasas, ArsB y Acr3, están implicadas en el transporte de As(III). Sin embargo, las proteínas ArsB pueden transportar también Sb(III) con eficiencias mucho mayores que el As(III), mientras que las permeasas Acr3 están asociadas fundamentalmente al transporte de As(III) (Achour *et al.*, 2007); recientemente se ha descrito que en el eucariota *S. cerevisiae* la proteína arsenito permeasa ScAcr3p presenta capacidad para liberar As(III) pero también Sb(III), aunque este último con una eficiencia mucho menor (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2011). En el caso de *C. glutamicum*, las proteínas CgAcr3s están exclusivamente implicadas en la salida de As(III) (Figuras 3.13 y 3.20). Este resultado estaría en consonancia con dos aspectos relevantes en relación con el comportamiento de *C. glutamicum* en presencia de Sb(III); por una parte el bajo nivel de acumulación de Sb(III) en *C. glutamicum* (Figura 3.19B) concuerda con una pobre eficiencia en la entrada celular del mismo, y por otra parte el bajo nivel de resistencia de Sb(III) en *C. glutamicum* (Figura 3.19A) concuerda con la elevada toxicidad celular del Sb(III) [similar a la del As(III)] y con la carencia de eficientes sistemas implicados en su salida. Los problemas asociados con la entrada de Sb(III) explicarían el porqué de la no inducción *in vivo* de los operones *ars* por parte de Sb(III) en *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2005), aunque en los análisis *in vitro* el Sb(III) resultó ser un eficiente inductor de la expresión de los operones *ars* (Ordóñez *et al.*, 2008). Considerando que la entrada de Sb(III) en *C. glutamicum* es muy baja y que por lo tanto la cantidad de Sb(III) intracelular no debería de ser elevada, podemos hipotetizar que en este microorganismo no ha habido una elevada presión evolutiva encaminada a la liberación de Sb(III) por las proteínas CgAcr3s.

Una de las principales diferencias estructurales entre las proteínas ArsB y Acr3 podría consistir en el requerimiento de diferentes aminoácidos implicados en el proceso de translocación de As(III), como ocurre con la cisteína 148 de la proteína AmAcr3 de *A. metalliredigens* (Fu *et al.*, 2009). Tras la propuesta de un modelo topológico con 10 segmentos transmembrana de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* a partir de la topología experimental de la proteína AmAcr3 de *A. metalliredigens* (Fu *et al.*, 2009) (Figura 3.22), se identificaron dos residuos conservados en la mayoría de las proteínas Acr3 analizadas que parecen estar implicados directamente en el transporte de As(III), y que en el caso de la proteína CgAcr3-1 resultaron ser los residuos hidrofóbicos cisteína 129 (C129) y glutámico 305 (E305) (Figura 3.24). La drástica disminución del transporte de As(III) a través de CgAcr3-1 por el bloqueo del grupo sulfhidrilo de la C129 (Figura 3.26) o por la sustitución del residuo E305 por otros aminoácidos de diferente carga y/o tamaño (Figura 3.28), sugiere que el ambiente hidrofóbico creado tanto por el residuo C129 como la carga negativa proporcionada por E305 serían importantes para el mecanismo de translocación de As(III). Además, la posición transmembranal y central de estos dos residuos y la elevada conservación de los segmentos TM4 ($x_3GxIx_4AxCxAMVx_2Wx_3$) y TM9 ($x_7AxNxFLAxAVx_5$) donde se localizan respectivamente los dos aminoácidos (Figura 3.22), podría formar una especie de poro o cavidad hidrofóbica que actuaría de forma selectiva en el paso de As(III) a través de las proteínas Acr3. Los residuos de ácido glutámico en proteínas de membrana parecen jugar un papel clave en los procesos de translocación de protones, como ya se ha descrito previamente (Iwata *et al.*, 1995), lo que apoyaría el movimiento antiportador de arsenito y protones a través de la proteína CgAcr3-1.

Basándonos en los resultados obtenidos y en lo conocido de la literatura, hemos propuesto el siguiente modelo de resistencia a As para *C. glutamicum* (Figura 3.46). En presencia de As y bajo condiciones aeróbicas, *C. glutamicum* estaría predominantemente expuesto a arseniato (y no a arsenito), el cual entraría en *C. glutamicum* a través de los sistemas de entrada de fosfato (Feo *et al.*, 2007) [Paso (i) de la Figura 3.46]. En ausencia de arsenito los metalorrepressores (CgArsRs) del mecanismo de resistencia al metaloide se encontrarían unidos a las regiones promotoras-operadoras de los operones *ars1* y *ars2*; para permitir la expresión del operón *ars* el arsenito necesita unirse a los represores (Ordóñez *et al.*, 2008) [Paso (iii) de la Figura 3.46]. En ausencia de arsenito no se observa expresión de las arseniato reductasas CgArsC1 o CgArsC2 (Figura 3.35A), sin embargo sí que se detectaría la proteína CgArsC1', aunque en muy baja cantidad y siendo su expresión independiente de las condiciones de inducción (Figura 3.35B). Los genes *CgarsC1* y *CgarsC2* que codifican para las proteínas CgArsC1 y CgArsC2 se expresan mediante dos ARNm, uno tricistrónico, y otro bicistrónico (Ordóñez *et al.*, 2005)

(Figura 4.46), sin embargo si el gen *CgarsC1'* se expresara a partir de esos mismos transcritos policistrónicos la cantidad de proteína CgArsC1' existente debería de estar al mismo nivel que las proteínas CgArsC1 y CgArsC2, y eso no ocurre así. Una de las hipótesis que justificaría la baja presencia de CgArsC1' en *C. glutamicum* sería la degradación postraduccional de la proteína, pero esta idea está descartada ya que la proteína CgArsC1' sí que se detecta cuando se fusiona a una cola de histidinas (Figura 3.35B). Estas observaciones nos hicieron pensar en la existencia de un nuevo promotor situado aguas arriba del gen *CgarsC1'*, el cual sería constitutivo y generaría un ARNm monocistrónico (Figura 3.46); mediante análisis bioinformáticos de los 75 nucleótidos que separan el final del gen *CgarsC1* y el comienzo de *CgarsC1'* se determinó la presencia de un hipotético promotor con un score de 0,62 sobre un valor máximo de 1 (Figura 3.45). La ausencia de expresión de la proteína CgArsC1' a partir de los transcritos policistrónicos podría deberse a la formación de una estructura secundaria en la zona unión a ribosoma (RBS) en los ARNm policistrónicos para expresar la proteína CgArsC1', estructura que no se formaría en el ARNm monocistrónico. Los efectos negativos de estas estructuras internas en la expresión de los transcritos son descritos frecuentemente, y en algunos casos también para genes del operón *ars* como ocurre con el gen *arsC* de *P. aeruginosa* en su expresión heteróloga en *E. coli* (Cai *et al.*, 1998). La expresión constitutiva de la proteína CgArsC1' conllevaría a la expresión de la proteína en ausencia de As(III) y permitiría la reducción del arseniato recientemente incorporado en la célula a arsenito [Paso (ii) de la Figura 3.46], el cual induciría la expresión de los dos operones *ars* permitiendo la expresión de las otras dos arseniato reductasas (CgArsC1 y CgArsC2) y de las arsenito permeasas (CgAcr3-1 y CgAcr3-2) [Paso (iv) de la Figura 3.46]. Un mecanismo similar ha sido indicado por Li & Krumholz (2007) para describir el mecanismo de resistencia a As en *Desulfovibrio desulfuricans*.

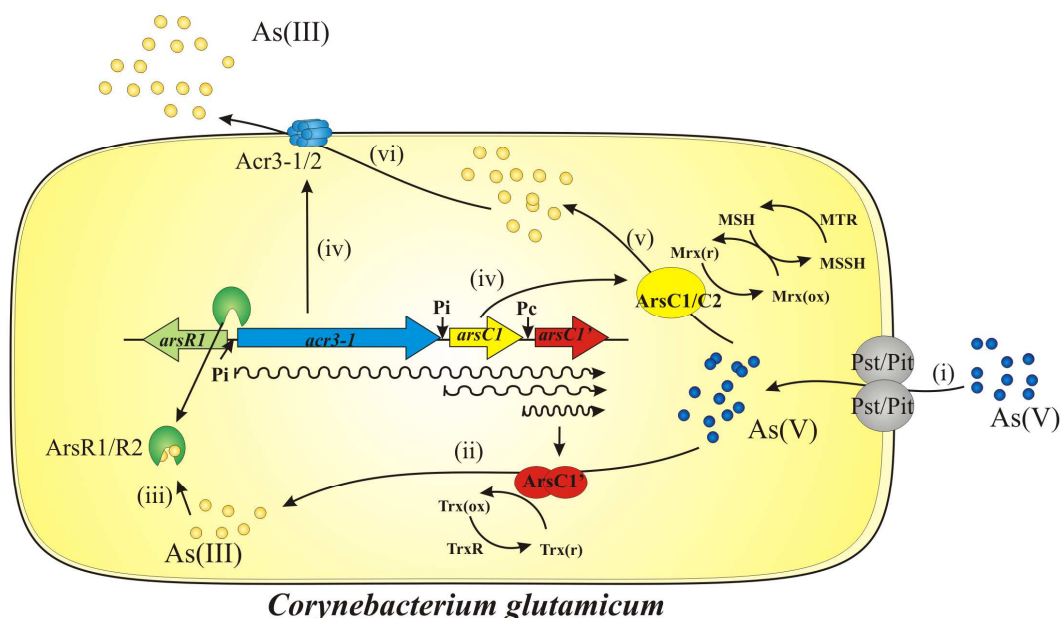


Figura 3.46. Modelo de resistencia a As en *C. glutamicum*. (i) Entrada de As(V); (ii) expresión constitutiva de la proteína CgArsC1' y reducción del As(V) a As(III); (iii) unión del As(III) a los reguladores (CgArsR1/CgArsR2) y desrepresión de la expresión de los operones *ars*; (v) transcripción de los genes que codifican para las arseniato reductasas (CgArsC1 y CgArsC2) y arsenito permeasas (CgAcr3-1 y CgAcr3-2); (v) reducción del As(V) por las reductasas CgArsC1 y CgArsC2 usando el sistema MSH/Mrx1 y (vi) liberación del As(III) formado de la célula a través de las arsenito permeasas CgAcr3-1 y CgAcr3-2.

La presencia de las arseniato reductasas dependientes de MSH/Mrx1 (CgArsC1 y CgArsC2) permitiría una mayor reducción del As(V) que está siendo incorporado a As(III) [Paso (v) de la Figura 3.45]. Una única arseniato reductasa dependiente de MSH/Mrx1 sería suficiente para afrontar el estrés provocado por As(V) en *C. glutamicum*, ya que la ausencia de CgArsC1 o CgArsC2 es complementada por la actividad arseniato reductasa de la otra (Figura 3.43), a diferencia de lo que ocurre con las arsenito permeasas las cuales presentan un efecto sumatorio, ya que la ausencia de una de ellas no es complementada por la actividad de la otra (Figura 3.5). Finalmente el As(III) formado es liberado al exterior a través de las dos arsenito permeasas [Paso (vi) de la Figura 3.45].

Conclusiones

4. CONCLUSIONES

4.1. Conclusiones.

1.- En *C. glutamicum* se han identificado tres genes que codifican para arsenito permeasas pertenecientes a la familia Acr3 y que constituyen el principal mecanismo de desintoxicación de As(III) en este microorganismo. La arsenito permeasa CgAcr3-1 participa con un 80% en la resistencia a As(III), CgAcr3-2 participa con el 20% restante y la proteína CgAcr3-3 no es funcional.

2.- Sólo las membranas invertidas de *C. glutamicum* o *E. coli* obtenidas por sonicación como método de rotura e inversión y con NADH como fuente de energía, nos han permitido obtener proteínas Acr3 funcionales en vesículas invertidas y permitir el estudio *in vitro* de transporte de metales a través de la proteína CgAcr3-1.

3.- La arsenito permeasa CgAcr3-1 utiliza el motivo de fuerza protónica para realizar la liberación de As(III) al exterior de la célula; tanto el gradiente químico (ΔpH) como el gradiente eléctrico ($\Delta\psi$) pueden realizar de forma independiente el transporte de arsenito.

4.- Las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2, según confirman análisis de topología comparativa, presentan una topología de diez dominios transmembrana de unos 23 residuos cada uno, siendo los segmentos TM2, TM3, TM4, TM9 y TM10 los más conservados en comparación con otras proteínas Acr3. Los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína CgAcr3-1 están localizados en la región citoplasmática.

5.- Las arsenito permeasas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 presentan exclusividad de sustrato transportando As(III), pero no Sb(III) ni otros oxianiones relacionados, y actúan como antiportadores de moléculas neutras de arsenito y protones. Dos residuos transmembranales de la proteína CgAcr3-1 (cisteína 129 y ácido glutámico 305) realizan un papel clave en el proceso de translocación de arsenito.

6.- La incorporación de As(III) en *C. glutamicum* no se produce a través de aguaglicerolporinas, ya que carece de los genes que las codifican. Mutantes de *C. glutamicum* interrumpidos o deletados en sus arsenito permeasas y sobreexpresando las aguaglicerolporinas de *S. coelicolor* o *C. diphtheriae* disminuyen su resistencia a As(III), pero acumulan hasta 7-8 veces más As(III) que la cepa silvestre, lo que convierte a estos mutantes en eficientes cepas biorremediadoras.

7.- De las cuatro arseniato reductasas presentes en *C. glutamicum* (CgArsC1, CgArsC2, CgArsC1' y CgArsC4), solamente las proteínas CgArsC1 y CgArsC2 se expresan en condiciones de inducción por As. Según análisis filogenéticos estas cuatro proteínas pertenecen a tres familias de arseniato reductasas diferentes.

8.- La proteína CgArsC1' parece expresarse constitutivamente en *C. glutamicum* y pertenece a la familia de arseniato reductasas dependientes de Trx/TrxR como se ha demostrado en estudios *in vitro*. CgArsC1' presenta un dominio amino terminal de 78 aminoácidos identificado sólo en algunas actinobacterias que es importante para su función biológica.

9.- La proteína CgArsC4 contiene aminoácidos y dominios peptídicos característicos de las arseniato reductasas dependientes de GSH/Grx aunque parece que no se expresa en *C. glutamicum*. La purificación de la proteína CgArsC4 a partir de células de *E. coli* y los intentos de acoplamiento *in vitro* de CgArsC4 a los sistemas redox Trx/TrxR, MSH/Mrx o GSH/Grx resultaron en todos los casos infructuosos.

10.- El nivel de acumulación de As(V) en mutantes de *C. glutamicum* carentes de las proteínas CgArsC1 y CgArsC2 y en los mutantes incapaces de sintetizar micotiol aumenta hasta 30 veces en comparación con la cepa silvestre.

4.2. Conclusions.

1.- *C. glutamicum* contains genes for the arsenite permeases CgAcr3-1, CgAcr3-2 and CgAcr3-3, which are the main As(III) detoxification mechanism in *C. glutamicum*. The CgAcr3-1 protein is involved in 80% of the As(III) resistance, the remainder 20% is ascribed to CgAcr3-2 while CgAcr3-3 is not functional.

2.- Only everted membranes vesicles of *C. glutamicum* or *E. coli* obtained by sonicator and with NADH as energy source, are able to achieve active Acr3 proteins in everted membranes vesicles in order to analyze *in vitro* studies of metals transport by CgAcr3-1.

3.- CgAcr3-1 uses the protonmotive force by releasing As(III) outside the cell; the chemical (ΔpH) and electrical ($\Delta\psi$) gradients can be used independently by CgAcr3-1 protein for the As(III) transport.

4.- The CgAcr3-1 and CgAcr3-2 proteins contain 10 transmembrane domains with 23 aminoacids in each one, and the TM2, TM3, TM4, TM9 and TM10 domains are the most conserved when compared with other Acr3 proteins, as observed by topological analyses. The N- and C-terminal of CgAcr3-1 are found in the cytoplasmic region.

5.- CgAcr3-1 and CgAcr3-2 are specific for As(III) transport but not for Sb(III) or for other examined oxianions. CgAcr3-1 and CgAcr3-2 proteins work as antiporter pump As(III)/H⁺ and two transmembranal residues from CgAcr3-1 (cysteine 129 and glutamic acid 305) seem to play a key role in the As(III) translocation process.

6.- The As(III) uptake in *C. glutamicum* is not based on aquaglyceroporins because this bacteria lacks the corresponding genes. *C. glutamicum* mutants with disrupted or deleted *Cgacr3s* genes and expressing the aquaglyceroporins from *S. coelicolor* or *C. diphtheriae*, causes a decrease of the As(III) resistance. However the indicated mutants accumulate 7 or 8 times more As(III) than the wild type strain, allowed us to use these mutants as efficient bioremediation strains.

7.- *C. glutamicum* contains four arsenate reductases (CgArsC1, CgArsC2, CgArsC1' and CgArsC4) belong to three different arsenate reductase families. Only two of the four hypothetical arsenate reductases CgArsC1 and CgArsC2 are expressed under induced conditions by arsenic.

8.- The protein CgArsC1' seems to be constitutively expressed in *C. glutamicum* and belongs to the Trx/TrxR arsenate reductase family as we could observe in *in vitro* analyses. CgArsC1' contains a N-terminal domain of 78 aminoacids only identified in certain actinobacterias which seems to be involved for its biological activity.

9.- The protein CgArsC4 contains aminoacids and domains corresponding to the GSH/Grx arsenate reductases family, however the protein seems not to be expressed in *C. glutamicum*. The purified protein CgArsC4 obtained from *E. coli* cells was coupled to the Trx/TrxR, MSH/Mrx or GSH/Grx redox systems, but results were unsuccessful in all the cases.

10.- *C. glutamicum* mutants lacking the CgArsC1 and CgArsC2 activities or mutants unable to synthesize mycothiol were able to accumulate 30 folds more As(V) than the control *C. glutamicum* wild type strain.

Anexos

5. ANEXOS

Anexo 1. Intento de purificación de la proteína arsenito permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum*.

Anexo 2. Identificación y estudio de las micorredoxinas de *C. glutamicum*.

Anexo 3. Estrategias de clonación.

Anexo 4. Oligonucleótidos, plásmidos y cepas usadas.

Anexo 1. Intento de purificación de la proteína arsenito permeasa CgAcr3-1 de *C. glutamicum*.

La proteína CgAcr3-1 es una proteína transmembranal y por tanto muy insoluble, lo que complicó en gran medida el proceso de purificación. El gen *Cgacr3-1* que codifica para esta arsenito permeasa fue clonado en el plásmido pET28a(+) (ver Anexo A3.1 y Tablas A4.2 y A4.3) de forma que en su expresión se le fusiona una cola con seis histidinas en el extremo amino terminal. Con el plásmido resultante, pETAcr3-1, se transformaron las cepas de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* C43(λ DE3) (Tabla A4.4); la cepa *E. coli* C43(λ DE3) es específica para la expresión de proteínas muy tóxicas como las proteínas de membrana. Frecuentemente al sobreexpresar proteínas de membrana de procariontes en *E. coli*, éstas tienden a situarse en la membrana celular o en cuerpos de inclusión citoplasmáticos (Gordon *et al.*, 2008; Drew *et al.*, 2006). En consecuencia durante los posteriores procesos de purificación se recuperan las membranas celulares de las que se extrae la proteína con el uso de detergentes (Noirclerc-Savoie *et al.*, 2003).

Las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pETAcr3-1 se crecieron hasta densidades ópticas de entre 0,5-2 tras lo cual se indujo la expresión de la proteína mediante la modificación de diferentes parámetros: temperatura, tiempos de inducción y concentraciones utilizadas de IPTG. La producción de la proteína se monitorizó mediante tinción con azul de Coomassie y ensayos de *Western blot* sobre la fracción de membrana celular. Tras múltiples intentos y ensayos de recuperación de las proteínas de las membranas celulares utilizando diferentes tipos y concentraciones de detergentes como Tritón X-100, SDS (dodecilsulfato sódico), Brig-35 o DDM (N-dodecil- β -D-maltósido), se observó una banda tenue de 40 kDa en el gel de acrilamida teñido con Coomassie y en el *Western blot* bajo las siguientes condiciones: crecimiento celular a 30°C, inducción posterior con 1 mM de IPTG durante 3 horas a 30°C e incubación de las membranas en presencia de DDM 2% durante 1 hora a 4°C (Figura A1.1); el tamaño fue algo menor del esperado (42 kDa), sin embargo es frecuente que las proteínas de membrana migren con pesos moleculares ligeramente diferentes por la presencia de detergentes (Rath *et al.*, 2009).

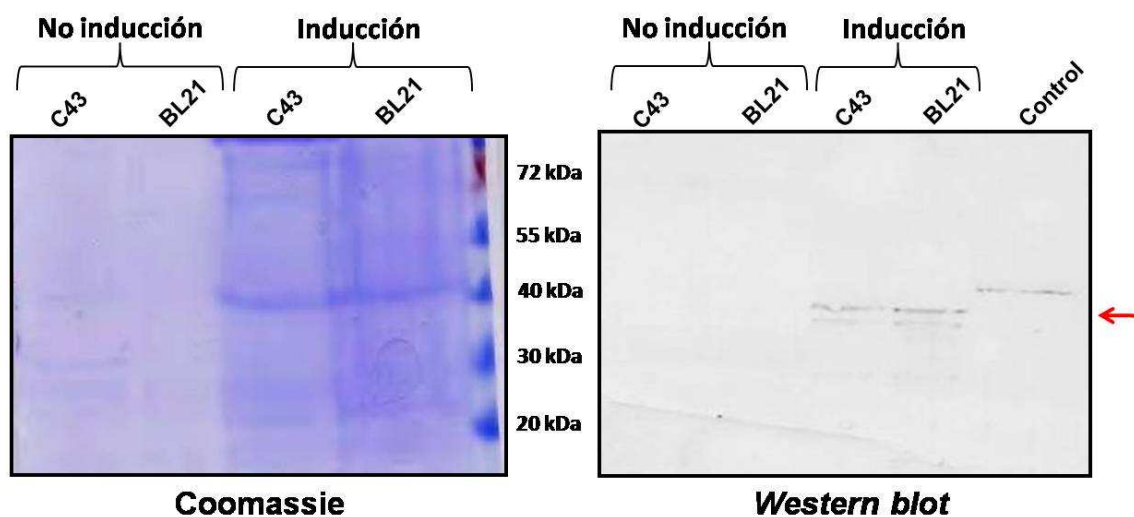


Figura A1.1. Análisis de células de *E. coli* C43 (C43) y BL21 (BL21) transformadas con el plásmido pETacr3-1 crecidas a 30°C no inducidas o inducidas (1 mM de IPTG durante 3 horas) e incubación de las membranas en presencia de DDM 2% mediante detección por: **(A)** gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie y **(B)** *Western blot* realizado con anticuerpos anti-histidinas. Se observa una banda en torno a 40 kDa reactiva a los anticuerpos anti-histidinas (flecha roja). El control positivo para el *Western blot* (Control) corresponde a la proteína citosólica CgMurC de *C. glutamicum* purificada con colas de histidinas.

La banda obtenida y separada en el gel de acrilamida fue aislada del gel y analizada mediante espectrometría de masas, sin embargo no se identificó la proteína CgAcr3-1 en la muestra; por lo que se considera que la sobreexpresión de la proteína CgAcr3-1 en *E. coli* bajo el promotor del fago T7 [como ocurre en las cepas BL21(DE3) y C43(ΔDE3)] puede resultar tóxica para las células.

Para solventar los posibles problemas de toxicidad de la proteína en *E. coli*, decidimos purificar la proteína CgAcr3-1 mediante un sistema *in vitro* (ver apartado 2.4.9.2 de Materiales y métodos), en el que la síntesis de la proteína de interés no se produce en el interior de *E. coli* sino en un tubo “ependorf” donde se añaden todos los componentes necesarios para llevar a cabo el proceso de transcripción y traducción a partir de un ADN molde donde se encuentra el gen que codifica para la proteína de interés. Para ello el gen que codifica para la proteína CgAcr3-1 fue clonado en el plásmido pIVEX2.4d. En el plásmido obtenido, pIVacr3-1 (ver Anexo A3.1 y Tabla A4.3), el ATG inicial del gen *Cgacr3-1* se encuentra a menos de 100 pb del promotor P_{T7} y a 5-8 pb del sitio de unión a ribosoma, así como fusionado el gen *Cgacr3-1* a seis codones para una cola de histidinas en el extremo 5' (amino terminal de la futura proteína);

esta posición del gen *Cgacr3-1* es necesaria para que la ARN polimerasa y los ribosomas añadidos en la mezcla de reacción realicen los procesos de transcripción y traducción y se obtenga finalmente la proteína CgAcr3-1.

Se realizaron diferentes pruebas cambiando la cantidad de plásmido pIVacr3-1, la temperatura y el tiempo de incubación de la mezcla de reacción, así como la concentración y el tipo de detergentes y nos permitieron observar bandas proteicas en geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie con un tamaño alrededor de 45 kDa, que posteriormente se corroboraron en análisis de *Western blot* (Figura A1.2). Sin embargo, en ninguno de los casos las bandas fueron identificadas como una proteína arsenito permeasa mediante análisis de espectrometría de masas, sino más bien como artefactos.

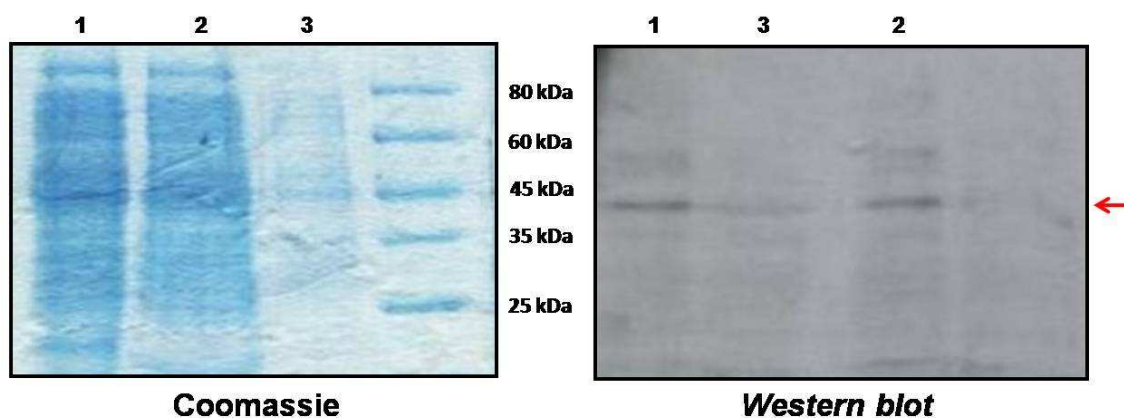


Figura A1.2. Análisis de expresión de la proteína CgAcr3-1 *in vitro* bajo diferentes condiciones detectada mediante dos condiciones: **(A)** gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie y **(B)** análisis de *Western blot* realizado con anticuerpos anti-histidinas. Composición de las diferentes mezclas de reacción: *Carril 1*, DDM 2%, 1 μ g de plásmido, 30°C durante 12 horas de incubación; *Carril 2*, Brig-35 1%, 0,5 μ g de plásmido, 20°C durante 4 horas de incubación; *Carril 3*, sin detergentes, 0,5 μ g de plásmido, 30°C durante 6 horas de incubación.

Hasta la fecha ninguna de las proteínas arsenito permeasas descritas, ni proteínas relacionadas como proteínas de la familia BART, han sido purificadas. Por tanto se necesitan más análisis para obtener la estructura de la proteína CgAcr3-1 de *C. glutamicum* y poder explicar en mayor detalle el mecanismo de translocación de As(III) a través de la permeasa.

Anexo 2. Identificación y estudio de las micorredoxinas de *C. glutamicum*.

Recientemente se han identificado dos micorredoxinas en el genoma de *C. glutamicum*, CgMrx1 y CgMrx2 (Ordóñez *et al.*, 2009), y solamente la proteína CgMrx1 está acoplada al mecanismo redox dependiente de micotiol (MSH) y participa *in vitro* en la cascada enzimática de reducción de As(V) de las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 de *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2009). La proteína CgMrx2 tiene un 76% de homología con la enzima NrdH de *Corynebacterium ammoniagenes*, la cual se ha identificado con una actividad similar a una tiorredoxina acoplada a la tiorredoxina reductasa (TrxR) (Stehr & Lindqvist, 2004); la proteína CgMrx2 también se acopla *in vitro* a la proteína CgTrxR de *C. glutamicum* (Ordóñez *et al.*, 2009).

Las micorredoxinas (Mrx) son proteínas con una función similar a las glutarredoxinas (Grx) pero que desempeñan su función de una manera específica para el MSH. El MSH es un pseudoazúcar exclusivo de actinobacterias y un estudio detallado de la distribución de proteínas homólogas a CgMrx1 y CgMrx2 en actinobacterias puso de manifiesto la presencia de las dos Mrxs en prácticamente todas las familias del orden *Actinomycetales* (Figura A1.1).

Un rastreo al genoma de *C. glutamicum* en busca de nuevas micorredoxinas ha permitido identificar una nueva micorredoxina, la micorredoxina 3 (CgMrx3; cg0496), que conserva una identidad de un 23% con la glutarredoxina 3 de *E. coli* (EcGrx3) y la glutarredoxina GrxB de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (SynGrxB). Proteínas homólogas a la enzima CgMrx3 se han encontradas también ampliamente distribuidas en actinobacterias (Figura A2.2), encontrándose en prácticamente todos los microorganismos donde antes se habían identificado proteínas homólogas a CgMrx1 y CgMrx2.

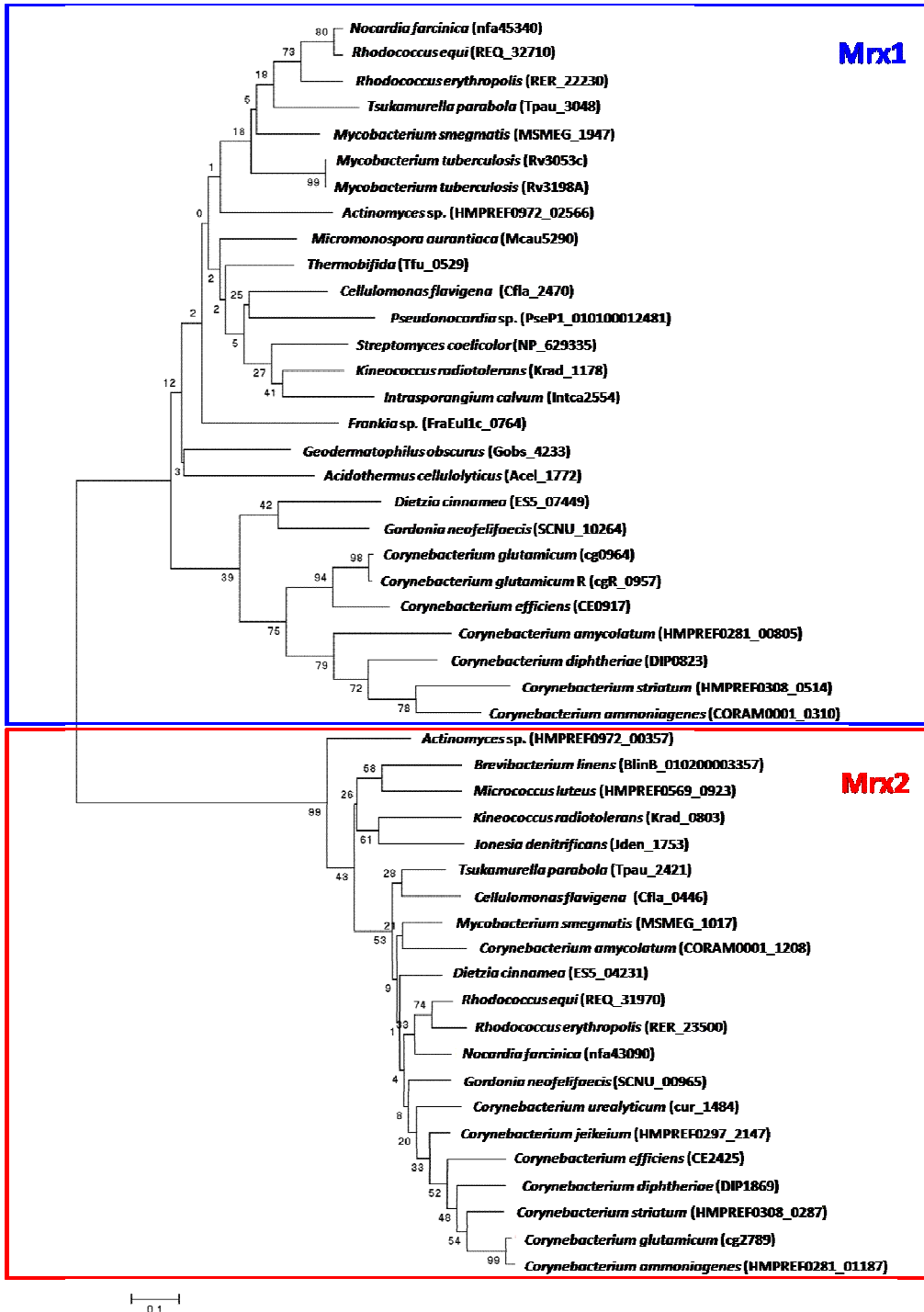


Figura A2.1. Análisis filogenético de las proteínas homólogas a las proteínas Mrx1 y Mrx2 de diferentes especies de actinobacterias. Los números representados son porcentajes por *bootstrapping* (1.000 réplicas). Las proteínas Mrx1 de distintas especies de actinobacterias se agrupan juntas, mientras que las proteínas Mrx2 forman un grupo separado. Se muestran los códigos de los genes que codifican para estas proteínas.

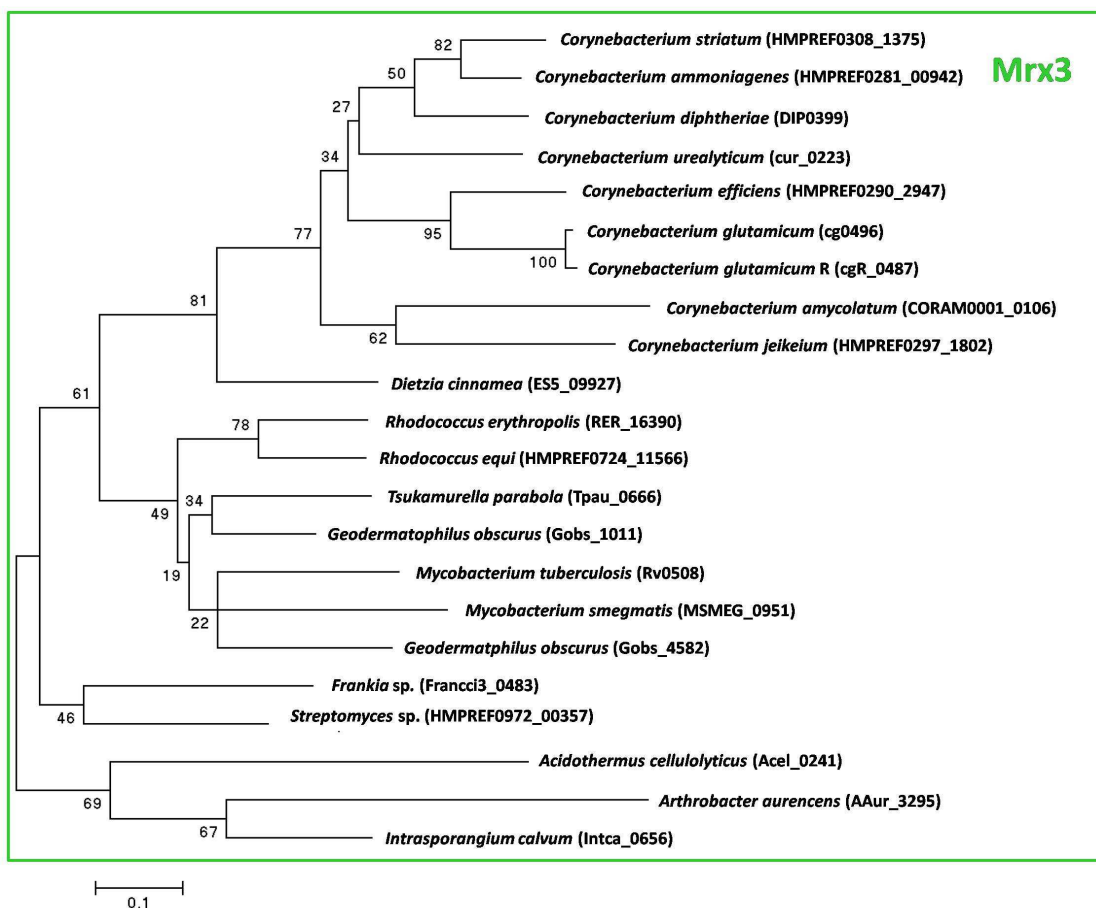


Figura A2.2. Análisis filogenético de las proteínas homólogas a la proteína Mrx3 de diferentes especies de actinobacterias. Los números representados son porcentajes por *bootstrapping* (1.000 réplicas). Se muestran los códigos de los genes que codifican para estas proteínas.

La proteína CgMrx3 presenta un tamaño similar a la proteína EcGrx3, sin embargo carece del dominio catalítico típico de las glutarredoxinas (CPYC), que sí que está presente en CgMrx1 (Figura A2.3). A partir del alineamiento de la Figura A2.3 se constata la ausencia de cinco aminoácidos aproximadamente a la mitad de la proteína CgMrx3 que están presentes en el resto de las proteínas analizadas y de la existencia de una tercera cisteína (cisteína 65) en la secuencia de CgMrx3 que está conservada en las enzimas EcGrx3 y SynGrx1.

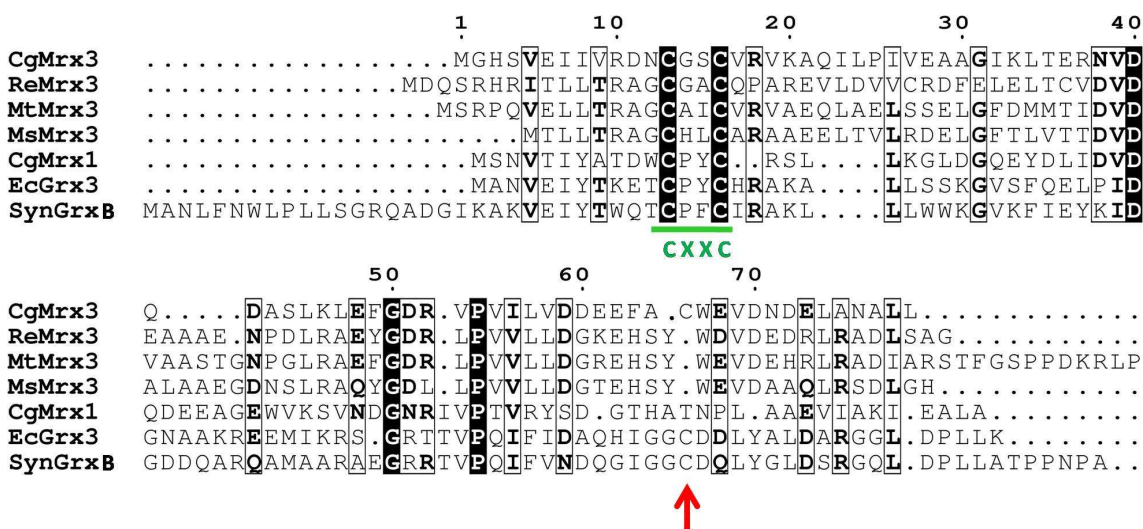


Figura A2.3. Alineamiento de las micorredoxinas del subgrupo de Mrx3: *C. glutamicum* (CgMrx3 y CgMrx1), *M. tuberculosis* (MtMrx3), *Synechocystis* sp. NCC 6803 [SynGrxB; Kaneko *et al.*, (1996)], *E. coli* [EcGrx3; Aslund *et al.*, (1996)], *Rhodococcus equi* (ReMrx3) y *M. smegmatis* (MsMrx3). Se señala el dominio catalítico CxxC (verde) y la tercera cisteína de CgMrx3 (flecha roja).

La proteína CgMrx3 tiene un peso molecular de 8,71 kDa y está codificada por el gen *Cgmrx3*, el cual tiene 237 pb y se encuentra en un operón junto a otros genes implicados en la síntesis de grupos hemo o porfirinas (Figura A2.4A). Esta organización se mantiene en otras actinobacterias, como *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *N. farcinica*, *R. erythropolis* y *S. coelicolor* A3(2), y en diferentes especies de corinebacterias como *C. efficiens* y *C. jeikeium*. Sin embargo, el gen *Cgmrx1* (240 pb) que codifica para la proteína CgMrx1 (8,72 kDa) se encuentra formando parte de un operón junto con otros genes sin una función aparentemente relacionada entre ellos (Figura A2.4B).

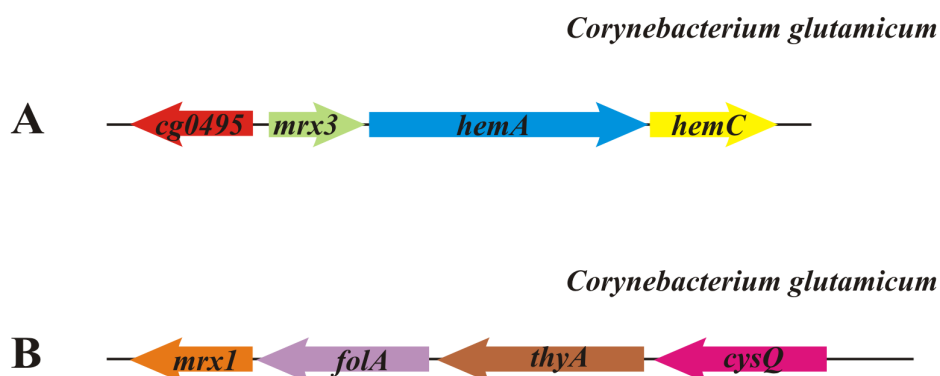


Figura A2.4. (A) Localización del gen *Cgmrx3* que codifica para la proteína CgMrx3 en el genoma de *C. glutamicum*. *cg0495*: hipotética fosfatasa de fosfoserina; *hemA* (cg0497): glutamil t-ARN reductasa; *hemC* (cg0498): porfobilinógeno desaminasa. **(B)** Localización del gen *Cgmrx1* que codifica para la proteína CgMrx1 en el genoma de *C. glutamicum*. *folA* (cg0965): dihidrofolato reductasa; *thyA* (cg0966): timidilato sintasa; *cysQ* (cg0967): 3' fosfoadenosina 5' fosfosulfato (PAPS) 3' fosfatasa.

A2.1. Inactivación de los genes que codifican para las micorredoxinas en *C. glutamicum*.

Para analizar las funciones de las micorredoxinas en *C. glutamicum*, intentamos interrumpir y deletar los genes que las codifican. El intento de interrupción y delección del gen *Cgmrx2* resultó ser fallido (Ordóñez E., datos no publicados), por lo que parece que ser esencial para la viabilidad celular. Esta conclusión es consistente con los datos obtenidos en *C. ammoniagenes*, donde el gen que codifica para la enzima NrdH es esencial y la proteína estaría implicada en el proceso de reducción de los desoxirribonucleótidos (Stehr & Lindqvist, 2004). Por ello se pasó a intentar interrumpir los genes *Cgmrx1* y *Cgmrx3* de *C. glutamicum*; para ello fragmentos internos de 99 y 123 pb, respectivamente, fueron clonados en el plásmido suicida de corinebacterias pK18mob, obteniéndose los plásmidos pKmrx1int y pKmrx3int (ver Anexo A3.2 y Tabla A4.3). Estos plásmidos fueron transferidos por conjugación a *C. glutamicum* RES167 y se integraron en el cromosoma por recombinación homóloga a través del fragmento interno clonado en ellos. Por otro lado, se intentaron deletar los genes por un sistema de doble recombinación usando el método de *sacB* (Schafer *et al.*, 1994; Jager *et al.*, 1992), el cual permite obtener mutantes sin ningún marcador de selección (ver Anexo A3.2).

Tras varios intentos de conjugación en *C. glutamicum*, se obtuvo un mutante interrumpido y otro deletado para el gen *Cgmrx1*, denominados *C. glutamicum* Mrx1 y *C. glutamicum* DELMrx1 (Tabla A4.5), respectivamente, y un mutante interrumpido para el gen *Cgmrx3*, denominado *C. glutamicum* Mrx3 (Tabla A4.5), por lo que se deduce que estos dos genes no son esenciales para la viabilidad celular. Los análisis de PCR realizados a los transconjugantes obtenidos mediante los oligonucleótidos M13 universales o cheqM1 (Tabla A4.1) confirmaron la integración de los plásmidos pKmrx1int y pKmrx3int en los genes *Cgmrx1* o *Cgmrx3* de *C. glutamicum* y la delección del gen *Cgmrx1*.

Los transconjugantes obtenidos anteriormente fueron sometidos a análisis de resistencia a As(V) en medio líquido de forma que sólo el mutante *C. glutamicum* Mrx3 exhibía una sensibilidad de 0,2 mM a As(V) (Figura A2.5A); esta sensibilidad fue similar a la que presentan los mutantes que carecen de las dos arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 dependientes de MSH/Mrx1 (cepas *C. glutamicum* ArsC1-C2 y *C. glutamicum* 2Δars). Los mutantes *C. glutamicum* Mrx1 y *C. glutamicum* DELMrx1 no presentan cambios en el nivel de resistencia a As(V) en comparación con lo observado para la cepa silvestre *C. glutamicum* ATCC 13032 (Figura A2.5A). Sin embargo, el nivel de resistencia a As(III) de los tres mutantes afectados en las micorredoxinas fue similar al de la cepa *C. glutamicum* ATCC 13032 y al mutante *C. glutamicum* ArsC1-C2 (Figura A2.5B). A la vista de estos resultados, todo parece indicar que ninguna de las dos micorredoxinas está implicada en la resistencia directa a As(III) y que solamente la micorredoxina CgMrx3 estaría implicada *in vivo* en el proceso de reducción de As(V) a As(III) en *C. glutamicum*.

Para completar estos estudios se obtuvo un doble mutante de micorredoxinas (*C. glutamicum* Mrx1-Mrx3; Tabla A4.5); para ello el vector pKmrx3int se transfirió por conjugación a la cepa *C. glutamicum* DELMrx1 que tiene el gen *Cgmrx1* deletado. El mutante *C. glutamicum* Mrx1-Mrx3 como se esperaba presentó el mismo nivel de resistencia a As(V) que la cepa carente de CgMrx3 (Figura A2.5A) y no presentó cambios en la resistencia a As(III) en comparación con la cepa silvestre (Figura A2.5B). Esto confirmaría que la proteína CgMrx1 no parece ser la micorredoxina preponderante en el proceso de reducción *in vivo* de As(V) por las arseniato reductasas dependientes de MSH/Mrx (CgArsC1 y CgArsC2), a pesar de que *in vitro* estas reductasas sí se acoplan a CgMrx1 (Ordóñez *et al.*, 2009). Un resultado similar ha sido detectado con la glutarredoxina SynGrxB (slr1562) de *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cual a pesar de participar conjuntamente con las arseniato reductasas SynArsC y SynArsl en el proceso de reducción de As(V) *in vitro*, la inactivación del gen *SyngrxB* no provoca cambios en la resistencia a As(V) *in vivo* en *Synechocystis* sp. (López-Maury *et al.*, 2009).

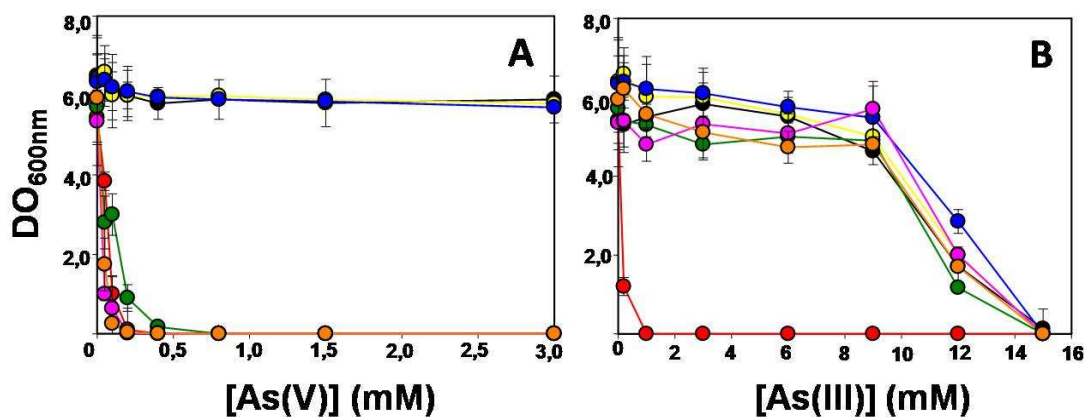


Figura A2.5. Resistencia a As(V) (A) y As(III) (B) en *C. glutamicum* ATCC 13032 (negra), *C. glutamicum* 2Δars (roja), *C. glutamicum* ArsC1-C2 (verde), *C. glutamicum* Mrx1 (azul), *C. glutamicum* DELMrx1 (amarilla), *C. glutamicum* Mrx3 (rosa) y *C. glutamicum* Mrx1-Mrx3 (naranja). Los resultados representados son el resultado de tres experimentos independientes.

Las enzimas Grx son proteínas que participan en mantener el equilibrio redox de las células, y protegen a las células frente a agentes exógenos que causan estrés oxidativo (Lillig *et al.*, 2008; Storz & Toledano, 1994). Para comprobar si las micorredoxinas llevan a cabo también esa función, los mutantes de micorredoxina obtenidos: *C. glutamicum* Mrx1, Mrx3 y Mrx1-Mrx3 se crecieron en medio MMC junto con diferentes estreses físicos, como la temperatura o el estrés osmótico (KCl 0,2 M), y químicos por la presencia de diferentes elementos químicos como cobre, cadmio, mercurio, cromo, níquel, plomo o zinc; sin embargo en ninguno de los casos se vio afectado el crecimiento de los mutantes de micorredoxina en comparación con la cepa silvestre. Solamente la exposición a peróxido de hidrógeno y a diamida provocó un cambio en el crecimiento de los mutantes de micorredoxina en comparación con la cepa silvestre *C. glutamicum* ATCC 13032 (Figura A2.6). Se observó un incremento de la resistencia a peróxido de hidrógeno en los mutantes de micorredoxina en comparación con la cepa silvestre, cambio que fue algo más acusado cuando se usó el doble mutante *C. glutamicum* Mrx1-Mrx3 (Figura A2.6A). Sin embargo, los mutantes simples y dobles de las micorredoxinas presentaron una disminución similar de la resistencia a diamida en comparación con la cepa silvestre *C. glutamicum* ATCC 13032 (Figura A2.6B).

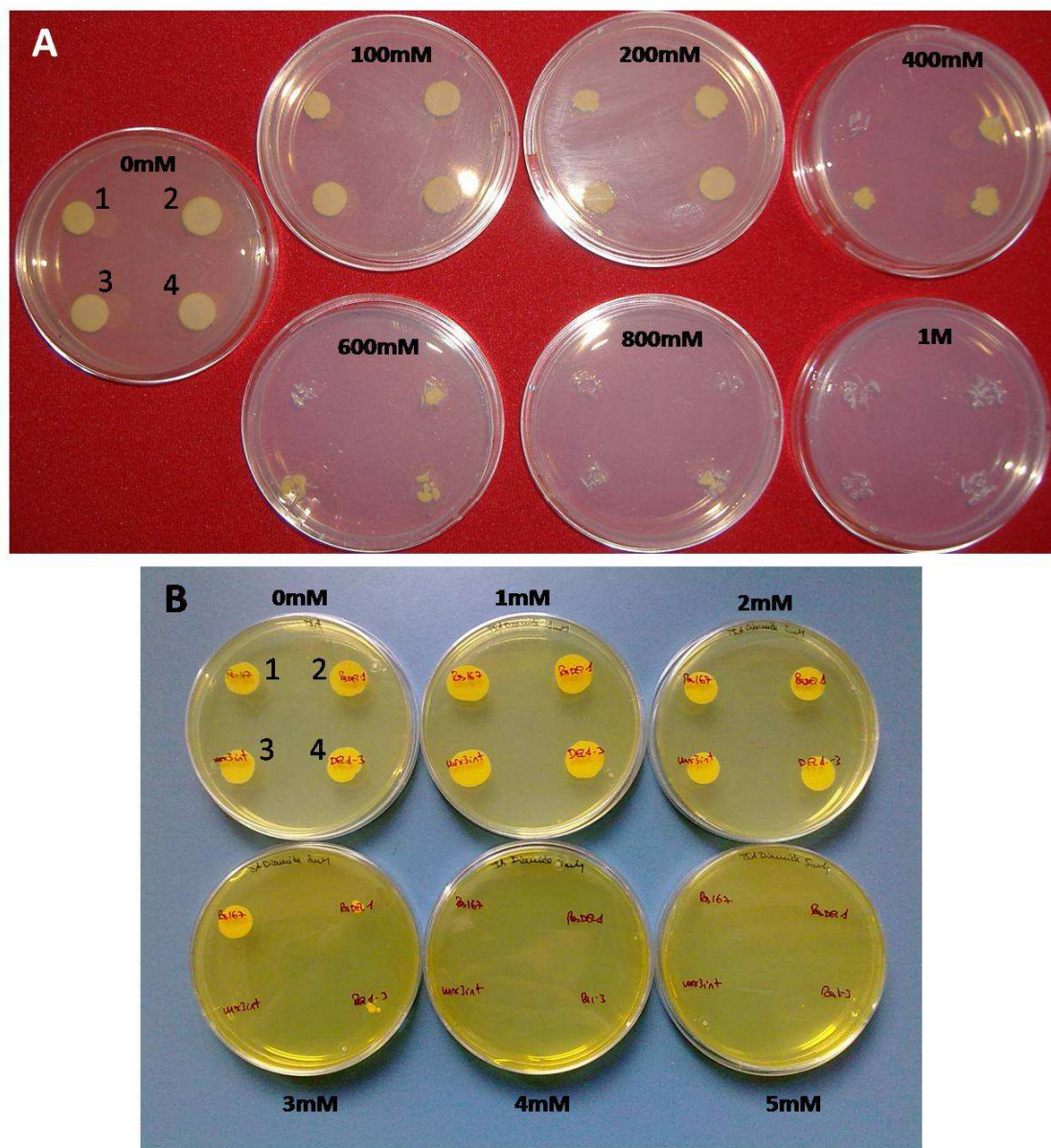


Figura A2.6. Análisis de resistencia a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (A) y diamida (B) en diferentes cepas de *C. glutamicum*. Al lado de cada placa se indica la concentración final de H₂O₂ o diamida utilizada. (1) *C. glutamicum* ATCC 13032, (2) *C. glutamicum* Mrx1, (3) *C. glutamicum* Mrx3, (4) *C. glutamicum* Mrx1-Mrx3.

Estos resultados parecen indicar que las microrredoxinas de *C. glutamicum* no son sólo exclusivas del proceso de reducción de As(V), sino que también participan en la protección de la célula frente a agentes oxidantes, al igual que ocurre con las glutarredoxinas EcGrx1, EcGrx2 y EcGrx3 de *E. coli* (Vlamiš-Gardikas *et al.*, 2002).

A2.2. Análisis *in vitro* de la proteína CgMrx3 de *C. glutamicum*.

Para analizar la posibilidad de que la proteína CgMrx3 se acoplara *in vitro* al sistema MSH/Mrx de *C. glutamicum* y por tanto participara en la reducción de As(V) junto con las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 (sistema al cual sí se acopla la enzima CgMrx1), se pasó a purificar la proteína CgMrx3. Para ello se clonó el gen *Cgmrx3* en el plásmido pET28a(+) obteniendo los vectores pETmrx3N y pETmrx3C (ver Anexo A3.1 y Tabla A4.3), los cuales mantienen el gen *Cgmrx3* fusionado a seis codones que codifican para una cola de histidinas en el extremo amino o carboxilo terminal, respectivamente. Con estos vectores se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), pero solamente en el caso del plásmido pETmrx3C la proteína CgMrx3 pudo ser sobreexpresada y purificada mediante cromatografía de afinidad.

La enzima CgMrx3 purificada fue oxidada con diamida y sometida a ensayos *in vitro* incubándola con MSH, CgMTR y NADPH y observando el consumo de NADPH mediante disminución de la DO_{340nm} . Tras probar diferentes concentraciones de cada uno de los componentes de la reacción, tampones de reacción y ordenes de adición de los diferentes componentes en la mezcla de reacción, no se observó reacción *in vitro* de la proteína CgMrx3 con el sistema redox MSH/Mrx (Figura A2.7A).

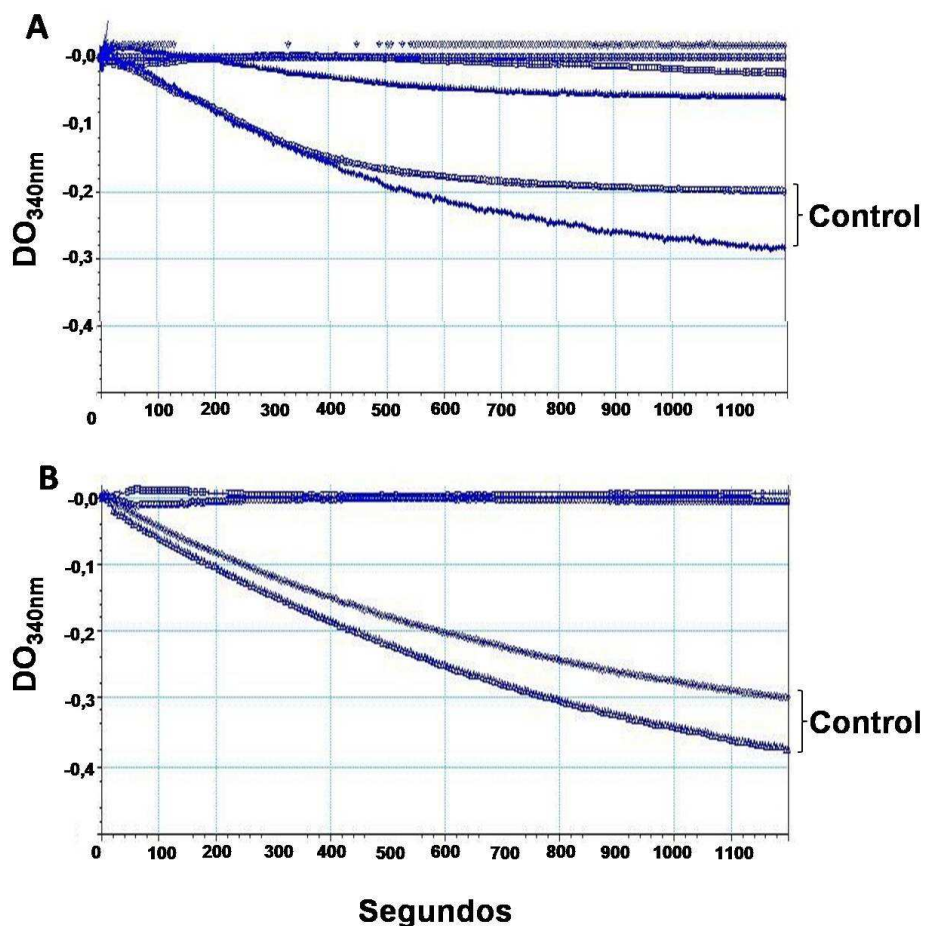


Figura A2.7. Análisis de acoplamiento de la proteína CgMrx3 a los sistemas redox MSH/Mrx (A) y Trx/TrxR (B). El acoplamiento se siguió observando el consumo de NADPH mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm. Las líneas indicadas como control (controles positivos) corresponden a las proteínas CgMrx1 (A) o CgTrx (B) en ambos casos oxidadas con diamida. Resto de las líneas corresponden a diferentes condiciones en la mezcla de reacción con variación de la concentración de la proteína CgMrx3: (□) 10 μM; (△) 20 μM; (◇) 50 μM; (○) 100 μM.

Dado que en *C. glutamicum* se ha identificado el sistema de oxidación-reducción Trx/TrxR (Fanous *et al.*, 2008) y que se ha descrito que la glutarredoxina SynGrxA de *Synechocystis* sp. es reducida por la proteína TrxR (Li *et al.*, 2007), se pasó a analizar si la proteína CgMrx3 pudiera estar asociada a dicho sistema. Para ello seguimos el consumo de NADPH acoplado a la disminución de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción formada por CgMrx3 oxidada con diamida, CgTrxR, NADPH y As(V); sin embargo tampoco se observó acoplamiento alguno de la proteína CgMrx3 al sistema Trx/TrxR (Figura A2.7B).

A la vista de los resultados, parece que en *C. glutamicum* y para las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 existe una dependencia de la proteína CgMrx3 como donador de electrones y que la enzima CgMrx1 no puede complementar la carencia de CgMrx3 *in vivo*. Sin embargo, el funcionamiento *in vitro* de la proteína CgMrx3 necesita ser analizado en mayor detalle para determinar cuál es su mecanismo exacto de acción.

Anexo 3. Estrategias de clonación.

A3.1. Clonación de genes en vectores para expresión de proteínas.

El gen que codifica para la arsenito permeasa CgAcr3-1 fue amplificado usando el ADN total de *C. glutamicum* ATCC 13032 con las parejas de oligonucleótidos Pacr3-1Fw/Pacr3-1Rv (Tabla A4.1). El fragmento resultante fue digerido con *NdeI/BamHI* y clonado en el vector pET28a(+) (Tabla A4.2 y Figura A3.1), obteniéndose el vector pETacr3-1 (Tabla A4.3), en donde queda fusionado el extremo amino terminal de la arsenito permeasa a una cola de histidinas. Ese mismo fragmento del gen *Cgacr3-1* amplificado y digerido con las mismas enzimas de restricción fue clonado en el plásmido pIVEX2.4d (Tabla A4.2 y Figura A3.1) obteniéndose el vector pIVacr3-1. La clonación de ambos vectores permite obtener dos versiones de la arsenito permeasa que se utilizarán en procesos de purificación dependiendo del tipo de ensayo a realizar, *in vivo* o *in vitro*, respectivamente.

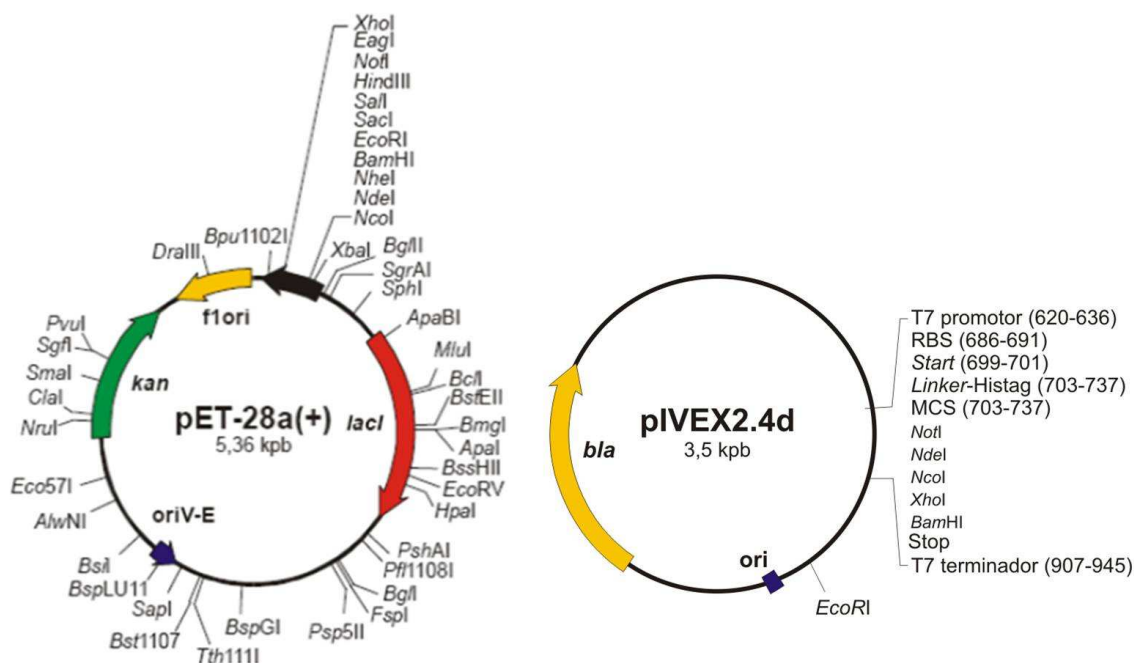


Figura A3.1. Esquema de los vectores pET28a(+) y pIVEX2.4d.

Los genes que codifican para las proteínas CgArsC1', CgArsC4 y la versión truncada de la proteína CgArsC1' que carece de los 78 aminoácidos del extremo amino terminal (CgArsC1'T)

fueron amplificados usando los oligonucleótidos *arsC1'Fw/arsC1'Rv*, *arsC4Fw/arsC4Rv* y *arsC1'TFw/arsC1'TRv* (Tabla A4.1). Los fragmentos resultantes (640 pb, 442 pb y 348 pb, respectivamente) fueron digeridos por *NdeI/XhoI* y clonados en pET28a(+) obteniendo los vectores pETarsC1', pETarsC4 y pETarsC1'T (Tabla A4.3).

En el caso de la proteína CgMrx3 clonamos el gen que la codifica en el plásmido pET28a(+) obteniendo dos construcciones diferentes, una con el gen fusionado a seis codones que codifican para una cola de histidinas en el extremo amino y otra construcción con la cola de histidinas en el extremo carboxilo. Para ello el gen fue amplificado con las parejas de oligonucleótidos *mrx3NFw/mrx3NRv* y *mrx3CFw/mrx3CRv* (Tabla A4.1) y los fragmentos amplificados fueron digeridos *NdeI/HindIII* y *NcoI/XhoI*, obteniéndose los vectores pETmrx3N y pETmrx3C, respectivamente (Tabla A4.3).

A3.2. Interrupción génica.

Para la interrupción génica por simple recombinación de los genes estudiados se han clonado fragmentos internos de los genes de interés en los plásmidos suicidas y movilizables pK18mob y pOJ260 (Tabla A4.2).

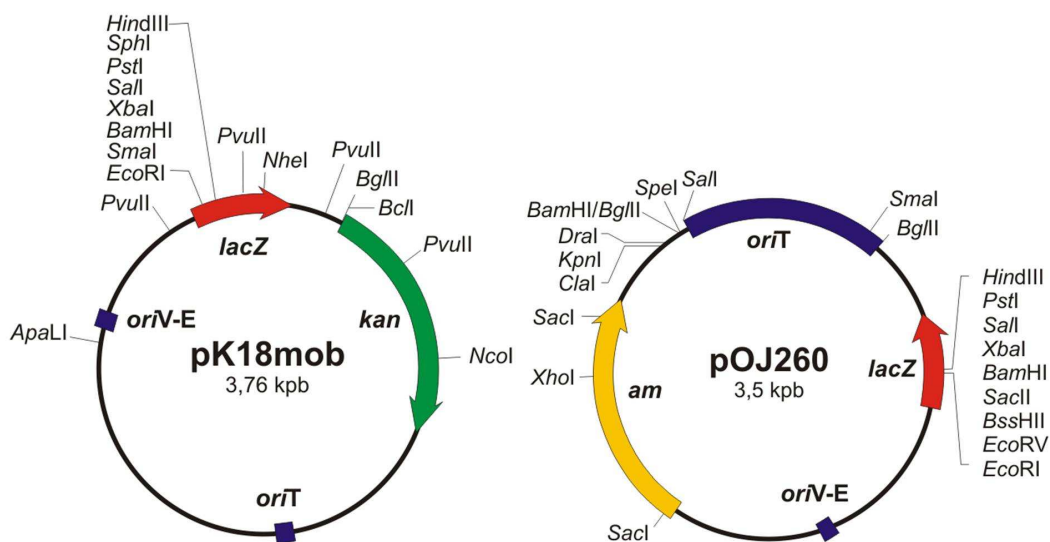


Figura A3.2. Esquema de los vectores pK18mob y pOJ260.

En el caso de la arsenito permeasa CgAcr3-3, de la arseniato reductasa CgArsC1' y de las micorredoxinas CgMrx1 y CgMrx3 se clonaron fragmentos internos de 310 pb, 282 pb, 99 pb y 123 pb respectivamente, que se amplificaron usando las parejas de oligonucleótidos acr3-3intFw/acr3-3intRv, arsC1'intFw/arsC1'intRv, mrx1intFw/mrx1intRv y mrx3intFw/mrx3intRv (Tabla A4.1). Los fragmentos obtenidos fueron digeridos usando las enzimas *Bam*HI/*Hind*III y subclonados en el plásmido pK18mob digerido con las correspondientes enzimas, obteniéndose los vectores pKacr3-3int, pKarsC1'int, pKmrx1int y pKmrx3int (Tabla A4.3).

En el caso del gen *CgarsC4* se amplificó un fragmento interno de 235 pb con la pareja de oligonucleótidos arsC4intFw/arsC4intRv (Tabla A4.1); posteriormente, se digirió el fragmento amplificado con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Hind*III para clonarlo en el plásmido pOJ260. Como resultado se obtuvo el vector pOarsC4int (Tabla A4.3).

Los genes *Cgmrx1* y *Cgmrx3* se intentaron deletar utilizando la estrategia del sistema *sacB*. Para la delección se clonó en el plásmido pK18mobsacB (Figura A3.3 y Tabla A4.2) un fragmento de 1.000 pb para cada gen generado mediante PCR de fusión. Las bandas de 1.000 pb para la delección incluyen 500 pb de la región situada aguas arriba de los genes *Cgmrx1* o *Cgmrx3* fusionadas a otro fragmento de 500 pb situado aguas abajo de los genes *Cgmrx1* o *Cgmrx3*. Los dos fragmentos de 500 pb para la delección de cada una de las micorredoxinas fueron amplificados utilizando las parejas de oligonucleótidos mrx1sac1Fw/mrx1sac1Rv y mrx1sac2Fw/mrx1sac2Rv para el gen *Cgmrx1*, y mrx3sac1Fw/mrx3sac1Rv y mrx3sac2Fw/mrx3sac2Rv para el gen *Cgmrx3* (Tabla A4.1). Las reacciones de PCR de fusión de 1.000 pb fueron generadas utilizando las dos PCRs anteriores de 500 pb de cada micorredoxina como moldes con las siguientes parejas de oligonucleótidos mrx1sac1Fw/mrx1sac2Rv para la delección de *Cgmrx1* y mrx3sac1Fw/mrx3sac2Rv para *Cgmrx3*. Finalmente las bandas de 1.000 pb fueron digeridas con *Eco*RI/*Hind*III o *Bam*H/*Xba*I y ligadas a pK18mobsacB digerido con las mismas enzimas, obteniendo los plásmidos pKsacmrx1 y pKsacmrx3, respectivamente (Tabla A4.3).

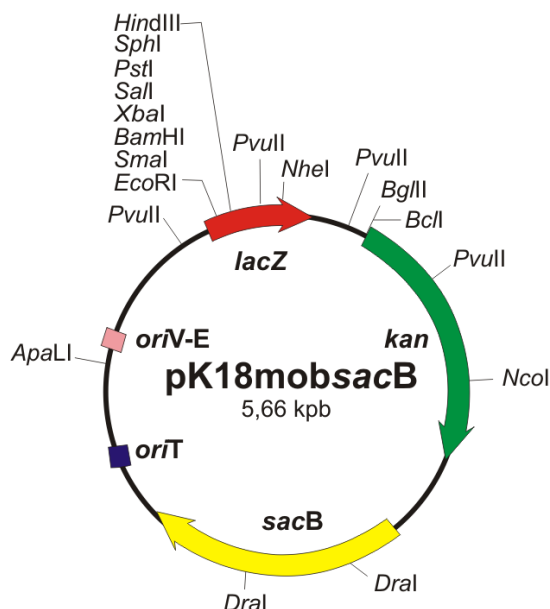


Figura A3.3. Esquema del vector pK18mobsacB.

A.3.3. Complementación o aumento de la expresión génica.

Para aumentar los niveles de las proteínas estudiadas (sobreexpresión) se clonaron los genes que las codifican en plásmidos bifuncionales de corinebacterias-*E. coli*, como el vector pECM2 (Figura A3.4 y Tabla A4.2).

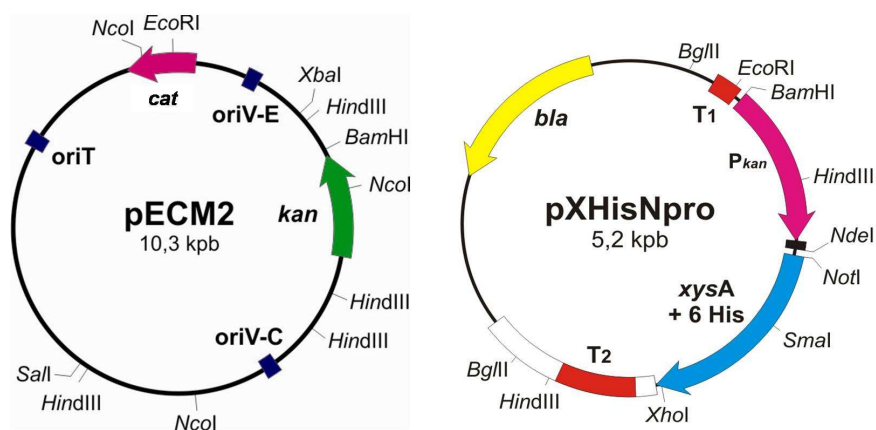


Figura A3.4. Esquema de los vectores pECM2 y pXHisNpro.

Los genes que codifican para las aguaglicerolporinas CdGlpF y ScGlpF de *Corynebacterium diphtheriae* y *Streptomyces coelicolor* A3(2), los reguladores CgArsR1 y CgArsR2 de *C.*

glutamicum y las polifosfato kinasas CgPPK2A y CgPPK2B de *C. glutamicum* fueron amplificados con los oligonucleótidos glpFcdFw/glpFcdRv, glpFscFw/glpFscRv, arsR1Fw/arsR1Rv, arsR2Fw/arsR2Rv, ppk2AFw/ppk2ARv y ppk2BFw/ppk2BRv (Tabla A4.1), y digeridos con *NdeI/XhoI*. Estos fragmentos fueron clonados primero en el vector pHisNpro (Figura A3.4 y Tabla A4.2) igualmente digerido con las mismas enzimas, quedando así el fragmento clonado bajo el control del promotor P_{kan} . De los vectores resultantes, pHCd, pHSc, pHR1, pHR2, pHPPK2A y pHPPK2B, respectivamente (Tabla A4.3), fueron liberados dos fragmentos usando la enzima de restricción *BglII*; los fragmentos *BglII/BglII* conteniendo el promotor P_{kan} con el gen de interés flanqueados por los terminadores T1 y T2 (*cassettes* de *BglII*) fueron subclonados en el plásmido pECM2 (previamente digerido con la enzima *BamHI*), obteniéndose los vectores pECd, pESc, pER1, pER2, pEPPK2A y pEPPK2B (Tabla A4.3), respectivamente.

El fragmento cromosómico formado por los genes *CgarsC1* y *CgarsC1'* fue amplificado como un *cassette* usando el ADN total de *C. glutamicum* ATCC 13032 con las parejas de oligonucleótidos arsC1Fw/arsC1'Rv (Tabla A4.1). El fragmento de 1.135 pb amplificado fue digerido con *NdeI/XhoI* y clonado primero en el vector pHisNpro digerido con las mismas enzimas quedando así el gen *CgarsC1* bajo el control del promotor P_{kan} y el gen *CgarsC1'* bajo su propio promotor. El vector resultante (pHC1C1'; Tabla A4.3) fue digerido con la enzima de restricción *BglII* y el fragmento *BglII/BglII* conteniendo el promotor P_{kan} con los genes de interés flanqueados por dos terminadores fueron subclonados en el plásmido pECM2 digerido con la enzima *BamHI*, obteniéndose el vector pEC1C1' (Tabla A4.3). La versión truncada de la proteína CgArsC1' fue clonada en el vector pECM2 siguiendo un protocolo similar; el fragmento de 348 pb del gen *CgarsC1'T*, careciendo de los 234 nucleótidos que codifican para los 78 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína CgArsC1', fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos arsC1'TFw/arsC1'Rv colocando un codón para una metionina como primer aminoácido de la proteína y usando como molde el ADN total de *C. glutamicum* ATCC 13032. El fragmento amplificado fue digerido con *NdeI/XhoI* y clonado primero en el vector pHisNpro. El vector resultante, pHC1'T, (Tabla A4.3) fue digerido con la enzima de restricción *BglII* y subclonado en el plásmido pECM2 digerido con la enzima *BamHI*, obteniéndose el vector pEC1'T (Tabla A4.3).

Los genes que codifican para las proteínas CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3 junto con sus propias secuencias promotoras fueron amplificados con las parejas de oligonucleótidos acr3-1Fw/acr3-1Rv, acr3-2Fw/acr3-2Rv y acr3-3Fw/acr3-3Rv, respectivamente (Tabla A4.1). Los

A.3.4. Fusión de proteínas a cola de histidinas.

La estrategia utilizada para concentrar proteínas en *C. glutamicum* y en *E. coli* ha sido la fusión del gen que las codifica a una cola de seis u ocho histidinas.

El gen *Cgacr3-1* fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos siguiente acr3-1Fw2/arc3-1HisRv (Tabla A4.1) con lo que se amplifica el gen bajo su propia secuencia promotora, se elimina el codón de fin del gen y se añaden codones para una cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal. Los fragmentos obtenidos se digirieron con *DraI* y se clonaron en el vector pECM2 digerido con *EcoRV*, obteniéndose el plásmido pECacr3His (Tabla A4.3). Ese mismo fragmento amplificado fue digerido con *BamHI/HindIII* y clonado en el vector pKars1up, previamente digerido con las mismas enzimas. El vector resultante fue llamado pKacr3His (Tabla A4.3).

Los genes *CgarsC1'* y *CgarsC4* fueron amplificados con las parejas de oligonucleótidos siguientes arsC1'Fw2/arsC1'HisRv y arsC4Fw2/arsC4HisRv (Tabla A4.1) con lo que se elimina el codón de fin del gen y se añaden codones para una cola de ocho histidinas en el extremo 5' de cada gen. Los fragmentos obtenidos (664 pb y 372 pb, respectivamente) se digirieron con *BamHI/HindIII* y se clonaron en el vector pK18mob, previamente digerido con las mismas enzimas. Los vectores resultantes fueron llamados pKarsC1'His y pKarsC4His (Tabla A4.3).

ANEXO 4. Oligonucleótidos, plásmidos y cepas.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se han diseñado según la secuencia del genoma de *C. glutamicum* anotada en la base de datos EMBL (**NC_006958.1**).

Tabla A4.1. Oligonucleótidos usados en el presente trabajo.

Los sitios de corte para enzimas de restricción aparecen subrayados y las mutaciones introducidas en algunas secuencias se resaltan en negrita y subrayado.

Experimento	Nombre	Gen	Secuencia de nucleótidos (5'- 3')
Inactivación de <i>Cgacr3-3</i>	acr3-3intFw acr3-3intRv	<i>acr3-3</i> <i>acr3-3</i>	CGGGAT <u>CCC</u> GATTCTCGCGCCGTGCATTGATTAC (<i>Bam</i> HI) CCC <u>AAGCTT</u> GGGCTGCCACTTTCTTGCCACTTGCTGAG (<i>Hind</i> III)
Inactivación de <i>CgarsC4</i>	arsC4intFw arsC4intRv	<i>arsC4</i> <i>arsC4</i>	TATTTTAAA <u>GGATCCTT</u> CAGTATCTCAAAGACACG (<i>DraI/Bam</i> HI) TATTTTAAA <u>AAGCTT</u> GCTCAGTTTCAGGTGTTTCTG (<i>DraI/Hind</i> III)
Inactivación de <i>CgarsC1'</i>	arsC1'intFw arsC1'intRv	<i>arsC1'</i> <i>arsC1'</i>	CGGGAT <u>CCC</u> GCTGAAGGTAAGGTGGCTTCAC (<i>Bam</i> HI) CCC <u>AAGCTT</u> GGCACACATCTCCACATCCCATTGTTATG (<i>Hind</i> III)
Inactivación de <i>Cgmx1</i> o <i>Cgmx3</i>	mx1intFw mx1intRv mx3intFw mx3intRv mx1sac1Fw mx1sac1Rv mx1sac2Fw mx1sac2Rv cheqM1 mx3sac1Fw mx3sac1Rv mx3sac2Fw mx3sac2Rv cheqM3	<i>mx1</i> <i>mx1</i> <i>mx3</i> <i>mx3</i> ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	TAATTTAAA <u>AAGCTT</u> ACCTCATCGACGTCGACC (<i>DraI/Bam</i> HI) TAATTTAAA <u>GGATCC</u> ATCGGAGTAGCGCAC (<i>DraI/Hind</i> III) TAATTTAAA <u>GGATCCC</u> CAGATTTTGCCGATTGTTGAGG (<i>DraI/Bam</i> HI) TAATTTAAA <u>AAGCTT</u> GGCACGCGATCACCGAATTCC (<i>DraI/Hind</i> III) TAATTTAAA <u>GAATTC</u> CATTGATGCAGTTCAATGGGGGTAAATTG (<i>DraI/Eco</i> RI) GTTTAAGGAGCAAAC <u>TCTAG</u> AGCAAAAAAGAGCCTTTC (<i>Xba</i> I) GAAAGGCTCTTTTTT <u>GCTCTAG</u> AGTTTGCTCCTTAAAC (<i>Xba</i> I) TAATTTAAA <u>AAGCTT</u> ATTTATGACAACCACAAGGAACAGGTTCG (<i>DraI/Hind</i> III) AAGCAGTTGAGTGCGGCATGTG TAATTTAA <u>AGGATCC</u> CTTCCGGAAGAGTCCCTTGGGCG (<i>DraI/Bam</i> HI) ATGGCTTTCATTCGCGGATTGCGCCCACTCCCTC GAGGGAGTGGGCGCAATCCGCGAATGAAAGCTAC TAATTTAAA <u>TCTAGA</u> GTATGCAGCGCGGTCTGGGTAAGTG (<i>DraI/Xba</i> I) TCTTCCTT <u>CAGAGCT</u> CATGAGACAAAC

Experimento	Nombre	Gen	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')
Purificación de proteínas	Pacr3-1Fw	<i>acr3-1</i>	TAAAAATTT <u>CATATG</u> ACAAACACTCAACTCAGACGCGGG (<i>Dral/Ndel</i>)
	Pacr3-1Rv	<i>acr3-1</i>	TAA AAATTT <u>GGATCC</u> CTATGAGTTGATGATTTGGCTGG (<i>Dral/BamHI</i>)
	arsC4Fw	<i>arsC4</i>	ATTTTAAA <u>CATATG</u> AAAGTCACGATTTTCCATAATCCG (<i>Dral/Ndel</i>)
	arsC4Rv	<i>arsC4</i>	ATTTTAAA <u>CTCGAG</u> TACAAGATGCTGTCAATG (<i>Dral/XhoI</i>)
	arsC1'Fw	<i>arsC1'</i>	ATTTTAAA <u>CATATG</u> ACCGGGCAAGCTGC (<i>Dral/Ndel</i>)
	arsC1'TFw	<i>arsC1'</i>	TAT <u>CATATG</u> CTGCACGCACTTGCG (<i>Ndel</i>)
	arsC1'Rv	<i>arsC1'</i>	ATTTTAAA <u>CTCGAG</u> CTAGTTTTGCGATAATTGAATG (<i>Dral/XhoI</i>)
	mxr3NFw	<i>mxr3</i>	TAA TTTAAA <u>CCATGG</u> GCCATTCGGTGGAG (<i>Dral/Ndel</i>)
mxr3NRv	<i>mxr3</i>	TAA TTTAAA <u>CTCGAG</u> CAACAAAGCATTGGCTAAC (<i>Dral/XhoI</i>)	
mxr3CFw	<i>mxr3</i>	TAA TTTAAA <u>CATATG</u> GGCCATTCGGTGGAG (<i>Dral/NcoI</i>)	
mxr3CRv	<i>mxr3</i>	TAA TTTAAA <u>CTCGAG</u> TCACAACAAAGCATTGGC (<i>Dral/XhoI</i>)	
Sobreexpresión de las arsenito permeasas	acr3-1Fw	<i>acr3-1</i>	TAATTTAAA <u>GGATCC</u> ATCACTGGACAGGGGTC (<i>Dral/BamHI</i>)
	acr3-1Rv	<i>acr3-1</i>	TAATTTAAA <u>AAGCTT</u> CTATGAGTTGATGATTTGGCTGG (<i>Dral/HindIII</i>)
	acr3-2 Fw	<i>acr3-2</i>	TAAGATATC <u>GGATCC</u> GGGACAGGATTCTTAAAC-(<i>Dral/BamHI</i>)
	acr3-2 Rv	<i>acr3-2</i>	TAA GATATC <u>AAGCTT</u> TCATGATCCTGCATTCTCC (<i>Dral/HindIII</i>)
	acr3-3 Fw	<i>acr3-3</i>	TAA TTTAAA <u>GGATCC</u> GGGCAGCATCACCTTCGC (<i>Dral/BamHI</i>)
acr3-3 Rv	<i>acr3-3</i>	TAA TTTAAA <u>AAGCTT</u> TCATGACTCCCCTATGCC (<i>Dral/HindIII</i>)	
Sobreexpresión de las aguaglicerolporinas	glpFcdFw	<i>glpFcd</i>	TATTTTAAA <u>CATATG</u> ACCGCCCTACAAGCATTG (<i>Dral/Ndel</i>)
	glpFcdRv	<i>glpFcd</i>	TATTTTAAA <u>CTCGAG</u> CTACAGCACTACAGTG (<i>Dral/XhoI</i>)
	glpFscFw	<i>glpFsc</i>	TATTTTAAA <u>CATATG</u> GTGCCAGCTCCGAC (<i>Dral/Ndel</i>)
	glpFscRv	<i>glpFsc</i>	TTATTTAAA <u>CTCGAG</u> TCAGGCGAACGCG (<i>Dral/XhoI</i>)
Sobreexpresión de los reguladores	arsR1Fw	<i>arsR1</i>	GGAATTC <u>CATATG</u> AGATTCGGGCTGGCTTGG (<i>EcoRI/Ndel</i>)
	arsR1Rv	<i>arsR1</i>	CCGCTCGAGCAAACGACTCATCATAATTCC (<i>XhoI</i>)
	arsR2Fw	<i>arsR2</i>	GGAATTC <u>CATATG</u> CTATTTAGTAAGGGTCATGAG (<i>EcoRI/Ndel</i>)
	arsR2Rv	<i>arsR2</i>	CCGCTCGAGTTATCCGATTTGCAGGATTGTG (<i>XhoI</i>)
Sobreexpresión de las polifosfato kinasas	ppk2AFw	<i>ppk2A</i>	GGAATTC <u>CATATG</u> CGAAAGAAAAAGACG (<i>EcoRI/Ndel</i>)
	ppk2ARv	<i>ppk2A</i>	CCGCTCGAGCTATTTCTGGACTTC (<i>XhoI</i>)
	ppk2BFw	<i>ppk2B</i>	GGAATTC <u>CATATG</u> GTGGGTAACCTTCCC (<i>EcoRI/Ndel</i>)
	ppk2BRv	<i>ppk2B</i>	CCGCTCGAGACCTTCTACTGAAAG (<i>XhoI</i>)
Sobreexpresión de las arseniato reductasas	arsC1Fw	<i>arsC1</i>	ATTTTAAA <u>CATATG</u> AATAATCAACCATCAGTACTTTTCG (<i>Dral/Ndel</i>)

Experimento	Nombre	Gen	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')
Fusiones a histidinas	acr3-1Fw	<i>acr3-1</i>	CACCTTTAAA <u>GGATCC</u> ATCACTGGACAGGGGTCCCG (<i>DraI/BamHI</i>)
	acr3-1HisRv	<i>acr3-1</i>	TTTAAAAAGCTTCTAATGATGATGATGATGATGTGAGTTGATG ATTT (<i>DraI/HindIII</i>)
	arsC1'Fw2	<i>arsC1'</i>	TAT <u>GGATCC</u> ATGACCGGGCAAGCTGC (<i>BamHI</i>)
	arsC1'HisRv	<i>arsC1'</i>	TATAAGCTTCTAATGATGATGATGATGATGATGATGGTTTTGC GATAATT (<i>HindIII</i>)
	arsC4Fw2	<i>arsC4</i>	TAT <u>GGATCC</u> ATGAAAGTCACGATTTTCCATAATCCG (<i>BamHI</i>)
	arsC4HisRv	<i>arsC4</i>	TATAAGCTTCTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGCAAGATG CTGTCAATG (<i>HindIII</i>)
Mutagénesis dirigida de <i>Cgacr3-1</i>	N-acr3K72A	<i>acr3-1</i>	ATGTACCCACCGTTGGCC <u>GCA</u> GTTCCGGTATGACAAAAC
	C-acr3K72A	<i>acr3-1</i>	AGTTTTGTCATACCGAACT <u>TGC</u> GGCCAACGGTGGGTACAT
	N-acr3C129A	<i>acr3-1</i>	AATTGTAGGACTCGCACGAG <u>GCT</u> ATTGCGATGGTCTTGGTT
	C-acr3C129A	<i>acr3-1</i>	AACCAAGACCATCGCAAT <u>AGC</u> TCGTGCGAGTCTACAATT
	N-acr3R210A	<i>acr3-1</i>	CTTGCTGGAGTTTTCTCG <u>GCA</u> ATTATTGGCGAAAAGATC
	C-acr3R210A	<i>acr3-1</i>	GATCTTTTCGCCAATAAT <u>TGC</u> CGAGAAAACCTCCAGCAAG
	N-acr3T241A	<i>acr3-1</i>	CTAATCGGTCTGCTTTAT <u>GCG</u> ATCGTCTTGTTGTTTTCA
	C-acr3T241A	<i>acr3-1</i>	TGAAAACAACAAGACGAT <u>CGC</u> ATAAAGCAGACCGATTAG
	N-acr3E305A	<i>acr3-1</i>	GCAGCTGGCAACAATTTT <u>GCA</u> CTTGCATTGCGGTGTGC
	C-acr3E305A	<i>acr3-1</i>	CGACACCGCAATCGCAAG <u>TGC</u> AAAATTGTTGCCAGCTGC
	N-acr3E305D	<i>acr3-1</i>	GCAGCTGGCAACAATTTT <u>GCA</u> CTTGCATTGCGGTGTGC
	C-acr3E305D	<i>acr3-1</i>	CGACACCGCAATCGCAAG <u>TGC</u> AAAATTGTTGCCAGCTGC
	N-acr3E305F	<i>acr3-1</i>	GCAGCTGGCAACAATTTT <u>GCA</u> CTTGCATTGCGGTGTGC
	C-acr3E305F	<i>acr3-1</i>	CGACACCGCAATCGCAAG <u>TGC</u> AAAATTGTTGCCAGCTGC
	N-acr3E305K	<i>acr3-1</i>	GCAGCTGGCAACAATTTT <u>GCA</u> CTTGCATTGCGGTGTGC
	C-acr3E305K	<i>acr3-1</i>	CGACACCGCAATCGCAAG <u>TGC</u> AAAATTGTTGCCAGCTGC
	N-acr3E332A	<i>acr3-1</i>	ACGATTGGTCCCTTGATT <u>GCA</u> ATTCCAGTACTTGTCCGGC
	C-acr3E332A	<i>acr3-1</i>	GCCGACAAGTACTGGAAT <u>TGC</u> AATCAAGGGACCAATCGT
Oligonucleótidos universales	M13-20	-----	GTAAAACGACGGCCAG
	M13-26	-----	CAGGAAACAGCTATGAC
	T7p	-----	TAATACGACTCACTATAGGG
	T7t	-----	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Tabla A4.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Tamaño	Descripción	Referencia
pET28a(+)	5,3 kb	Vector de expresión que contiene el origen de replicación <i>ColE1</i> de <i>E. coli</i> y un gen de resistencia a kanamicina. Permite fusionar a un gen en los extremos 5' o 3' secuencias que codifican para seis histidinas.	Novagen
pIVEX2.4d	3,5 kb	Vector que contiene el origen de replicación de <i>E. coli</i> y un gen de resistencia a ampicilina. Permite fusionar a un gen en el extremo 5' secuencias que codifican para seis histidinas.	5-PRIME
pK18mob	3,7 kb	Vector movilizable que contiene el origen de replicación <i>ColE1</i> de <i>E. coli</i> y un gen de resistencia a kanamicina. Puede ser transferido por conjugación mediada por el RP4 de <i>E. coli</i> a otras bacterias.	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pOJ260	3,5 kb	Vector movilizable que contiene el origen de replicación <i>ColE1</i> de <i>E. coli</i> y un gen de resistencia a apramicina. Puede ser transferido por conjugación mediada por el plásmido RP4 de <i>E. coli</i> a otras bacterias.	(Bierman <i>et al.</i> , 1992)
pK18mobsacB	5,6 kb	Vector movilizable derivado del pK18mob que contiene el gen de resistencia a kanamicina y el gen <i>sacB</i> . El vector es usado para generar mutantes delecionados en un determinado gen.	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pECM2	10,8 kb	Vector movilizable capaz de replicarse en <i>E. coli</i> (origen de replicación p15A) y <i>C. glutamicum</i> (origen de replicación pHM1519). Contiene los genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol.	(Jager <i>et al.</i> , 1992)
pEC1	12 kb	Derivado del pECM2 que contiene el gen <i>CgarsC1</i> bajo el promotor P_{kan} .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pEC1'	12,3 kb	Derivado del pECM2 que contiene el gen <i>CgarsC1'</i> bajo el promotor P_{kan} .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pHXisNpro	5,2 kp	Vector que contiene el origen de replicación <i>ColE1</i> de <i>E. coli</i> , un gen de resistencia a ampicilina y el dominio catalítico de la xilanasa (<i>xysA</i>) de <i>Streptomyces halstedii</i> con una cola de histidinas, bajo el promotor del gen de resistencia a kanamicina y flanqueado por los terminadores del gen de resistencia a metilenomicina (T1) y del fago <i>fd</i> (T2).	(Adham <i>et al.</i> , 2001)
pKars1up	4,3 kb	Derivado de pK18mob que contiene un fragmento de 500 pb procedente de una zona aguas arriba del extremo 5' del operón <i>ars1</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2008)

Nombre	Tamaño	Descripción	Referencia
pETarsC2	5,6 kb	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>CgarsC2</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pETarsC1	5,6 kb	Derivado del pET28a(+) que contiene el gen <i>CgarsC1</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pETMtr	6,7 kb	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Cgmtr</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pETmrx1	5,6 kb	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Cgmr1</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pETTrxR	6,2 kb	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>CgtrxR</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pETGrx2	6,0 kb	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Ecgrx2</i> de <i>E. coli</i> .	Prof. Barry Rosen, Universidad de Florida
pETTrx	5,6 kb	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Cgtrx</i> de <i>C. glutamicum</i> .	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2009)
pAT6100	6 kb	Vector que contiene el origen de replicación de <i>E. coli</i> y un gen de resistencia a kanamicina. Contiene el elemento transponible IS6100.	(Mormann <i>et al.</i> , 2006)
pMV23	5,2 kb	Vector que contiene el origen de replicación de <i>E. coli</i> y genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol. Contiene el minitransposón Tn31831 y el gen <i>tnpA</i> de IS31831 en <i>cis</i> .	(Suzuki <i>et al.</i> , 2006)
pSUP301	5 kb	Vector movilizable que contiene el origen de replicación de <i>E. coli</i> y genes de resistencia a ampicilina y kanamicina. Puede ser transferido por conjugación mediada por el plásmido RP4.	(Mateos <i>et al.</i> , 1996)

Tabla A4.3. Plásmidos construidos en este trabajo.

Nombre	Resistencia	Descripción
pETacr3-1	Km ^R	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 5'.
pIVacr3-1	Ap ^R	Derivado de pIVEX2.4d que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 5'.
pETarsC1'	Km ^R	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>CgarsC1'</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 5'.
pETarsC1'T	Km ^R	Derivado de pET28a(+) que contiene la versión truncada del gen <i>CgarsC1'</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 5'.
pETarsC4	Km ^R	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>CgarsC4</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 5'.
pETmr3N	Km ^R	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Cgmr3</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 5'.
pETmr3C	Km ^R	Derivado de pET28a(+) que contiene el gen <i>Cgmr3</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
pKacr3-3int	Km ^R	Derivado de pK18mob que contiene un fragmento interno de 310 pb del gen <i>Cgacr3-3</i> .
pKarsC1'int	Km ^R	Derivado de pK18mob que contiene un fragmento interno de 282 pb del gen <i>CgarsC1'</i> .
pOarsC4int	Am ^R	Derivado de pOJ260 que contiene un fragmento interno de 235 pb del gen <i>CgarsC4</i> .
pKmr1int	Km ^R	Derivado de pK18mob que contiene un fragmento interno de 99 pb del gen <i>Cgmr1</i> .
pKmr3int	Km ^R	Derivado de pK18mob que contiene un fragmento interno de 123 pb del gen <i>Cgmr3</i> .
pECd	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>CdglpF</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pHCd	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el gen <i>CdglpF</i> .
pESc	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>ScglpF</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .

Nombre	Resistencia	Descripción
pHSc	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el gen <i>ScglpF</i> .
pER1	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>CgarsR1</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pHR1	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el gen <i>CgarsR1</i> .
pHR2	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el gen <i>CgarsR2</i> .
pER2	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>CgarsR2</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pHPPK2A	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el gen <i>Cgppk2A</i> .
pEPPK2A	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>Cgppk2A</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pHPPK2B	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el gen <i>Cgppk2B</i> .
pEPPK2B	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>Cgppk2B</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pHC1'T	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene la versión truncada del gen <i>CgarsC1'</i> .
pEC1'T	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene la versión truncada del gen <i>CgarsC1'</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pEC1C1'	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el <i>cassette</i> de los genes <i>CgarsC1</i> y <i>CgarsC1'</i> bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .
pHC1C1'	Ap ^R	Derivado de pHXisNpro que contiene el <i>cassette</i> de los genes <i>CgarsC1</i> y <i>CgarsC1'</i> .
pKsacmrx1	Km ^R	Derivado de pk18mobsacB que contiene un fragmento de 1.000 pb que incluye 500 pb de aguas arriba del gen <i>Cgmrx1</i> y 500 pb aguas abajo del gen <i>Cgmrx1</i> .
pKsacmrx3	Km ^R	Derivado de pk18mobsacB que contiene un fragmento de 1.000 pb que incluye 500 pb de aguas arriba del gen <i>Cgmrx3</i> y 500 pb de aguas abajo del gen <i>Cgmrx3</i> .

Nombre	Resistencia	Descripción
pKacr3-1	Km ^R	Derivado de pKars1up que contiene un fragmento de 1.275 pb que incluye el promotor y el gen <i>Cgacr3-1</i> .
pKacr3-2	Km ^R	Derivado de pKars1up que contiene un fragmento de 1.230 pb que incluye el promotor y el gen <i>Cgacr3-2</i> .
pKacr3-3	Km ^R	Derivado de pKars1up que contiene un fragmento de 1.197 pb que incluye el promotor y el gen <i>Cgacr3-3</i> .
pECacr3-1	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene un fragmento de 1.275 pb que incluye el promotor y el gen <i>Cgacr3-1</i> .
pECacr3-2	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene un fragmento de 1.230 pb que incluye el promotor y el gen <i>Cgacr3-2</i> .
pECacr3-3	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene un fragmento de 1.197 pb que incluye el promotor y el gen <i>Cgacr3-3</i> .
pKacr3His	Km ^R	Derivado de pKars1up que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
pECacr3His	Cm ^R Km ^R	Derivado de pECM2 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
pKarsC1'His	Km ^R	Derivado de pK18mob que contiene el gen <i>CgarsC1'</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
pKarsC4His	Km ^R	Derivado de pK18mob que contiene el gen <i>CgarsC4</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
pKacr3-1K72A	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación K72A.
pKacr3-1C129A	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación C129A.
pKacr3-1R210A	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación R210A.
pKacr3-1T241A	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación T241A.
pKacr3-1E305A	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305A.

Nombre	Resistencia	Descripción
pKacr3-1E305D	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305D.
pKacr3-1E305F	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305F.
pKacr3-1E305K	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305K.
pKacr3-1E332A	Km ^R	Derivado de pKacr3-1 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E332A.
pKacr3-1K72AHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación K72A.
pKacr3-1C129AHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación C129A.
pKacr3-1R210AHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación R210A.
pKacr3-1T241AHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación T241A.
pKacr3-1E305AHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305A.
pKacr3-1E305DHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305D.
pKacr3-1E305FHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305F.
pKacr3-1E305KHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E305K.
pKacr3-1E332AHis	Km ^R	Derivado de pKacr3His que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> con la mutación E332A.

Tabla A4.4. Cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Descripción	Origen o referencia
<i>E. coli</i> TOP10	Cepa utilizada en experimentos de clonación. Genotipo: F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>.</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	Cepa utilizada como donadora en el proceso de conjugación entre <i>E. coli</i> y <i>C. glutamicum</i> . Contiene integrados en su cromosoma los genes <i>tra</i> del plásmido conjugativo RP4. Genotipo: <i>hds pro recA Tc::Mu</i>	(Schafer <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> W3110	Cepa silvestre. Genotipo: F ⁻ (<i>rmD-rmE</i>)	(Bachmann., 1972)
<i>E. coli</i> AW3110	Cepa derivada de <i>E. coli</i> W3110 que tiene sustituido el operón <i>ars</i> por el gen de resistencia a cloranfenicol. Genotipo: Cm ^R	(Carlin <i>et al.</i> , 1995)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Star	Cepa utilizada para la expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> . Genotipo: F2 <i>omp T hsdSB(rB2 mB2) gal dcm (DE3)</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> C43 (λ DE3)	Cepa derivada de la BL21(DE3) utilizada para la expresión de proteínas tóxicas. Genotipo: F – <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Lucigen
<i>E. coli</i> OSBR1	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que tiene interrumpido el gen <i>EcglpF</i> a través del transposón Tn <i>phoA</i> .	(Sanders <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> Cg0223	Cepa derivada de <i>E. coli</i> OSBR1 que contiene el gen <i>cg0223</i> en alto número de copias y bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .	(Ordóñez E. no publicado)
<i>E. coli</i> Cg3387	Cepa derivada de <i>E. coli</i> OSBR1 que contiene el gen <i>cg3387</i> en alto número de copias y bajo el promotor <i>P_{kan}</i> .	(Ordóñez E. no publicado)
<i>C. glutamicum</i> 13032	Cepa silvestre. Colonias amarillas en medio sólido. Fenotipo: Nal ^R .	ATCC
<i>C. glutamicum</i> RES167	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 utilizada como cepa receptora de plásmidos introducidos mediante conjugación. Presenta una modificación en los sistemas de restricción. Fenotipo: Nal ^R .	(Tauch <i>et al.</i> , 2002)

Nombre	Descripción	Origen o referencia
<i>C. glutamicum</i> 2Δars	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta los dos operones ars deletados.	(Ordóñez et al., 2008)
<i>C. glutamicum</i> Acr3-1	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen Cgacr3-1 interrumpido. Anteriormente llamada <i>C. glutamicum</i> ArsB1.	(Ordóñez et al., 2005)
<i>C. glutamicum</i> Acr3-2	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen Cgacr3-2 interrumpido. Anteriormente llamada <i>C. glutamicum</i> ArsB2.	(Ordóñez et al., 2005)
<i>C. glutamicum</i> Acr3-3	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen Cgacr3-3 interrumpido. Anteriormente llamada <i>C. glutamicum</i> ArsB3.	(Ordóñez et al., 2005)
<i>C. glutamicum</i> Acr3-1_Acr3-2	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> Acr3-1 que presenta el gen Cgacr3-2 interrumpido. Anteriormente llamada <i>C. glutamicum</i> ArsB1-B2.	(Ordóñez et al., 2005)
<i>C. glutamicum</i> ArsC1	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen CgarsC1 interrumpido.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> ArsC2	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen CgarsC2 interrumpido.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> ArsC1-C2	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> ArsC1 que presenta el gen CgarsC2 interrumpido.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> MshC	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen CgmshC deletado.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> MshA	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen CgmshA deletado.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> MshB	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen CgmshB deletado.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> MshD	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que presenta el gen CgmshD deletado.	(Ordóñez et al., 2009)
<i>C. glutamicum</i> Cg0223	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen cg0223 en alto número de copias y bajo el promotor Pkan.	(Ordóñez E. no publicado)
<i>C. glutamicum</i> Cg3387	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen cg3387 en alto número de copias y bajo el promotor Pkan.	(Ordóñez E. no publicado)
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Cepa silvestre. Forma colonias que penetran en el agar (micelio vegetativo) y que posteriormente generan un micelio aéreo con esporas.	Prof. David A. Hopwood, John Innes Institute , Norwich, UK

Anexos

Nombre	Descripción	Origen o referencia
<i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129	Cepa silvestre.	Prof. Aruni De Zoysa, Health Protection Agency, London, UK

Tabla A4.5. Cepas obtenidas en el presente trabajo.

Nombre	Resistencia	Descripción
<i>E. coli</i> pKacr3-1	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el plásmido pKacr3-1.
<i>E. coli</i> pKacr3-2	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el plásmido pKacr3-2.
<i>E. coli</i> pKacr3-3	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el plásmido pKacr3-3.
<i>E. coli</i> pKacr3His	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el plásmido pKacr3His.
<i>E. coli</i> K72A	Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación K72A.
<i>E. coli</i> C129A	Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación C129A.
<i>E. coli</i> R210A	Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación R210A.
<i>E. coli</i> T241A	Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación T241A.
<i>E. coli</i> E305A	Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación E305A.
<i>E. coli</i> E332A	Km ^R	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AW3110 que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación E332A.
<i>C. glutamicum</i> pECacr3-1	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pECacr3-1.
<i>C. glutamicum</i> pECacr3-2	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pECacr3-2.
<i>C. glutamicum</i> pECacr3-3	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pECacr3-3.
<i>C. glutamicum</i> pKacr3-1	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pKacr3-1.
<i>C. glutamicum</i> pKacr3-2	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pKacr3-2.

Nombre	Resistencia	Descripción
<i>C. glutamicum</i> pKacr3-3	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pKacr3-3.
<i>C. glutamicum</i> pKacr3His	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pKacr3His.
<i>C. glutamicum</i> pECacr3His	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el plásmido pECacr3His.
<i>C. glutamicum</i> K72A	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación K72A.
<i>C. glutamicum</i> C129A	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación C129A.
<i>C. glutamicum</i> R210A	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación R210A.
<i>C. glutamicum</i> T241A	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación T241A.
<i>C. glutamicum</i> E305A	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación E305A.
<i>C. glutamicum</i> E332A	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-1</i> bajo su propio promotor y con la mutación E332A.
<i>C. glutamicum</i> CdGlpF	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el plásmido pECd.
<i>C. glutamicum</i> ScGlpF	Cm ^R Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el plásmido pEsc.
<i>C. glutamicum</i> 2Δars_Acr3-3	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>Cgacr3-3</i> interrumpido.
<i>C. glutamicum</i> ArsC1'	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>CgarsC1'</i> interrumpido.
<i>C. glutamicum</i> ArsC4	Am ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>CgarsC4</i> interrumpido.
<i>C. glutamicum</i> 2Δars_ArsC4	Am ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> 2Δars que contiene el gen <i>CgarsC4</i> interrumpido.

Nombre	Resistencia	Descripción
<i>C. glutamicum</i> ArsC1'His	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>CgarsC1'</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
<i>C. glutamicum</i> ArsC4His	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>CgarsC4</i> fusionado a una cola de histidinas en el extremo 3'.
<i>C. glutamicum</i> Mrx1	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>Cgmrx1</i> interrumpido.
<i>C. glutamicum</i> DELMrx1	---	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>CgarsC1'</i> deletado.
<i>C. glutamicum</i> Mrx3	Km ^R	Cepa derivada de <i>C. glutamicum</i> RES167 que contiene el gen <i>Cgmrx3</i> interrumpido.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

Maltonen E. K. J., Silow M. (2008). Transmembrane topology of the Acr3 family arsenite transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 963-973.

Achour A. R., Bauda P., Billard P. (2007). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol* **158**, 128-137.

Achour-Rokbani A., Cordi A., Poupin P., Bauda P., Billard P. (2010). Characterization of the *ars* gene cluster from extremely arsenic-resistant *Microbacterium* sp. strain A33. *Appl Environ Microbiol* **76**, 948-955.

Adham S. A., Campelo A. B., Ramos A., Gil J. A. (2001). Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered *xysA* gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5425-5430.

Agre P., King L. S., Yasui M., Guggino W. B., Ottersen O. P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S. (2002). Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* **542**, 3-16.

Agusa T., Kunito T., Kubota R., Inoue S., Fujihara J., Minh T. B., Ha N. N., Tu N. P., Trang P. T., Chamnan C., Takeshita H., Iwata H., Tuyen B. C., Viet P. H., Tana T. S., Tanabe S. (2010). Exposure, metabolism, and health effects of arsenic in residents from arsenic-contaminated groundwater areas of Vietnam and Cambodia: a review. *Rev Environ Health* **25**, 193-220.

Ahmann D., Roberts A. L., Krumholz L. R., Morel F. M. (1994). Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* **27**, 371-750.

Ahmad S., Kitchin K. T., Cullen W. R. (2000). Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch Biochem Biophys* **382**, 195-202.

Ajees A. A., Yang J., Rosen B. P. (2010). The ArsD As(III) metallochaperone. *Biometals* **25**, PMID: 21188475.

Akter K. F., Owens G., Davey D. E., Naidu R. (2005). Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Rev Environ Contam Toxicol* **184**, 97-149.

Albores A., Koropatnick J., Cherian M. G., Zelazowski A. J. (1992). Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production *in vivo*. *Chem Biol Interact* **85**, 127-40.

Amyes S. G. (1997). Antibiotic resistance, resistance mediated by inhibitor-resistant and extended-spectrum TEM and SHV β -lactamases. *J Med Microbiol* **46**, 454-457.

Arnér E. S. J., Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**, 6102-6109.

Aslund F., Ehn B., Miranda-Vizuete A., Pueyo C., Holmgren A. (1994). Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9813-9817.

Aslund F., Nordstrand K., Berndt K. D., Nikkola M., Bergman T., Ponstingl H., Jörnvall H., Otting G., Holmgren A. (1996). Glutaredoxin-3 from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**, 6736-6745.

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

Auwaerter P. G., Dove J., Mackowiak P. A. (2011). Simon Bolivar's medical labyrinth: An infectious diseases conundrum. *Clin Infect Dis* **52**, 78-85.

Azevedo J. S., Silva-Rocha R., Silva A., Peixe Carepo M. S., Cruz Schneider M. P. (2008). Gene expression of the arsenic resistance operon in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. *Can J Microbiol* **54**, 137-142.

B**achmann B. J. (1972).** Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Mol Biol Rev* **36**, 525-557.

- Balakumar P., Kaur J. (2009).** Arsenic exposure and cardiovascular disorders: an overview. *Cardiovasc Toxicol* **9**, 169-176.
- Barksdale L. (1970).** *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev* **36**, 407-477.
- Baker-Austin C., Dopson M., Wexler M., Sawers R. G., Stemmler A., Rosen B. P., Bond P. L. (2007).** Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Extremophiles* **11**, 425-434.
- Belrhli H., Nollert P., Royant A., Menzel C., Rosenbusch J. P., Landau E. M., Pebay-Peyroula E. (1999).** Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution. *Structure* **7**, 909-917.
- Bennett M. S., Guan Z., Laurberg M., Su X. (2001).** *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13577-13582.
- Bentley R., Chasteen T. G. (2002).** Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 250-271.
- Bernstam L., Nriagu J. (2000).** Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **3**, 293-322.
- Beyersmann D., Hartwig A. (2008).** Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* **82**, 493-512.
- Bhattacharjee H., Rosen B. P. (2007).** Arsenic metabolism in procaryotic and eukaryotic microbes. In: *Molecular microbiology of heavy metals. Microbiology monographs*, pp. 371-406.
- Bhattacharya P., Welch A. H., Stollenwerk K. G., McLaughlin M. J., Bundschuh J., Panaullah G. (2007).** Arsenic in the environment: Biology and chemistry. *Sci Total Environ* **379**, 109-120.
- Bienert G. P., Thorsen M., Schussler M. D., Nilsson H. R., Wagner A., Tamas M. J., Jahn T. P. (2008).** A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. *BMC Biol* **6**, 26.
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E. T., Rao R. N., Schoner B. E. (1992).** Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43-49.
- Boal A. K., Rosenzweig A. C. (2009).** Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev* **109**, 4760-4779.
- Bobrowicz P., Wysocki R., Owsianik G., Goffeau A., Ulaszewski S. (1997).** Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 819-828.

Borgnia M., Nielsen S., Engel A., Agre P. (1999). Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* **68**, 425-458.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Branco R., Chung A., Morais P. (2008). Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. *BMC Microbiol* **8**, 95.

Bryson K., McGuffin L. J., Marsden R. L., Ward J. J., Sodhi J. S., Jones D. T. (2005). Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Research* **33**, 36-38.

Bun-Ya M., Harashima S., Oshima Y. (1992). Putative GTP-binding protein, Gtr1, associated with the function of the Pho84 inorganic phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 2958-2966.

Bun-ya M., Shikata K., Nakade S., Yompakdee C., Harashima S., Oshima Y. (1996). Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29**, 344-351.

Bushweller J. H., Aslund F., Wüthrich K., Holmgren A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14-S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31**, 9288-9293.

Butcher B. G., Deane S. M., Rawlings D. E. (2000). The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1826-1833.

Butcher B. G., Rawlings D. E. (2002). The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology* **148**, 3983-3992.

Cai J., Salmon K., DuBow M. (1998). A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology* **144**, 2705-2713.

Cai L., Liu G., Rensing C., Wang G. (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol* **9**, 4.

Cánovas D., Cases I., de Lorenzo V. (2003). Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* **5**, 1242-1256.

Carew M. W., Leslie E. M. (2010). Selenium-dependent and -independent transport of arsenic by the human multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2): Implications for the mutual detoxification of arsenic and selenium. *Carcinogenesis* **31**, 1450-1455.

- Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B. (1995).** The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol* **177**, 981-986.
- Castillo R., Saier M. H. (2010).** Functional Promiscuity of Homologues of the Bacterial ArsA ATPases. *Int J Microbiol* doi:10.1155/2010/187373.
- Catarecha P., Segura M. D., Franco-Zorrilla J. M., Garcia-Ponce B., Lanza M., Solano R., Paz-Ares J., Leyva A. (2007).** A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* **19**, 1123-1133.
- Cavet J. S., Meng W., Pennella M. A., Appelhoff R. J., Giedroc D. P., Robinson N. J. (2002).** A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. *J Biol Chem* **277**, 38441-38448.
- Cavet J. S., Graham A. I., Meng W., Robinson N. J. (2003).** A cadmium-lead-sensing ArsR-SmtB repressor with novel sensory sites: Complementary metal discrimination by NMTR and CMTR in a common cytosol. *J Biol Chem* **278**, 44560-44566.
- Centeno J. A., Mullick F. G., Martinez L., Page N. P., Gibb H., Longfellow D., Thompson C., Ladich E. R. (2002).** Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environ Health Perspect* **5**, 883-886.
- Centeno J. A., Tseng C. H., Van der Voet G. B., Finkelman R. B. (2007).** Global impacts of eogenic arsenic: a medical geology research case. *Ambio*. **36**, 78-81.
- Chang J. S., Ren X., Kim K. W. (2008).** Biogeochemical cyclic activity of bacterial *arsB* in arsenic-contaminated mines. *J Environ Sci* **20**, 1348-1355.
- Chao Y., Fu D. (2004).** Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* **26**, 12043-12050.
- Chauhan N. S., Ranjan R., Purohit H. J., Kalia V. C., Sharma R. (2009).** Identification of genes conferring arsenic resistance to *Escherichia coli* from an effluent treatment plant sludge metagenomic library. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 130-139.
- Chen C. M., Misra T. K., Silver S., Rosen B. P. (1986).** Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol Chem* **261**, 15030-15038.
- Chen C., Wang S., Chiou J., Tseng C., Chiou H., Hsueh Y., Chen S., Wu M., Lai M. (2007).** Arsenic and diabetes and hypertension in human populations: A review. *Toxicol Appl Pharmacol* **222**, 298-304.
- Chen Y., Rosen B. P. (1997).** Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. *J Biol Chem* **272**, 14257-14262.
- Chung C. T., Niemela S. L., Miller R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2172-2175.

Cleiss-Arnold J., Koechler S., Proux C., Fardeau M., Dillies M., Coppee J., Arsene-Ploetze F., Bertin P. (2010). Temporal transcriptomic response during arsenic stress in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *BMC Genomics* **11**, 709.

Cobbett C., Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 159-182.

Cole S. P. C., Sparks K. E., Fraser K., Loe D. W., Grant C. E., Wilson G. M., Deeley R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* **54**, 5902-5910.

Cole S. P. C., Deeley R. G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 438-446.

Correia, A. (1995). Biología molecular de corinebacteria productoras de aminoácidos: Análise do genoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. *Tesis Doctoral*. Universidad de Aveiro.

Costa J. J., Michel J. L., Rappuoli R., Murphy J. R. (1981). Restriction map of corynebacteriophages β_c and β_{vir} and physical localization of the diphtheria *tox* operon. *J Bacteriol* **148**, 124-130.

Cruz B. H., Díaz-Cruz J. M., Ariño C., Esteban M. (2005). Complexation of heavy metals by phytochelatins: voltammetric study of the binding of Cd^{2+} and Zn^{2+} ions by the phytochelatin $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3\text{Gly}$ assisted by multivariate curve resolution. *Environ Sci Technol* **39**, 778-786.

Culotta V. C., Klomp L. W. J., Strain J., Casareno R. L. B., Krems B., Gitlin J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**, 23469-23472.

Cure G. L., Keddie R. M. (1973). Methods for the morphological examination of aerobic coryneform bacteria. In *Sampling - Microbiological Monitoring of Environments*, pp. 123-135. Eds. Board R. G., Lovelock. D. W. London: Academic Press.

Datta R., Quispe M. A., Sarkar D. (2011). Greenhouse study on the phytoremediation potential of vetiver grass, *Chrysopogon zizanioides* L., in arsenic-contaminated soils. *Bull Environ Contam Toxicol* **86**, 124-128.

De Kerpel, M., Van Molle I., Brys L., Wyns L., De Greve H., Bouckaert J. (2006). N-terminal truncation enables crystallization of the receptor-binding domain of the FedF bacterial adhesin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 1278-1282.

de Miguel-Martinez I., Fernández-Fuertes F., Ramos-Macías A., Bosch-Benitez J. M., Martín-Sánchez A. M. (1996). Sepsis due to multiply resistant *Corynebacterium amycolatum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 617-618.

Deeley R. G., Cole S. P. C. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett* **580**, 1103-1111.

delCardayré S. B., Davies J. E. (1998). *Staphylococcus aureus* coenzyme A disulfide reductase, a new subfamily of pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase. *J Biol Chem* **273**, 5752-5757.

Delnomdedieu M., Basti M. M., Otvos J. D., Thomas D. J. (1994). Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chem Biol Interact* **90**, 139-155.

Dembitsky V. M., Levitsky D. O. (2004). Arsenolipids. *Prog Lipid Res* **43**, 403-448.

DeMel S., Shi J., Martin P., Rosen B. P., Edwards B. F. P. (2004). Arginine 60 in the ArsC arsenate reductase of *E. coli* plasmid R773 determines the chemical nature of the bound As(III) product. *Protein Sci* **13**, 2330-2340.

den Hengst C. D., Buttner M. J. (2008). Redox control in actinobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1201-1216.

Dey S., Dou D. X., Tisa L. S., Rosen B. P. (1994). Interaction of the catalytic and the membrane subunits of an oxyanion-translocating ATPase. *Arch Biochem Biophys* **311**, 418-424.

Dey S., Rosen B. P. (1995). Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J Bacteriol* **177**, 385-389.

Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U., Hacker J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414-424.

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.

Drahota P., Filippi M. (2009). Secondary arsenic minerals in the environment: A review. *Environ Int* **35**, 1243-1255.

Drew D., Lerch M., Kunji E., Slotboom D.J., de Gier J.W. (2006). Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods* **3**, 303-313.

Duan G. L., Zhou Y., Tong Y. P., Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Zhu Y. G. (2007). A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytol* **174**, 311-321.

Eapen S., D'Souza S. F. (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnol Adv* **23**, 97-114.

Endo G., Silver S. (1995). CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. *J Bacteriol* **177**, 4437-4441.

Esteban J., Nieto E., Calvo R., Fernández-Robals R., Valero-Guillén P. L., Soriano F. (1999). Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**, 518-521.

Fanou A., Weiss W., Görg A., Jacob F., Parlar H. (2008). A proteome analysis of the cadmium and mercury response in *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **8**, 4976-4986.

Fanou A., Hecker M., Görg A., Parlar H., Jacob F. (2010). *Corynebacterium glutamicum* as an indicator for environmental cobalt and silver stress—a proteome analysis. *J Environ Sci Health B*. **45**, 666-675.

Feng J., Che Y., Milse J., Yin Y., Liu L., Rückert C., Shen X., Qi S., Kalinowski J., Liu S. (2006). The gene NCgl2918 encodes a novel maleylpyruvate isomerase that needs mycothiol as cofactor and links mycothiol biosynthesis and gentisate assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **281**, 10778-10785.

Fernández-Natal I., Guerra J., Alcoba M., Cachón F., Soriano F. (2001). Bacteremia caused by multiply resistant *Corynebacterium urealyticum*: six case reports and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**, 514-517.

Feo J. C., Ordóñez E., Letek M., Castro M. A., Muñoz M. I., Gil J. A., Mateos L. M., Aller A. J. (2007). Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Res* **41**, 531-542.

Finn R. D., Tate J., Mistry J., Coghill P. C., Sammut S. J., Hotz H., Ceric G., Forslund K., Eddy S. R., Sonnhammer E. L. L., Bateman A. (2008). The pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **36**, 281-288.

Finney L. A., O'Halloran T. V. (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**, 931-936.

Fitch W. M., Bruschi M. (1987). The evolution of prokaryotic ferredoxins with a general method correcting for unobserved substitutions in less branched lineages. *Mol Biol Evol* **4**, 381-394.

Fiuza M., Canova M. J., Zanella-Cléon I., Becchi M., Cozzone A. J., Mateos L. M., Kremer L., Gil J. A., Molle V. (2008). From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J Biol Chem* **27**, 18099-18112.

Flora S.J., Pachauri V., Mittal M., Kumar D. (2011). Interactive effect of arsenic and fluoride on cardio-respiratory disorders in male rats: possible role of reactive oxygen species. *Biometals* **18**. PMID: 21243404.

Fu H. L., Meng Y., Ordóñez E., Villadangos A. F., Bhattacharjee H., Gil J. A., Mateos L. M., Rosen B. P. (2009). Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **24**, 19887-19895.

Fu H., Rosen B. P., Bhattacharjee H. (2010). Biochemical characterization of a novel ArsA ATPase complex from *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF. *FEBS Lett* **584**, 3089-3094.

Fu H., Jiang X., Rosen B. P. (2011). Metalloid transport systems. In: *Biological chemistry of arsenic, antimony and bismuth*. pp. 181-207. Eds. Sun H., Winley J.

Funke G., Punter V., Von Graevenitz A. (1996). Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2874-2878.

Gebel T. (1997). Arsenic and antimony: Comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem Biol Interact* **107**, 131-144.

Ghosh M., Shen J., Rosen B. P. (1999). Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5001-5006.

Gladysheva T., Liu J., Rosen B. P. (1996). His-8 lowers the pK_a of the essential Cys-12 residue of the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *J Biol Chem* **271**, 33256-33260.

Gold B., Deng H., Bryk R., Vargas D., Eliezer D., Roberts J., Jiang X., Nathan C. (2008). Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat Chem Biol* **4**, 609-616.

Goodfellow M. (1989). Supragenetic classification of actinomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriol.* Eds. William, S. T., Sharpe, M. E., Holt, J. G. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. **4**, 2333-2339.

Goodfellow M. (2010). The Actinobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Eds. Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H., Trujillo M., Suzuki K., Ludwig W., Whitman W. B. ISBN 0-387-95042-7

Gordon E., Horsefield R., Swarts H. G. P., de Pont J. J. H. H. M., Neutze R., Snijder A. (2008). Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **62**, 1-8.

Gouet P., Courcelle E., Stuart D. I., Metz F. (1999). ESPript: Analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308.

Gourbal B., Sonuc N., Bhattacharjee H., Legare D., Sundar S., Ouellette M., Rosen B. P., Mukhopadhyay R. (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**, 31010-31017.

Greven M., Green S., Robinson B., Clothier B., Vogeler I., Agnew R., Neal S., Sivakumaran S. (2007). The impact of CCA-treated posts in vineyards on soil and ground water. *Water Sci Technol* **56**, 161-168.

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1987). Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 439-443.

Guo X., Li Y., Peng K., Hu Y., Li C., Xia B., Jin C. (2005). Solution structures and backbone dynamics of arsenate reductase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **280**, 39601-39608.

Ha S., Smith A. P., Howden R., Dietrich W. M., Bugg S., O'Connell M. J., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**, 1153-1164.

Haimeur A., Conseil G., Deeley R. G., Cole S. P. C. (2004). Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* **65**, 1375-1385.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

Harold F. M. (1972). Ion transport and electrogenesis in bacteria. *Biochem J* **127**, 49P-50P.

Hayakawa T., Kobayashi Y., Cui X., Hirano S. (2005). A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* **79**, 183-191.

Heck J. E., Chen Y., Grann V. R., Slavkovich V., Parvez F., Ahsan H. (2008). Arsenic exposure and anemia in Bangladesh: a population-based study. *J Occup Environ Med* **50**, 80-87.

Heery D. M., Dunican L. K. (1989). Improved efficiency M13 cloning using electroporation. *Nucleic Acids Res* **17**, 8006-8006.

Heller K. B., Lin E. C., Wilson T. H. (1980). Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**, 274-278.

Helmann J. D. (2010). Bacillithiol, a new player in bacterial redox homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. Doi: 10.1089/ars2010.3562.

Hirata K., Tsuji N., Miyamoto K. (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *J Biosci Bioeng* **100**, 593-599.

Holmes D. S., Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-197.

Holmgren A., Aslund F. (1995). Glutaredoxin. *Methods Enzymol* **252**, 283-292.

Houssin C., Nguyen D. T., Leblon G., Bayan N. (2002). S-layer protein transport across the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*: *in vivo* kinetics and energy requirements. *FEMS Microbiol Lett* **19**, 71-79.

Hsu C. M., Rosen B. P. (1989). Characterization of the catalytic subunit of an anion pump. *J Biol Chem* **264**, 17349-17354.

Huang Z. C., An Z. Z., Chen T. B., Lei M., Xiao X. Y., Liao X. Y. (2007). Arsenic uptake and transport of *Pteris vittata* L. as influenced by phosphate and inorganic arsenic species under sand culture. *J Environ Sci* **19**, 714-718.

Indriolo E., Na G., Ellis D., Salt D. E., Banks J. A. (2010). A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell* **22**, 2045-2057.

Islam F. S., Gault A. G., Boothman C., Polya D. A., Charnock J. M., Chatterjee D., Lloyd J. R. (2004). Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature* **430**, 68-71.

Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **24**, 660-669.

Jäger W., Schafer A., Puhler A., Labes G., Wohlleben W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**, 5462-5465.

Ji G., Silver S. (1992). Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* **174**, 3684-3694.

Ji G., Garber E. A., Armes L. G., Chen C. M., Fuchs J. A., Silver S. (1994). Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Biochemistry* **33**, 7294-7299.

Jiang X., McDermott J. R., Ajees A. A., Rosen B. P., Liu Z. (2010). Trivalent arsenicals and glucose use different translocation pathways in mammalian GLUT1. *Metallomics* **2**, 211-219.

Johnson T., Newton G. L., Fahey R. C., Rawat M. (2009). Unusual production of glutathione in Actinobacteria. *Arch Microbiol* **191**, 89-93.

Kaback H. R. (1974). Transport studies in bacterial membrane vesicles. *Science* **6**, 882-892.

Kägi J.H. (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**, 613-626.

Kandegedara A., Thiyagarajan S., Kondapalli K. C., Stemmler T. L., Rosen B. P. (2009). Role of bound Zn(II) in the CadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor. *J Biol Chem* **284**, 14958-14965.

Kaneko H., Sakaguchi K. (1979). Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric Biol Chem* **43**, 1007-1013.

Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirose M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Housouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okamura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* **3**, 109-136.

Kang S. H., Singh S., Kim J., Lee W., Mulchandani A., Chen W. (2007). Bacteria metabolically engineered for enhanced phytochelatin production and cadmium accumulation. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6317-6320.

Kapaj S., Peterson H., Liber K., Bhattacharya P. (2006). Human health effects from chronic arsenic poisoning: A review. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **41**, 2399-2428.

Karin M. (1985). Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell* **41**, 9-10.

Kashket E. R., Wilson T. H. (1974). Protonmotive force in fermenting *Streptococcus lactis* 7962 in relation to sugar accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* **59**, 879-886.

Katz S. A., Salem H. (2005). Chemistry and toxicology of building timbers pressure-treated with chromated copper arsenate: A review. *J Appl Toxicol* **25**, 1-7.

Keppler D. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* **201**, 299-323.

Khan B. I., Jambeck J., Solo-Gabriele H. M., Townsend T. G., Cai Y. (2006). Release of arsenic to the environment from CCA-treated wood. 2. Leaching and speciation during disposal. *Environ Sci Technol* **40**, 994-999.

Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chen B. F., Hopwood D. A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. Edited by Anonymous. Norwich: The John Innes Foundation.

Kile M. L., Hoffman E., Rodrigues E. G., Breton C. V., Quamruzzaman Q., Rahman M., Mahiuddin G., Hsueh Y., Christiani D. C. (2011). A pathway-based analysis of urinary arsenic metabolites and skin lesions. *Am J Epidemiol* **173**, 778-786.

Kim Y. J., Kim J. H., Lee C. E., Mok Y. G., Choi J. S., Shin H. S., Hwang S. (2006). Expression of yeast transcriptional activator MSN1 promotes accumulation of chromium and sulfur by enhancing sulfate transporter level in plants. *FEBS Lett* **580**, 206-210.

King L. S., Kozono D., Agre P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 687-698.

Kintz P., Ginet M., Marques N., Cirimele V. (2007). Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic Sci Int* **170**, 204-206.

Kitchin K. T., Wallace K. (2008). Evidence against the nuclear in situ binding of arsenicals—oxidative stress theory of arsenic carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**, 252-257.

Kligerman A. D., Malik S. I., Campbell J. A. (2010). Cytogenetic insights into DNA damage and repair of lesions induced by a monomethylated trivalent arsenical. *Mutat Res* **695**, 2-8.

Kneer R., Kutchan T. M., Hochberger A., Zenk M. H. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch Microbiol* **157**, 305-310.

Kostal J., Yang R., Wu C. H., Mulchandani A., Chen W. (2004). Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4582-4587.

Kreppel H., Bauman J. W., Liu J., McKim J. M., Klaassen C. D. (1993). Induction of metallothionein by arsenicals in mice. *Fundam Appl Toxicol* **20**, 184-189.

Kulp D., Haussler D., Reese M. G., Eeckman F. H. (1996). A generalized hidden Markov model for the recognition of human genes in DNA. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **4**, 134-142.

Kumar K. S., Dayananda S., Subramanyam C. (2005). Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Lett* **242**, 45-50.

Kuroda M., Dey S., Sanders O. I., Rosen B. P. (1997). Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the ars anion-translocating ATPase. *J Biol Chem* **272**, 326-331.

Kwaszewska A., Szewczyk E. M. (2007). Production of antibacterial substances by resident corynebacteria isolated from human skin. *Med Dosw Mikrobiol* **59**, 251-257.

Kwong Y. L., Todd D. (1997). Delicious poison: Arsenic trioxide for the treatment of leukemia. *Blood* **89**, 3487.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee M., Paik I. S., Kim I., Kang H., Lee S. (2007). Remediation of heavy metal contaminated groundwater originated from abandoned mine using lime and calcium carbonate. *J Hazard Mater* **144**, 208-214.

Lee D. J., Ho K. L., Chen Y. Y. (2011). Degradation of cresols by phenol-acclimated aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 209-215.

Lehmann K. B., Neumann R. O. (1907). Atlas und grundis der bakteriologischen diagnostik. Munchen.

Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Cole S. P., Deeley R. G., Keppler D. (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* **269**, 27807-27810.

Leipe D. D., Wolf Y. I., Koonin E. V., Aravind L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**, 41-72.

Leslie E. M., Deeley R. G., Cole S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**, 216-237.

Li B., Lin J., Mi S., Lin J. (2010). Arsenic resistance operon structure in *Leptospirillum ferriphilum* and proteomic response to arsenic stress. *Bioresour Technol* **101**, 9811-9814.

Li J., Waters S. B., Drobna Z., Devesa V., Styblo M., Thomas D. J. (2005). Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**, 164-169.

Li R., Haile J. D., Kennelly P. J. (2003). An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. *J Bacteriol* **185**, 6780-6789.

Li R., Ago Y., Liu W., Mitani N., Feldmann J., McGrath S. P., Ma J. F., Zhao F. (2009). The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species. *Plant Physiol* **150**, 2071-2080.

Li X., Krumholz L. R. (2007). Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* gene. *J Bacteriol* **189**, 3705-3711.

Li Y., Hu Y., Zhang X., Xu H., Lescop E., Xia B., Jin C. (2007). Conformational fluctuations coupled to the thiol-disulfide transfer between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **282**, 11078-11083.

Lièvre D., Bertin P. N., Lett M. C. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie* **91**, 1229-1237.

Lightfoot N. E., Pacey M. A., Darling S. (2010). Gold, nickel and copper mining and processing. *Chronic Dis Can* **29**, 101-124.

Lillig C. H., Berndt C., Holmgren A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1304-1317.

Lin Y. F., Yang J., Rosen B. P. (2007). ArsD: An as(III) metallochaperone for the ArsAB as(III)-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 453-458.

Lindner S. N., Vidaurre D., Willbold S., Schoberth S. M., Wendisch V. F. (2007). NCgl2620 encodes a class II polyphosphate kinase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5026-5033.

Liochev S. I., Fridovich I. (2002). Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. *J Biol Chem* **277**, 34674-34678.

Lipman, D. J., Pearson, W. R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**, 1435-1441.

Liu J., Gladysheva T. B., Lebe L., Rosen B. P. (1995). Identification of an essential cysteinyl residue in the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* **34**, 13472-13476.

Liu J., Rosen B. P. (1997). Ligand interactions of the ArsC arsenate reductase. *J Biol Chem* **272**, 21084-9.

Liu J., Kadiiska M. B., Liu Y., Lu T., Qu W., Waalkes M. P. (2001). Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* **61**, 314–320.

Liu Z., Shen J., Carbrey J. M., Mukhopadhyay R., Agre P., Rosen B. P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 6053-6058.

Liu Z., Carbrey J. M., Agre P., Rosen B. P. (2004a). Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 1178-1185.

Liu Z., Boles E., Rosen B. P. (2004b). Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 17312-17318.

Liu Z., Styblo M., Rosen B. P. (2006a). Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environ Health Perspect* **114**, 527-531.

Liu Z., Sanchez M. A., Jiang X., Boles E., Landfear S. M., Rosen B. P. (2006b). Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 424-430.

López-Maury L., Florencio F. J., Reyes J. C. (2003). Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **185**, 5363-5371.

López-Maury L., Sanchez-Riego A. M., Reyes J. C., Florencio F. J. (2009). The Glutathione/Glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **191**, 3534-3543.

Lu J., Chew E., Holmgren A. (2007). Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 12288-12293.

Lugli A., Zlobec I., Singer G., Kopp Lugli A., Terracciano L. M., Genta R. M. (2007). Napoleon Bonaparte's gastric cancer: a clinicopathologic approach to staging, pathogenesis, and etiology. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **4**, 52-57.

Luo S., Levine R. L. (2009). Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* **23**, 464-472.

Maciaszczyk E., Wysocki R., Golik P., Lazowska J., Ulaszewski S. (2004). Arsenical resistance genes in *Saccharomyces douglasii* and other yeast species undergo rapid evolution involving genomic rearrangements and duplications. *FEMS Yeast Res* **4**, 821-832.

Maciaszczyk-Dziubinska E., Wawrzycka D., Sloma E., Migocka M., Wysocki R. (2010). The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 2170-2175.

Maciaszczyk-Dziubinska E., Migocka M., Wysocki R. (2011). Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H(+) and Sb(III)/H(+) exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **4**, doi:10.1016/j.bbamem.2011.03.014.

Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T. (1996). The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110**, 1145-1150.

Mandal B. K., Suzuki K. T. (2002). Arsenic round the world: A review. *Talanta* **58**, 201-235.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York*.

Mansour N. M., Sawhney M., Tamang D. G., Vogl C., Saier M. H. (2007). The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J* **274**, 612-629.

Marapakala K., Ajees A. A., Qin J., Sankaran B., Rosen B. P. (2010). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the ArsM As(III) S-adenosylmethionine methyltransferase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**, 1050-1052.

Margesin R., Plaza G. A., Kasenbacher S. (2011). Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere* **82**, 1583-1588.

Marnett L. J. (1999). Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ* **150**, 17-27.

Martin P., DeMel S., Shi J., Gladysheva T., Gatti D. L., Rosen B. P., Edwards B. F. P. (2001). Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure* **9**, 1071-1081.

Martinez-Martinez L., Ortega M. C., Suarez A. I. (1995). Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* **33**, 1318-1321.

Mateos L. M., Schafer A., Kalinowski J., Martin J. F., Puhler A. (1996). Integration of narrow-host-range vectors from *Escherichia coli* into the genomes of amino acid-producing corynebacteria after intergeneric conjugation. *J Bacteriol* **178**, 5768-5775.

Mathieu J. L., Gadgil A. J., Addy S. E., Kowolik K. (2010). Arsenic remediation of drinking water using iron-oxide coated coal bottom ash. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **45**, 1446-1460.

Maxwell L. R., Hendricks S. B., Deming L. S. (1937). The Molecular Structure of P₄O₆, P₄O₈, P₄O₁₀ and As₄O₆ by Electron Diffraction *J Chem Phys* **5**, doi:10.1063/1.1750089.

McDermott J. R., Jiang X., Beene L. C., Rosen B. P., Liu Z. (2010). Pentavalent methylated arsenicals are substrates of human AQP9. *Biometals* **23**, 119-127.

Mead M. N. (2005). Arsenic: in search of an antidote to a global poison. *Environ Health Perspect* **113**, 378-386.

Meharg A. A., Williams P. N., Adomako E., Lawgali Y. Y., Deacon C., Villada A., Cambell R. C., Sun G., Zhu Y. G., Feldmann J., Raab A., Zhao F. J., Islam R., Hossain S., Yanai J. (2009). Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environ Sci Technol* **43**, 1612-1617.

Meng Y. L., Liu Z., Rosen B. P. (2004). As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**, 18334-18341.

Merrifield M. E., Ngu T., Stillman M. J. (2004). Arsenic binding to *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 127-132.

Messens J., Hayburn G., Desmyter A., Laus G., Wyns L. (1999). The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **38**, 16857-16865.

Messens J., Martins J. C., Brosens E., Van Belle K., Jacobs D. M., Willem R., Wyns L. (2002a). Kinetics and active site dynamics of *Staphylococcus aureus* arsenate reductase. *J Biol Inorg Chem* **7**, 146-156.

Messens J., Martins J. C., Van Belle K., Brosens E., Desmyter A., De Gieter M., Wieruszkeski J., Willem R., Wyns L., Zegers I. (2002b). All intermediates of the arsenate reductase mechanism, including an intramolecular dynamic disulfide cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8506-8511.

Messens J., Martins J. C., Zegers I., Van Belle K., Brosens E., Wyns L. (2003). Purification of an oxidation-sensitive enzyme, pI258 arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *J Chromatogr* **790**, 217-227.

Messens J., Silver S. (2006). Arsenate reduction: Thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol* **362**, 1-17.

Meza M. M., Kopplin M. J., Burgess J. L., Gandolfi A. J. (2004). Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui valley, Sonora, Mexico. *Environ Res* **96**, 119-126.

Mielniczki-Pereira A. A., Schuch A. Z., Bonatto D., Cavalcante C. F., Vaitsman D. S., Riger C. J., Eleutherio E. C. A., Henriques J. A. P. (2008). The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism. *Toxicol Lett* **180**, 21-27.

Miller J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Edited by Anonymous. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Mitchell P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* **41**, 445-502.

Morby A. P., Turner J. S., Huckle J. W., Robinson N. J. (1993). SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: Identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Research* **21**, 921-925.

Mormann S., Lomker A., Ruckert C., Gaigalat L., Tauch A., Puhler A., Kalinowski J. (2006). Random mutagenesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 using an IS6100-based transposon vector identified the last unknown gene in the histidine biosynthesis pathway. *BMC Genomics* **7**, 205.

Mukherjee A., Bhattacharya P., Savage K., Foster A., Bundschuh J. (2008). Distribution of geogenic arsenic in hydrologic systems: Controls and challenges. *J Contam Hydrol* **99**, 1-7.

Mukhopadhyay R., Rosen B.P. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiol Lett* **168**, 127-136.

Mukhopadhyay R., Shi J., Rosen B. P. (2000). Purification and characterization of Acr2p, the *saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* **275**, 21149-21157.

Mukhopadhyay R., Rosen B. P. (2001). The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. *J Biol Chem* **276**, 34738-34742.

Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Phung L. T., Silver S. (2002a). Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 311-325.

Mukhopadhyay R., Rosen B. P. (2002b). Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* **110**, 745-748.

Mukhopadhyay R., Zhou Y., Rosen B. P. (2003). Directed evolution of a yeast arsenate reductase into a protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **278**, 24476-24480.

Mukhopadhyay R., Mandal G., Atluri V. S. R., Figarella K., Uzcategui N. L., Zhou Y., Beitz E., Ajees A. A., Bhattacharjee H. (2011). The role of alanine 163 in solute permeability of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol Biochem Parasitol* **175**, 83-90.

Muller D., Medigue C., Koechler S., Barbe V., Barakat M., Talla E., Bonnefoy V., Krin E., Arsene-Ploetze F., Carapito C. (2007). A tale of two oxidation states: Bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genetics* **3**, e53.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-273.

Mulrooney S. B., Ward S. K., Hausinger R. P. (2005). Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease. *J Bacteriol* **187**, 3581-3585.

Nakamura T., Hsu C., Rosen B. P. (1986). Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*. Solubilization and reconstitution of delta pH-driven sodium/proton and calcium/proton antiporters. *J Biol Chem* **261**, 678-683.

Newton G. L., Buchmeier N., Fahey R. C. (2008). Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 471-494.

Neyt C., Iriarte M., Thi V., Cornelis G. (1997). Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J Bacteriol* **179**, 612-619.

Nies A. T., Schwab M., Keppler D. (2008). Interplay of conjugating enzymes with OATP uptake transporters and ABCC/MRP efflux pumps in the elimination of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 545-568.

Niggemyer A., Spring S., Stackebrandt E., Rosenzweig R. F. (2001). Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: Implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5568-5580.

Nikaido H., Saier M. H. (1992). Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science*. **6**, 936-942.

Noirclerc-Savoie M., Morlot C., Gérard P., Vernet T., Zapun A. (2003). Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Protein Expr Purif* **30**, 18-25.

Olender A., Łetowska I. (2010). Wound infections due to opportunistic *Corynebacterium* species *Med Dosw Mikrobiol* **62**, 135-140.

Ordóñez E., Letek M., Valbuena N., Gil J. A., Mateos L. M. (2005). Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *App Environ Microbiol* **71**, 6206-6215.

Ordóñez E., Thiyagarajan S., Cook J. D., Stemmler T. L., Gil J. A., Mateos L. M., Rosen B. P. (2008). Evolution of metal(loid) binding sites in transcriptional regulators. *J Biol Chem* **283**, 25706-25714.

Ordóñez E., Van Belle K., Roos G., De Galan S., Letek M., Gil J. A., Wyns L., Mateos L. M., Messens J. (2009). Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert Thiol/Disulfide exchange. *J Biol Chem* **284**, 15107-15116.

Ordóñez E. (2009). Mecanismos moleculares implicados en la resistencia a arsénico en *Corynebacterium glutamicum*. *Tesis Doctoral*. Universidad de León.

Oremland R. S., Stolz J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science* **300**, 939-944.

Oremland R. S., Stolz J. F. (2005). Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol* **13**, 45-49.

Ortiz-Pérez A., Martín-De-Hijas N. Z., Esteban J., Fernández-Natal M. I., García-Cía J. I., Fernández-Roblas R. (2010). High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist* **16**, 273-277.

Otsuka Y., Ohkusu K., Kawamura Y., Baba S., Ezaki T., Kimura S. (2006). Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* **54**, 109-114.

Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-2423.

Páez-Espino D., Tamames J., de Lorenzo V., Cánovas D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* **22**, 117-130.

Partey F., Norman D., Ndur S., Nartey R. (2008). Arsenic sorption onto laterite iron concretions: temperature effect. *J Colloid Interface Sci* **15**, 493-500.

Pi J., Yamauchi H., Sun G., Yoshida T., Aikawa H., Fujimoto W., Iso H., Cui R., Waalkes M. P., Kumagai Y. (2005). Vascular dysfunction in patients with chronic arsenosis can be reversed by reduction of arsenic exposure. *Environ Health Perspect* **113**, 339-341.

Poirot O., O'Toole E., Notredame C. (2003). Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* **31**, 3503-3506.

Porquet A., Filella M. (2007). Structural evidence of the similarity of Sb(OH)₃ and As(OH)₃ with glycerol: Implications for their uptake. *Chem Res Toxicol* **20**, 1269-1276.

Prithivirajsingh S., Mishra S. K., Mahadevan A. (2001). Detection and analysis of chromosomal arsenic resistance in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1393-1401.

Qi Y., Kobayashi Y., Hulett F. (1997). The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *J Bacteriol* **179**, 2534-2539.

Qin J., Rosen B. P., Zhang Y., Wang G., Franke S., Rensing C. (2006). Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2075-2080.

Qin J., Fu H. L., Ye J., Bencze K. Z., Stemmler T. L., Rawlings D. E., Rosen B. P. (2007). Convergent evolution of a new arsenic binding site in the ArsR/SmtB family of metalloregulators. *J Biol Chem* **282**, 34346-34355.

Qin J., Lehr C. R., Yuan C., Le X. C., McDermott T. R., Rosen B. P. (2009). Biotransformation of arsenic by a yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 5213-5217.

- Rae T. D., Schmidt P. J., Pufahl R. A., Culotta V. C., O'Halloran T. V. (1999).** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-808.
- Ramírez-Solis A., Mukopadhyay R., Rosen B. P., Stemmler T. L. (2004).** Experimental and theoretical characterization of arsenite in water: Insights into the coordination environment of As-O. *Inorg Chem* **43**, 2954-2959.
- Rao N. N., Torriani A. (1990).** Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**, 1083-1090.
- Rastorguev S. M., Zavilgelsky G. B., Tchurikov N. A. (1998).** Inc11 plasmid R64 encodes the ArsR protein that alleviates type I restriction. *FEBS Lett* **426**, 21-23.
- Rath A., Glibowicka M., Nadeau V. G., Chen G., Deber C. M. (2009).** Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 1760-1765.
- Rausser W. E. (1999).** Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**, 19-48.
- Rawat M., Av-Gay Y. (2007).** Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 278-292.
- Renaud F. N., Dutaur M., Daoud S., Aubel D., Riegel P., Monget D., Freney J. (1998).** Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *J Clin Microbiol* **36**, 3698-3702.
- Renaud F., Aubel D., Riegel P., Meugnier H., Bollet C. (2001).** *Corynebacterium freneyi* sp. nov., alpha-glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1723-1728.
- Rice R. H., Xia Y., Alvarado R. J., Phinney B. S. (2010).** Proteomic analysis of human nail plate. *J Proteome Res* **9**, 6752-6758.
- Rittmann D., Lindner S. N., Wendisch V. F. (2008).** Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6216-6222.
- Robinson G. R. Jr., Larkins P., Boughton C. J., Reed B. W., Sibrell P. L. (2007).** Assessment of contamination from arsenical pesticide use on orchards in the Great Valley region, Virginia and West Virginia, USA. *J Environ Qual* **36**, 654-663.
- Roos G., Buts L., Van Belle K., Brosens E., Geerlings P., Loris R., Wyns L., Messens J. (2006).** Interplay between ion binding and catalysis in the thioredoxin-coupled arsenate reductase family. *J Mol Biol* **360**, 826-838.
- Rosen B. P., McClees J. S. (1974).** Active transport of calcium in inverted membrane vesicles of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 5042-5046.

- Rosen B. P. (1999).** Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* **7**, 207-212.
- Rosen B. P. (2002a).** Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* **133**, 689-693.
- Rosen B. P. (2002b).** Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters* **529**, 86-92.
- Rosen B.P. (2006).** Metal in biology: past, present, and future. *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification. Topic in Current Genetics*. 14/2006, pp 486-505. doi:10/1007/4735_94.
- Rosen B. P., Ajees A. A., McDermott T. R. (2011).** Life and death with arsenic. *BioEssays* **33**, 350-357.
- Rosenberg H., Gerdes R. G., Chegwidden K. (1977).** Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**, 505-511.
- Rosenstein R., Peschel A., Wieland B., Gotz F. (1992).** Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *J Bacteriol* **174**, 3676-3683.
- Rosenzweig A. C., Huffman D. L., Hou M. Y., Wernimont A. K., Pufahl R. A., O'Halloran T. V. (1999).** Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* **7**, 605-617.
- Roy S., Mir M. A., Anand S. P., Niederweis M., Ajitkumar P. (2004).** Identification and semi-quantitative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *ftsZ* gene-specific promoter activity-containing regions. *Res Microbiol* **155**, 817-826.
- Ruan X., Bhattacharjee H., Rosen B. P. (2006).** Cys-113 and Cys-422 form a high affinity metalloid binding site in the ArsA ATPase. *J Biol Chem* **281**, 9925-9934.
- Ryan D., Collieran . (2002).** Arsenic resistance in IncHI2 plasmids. *Plasmid* **47**, 234-240.
- Saleem M., Brim H., Hussain S., Arshad M., Leigh M. B., Zia-ul-hassan. (2008).** Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. *Biotechnol Adv* **26**, 151-161.
- Samikkannu T., Chen C. H., Yih L. H., Wang A. S., Lin S. Y., Chen T. C., Jan K. Y. (2003).** Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem Res Toxicol* **16**, 409-414.
- Sanders O., Rensing C., Kuroda M., Mitra B., Rosen B. (1997).** Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 3365-3367.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.

Sato T., Kobayashi Y. (1998). The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J Bacteriol* **180**, 1655-1661.

Sauge-Merle S., Cuine S., Carrier P., Lecomte-Pradines C., Luu D., Peltier G. (2003). Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Appl Environ Microbiol* **69**, 490-494.

Schafer A., Kalinowski J., Simon R., Seep-Feldhaus A. H., Puhler A. (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol* **172**, 1663-1666.

Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puhler A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.

Scheindlin S. (2005). The duplicitous nature of inorganic arsenic. *Mol Interv* **5**, 60-64.

Schmeisser E., Goessler W., Francesconi K. A. (2006). Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. *Anal Bioanal Chem* **385**, 367-376.

Schmöger M. E. V., Oven M., Grill E. (2000). Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiol* **122**, 793-802.

Schrempp S., Bayan N., Shechter E. (1994). Characterization of energetically functional inverted membrane vesicles from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett* **356**, 104-108.

Scott D. L., Ramanathan S., Shi W., Rosen B. P., Daunert S. (1997). Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal Chem* **69**, 16-20.

Shah D., Shen M. W. Y., Chen W., DaSilva N. A. (2010). Enhanced arsenic accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing transporters Fps1p or Hxt7p. *J Biotechnol* **150**, 101-107.

Shi H., Hudson L. G., Liu K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **37**, 582-593.

Shi J., Vlamis-Gardikas A., Åslund F., Holmgren A., Rosen B. P. (1999). Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J Biol Chem* **274**, 36039-36042.

Shi J., Mukhopadhyay R., Rosen B. P. (2003). Identification of a triad of arginine residues in the active site of the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *FEMS Microbiol Lett* **227**, 295-301.

Shi W., Dong J., Scott R. A., Ksenzenko M. Y., Rosen B. P. (1996). The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the *ars* operon. *J Biol Chem* **271**, 9291-9297.

Sigrist C. J. A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. (2002). PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* **3**, 265-274.

Silver S., Phung L. T. (2005a). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* **71**, 599-608.

Silver S., Phung L. T. (2005b). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**, 587-605.

Singh S., Lee W., DaSilva N. A., Mulchandani A., Chen W. (2008a). Enhanced Arsenic Accumulation by Engineered Yeast Cells Expressing *Arabidopsis thaliana* Phytochelatin Synthase. *Biotechnol Bioeng* **99**, 333-340.

Singh S., Mulchandani A., Chen W. (2008b). Highly selective and rapid arsenic removal by metabolically engineered *Escherichia coli* cells expressing *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2924-2927.

Singh S., Kang S. H., Lee W., Mulchandani A., Chen W. (2010). Systematic engineering of phytochelatin synthesis and arsenic transport for enhanced arsenic accumulation in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* **105**, 780-785.

Song X., Geng Z., Li X., Zhao Q., Hu X., Zhang X., Wang Z. (2011). Functional and structural evaluation of cysteine residues in the human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (hAs3MT). *Biochimie* **93**, 369-375.

Soriano C., Creus A., Marcos R. (2007). Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* **634**, 40-50.

Stackebrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L. (1997). Proposal for new hierarchic classification system. *Actinobacteria*, classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* **47**, 479-491.

Stehr M., Lindqvist Y. (2004). NrdH-redoxin of *Corynebacterium ammoniagenes* forms a domain-swapped dimer. *Proteins* **55**, 613-619.

Storz G., Toledano M.B. (1994). Regulation of bacterial gene expression in response to oxidative stress. *Methods Enzymol* **236**, 196-207.

Sundaram S., Rathinasabapathi B., Ma L. Q., Rosen B. P. (2008). An arsenate-activated glutaredoxin from the arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. regulates intracellular arsenite. *J Biol Chem* **283**, 6095-6101.

Sutherland D. E., Stillman M. J. (2011). The "magic numbers" of metallothionein. *Metallomics* doi: 10.1039/COMT00102C.

Suzuki K., Wakao N., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (1998). Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 411-418.

Suzuki N., Okai N., Nonaka H., Tsuge Y., Inui M., Yukawa H. (2006). High-throughput transposon mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum* and construction of a single-gene disruptant mutant library. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3750-3755.

Tabor S., Richardson C.C. (1992). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Biotechnology* **24**, 280-284.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

Tartof K. D., Hobbs C. A. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus* **9**, 12.

Tauch A., Kirchner O., Löffler B., Gotker S., Pühler A., Kalinowski J. (2002). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**, 362-367.

Tauch A., Kaiser O., Hain T., Goesmann A., Weisshaar B., Albersmeier A., Bekel T., Bischoff N., Brune I., Chakraborty T., Kalinowski J., Meyer F., Rupp O., Schneiker S., Viehoveer P., Pühler A. (2005). Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J Bacteriol* **187**, 4671-4682.

Tauch A., Trost E., Tilker A., Ludewig U., Schneiker S., Goesmann A., Arnold W., Bekel T., Brinkhoff K., Brune I., Götter S., Kalinowski J., Kamp P.B., Lobo F.P., Viehoveer P., Weisshaar B., Soriano F., Dröge M., Pühler A. (2008). The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing *J Biotechnol* **136**, 11-21.

Thirumoorthy N., Manisenthil Kumar K. T., Shyam Sundar A., Panayappan L., Chatterjee M. (2007). Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol* **13**, 993-996.

Thomas D. J., Waters S. B., Styblo M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**, 319-326.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.

Thorsen M., Di Y., Tangemo C., Morillas M., Ahmadpour D., Van der Does C., Wagner A., Johansson E., Boman J., Posas F., Wysocki R., Tamás M. J. (2006). The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 4400-4410.

Thumann J., Grill E., Winnacker E., Zenk M. H. (1991). Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin—metal complexes. *FEBS Lett* **284**, 66-69.

Tisa L., Rosen B. (1990). Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J Biol Chem* **265**, 190-194.

Tokar E. J., Qu W., Waalkes M. P. (2011). Arsenic, stem cells, and the developmental basis of adult cancer. *Toxicol Sci* **120**, 192-203.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**, 145-149.

Tsai S., Singh S., Chen W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 659-667.

Tseng Y. Y., Yu C.W., Liao V. H. FEBS J. (2007). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional ArsA. **274**, 2566-2572.

Tsuji N., Nishikori S., Iwabe O., Shiraki K., Miyasaka H., Takagi M., Hirata K., Miyamoto K. (2004). Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 751-755.

Tsuji N., Nishikori S., Iwabe O., Matsumoto S., Shiraki K., Miyasaka H., Takagi M., Miyamoto K., Hirata K. (2005). Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta* **222**, 181-191.

Turner J. S., Robinson N. J., Gupta A. (1995). Construction of Zn₂₊/Cd₍₂₊₎-tolerant cyanobacteria with a modified metallothionein divergon: further analysis of the function and regulation of smt. *J Ind Microbiol* **14**, 259-264.

Vahidnia A., van der Voet G. B., de Wolff F. A. (2007). Arsenic neurotoxicity — A review. *Hum Exp Toxicol* **26**, 823-832.

Vala A. K. (2010). Tolerance and removal of arsenic by a facultative marine fungus *Aspergillus candidus*. *Bioresour Technol* **101**, 2565-2567.

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.

van Wezel G. P., Mahr K., König M., Traag B. A., Pimentel-Schmitt E. F., Willimek A., Titgemeyer F. (2005). GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **55**, 624-636.

Vanechoutte M., Riegel P., de Briel D., Monteil H., Verschraegen G., De Rouck A., Claeys G. (1995). Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res Microbiol* **146**, 633-641.

Vaquero-Raya E. C., Molero-Richard X. (2005). Reactive oxygen species in inflammatory diseases of the pancreas. A possible therapeutic target?. *Gastroenterol Hepatol* **28**, 473-484.

Vatamaniuk O. K., Mari S., Lang A., Chalasani S., Demkiv L. O., Rea P. A. (2004). Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis. *J Biol Chem* **279**, 22449-22460.

Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Sundaram M. V., Rea P. A. (2005). CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **280**, 23684-23690.

Villa-Bellosta R., Sorribas V. (2008). Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**, 125-134.

Villa-Bellosta R., Sorribas V. (2009). Different effects of arsenate and phosphonoformate on P_i transport adaptation in opossum kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C516-C525.

Villa-Bellosta R., Sorribas V. (2010). Arsenate transport by sodium/phosphate cotransporter type IIb. *Toxicol Appl Pharmacol* **247**, 36-40.

Vlavis-Gardikas A., Potamitou A., Zarivach R., Hochman A., Holmgren A. (2002). Characterization of *Escherichia coli* null mutants for glutaredoxin 2. *J Biol Chem* **277**, 10861-10868.

Vorontsov I., Minasov G., Brunzelle J. S., Shuvalova L., Kiryukhina O., Collart F. R., Anderson W. F. (2007). Crystal structure of an apo form of *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity. *Protein Sci* **16**, 2483-90.

Walmsley A. R., Zhou T., Borges-Walmsley M. I., Rosen B. P. (2001). Antimonite regulation of the ATPase activity of ArsA, the catalytic subunit of the arsenical pump. *Biochem J* **360**, 589-597.

Wang L., Chen S., Xiao X., Huang X., You D., Zhou X., Deng Z. (2006). *arsRBOCT* arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008. *App Environ Microbiol* **72**, 3738-3742.

Wang L., Jeon B., Sahin O., Zhang Q. (2009). Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5064-5073.

Waters S. B., Devesa V., Fricke M. W., Creed J. T., Stýblo M., Thomas D. J. (2004). Glutathione modulates recombinant rat arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine. *Chem Res Toxicol* **17**, 1621-1629.

Willisky G. R., Malamy M. H. (1980a). Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**, 356-365.

Willisky G. R., Malamy M. H. (1980b). Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**, 366-374.

Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.

Wolfe-Simon F., Blum J. S., Kulp T. R., Gordon G. W., Hoefft S. E., Pett-Ridge J., Stolz J. F., Webb S. M., Weber P. K., Davies P. C., Anbar A. D., Oremland R. S. (2010). A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science* PMID: 21127214.

Wood T. C., Salavagionne O. E., Mukherjee B., Wang L., Klumpp A. F., Thomae B. A., Eckloff B. W., Schaid D. J., Wieben E. D., Weinshilboum R. M. (2006). Human arsenic methyltransferase (As3MT) pharmacogenetics. *J Biol Chem* **281**, 7364-7373.

Wu J., Rosen B. P. (1991). The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Mol Microbiol* **5**, 1331-1336.

Wu J., Tisa L., Rosen B. (1992). Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion- translocating ATPase. *J Biol Chem* **267**, 12570-12576.

Wünschmann J., Beck A., Meyer L., Letzel T., Grill E., Lenzian K. J. (2007). Phytochelatin synthesis is mediated by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **581**, 1681-1687.

Wysocki R., Bobrowicz P., Ulaszewski S. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* Acr3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* **272**, 30061-30066.

Wysocki R., Chery C. C., Wawrzycka D., Van Hulle M., Cornelis R., Thevelein J. M., Tamas M. J. (2001). The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **40**, 1391-1401.

Xia X., Postis V. L., Rahman M., Wright G. S., Roach P. C., Deacon S. E., Ingram J. C., Henderson P. J., Findlay J. B., Phillips S. E., McPherson M. J., Baldwin S. A. (2008). Investigation of the structure and function of a *Shewanella oneidensis* arsenical-resistance family transporter. *Mol Membr Biol* **25**, 691-701.

Yang H., Cheng J., Finan T. M., Rosen B. P., Bhattacharjee H. (2005). Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**, 6991-6997.

Yang J., Abdul Salam A. A., Rosen B. P. (2011). Genetic mapping of the interface between the ArsD metallochaperone and the ArsA ATPase. *Mol Microbiol* **79**, 872-881.

Ye J., Kandegedara A., Martin P., Rosen B. P. (2005). Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pl258 CadC cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor. *J Bacteriol* **187**, 4214-4221.

Ye J., Yang H., Rosen B. P., Bhattacharjee H. (2007). Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett* **581**, 3996-4000.

Ye J., He Y., Skalicky J., Rosen B. P., Stemmler T. L. (2011). Resonance assignments and secondary structure prediction of the As(III) metallochaperone ArsD in solution. *Biomol NMR Assign* **5**, 109-112.

Yin Y. J., Wang B. J., Jiang C. Y., Luo Y. M., Jin J. H., Liu S.J. (2010). Identification and quantification of mycothiol in Actinobacteria by a novel enzymatic method. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 1393-1401.

Yoshida T., Yamauchi H., Fan Sun G. (2004). Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: Dose–response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**, 243-252.

Yoshinaga M., Cai Y., Rosen B. P. (2011). Demethylation of methylarsonic acid by a microbial community. *Environ Microbiol* **13**, 1205-1215

Yu C., Xia B., Jin C. (2011). (1)H, (13)C and (15)N resonance assignments of the arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biomol NMR Assign* **5**, 85-87.

Zagury G. J., Dobran S., Estrela S., Deschênes L. (2008). Inorganic arsenic speciation in soil and groundwater near in-service chromated copper arsenate-treated wood poles. *Environ Toxicol Chem* **27**, 799-807.

Zakharyan R. A., Aposhian H. V. (1999). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem Res Toxicol* **12**, 1278-1283.

Zegers I., Martins J. C., Willem R., Wyns L., Messens J. (2001). Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. *Nat Struct Biol* **8**, 843-847.

Zhang X., Yang F., Shim J., Kirk K. L., Anderson D. E., Chen X. (2007). Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett* **255**, 95-106.

Zhang X., Yan X., Zhou Z., Yang F., Wu Z., Sun H., Liang W., Song A., Lallemand-Breitenbach V., Jeanne M., Zhang Q. Y., YANG H. Y., Huang Q. H., Zhou G. B., Tong J. H., Zhang Y., Wu J. H., Hu H. Y., de Thé H., Chen S. J., Chen Z. (2010). Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science* **328**, 240-243.

Zhao F., McGrath S. P., Meharg A. A. (2010). Arsenic as a food chain contaminant: Mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 535-559.

Zhou T., Rosen B. P., Gatti D. L. (1999). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalytic subunit of the ATP-dependent arsenite pump encoded by the *Escherichia coli* plasmid R773. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 921-924.