



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL DOMINIO CARBOXILO-  
TERMINAL DE LA FITOQUELATINA  
SINTASA DE *Euglena gracilis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

KARLA ITZEL CASANOVA FIGUEROA

T U T O R

Dr. JORGE DONATO GARCÍA GARCÍA

2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno

Casanova

Figueroa

Karla Itzel

55 21 86 26

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310017857

2. Datos del tutor

Dr.

Jorge Donato

García

García

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Rosario Adelaida

Muñoz

Clares

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Juan Carlos

Gallardo

Pérez

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Juan Luis

Chávez

Pacheco

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Christian Adrián

Cárdenas

Monroy

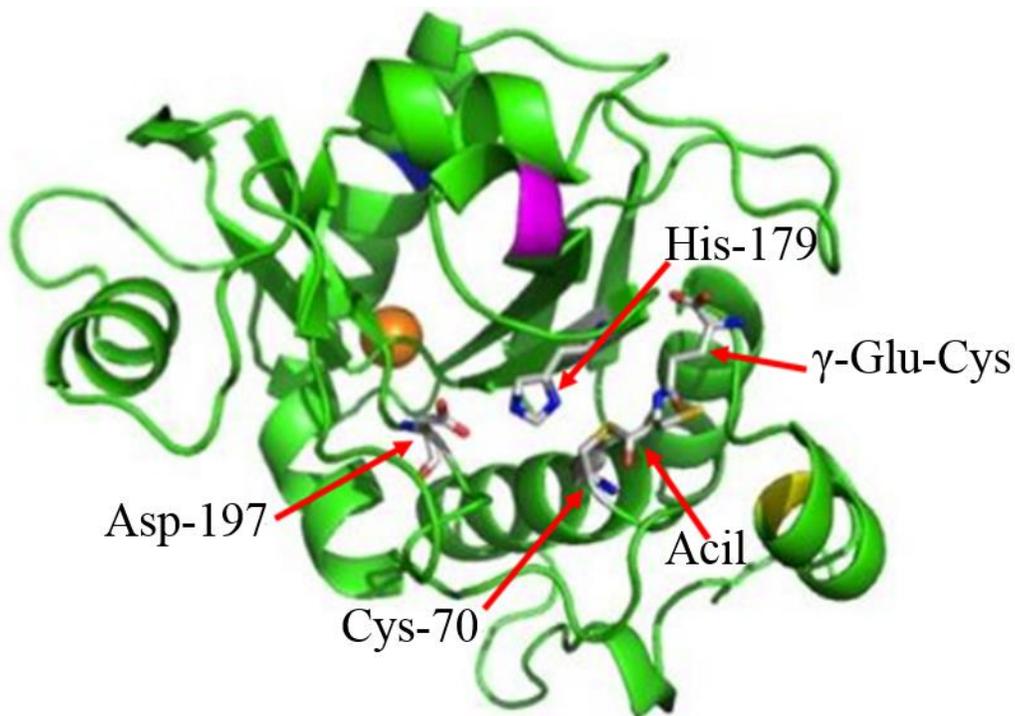
7. Datos del trabajo escrito.

Análisis del dominio Carboxilo-terminal de la fitoquelatina sintasa de *Euglena gracilis*

60 p

2017

# ANÁLISIS DEL DOMINIO CARBOXILO- TERMINAL DE LA FITOQUELATINA SINTASA DE *Euglena gracilis*



Interacción del extremo amino terminal (también llamado dominio amino terminal) de la fitoquelatina sintasa de *Euglena gracilis* (*EgPCS*) con el sustrato glutatión (GSH). El modelo reportado se obtuvo mediante un análisis de *docking* y la información cristalográfica de la fitoquelatina sintasa trunca de la cianobacteria *Nostoc* sp. (*NsPCS*) debido que hasta la fecha no se ha reportado ningún otro cristal. El modelo representa a la enzima acilada con una molécula de  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -Glu-Cys) proveniente del GSH. La formación de este intermediario *EgPCS*-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)), depende de la triada catalítica Cys-70, His-179 y Asp-197. [Figura modificada de García-García et al., 2014](#). Este mecanismo se analiza con mayor detalle en la **Sección 1.5**.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Donato García García, tutor de esta tesis, por ser parte fundamental en mi inicio como profesionista. Por su trabajo, esfuerzo y paciencia.

A la Biól. Rosina Sánchez Thomas por su apoyo técnico para la realización de esta tesis, además de su amistad.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez, Jefe del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por el apoyo que me brindó durante mi estancia en la institución. A él, mi más sincero respeto y admiración.

Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y al M. en C. Héctor Vázquez Meza por el acceso a su laboratorio para la ruptura de las levaduras.

A los miembros del comité sinodal por sus valiosas observaciones y sugerencias hacia el presente trabajo. Sin olvidar que parte de ellos también fueron mis profesores y por lo tanto, pilares en mi formación académica.

Dra. Rosario A. Muñoz Clares. Facultad de Química, UNAM

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez. Instituto Nacional de Cardiología

Dr. Juan Luis Chávez Pacheco. Instituto Nacional de Pediatría

M. en C. Christian A. Cárdenas Monroy. Facultad de Medicina, UNAM

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares por su trabajo como docente e investigadora, que me permitió reafirmar mi pasión por la ciencia. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por motivarme a aprender y a razonar.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, casa de conocimiento que enamora y cautiva.



# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	9
1. ANTECEDENTES .....	1
1.1 Introducción al estudio de los metales pesados .....	1
1.1.1. Función de los metales pesados en los organismos .....	1
1.1.2. Propiedades de los metales pesados y toxicidad.....	2
1.2. Cadmio.....	3
1.3. Mecanismos de resistencia ante metales pesados: los complejos metal-ligando .	4
1.3.1. Mecanismos biológicos de resistencia a metales pesados .....	4
1.3.2. Complejos metal-ligando: fitoquelatinas y metalotioneínas.....	6
1.3.3. Estructura de las fitoquelatinas .....	6
1.4. La vía de asimilación de azufre, síntesis de cisteína, glutatión y fitoquelatinas ..	8
1.4.1. La vía de asimilación del azufre .....	9
1.4.2 La síntesis de Cys.....	10
1.4.3. La síntesis de GSH.....	10
1.4.4. La síntesis de PCs.....	11
1.5. Mecanismo catalítico de la PCS .....	12
1.5.1. Generalidades de la PCS .....	12
1.5.2. Función del “sitio I” en la catálisis de la PCS .....	14
1.5.3. Función del “sitio II” en la catálisis de la PCS .....	15
1.6. La estructura de la PCS como la clave de su función .....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS .....	19
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Crecimiento de las células <i>Saccharomyces cerevisiae</i> $\Delta ycf1$ transformadas con las diferentes secuencias de la <i>EgPCS</i> ante la exposición a $CdCl_2$ .....	21
5.2. Cuantificación de cadmio intracelular en <i>S. cerevisiae</i> $\Delta ycf1$ .....	21
5.3. Identificación y cuantificación de péptidos con grupos -SH de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta ycf1$ por HPLC .....	22

5.4. Sobre-producción y purificación de enzimas <i>EgPCS</i> .....	23
5.5. Determinación de la actividad enzimática .....	24
5.6. Determinación de la relación entre el pH y la actividad la enzima <i>EgPCS_435</i> .....	24
5.7. Determinación de los parámetros cinéticos de la <i>EgPCS_435</i> .....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
6.1. Análisis <i>in vivo</i> de las secuencias <i>EgPCS</i> truncas.....	26
6.1.1. Crecimiento de las células transformadas con las variantes de la <i>EgPCS</i> ...	26
6.1.2. Cuantificación del cadmio intracelular .....	31
6.1.3. Determinación y cuantificación de péptidos -SH intracelulares por HPLC	32
6.2. Análisis <i>in vitro</i> de las secuencias <i>EgPCS</i> truncas .....	33
6.2.1. Sobre-producción y aislamiento de enzimas recombinantes .....	33
6.2.2. Determinación de la preferencia por metal de la <i>EgPCS_435</i> .....	35
6.2.3. Relación entre el pH y la actividad la enzima <i>EgPCS_435</i> .....	36
6.2.4. Obtención de los parámetros $V_{max}$ , $K_m$ y $V_{max}/K_m$ por Zn-GS <sub>2</sub> de la <i>EgPCS_435</i> .....	37
6.2.6. Obtención de los parámetros $V_{max}$ , $K_m$ por GSH de la <i>EgPCS_435</i> .....	40
7. DISCUSIÓN GENERAL .....	42
8. CONCLUSIONES .....	44
9. REFERENCIAS .....	45

## ABREVIATURAS

**AtPCS** Fitoquelatina sintasa de *Arabidopsis thaliana*

**Cd-GS<sub>2</sub>** Bis-glutatonato de cadmio

**C-terminal** Extremo carboxilo terminal

**Cys** Cisteína

**DTNB** 5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)

**EEA** Espectro de Absorción Atómica

**EgPCS** Fitoquelatina sintasa de *Euglena gracilis*

**EgPCS-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys))** Intermediario fitoquelatina sintasa de *Euglena gracilis*-acil-( $\gamma$ -glutamilcisteína)

**Glu** Ácido glutámico

**Gly** Glicina

**GSH** Glutación reducido

**GSSG** Glutación oxidado

**His** Histidina

**HPLC** Cromatografía líquida de alta eficiencia

**Me** Metal pesado

**MTs** Metalotioneinas

**NsPCS** Fitoquelatina sintasa de *Nostoc* sp.

**N-terminal** Extremo amino terminal

**PCs** Fitoquelatinas

**PCS** Fitoquelatina sintasa

**Pol-GSH** Polímeros de glutación

**ROS** Especies reactivas del oxígeno

**-SH** grupo tiol

**Zn-GS<sub>2</sub>** Bis-glutatonato de zinc

**$\beta$ ME** 2-mercaptoetanol

**$\gamma$ -EC**  $\gamma$ -glutamilcisteína

## RESUMEN

Dentro de los mecanismos de resistencia ante la exposición a metales pesados, en plantas y microorganismos, se encuentra la síntesis de fitoquelatinas (PCs). Las PCs son péptidos que funcionan como uno de los principales ligandos del  $\text{Cd}^{2+}$ . La enzima que cataliza la síntesis de PCs es la fitoquelatina sintasa (PCS), quien utiliza glutatión (GSH) y bis-glutationato de metal ( $\text{Me-GS}_2$ ; dos moléculas de GSH unidas a un metal pesado) como co-sustratos.

El análisis de aminoácidos de las PCSs ha demostrado que el extremo amino terminal de la enzima se encuentra muy conservado, y que en esa región se localiza el sitio de unión al sustrato GSH; mientras el extremo carboxilo terminal es altamente variable. Cabe destacar que el sitio de unión del co-sustrato  $\text{Me-GS}_2$  no ha sido localizado en ninguna PCS. Dentro de las enzimas caracterizadas, se encuentra la del protista de vida libre *Euglena gracilis*, la *EgPCS* que consta de 476 aminoácidos. Entre las características que hacen diferente a la *EgPCS* de otras PCSs, se encuentra que cuando sólo se compone del extremo amino terminal, no es activa y que su mejor co-sustrato es el bis-glutationato de zinc ( $\text{Zn-GS}_2$ ). Así mismo, la PCS de *Arabidopsis thaliana*, la *AtPCS* sí presenta actividad cuando consiste sólo del extremo amino terminal y presenta mayor actividad con el bis-glutationato de cadmio ( $\text{Cd-GS}_2$ ).

En este proyecto se determinó el efecto que tiene la transformación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* sensibles a cadmio con diferentes secuencias truncas de la *EgPCS*. En la exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , se observó un fenotipo de resistencia a  $\text{Cd}^{2+}$  en las levaduras transformadas con una *EgPCS* de 435 aminoácidos o mayor; en contraste, el crecimiento se vio afectado en las levaduras transformadas con secuencias de la *EgPCS* menores a 435 aminoácidos. El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), sugiere que las células transformadas con la *EgPCS* de 435 aminoácidos y la *EgPCS* nativa de 476 aminoácidos (*EgPCS*\_435 y *EgPCS*\_nativa, respectivamente) fueron resistentes a la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  debido a que presentan un contenido de moléculas tioladas de bajo peso molecular superior al de las células no resistentes. Además, las células transformadas con la

*EgPCS\_435* y *EgPCS\_nativa* son capaces de sintetizar PCs, mientras en las células no resistentes, no se detectó la producción de estas moléculas.

Por otra parte, la caracterización cinética de la *EgPCS\_435* muestra que esta enzima trunca conserva las siguientes características de la *EgPCS\_nativa*: 1) es capaz de sintetizar PC<sub>2-4</sub> a pH alcalino, 2) conserva la preferencia por el co-sustrato Zn-GS<sub>2</sub> sobre Cd-GS<sub>2</sub> y 3) tiene un comportamiento hiperbólico-sigmoide con Zn-GS<sub>2</sub> fijo y GSH variable. Con respecto a la característica número 3, previamente [García-García \*et al.\* \(2014\)](#) sugirió que este comportamiento se debe a que la enzima posee dos sitios de unión a GSH. Por otra parte, la *EgPCS\_435* presentó una inhibición por el co-sustrato Zn-GS<sub>2</sub> ( $K_{i(\text{Zn-GS}_2)} = 9.7 - 23.9 \mu\text{M}$ ), a diferencia de la enzima nativa que no se ve afectada a concentraciones de hasta 400  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos plantean la posibilidad de que dentro de la secuencia comprendida entre los residuos 416 y 476 de la *EgPCS*, existen aminoácidos indispensables para la actividad de la enzima. Dicha secuencia sólo se encuentra en la *EgPCS* y comprende los residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 que podrían intervenir en el reconocimiento del Me-GS<sub>2</sub>.



# 1. ANTECEDENTES

---

## 1.1 Introducción al estudio de los metales pesados

---

### 1.1.1. Función de los metales pesados en los organismos

Las biomoléculas se componen principalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre (simbolizados mnemotécnicamente como CHONPS). Aunque se han identificado más de 30 elementos en las células, los bioelementos CHONPS constituyen cerca del 98% (Bánfalvi, 2011); el 2% restante, corresponde a los macro y micronutrientes esenciales. En humanos, se requiere de más de 100 mg/día de macronutrientes y menos de 100 mg/día de micronutrientes (Frassinetti *et al.*, 2006). En el grupo de los micronutrientes se encuentran los metales pesados (Serra-Majem y Aranceta-Bartrina, 2006).

Los *metales pesados*, objeto de estudio de esta tesis, se clasifican de distinta forma a partir de sus propiedades fisicoquímicas. El término metal pesado no ha sido definido por IUPAC (por las siglas en inglés de *International Union of Pure and Applied Chemistry*), por lo que muchos autores consideran a un metal como “pesado”, si su densidad es  $\geq 3$ ,  $\geq 5$ , incluso  $\geq 7$  g/cm<sup>3</sup>, sin llegar aún a un consenso (Bjerrum, 1936; Moreno-Sánchez *et al.*, 1999; Bánfalvi, 2011). A pesar de lo anterior, el término metal pesado se refiere generalmente a un metal de transición (cationes de los grupos 3 al 12 de la tabla periódica), que pueden desempeñar tanto funciones esenciales como tóxicas (**Sección 1.1.2**).

Metales pesados como el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio y zinc son esenciales en muchas moléculas debido a que, entre otras funciones, pueden estabilizar cargas, participar en reacciones redox y ionizar moléculas de agua durante la catálisis enzimática (Berg *et al.*, 2002; Bánfalvi, 2011). Por otra parte, la exposición a metales esenciales a concentraciones supernormales y de metales no esenciales como el cadmio, mercurio, níquel y plomo, generalmente tienen efectos tóxicos en hígado, riñones y sistema nervioso (Stohs y Bagchu, 1995; **Sección 1.2**).

### 1.1.2. Propiedades de los metales pesados y toxicidad

Para entender un poco más acerca del comportamiento químico de los metales y sus funciones, es imperativo conocer los siguientes aspectos:

- **Propiedades ácido base:** La *teoría ácido-base fuerte-suave* de Pearson (*HSAB*, por sus siglas en inglés), ordena a los metales de transición de acuerdo con sus preferencias por ligandos orgánicos específicos (revisado en Lemire *et al.*, 2013). A un ligando lo podemos definir como un ion o molécula que se une a un átomo metálico central para formar un complejo coordinado (Dwyer, 1964; Song *et al.*, 2014). Por ejemplo, ácidos suaves como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Hg}^+$ , así como ácidos intermedios tales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , tienden a asociarse fuertemente con bases suaves como los grupos tiol ( $\text{R-SH}$ , también llamados sulfhidrilo), que se encuentran en diversos péptidos y proteínas (Lemire *et al.*, 2013).
- **Propiedades redox:** Algunos metales participan en reacciones redox, debido a que tienen la capacidad termodinámica de adquirir o donar electrones (Chang, 2011; Lemire *et al.*, 2013). El potencial reductor influye en la reactividad de los metales hacia las biomoléculas, y esto a su vez puede influir en su toxicidad (Lemire *et al.*, 2013).
- **Capacidad para generar radicales libres:** Entre los efectos tóxicos que ejercen los metales pesados, se encuentra que contribuyen fuertemente en la producción de radicales libres. Un *radical libre* es un átomo o compuesto que tiene por lo menos un electrón no apareado en su orbital externo por lo que es inestable y consecuentemente reactivo. En la célula se encuentran normalmente radicales, pero los niveles aumentan durante el envenenamiento por metales. Estas especies reactivas toman indiscriminadamente los electrones de átomos que se encuentran cercanos, y así los convierten en radicales libres secundarios en un fenómeno que se extiende como una reacción en cadena (Bánfalvi, 2011). Otro producto de la interacción de los metales pesados con las células es la acumulación de especies reactivas del oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés), que tienen la capacidad de causar daño oxidante a proteínas,

ácidos nucleicos y lípidos (Apel y Hirt, 2004). La producción de estas entidades reactivas, provoca daño celular que se traduce mayoritariamente en envejecimiento (Bánfalvi, 2011).

Muchos metales pueden ejercer su toxicidad en los sistemas biológicos por medio de múltiples vías y de manera simultánea. Entre los mecanismos tóxicos que pueden ejercer los metales y que son de interés para esta tesis, se encuentran:

1. **Sustitución de metales:** Un ion metálico reemplaza a otro, de modo que se altera o se destruye la función de la molécula blanco (Sección 1.2.).
2. **Óxido reducción con tioles:** La molécula principal en este proceso es el glutatión (GSH). Este fenómeno puede liberar ROS como producto de la reducción (Sección 1.4.3.).

Ahora, independientemente de si un metal es esencial o no para la vida, un aumento en la concentración intracelular de metales resulta tóxico para las células, por lo que éstas deben tener mecanismos que regulen su concentración (Mendoza-Cózatl, 2005).

---

## 1.2. Cadmio

---

Dentro del estudio de los efectos de los metales pesados en las plantas, el cadmio es el metal más estudiado. El cadmio es un metal de transición que pertenece al grupo IIB de la tabla periódica, se encuentra usualmente como mineral y se combina con otros elementos como el oxígeno (CdO), cloro (CdCl<sub>2</sub>) o azufre (CdSO<sub>4</sub>, CdS) (Faroon *et al.*, 2012). Su número de oxidación más frecuente es 2+, aunque también se presenta como 1+ en algunos compuestos. Tiene una densidad de 8.64 g/cm<sup>3</sup> y se puede clasificar como un ácido suave (IARC, 1993; Lemire *et al.*, 2013). El cadmio se encuentra en la corteza terrestre a una concentración de 0.1 a 0.5 ppm y está comúnmente asociado al zinc, plomo y cobre (Faroon *et al.*, 2012).

A pesar de su abundancia, el cadmio se encuentra dentro de las seis sustancias más tóxicas (IARC, 1993) debido a que lo podemos encontrar en aire, agua y suelo (Faroon *et al.*, 2012); además en los sistemas biológicos, cuenta con una vida media de entre 10 y 40 años (El-Shahawi *et al.*, 2015). El cadmio se utiliza en una amplia variedad de materiales industriales entre los que destacan las baterías y el plástico donde se destina el 83 y el 1.2 % del cadmio total utilizado (Faroon *et al.*, 2012). Tanto las baterías como el plástico en general, son residuos comunes que se desechan de manera incorrecta.

A nivel fisiológico, se ha encontrado que en humanos y ratas, el cadmio tiene repercusiones en el sistema cardiovascular, digestivo, nervioso, renal, reproductor y respiratorio; además, es catalogado como un agente carcinogénico (IARC, 1993; Faroon *et al.*, 2012). A nivel celular, sus efectos están relacionados con la inhibición del crecimiento, inhibición de la fotosíntesis, inhibición de la respiración celular, inhibición de la división celular, la multinucleación, el aumento en el contenido de DNA, cambios en la estructura del cloroplasto y de la mitocondria, induce la lipoperoxidación, así como el aumento de tioles ácido-solubles y la generación de ROS (revisado en Mendoza-Cózatl, 2005). Además, se ha reportado que iones  $Cd^{2+}$ , pueden desplazar iones  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  de proteínas (Stohs y Bagchu, 1995), lo que conlleva a la modificación o pérdida de función de la molécula (Harrison *et al.*, 2007).

---

### **1.3. Mecanismos de resistencia ante metales pesados: los complejos metal-ligando**

---

#### *1.3.1. Mecanismos biológicos de resistencia a metales pesados*

Los seres vivos son sistemas abiertos que interaccionan con el medio que los rodea. A partir de esta interacción, responden a los diferentes estímulos que hay en su entorno, particularmente, existen diversos organismos que implementan diferentes mecanismos para protegerse del estrés provocado por los metales pesados. Dentro de estas estrategias, los organismos pueden tomar al metal para transformarlo, confinarlo o transportarlo. Por ejemplo, pueden unirlo a la pared

celular o la membrana plasmática, reducir su transporte hacia el interior celular, expulsarlo en forma activa, precipitarlo por excreciones celulares, bio-transformarlo, acomplejarlo con metabolitos intracelulares y almacenarlo en organelos como vacuolas, cloroplastos y mitocondrias (Moreno-Sánchez *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2016).

La interacción del metal con metabolitos y el almacenamiento en organelos, es una estrategia para disminuir la intoxicación por metales pesados a partir de la formación de complejos metálicos. Estos complejos metálicos se forman con moléculas que poseen grupos hidroxilo (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>, -NRH y -NR<sub>2</sub>) y/o tiol (-SH). Una característica de un complejo metálico, es que el metal ocupa una posición central dentro del complejo (Dwyer, 1964).

Prácticamente todos los metales pueden funcionar como átomos centrales, aunque los átomos de los metales de transición son mucho más comunes que los átomos de metales alcalinos para esta función. Una convención para designar las partes de los complejos metálicos que no alude la naturaleza del enlace, es designar a cualquier ion negativo o molécula polar que se une al átomo metálico como *ligando*, y al enlace entre el ligando y el metal como *enlace metal-ligando* (Dwyer, 1964).

En algunos complejos metal-ligando, el átomo metálico se encuentra unido a más de un ligando, de tal manera que se forma un anillo heterocíclico. Este tipo de anillo recibe el nombre de *anillo quelante* o *quelato*, y la molécula o ion con la que se forma es conocida como agente quelante. El proceso en el que se forma un anillo quelante se llama, *reacción de quelación*. Las moléculas capaces de quelar son conocidas como quelantes, cuyo nombre deriva del griego *chele* que se refieren a las quelas o tenazas de los artrópodos, específicamente de los crustáceos. Cabe destacar que un quelante también puede ser denominado como agente secuestrador o antagonista de metales pesados (Dwyer, 1964).

### 1.3.2. Complejos metal-ligando: fitoquelatinas y metalotioneínas

Para el cadmio, los ligandos más favorables son los tiolatos (Clemens, 2006). Los dos ligandos mejor caracterizados de tipo tiol (-SH) que forman complejos metal-ligando, son las fitoquelatinas (PCs) y las metalotioneínas (MTs). Las PCs y las MTs son péptidos ricos en cisteína (Cys) cuya síntesis se induce por la presencia de metales pesados a los que posteriormente se unen (Cobbett y Goldsbrough, 2002; García-García *et al.*, 2016). Antiguamente, las PCs se clasificaban como MTs clase III. Sin embargo, las PCs son el producto de una reacción enzimática (Sección 1.4.4.) y las MTs están codificadas dentro de un gen (Cobbett y Goldsbrough, 2002)

Las PCs están ampliamente distribuidas pues se han encontrado en plantas, protistas, hongos, bacterias e incluso nemátodos. Las PCs son péptidos simples en cuanto a estructura, tienen una masa molecular menor a 10 kDa y son sintetizados por la enzima fitoquelatina sintasa (PCS). Las PCs fueron descubiertas y caracterizadas por primera vez en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y recibieron el nombre de cadistinas (Murasugi *et al.*, 1981; Kondo *et al.*, 1984). El estudio de las PCs tomó relevancia al descubrirse que son pieza clave en la desintoxicación y homeostasis de metales pesados; más aún al funcionar como uno de los principales ligandos de cadmio en células vegetales (Grill *et al.*, 1985; Clemens, 2006).

### 1.3.3. Estructura de las fitoquelatinas

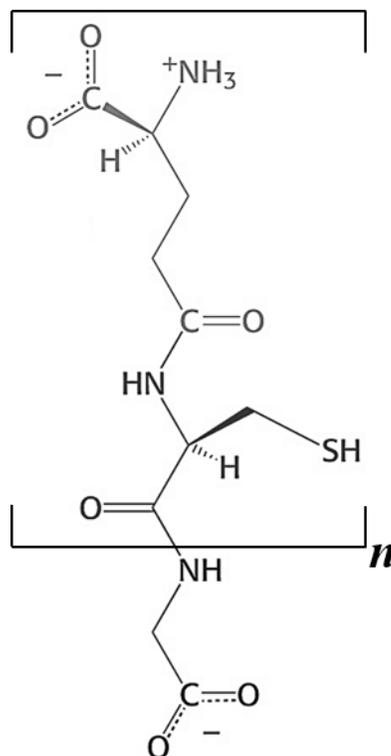
Las PCs forman una familia de péptidos derivados del glutatión (GSH), que generalmente consisten en repeticiones del dipéptido formado por ácido glutámico (Glu) y cisteína (Cys), seguido de una glicina (Gly) terminal. Las PCs pueden ser representadas como  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  donde  $n = 2 - 11$  (Grill *et al.*, 1989), y generalmente dentro de 2 a 5 (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Figura 1). Por otro parte, el valor de  $n$  depende del organismo y del metal al que se exponga (Rauser, 1999).

Dentro de la estructura de las PCs, los residuos de Glu y Cys están unidos mediante un enlace  $\gamma$ -peptídico, es decir, el enlace ocurre entre el grupo carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ) del C- $\gamma$  del Glu y el grupo amino protonado ( $-\text{NH}_3^+$ ) del C- $\alpha$  de la Cys. Con base en el número de subunidades de  $\gamma$ -Glu-Cys que posean, se denominan como  $\text{PC}_2$  ( $n = 2$ ),  $\text{PC}_3$  ( $n = 3$ ), etcétera.

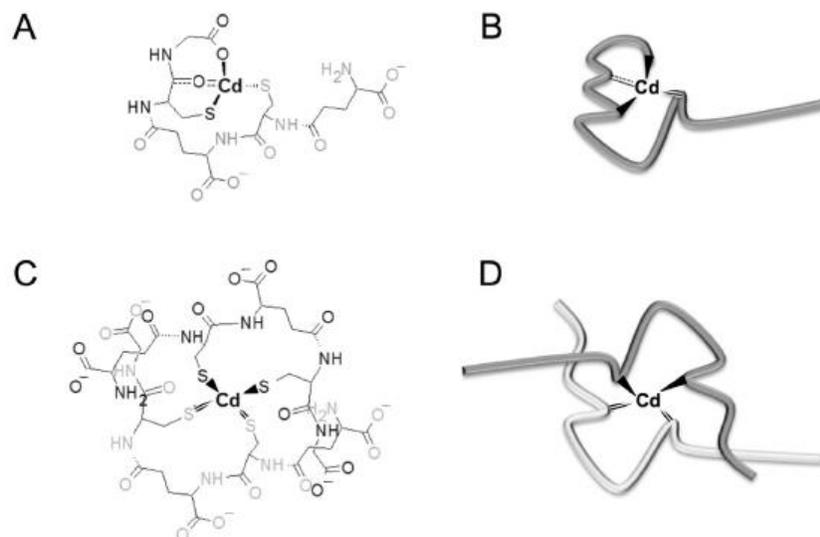
La actividad de las PCs se debe al grupo  $-\text{SH}$  del residuo de Cys que poseen, el cual, es fuertemente nucleofílico y confiere la capacidad de reaccionar con los metales pesados (Rea *et al.*, 2004). En la **Figura 2** se ilustra la interacción de la  $\text{PC}_2$  con el cadmio.

Complementando la información previa, se ha reportado la presencia de PCs con una estructura alterna a la que fue descrita anteriormente. Estas PCs *alternas* se han encontrado en plantas y protistas como *Euglena gracilis* (Grill *et al.*, 1986; Klapheck *et al.*, 1994; Zenk, 1996; Sánchez-Thomas *et al.*, 2016).

Con base en su estructura, las PCs se dividen en cinco clases, las cuales, constan de la subunidad  $\gamma$ -Glu-Cys pero varían en el residuo que poseen en su extremo carboxilo terminal (C-terminal). Las PCs denominadas como canónicas (Sánchez-Thomas *et al.*, 2016) poseen una glicina en el C-terminal, mientras que las homo-PCs tienen una  $\beta$ -alanina; las hidrox-PCs tienen una serina; y las iso-PCs tienen un ácido glutámico (Zenk, 1996). La distribución y abundancia de las distintas clases de PCs varía entre los diferentes organismos (Rauser, 1999).



**Figura 1. Fórmula estructural de las fitoquelatinas canónicas.** Cuando  $n = 1$ , la estructura es una molécula de glutatión reducido (GSH). *Figura modificada de Berg et al., 2002.*



**Figura 2. Interacción entre cadmio y moléculas de PC<sub>2</sub>.** (A) A concentraciones equimolares, la interacción entre Cd-PC<sub>2</sub> es 1:1 en donde el grupo  $-\text{COO}^-$  de la Gly y los grupos  $-\text{S}^-$  de las Cys interaccionan con el cadmio, esto se complementa con una interacción débil con el grupo  $\text{C}=\text{O}$  de la Cys unida a la Gly. (C) En presencia de una alta cantidad de PC<sub>2</sub>, el cadmio es completamente quelado por cuatro grupos  $-\text{S}^-$  que provienen de dos moléculas de PC<sub>2</sub>. Los paneles (B) y (D) son representaciones de (A) y (C), respectivamente. [Figura tomada de García-García \*et al.\*, 2016.](#)

---

#### 1.4. La vía de asimilación de azufre, síntesis de cisteína, glutatión y fitoquelatinas

---

Los compuestos con azufre como la cisteína y el glutatión (Cys y GSH, respectivamente), son esenciales para el metabolismo de todas las células. La Cys es un aminoácido que forman parte de las proteínas y que, debido a su estructura, es capaz de formar puentes disulfuro y ser un buen agente nucleofílico. Por otra parte, el GSH es un metabolito esencial que funciona como agente antioxidante al proteger a las células de diferentes tipos de ROS; y en este proyecto, es de nuestro interés puesto que es precursor de PCs. A continuación, se describe la vía de asimilación de azufre y posteriormente la síntesis de Cys, GSH y PCs. Si el lector desea consultar información más detallada, puede consultar [Mendoza-Cózatl \*et al.\*, 2004.](#) Este capítulo se escribió con el fin de describir los pasos previos a la síntesis de PCs y para

demostrar que la modificación de una sola enzima o un intermediario, tiene cierto grado de repercusión sobre la vía puesto que los pasos en la ruta están interconectados.

#### 1.4.1. La vía de asimilación del azufre

La vía de asimilación del azufre (**Figura 3**) puede ser descrita en 4 pasos principales:

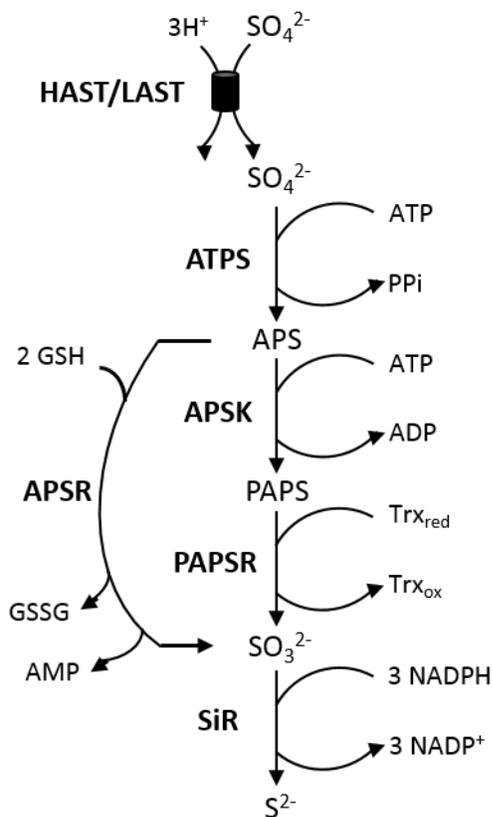
1. **Entrada de  $\text{SO}_4^{2-}$ .** El sulfato inorgánico ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) se co-transporta dentro de las células con tres protones ( $3\text{H}^+$ ) a través de HAST y LAST (transportadores de sulfato de alta y baja afinidad,  $<100$  o  $>100 \mu\text{M}$ , respectivamente).

2. **Activación del  $\text{SO}_4^{2-}$ .** La ATP sulfurilasa (ATPS) activa al  $\text{SO}_4^{2-}$  por medio de adenosín trifosfato (ATP), lo que produce adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y pirofosfato (PPi).

3. **Reducción del  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SO}_3^{2-}$ .**

Este proceso puede darse en dos vías, y dependerá del organismo:

3.A. **Vía APSK.** La APS cinasa (APSK) fosforila el APS para producir fosfoadenilil-sulfato (PAPS). Después, la PAPS reductasa (PAPSR) reacciona con tiorredoxina reducida ( $\text{Trx}_r$ ) y PAPS para generar sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ).



**Figura 3. Vía de la asimilación del azufre generalizada.**

**3.B. Vía APSR.** La APS reductasa (APSR) reacciona con GSH y APS para producir  $\text{SO}_3^{2-}$ .

**4. Reducción del  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{S}^{2-}$ .** El  $\text{SO}_3^{2-}$  producido tanto por la vía APSK como por la APSR se reduce a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) por la sulfito reductasa (SiR).

#### *1.4.2 La síntesis de Cys*

A partir de  $\text{S}^{2-}$ , se han reportado dos diferentes vías para la síntesis de Cys (**Figura 4**); la ruta a seguir varía entre los organismos.

**A. Vía OAS.** El  $\text{S}^{2-}$  es condensado con *O*-acetilserina (OAS) por la *O*-acetilserina(tiol)liasa (OAS TL, también llamada OAS sulfhidrilasa) para formar Cys de manera directa.

**B. Vía hCys.** LA OAS TL también cataliza la condensación del  $\text{S}^{2-}$  con *O*-acetilhomoserina (OAH) para formar homocisteína (hCys). La hCys se asocia con serina (Ser) para formar cistationina (CT) por la acción de la cistationina  $\beta$ -sintasa ( $\beta$ -CTS). Posteriormente, CT es disociada en Cys por la cistationina  $\gamma$ -liasa ( $\gamma$ -CTL).

Por otra parte, la producción de Cys puede derivar de la síntesis de serina (Ser) y glicina (Gly). Ser y Gly son aminoácidos que pueden ser sintetizadas por diferentes vías, aunque ambos aminoácidos provienen del 3-fosfoglicerato que es un intermediario tanto de la glucólisis como del ciclo de Calvin.

#### *1.4.3. La síntesis de GSH*

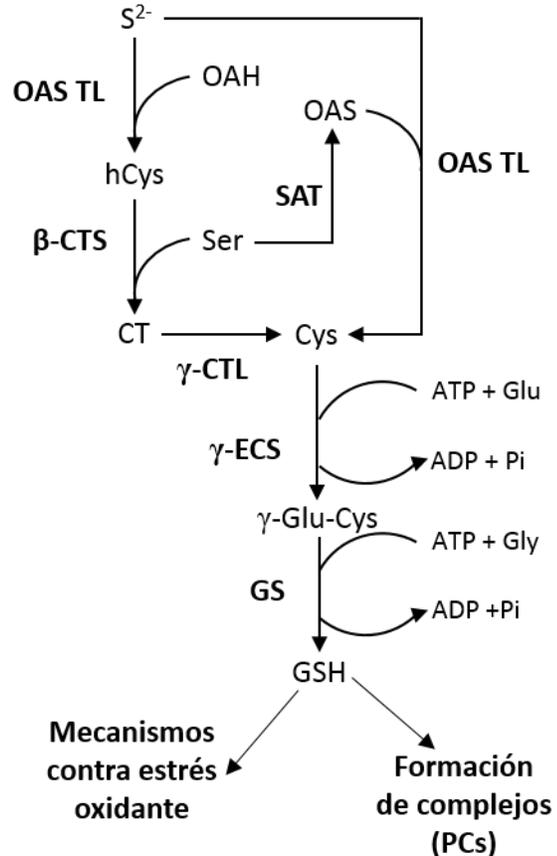
El GSH es sintetizado desde Cys en dos reacciones consecutivas y dependientes de ATP como se describe a continuación:

1. La  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) une Cys y Glu para formar el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -Glu-Cys o  $\gamma$ -EC).

2. La glutatión sintetasa (GS) une un residuo de glicina (Gly) al extremo carboxilo del dipéptido  $\gamma$ -Glu-Cys para formar GSH.

El GSH está presente en todos los organismos, forma parte de más del 90% del azufre no-proteico y se encuentra en una concentración de 0.1 a 10 mM en plantas, levaduras, bacterias, animales y protistas como *Euglena gracilis* (Meister, 1995; Lushchak, 2012; Montero *et al.*, 2013). El GSH forma parte del mecanismo contra estrés oxidante, tiene la capacidad de reducir puentes disulfuro de otras moléculas y formar complejos con compuestos tóxicos para su degradación, transporte, excreción y/o compartimentación.

El GSH es un metabolito en encrucijada debido a que es sustrato de múltiples enzimas (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2001; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2007; Figura 4).



**Figura 4. Vía de síntesis de Cys y GSH.**

#### 1.4.4. La síntesis de PCs

Una de las rutas que puede tomar el GSH es hacia la síntesis de PCs, la cual, se induce por la presencia de metales pesados, principalmente el cadmio. Este mecanismo consiste en la formación de PCs a partir de GSH y bis-glutationato de metal (Me-GS<sub>2</sub>; dos moléculas de GSH que se unen a un átomo metálico) o de PCs de cadena más corta a través de la fitoquelatina sintasa (PCS). Posteriormente, las PCs sintetizadas quelan al metal libre formando un

complejo metal-PC de 1 a 7 kDa (Mendoza-Cózatl, 2005; García-García *et al.*, 2016; Figura 2).

Los complejos metal-PC pueden ser transportados a organelos como vacuola, mitocondria y cloroplasto en donde se incorporan otros metabolitos como aminoácidos, GSH y  $S^{2-}$ . Particularmente, en *E. gracilis*, el resultado es la formación de complejos de alto peso molecular de 30 a 40 kDa, los cuales, tienen una mayor capacidad de quelar metales y son más estables que los complejos metal-PCs (Mendoza-Cózatl, 2005).

---

## 1.5. Mecanismo catalítico de la PCS

---

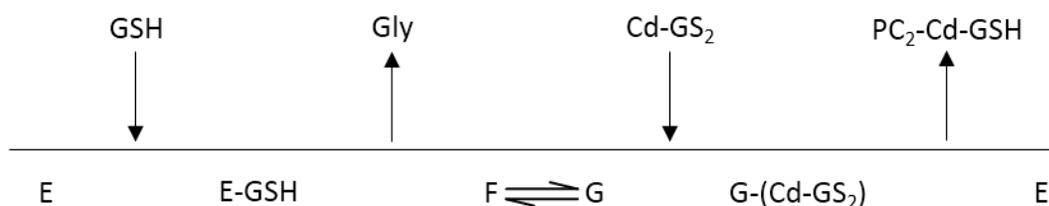
### 1.5.1. Generalidades de la PCS

La enzima que cataliza la biosíntesis de PCs es la  $\gamma$ -glutamylcisteína-dipeptidil-transpeptidasa (EC 2.3.2.15) cuyo nombre coloquial es *fitoquelatina sintasa* (PCS; Pal y Rai, 2010). La PCS fue aislada y caracterizada por primera vez en 1989 por Grill *et al.* de extractos de *Silene cucubalus*. A partir de este hecho, se han caracterizado cinéticamente las PCSs de otros organismos como la de *Arabidopsis thaliana*, y la de *E. gracilis* (Vatamaniuk *et al.* 1999; Vatamaniuk *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2014). Se ha reportado que el gen que codifica a la PCS es constitutivo, por lo que su expresión no es dependiente de la exposición a metales pesados (García-García *et al.*, 2014).

Se ha postulado que la PCS es una metalo-enzima porque el metal puede actuar como activador, y formar parte de uno de los sustratos de la enzima (Grill *et al.*, 1989; García-García *et al.*, 2014). Sin embargo, debido a que la posibilidad de encontrar iones metálicos libres dentro de la célula es extremadamente limitada (Rae *et al.*, 1999), Vatamaniuk *et al.* (2004) propusieron que el metal “libre” no se une directamente a la PCS, sino que la interacción se da con el complejo Me-GS<sub>2</sub> (dos moléculas de GSH unidas a un metal pesado). Para la mayoría de las PCSs el mejor sustrato Me-GS<sub>2</sub> es el que se forma con el cadmio (Cd-GS<sub>2</sub>; bis-glutationato de cadmio); aunque también se ha reportado que otros iones como

el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , pueden funcionar como sustratos de la PCS (Grill *et al.*, 1989; García-García *et al.*, 2014).

Mediante el análisis cinético de la PCS de *A. thaliana* (*AtPCS*), se determinó que esta enzima cataliza una reacción bisustrato en la cual, el  $\text{Cd-GS}_2$  y el GSH libre son co-sustratos de alta afinidad y baja afinidad, respectivamente (Rea *et al.*, 2004). Vatamaniuk *et al.* (2000), propusieron que la *AtPCS* es una enzima que cataliza por medio del mecanismo Bi Bi Ping Pong. En el mecanismo propuesto por este grupo de investigación, el GSH se une en primera instancia a la *AtPCS*, produciendo un intermediario *AtPCS*-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)) y la liberación de un residuo de Gly. En el siguiente paso, el  $\text{Cd-GS}_2$  interacciona con la enzima acilada; de este modo, una de las moléculas de GSH que provienen del  $\text{Cd-GS}_2$  acepta el dipéptido  $\gamma$ -Glu-Cys del complejo enzimático *AtPCS*-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)). Finalmente, se libera el complejo  $\text{PC}_2\text{-Cd-GSH}$  y la enzima se regenera para un nuevo ciclo catalítico (Figura 5).



**Figura 5. Diagrama de Cleland del mecanismo cinético Bi Bi Ping Pong propuesto por Vatamaniuk *et al.* (2000) para la producción de  $\text{PC}_2$  por la *AtPCS*. E es la enzima libre, *AtPCS*; F es la enzima acilada con el residuo  $\gamma$ -Glu-Cys, *AtPCS*-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)); G es la enzima acilada con el residuo  $\gamma$ -Glu-Cys que interacciona con el segundo sustrato,  $\text{Cd-GS}_2$ .**

En el mecanismo propuesto por Vatamaniuk *et al.* (2000), la  $\text{PC}_2$  forma parte de un complejo  $\text{PC}_2\text{-Cd-GSH}$  que es transportado directamente a la vacuola en donde se forman los complejos de alto peso molecular (Sección 1.4.4.). Sin embargo, el mecanismo propuesto por Vatamaniuk *et al.* (2000) no está basado en una caracterización cinética rigurosa, en la cual, se definan parámetros cinéticos reales.

Otros autores como [García-García \*et al.\* \(2014\)](#) proponen que los productos de la PCS son una molécula libre de PC<sub>2</sub> y el complejo inestable “-Cd-GS”. Estos productos son liberados en la reacción donde el dipéptido  $\gamma$ -Glu-Cys del complejo PCS-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)) se transfiere a una molécula de GSH del complejo Me-GS<sub>2</sub> (**Ecuación 3**). En un segundo ciclo de reacción en donde sigue existiendo un exceso de GSH y ya existe PC<sub>2</sub> en el medio, otra molécula de GSH es tomada para volver a formar al complejo PCS-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)); sin embargo, en la reacción de transpeptidación, el dipéptido  $\gamma$ -Glu-Cys del complejo PCS-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)) ahora puede ser transferido a otra molécula de GSH que proviene del co-sustrato Me-GS<sub>2</sub> o a una molécula de PC<sub>2</sub> de los complejos putativos Me-(PC<sub>2</sub>)<sub>2</sub> o GS-Me-PC<sub>2</sub>. Como se ha expuesto anteriormente, la hipótesis sobre la liberación de los productos PC<sub>2</sub> y el complejo inestable -Cd-GS propuesta por [García-García \*et al.\* \(2014\)](#) difiere de la hipótesis propuesta por [Vatamaniuk \*et al.\* \(2000\)](#). En conclusión, aún se necesita de un análisis más detallado para determinar cómo es que funcionan las PCSs.

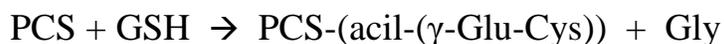
Con base en el mecanismo propuesto por [García-García \*et al.\* \(2014\)](#), la producción de la PC más pequeña, la PC<sub>2</sub>, puede ser descrita mediante la siguiente ecuación global irreversible (**Ecuación 1**), en la cual, el “-Me-GS” es el intermediario inestable que al salir como producto podría interaccionar con otra molécula de GSH del medio de reacción para volver a formar el co-sustrato Me-GS<sub>2</sub> o interaccionar con una molécula de PC<sub>2</sub> recién sintetizada para formar el sustrato putativo PC<sub>2</sub>-Me-GS.



### 1.5.2. Función del “sitio I” en la catálisis de la PCS

El mecanismo cinético de la reacción bisustrato que lleva a cabo la PCS aún está en controversia; sin embargo, tras la resolución del cristal de la PCS trunca de la cianobacteria *Nostoc* sp. (*NsPCS*), en presencia de GSH, se confirmó que la escisión de la Gly del GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), para dar lugar al dipéptido  $\gamma$ -

Glu-Cys (**Ecuación 2**) se da en el denominado *sitio I* de la enzima (Vivares *et al.*, 2005). Este sitio I está formado por tres residuos de aminoácidos que forman la triada catalítica: en la *NsPCS* son Cys-70, His-183 y Asp-201; en la *AtPCS* son Cys-56, His-162 y Asp-180; y en la *EgPCS* son Cys-70, His-179 y Asp-197 (Vivares *et al.*, 2005; García-García *et al.*, 2014).



**Ecuación 2**

Cuando la triada catalítica Cys-56, His-162 y Asp-180 es sustituida mediante mutagénesis sitio dirigida, la actividad enzimática en la *AtPCS* se abate completamente (Rea *et al.*, 2004). En esta primera reacción (**Ecuación 2**), la presencia de GSH libre de iones metálicos es suficiente para la acilación de la Cys-56, una reacción que parece no estar acompañada de síntesis neta de PCs (Rea *et al.*, 2004). La Cys-56 ejerce un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico entre los residuos de Cys y Gly del GSH; de esta manera se da la formación de un tioéster ácil  $\gamma$ -Glu-Cys y se libera Gly.

Al igual que en las proteasas de cisteína en general, se sugiere que el carácter nucleófilo de la Cys-56 es potenciado por su proximidad a la His-162 y al Asp-180. Además, el protón sulfhidrilo de la Cys-56 se transfiere al anillo imidazol de la His-162, cuyo carácter electrofílico se ve potenciado por su proximidad inmediata al  $\beta$ -carboxilato del Asp-180 (Rea *et al.* 2004; Vivares *et al.*, 2005).

### 1.5.3. Función del “sitio II” en la catálisis de la PCS

La existencia y función de un “sitio II” en las PCSs aún se encuentra bajo el escrutinio de la comunidad científica. En general, se piensa que la segunda reacción de la catálisis de la PCS, la transferencia del residuo  $\gamma$ -Glu-Cys del complejo PCS-(acil-( $\gamma$ -Glu-Cys)) a una molécula de GSH del complejo metálico Me-GS<sub>2</sub> ocurre en dicho “sitio II” (Rea *et al.* 2004; Clemens, 2006; García-García *et al.*, 2014). Esta reacción (**Ecuación 3**), es dependiente de iones metálicos y se desconoce el sitio donde se realiza (Rea *et al.* 2004; Clemens, 2006; García-García *et al.*, 2014).



**Ecuación 3**

---

### **1.6. La estructura de la PCS como la clave de su función**

---

El análisis de la secuencia de aminoácidos de diferentes PCSs, ha demostrado que el extremo N-terminal de la enzima se encuentra conservado, con una identidad de aproximadamente de 30 al 45 % entre los diferentes organismos que la poseen, mientras que el extremo C-terminal es altamente variable (identidad menor al 15%). En eucariontes, las PCSs costan de 421 a 506 residuos; mientras en procariontes, quienes carecen de extremo C-terminal, constan de de 220 a 237 residuos. En el extremo N-terminal de todas las PCSs, se encuentra el extremo 05023 Pfam, una secuencia consenso de 133 aminoácidos con la que se identifica si una proteína forma parte de la superfamilia PCS ([Harada \*et al.\*, 2004](#); [García-García \*et al.\*, 2014](#)).

La *NsPCS* consta de 242 aminoácidos, los cuales alínean con el extremo N-terminal de la mayoría de las PCSs ([Tsuji \*et al.\*, 2004](#)). La *NsPCS* es capaz de remover el residuo de Gly del GSH (**Ecuación 2**) y hacer la transpeptidación para producir PCs ineficientemente (**Ecuación 3**; [Tsuji \*et al.\*, 2004](#)). Por otra parte, cuando la *AtPCS* (enzima completa de 485 aminoácidos) es sometida a proteólisis por la proteasa V8, se generan dos fragmentos N-terminales, que finalizan en las posiciones 372 (PCS\_Nt1) y 283 (PCS\_Nt2). Ambas enzimas modificadas, son capaces de sintetizar PCs a partir de GSH en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ , a una velocidad de aproximadamente 5 veces menor que la de la *AtPCS* completa ([Ruotolo \*et al.\*, 2004](#)).

Estos hallazgos en la *NsPCS* y *AtPCS* fueron pieza clave para hipotetizar que el extremo catalítico de todas las PCS es el N-terminal y que la función del extremo C-terminal era darle estabilidad al polipéptido de longitud completa y

participar en el reconocimiento de la gama de metales con los que la enzima es activa (Ruotolo *et al.*, 2004).

Cobbett (2000), fue el primero en proponer que el C-terminal variable podría unir, vía residuos de Cys conservadas, los iones metálicos para así transferirlos al extremo N-terminal catalítico. Después, Maier *et al.* (2003), examinaron la unión a  $\text{Cd}^{2+}$  de las PCSs de *S. pombe* y *Triticum aestivum* por medio de fragmentos de las enzimas de aproximadamente 25 aminoácidos cada uno. Maier *et al.* (2003) encontraron que residuos de Cys que se encuentran conservados en el extremo N-terminal, podrían estar implicados en la unión a  $\text{Cd}^{2+}$  en la enzima completa y consecuentemente en la síntesis de PCs.

Posteriormente, Vatamaniuk *et al.* (2004) y Tsuji *et al.* (2005), modificaron las cuatro Cys antes mencionadas y observaron que ninguno de estos cambios representa una disminución significativa en la habilidad de la *AtPCS* para conferir la tolerancia a  $\text{Cd}^{2+}$  o catalizar la síntesis de PCs. Vivares *et al.* (2005), a partir de la resolución del cristal de la *NsPCS*, determinaron que estos cuatro residuos de Cys podría estar lejos del sitio activo.

A pesar de múltiples intentos, hasta el momento sólo se cuenta con el cristal de la *NsPCS* en donde se muestra que la reacción descrita en la **Ecuación 2** se lleva a cabo en el extremo N-terminal (Vivares *et al.*, 2005). Y como fue expuesto antes, el sitio donde se lleva a cabo la interacción con el  $\text{Me-GS}_2$  sigue siendo incierto.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La bio-recuperación de metales pesados es una estrategia potencial para la remoción de los mismos mediante el uso de organismos con alta capacidad de acumulación. Sin embargo, en sistemas contaminados por metales pesados aún no es completamente aplicable ni eficiente (García-García *et al.*, 2016). Así, la investigación acerca de los mecanismos bioquímicos relacionados con la remoción de metales pesados puede permitir la identificación de blancos génicos y químicos que, mediante su manipulación, provean organismos con una mayor capacidad de remoción.

La PCS es una enzima de interés biotecnológico puesto que su producto está directamente relacionado con la inactivación intracelular de metales pesados que son tóxicos. Sin embargo, existen muchas interrogantes sobre su mecanismo cinético y de regulación, aspectos de suma importancia en la manipulación de vías metabólicas. También, cabe destacar que la PCS presenta una baja eficiencia catalítica ( $V_{\max}/K_m$ ), debido a que es una enzima lenta ( $V_{\max}$  baja) y a que tiene baja afinidad por uno de sus sustratos ( $K_{m(\text{GSH})}$  mayor a la concentración fisiológica de GSH). Es decir, los parámetros cinéticos señalan que, la producción de PCs es un proceso lento y que sólo se activa cuando las concentraciones de GSH suben debido al efecto tóxico provocado por la exposición a metales.

Dentro de las PCSs caracterizadas cinéticamente, se encuentra la del protista híper-acumulador de  $\text{Cd}^{2+}$ , *E. gracilis*, la *EgPCS*. La *EgPCS* guarda similitudes con otras PCSs, sin embargo, tiene las siguientes particularidades: 1) su mejor co-sustrato es el bis-glutationato de zinc ( $\text{Zn-GS}_2$ ); 2) la falta del extremo C-terminal inactiva a la enzima; y 3) posee los residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 en la región del C-terminal.

Debido a que en otras proteínas se han encontrado residuos tanto de cisteínas como de histidinas que están involucrados en la interacción con metales como  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , el presente trabajo se enfocó en analizar la contribución sobre la actividad de la *EgPCS* conferida por el extremo C-terminal que contiene los

residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430. Con este estudio y los que lo sucedan, se busca proporcionar información sobre la estructura y mecanismo cinético de las PCSs, que podría ser utilizada en el diseño de enzimas más eficientes que mediante sobre-expresión heteróloga formen parte de organismos con mayor capacidad de bioremediar sistemas contaminados por metales.

### **3. HIPÓTESIS**

Los residuos Cys-42, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 contenidos en el extremo C-terminal de la *EgPCS* forman parte de la secuencia mínima y esencial para la actividad de la enzima.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Analizar la contribución del extremo C-terminal de la *EgPCS* sobre la actividad de la enzima, a partir del análisis de enzimas con diferente longitud del C-terminal.

#### **Objetivos particulares**

Medir el crecimiento celular de levaduras transformadas con enzimas C-terminal truncas de la *EgPCS* expuestas a  $\text{CdCl}_2$ .

Cuantificar moléculas con grupos tiol (Cys,  $\gamma$ -Glu-Cys, GSH y PCs) en levaduras transformadas con las distintas versiones de la *EgPCS*.

Cuantificar el contenido de cadmio total en las levaduras de interés.

Sobre-producir, purificar y obtener los parámetros cinéticos,  $V_{\max}$ ,  $K_m$  y  $V_{\max}/K_m$  de las variantes truncas de la *EgPCS* que provean protección a las levaduras contra el estrés provocado por  $\text{Cd}^{2+}$ .

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Crecimiento de las células *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta ycf1$ transformadas con las diferentes secuencias de la *EgPCS* ante la exposición a $CdCl_2$

Previo a este trabajo, en el laboratorio del Dr. Jorge D. García-García se generaron variantes truncas del extremo C-terminal de la *EgPCS* usando herramientas de biología molecular. Las enzimas truncas evaluadas en este proyecto constaron de 257, 296, 315, 335, 355, 379, 395, 415, 435, 443 y 468 aminoácidos; además se incluyeron la *EgPCS*\_nativa (476 aminoácidos) y a la *EgPCS*\_Nter (235 aminoácidos que corresponden al extremo N-terminal). Todas estas secuencias fueron clonadas en el vector de sobre-expresión de proteínas específico para levadura, pYES2, mientras que el vector vacío se utilizó como control. Con estas construcciones se transformaron células sensibles a cadmio, *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$  que fueron seleccionadas auxotróficamente.

En el presente proyecto de tesis, las células *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$  transformadas fueron expuestas a  $CdCl_2$  (0-70  $\mu M$ ) hasta 48 horas. El medio de cultivo utilizado fue YNB-URA (1.7% p/v de Yeast Nitrogen Base sin uracilo (BD), 0.2% p/v de Yeast synthetic Drop-out medium (Sigma-Aldrich) suplementado con 2% p/v de glucosa o 2% p/v de galactosa con/sin 1% p/v de rafinosa para inducir la expresión de las proteínas. Las células se incubaron a 28° C y 200 rpm. Los cultivos se iniciaron a partir de un preinóculo suficiente para alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.2.

### 5.2. Cuantificación de cadmio intracelular en *S. cerevisiae* $\Delta ycf1$

Se prepararon medios de cultivo YNB-URA+Galactosa de volúmenes de 10 mL sin  $CdCl_2$  y de 100 mL con 50  $\mu M$  de  $CdCl_2$ . Los cultivos se iniciaron con 0.2 y 0.4 unidades de  $DO_{600nm}$  en los medios sin y con metal, respectivamente. Después de 48 horas de incubación, las células fueron cosechadas y lavadas con 100 mM de  $KH_2PO_4$  + 5 mM de EGTA (ácido tetra-acético etilenglicol) a pH 7.4 en dos ocasiones para retirar el  $Cd^{2+}$  extracelular. En 1 mL de  $H_2O$  mQ se

resuspendieron las células; de la suspensión se tomaron 50  $\mu\text{L}$  para medir la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  y el resto se digirió con 2.5 mL de  $\text{HNO}_3$  70% v/v y 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  99% v/v por 2 horas a 100 °C. Las muestras digeridas se aforaron a 5 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  mQ para cuantificar el cadmio intracelular por espectrometría de absorción atómica (EEA; Varian SpectrAA-640, Australia) a 228.8 nm a partir de un estándar certificado (Sigma-Aldrich).

### 5.3. Identificación y cuantificación de péptidos con grupos -SH de *S. cerevisiae* $\Delta\text{ycf1}$ por HPLC

Para determinar y cuantificar la síntesis de PCs y de otros péptidos con grupos -SH en las células *S. cerevisiae*, se iniciaron cultivos con volúmenes de 100 mL sin  $\text{CdCl}_2$  y de 150 mL con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Los cultivos se iniciaron con 0.2 y 0.4 unidades de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  en los medios sin y con metal, respectivamente. Después de 48 horas de incubación, las células fueron cosechadas y lavadas con amortiguador de 200 mM de sorbitol, 10 mM de HEPES y 1 mM de EGTA. Las células se resuspendieron en 1 mL del mismo amortiguador suplementado con 1 mM de DTT (ditiotreitól). Las células se rompieron con perlas de vidrio de 0.5 mm en Mini-Beadbeater (Biospec Products) en cinco ciclos de 1 minuto de disrupción, seguido de 5 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron (20,379 RCF, 10 minutos, 4 °C) para separar los restos celulares de los péptidos con grupos -SH a analizar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Al sobrenadante se le determinó la proteína total por el método de Lowry a 660 nm con BSA (albúmina sérica bovina) como estándar y después se le añadió 2.7 % v/v de PCA para la precipitación de sustancias ácido-sensibles. Después de centrifugar, el sobrenadante se filtró con un poro de 0.45  $\mu\text{M}$  de diámetro y 50  $\mu\text{L}$  fueron inyectados para su análisis por HPLC (Waters 1525 system; Milford, MA, USA). Se utilizó una columna de fase reversa C18. La columna se equilibró con TFA (ácido trifluoroacético; Sigma) 0.1% v/v en agua y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo (Sigma-Aldrich) 100% a un flujo neto de 1 mL/min.

Los compuestos con grupos -SH se derivatizaron con 0.1 mM de DTNB (5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)). El DTNB se disolvió en amortiguador 0.1 M

de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 8. Los analitos se identificaron mediante el uso de estándares internos ( $\text{PC}_{2-4}$ ) y se cuantificaron como equivalentes de Cys a partir del área debajo de la curva de los cromatogramas obtenidos.

#### 5.4. Sobre-producción y purificación de enzimas EgPCS

Previo a este trabajo, las secuencias modificadas de la EgPCS analizadas en el presente proyecto, se clonaron en el vector pET-DEST42 (Invitrogen) con la etiqueta 6xHis en el C-terminal. Las proteínas recombinantes fueron sobre-expresadas en el sistema *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) en 500 mL de medio LB (Luria Broth) suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de carbenicilina a 37 °C hasta alcanzar un  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  cercana a 1. Para la inducción del promotor T7lac que expresa la RNA polimerasa T7, se añadió 400  $\mu\text{M}$  de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). La inducción se realizó a 25 °C y 200 rpm por aproximadamente 16 horas.

Las células se cosecharon por centrifugación (4,534 RCF, 10 minutos, 4 °C). El botón celular fue resuspendido en 6 mL de amortiguador de lisis para bacterias (100 mM de trietanolamina pH 7.4, 300 mM de NaCl y 2 mM de imidazol). La suspensión se sonicó por 10 segundos, tres veces en un baño de hielo (20% de amplitud; Branson sonicator). La suspensión se cosechó para recuperar el sobrenadante. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) con resina a base de cobalto (TALON® Metal Affinity Resin, Clontech) previamente equilibrada con amortiguador de lisis para bacterias. Se realizaron tres lavados con amortiguador de lisis 10 mM de imidazol. La resina que contenía la proteína recombinante fue vaciada dentro de una columna de flujo por gravedad donde se realizó la elución con amortiguador de lisis 100 mM de imidazol. Posteriormente, se centrifugó el eluato en un Amicon 3,000 MWCO (Millipore). La solución final fue almacenada a -20 °C en 50% v/v de glicerol a un pH final de 8.

Una alícuota de solución de enzima de entre 12.5 y 50  $\mu\text{L}$  fue precipitada con 13% v/v de TCA para eliminar la interferencia por el amortiguador de imidazol y así cuantificar la proteína por el método de Lowry previamente descrito. La presencia y peso molecular de las enzimas recombinantes fue determinada a

través de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con 12% p/v de acrilamida, mientras que el grado de pureza fue analizado mediante el software ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National. Institutes of Health, USA).

### *5.5. Determinación de la actividad enzimática*

La actividad de la enzima *EgPCS\_435* se determinó usando una mezcla de reacción que contenía 0.01 mg/mL de BSA, 10 mM de  $\beta$ ME (2-mercaptoetanol), 40 mM de GSH, 50  $\mu$ M de  $ZnSO_4$  y 4-170  $\mu$ g/mL de proteína del extracto enzimático parcialmente purificado. En la mayoría de las reacciones se utilizó una solución amortiguadora de 50 mM de HEPES pH 8, lo cual fue diferente cuando se determinó el pH óptimo (**Sección 5.6.**). Después de incubar las reacciones a 35 °C y a distintos tiempos de interés, éstas se detuvieron con 2.7% v/v de PCA y se congelaron con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC como se indica en la **Sección 5.3.**

### *5.6. Determinación de la relación entre el pH y la actividad la enzima *EgPCS\_435**

El medio de reacción se llevó a un volumen de 500  $\mu$ L con amortiguador compuesto por HEPES, MES y Tris, cada uno en concentración de 50 mM con valores de pH entre 6.0 y 9.0. Después de la incubación a 35 °C por una hora, las reacciones se detuvieron y se almacenaron como se menciona en la sección anterior.

### *5.7. Determinación de los parámetros cinéticos de la *EgPCS\_435**

Una vez que se determinó el pH con el cual trabajar, se realizó un curso temporal (0-24 horas) para determinar el tiempo en el que la cinética de reacción es lineal. El medio de reacción fue el previamente descrito con HEPES 50 mM (**Sección 5.5.**). Se determinó la curva de saturación por  $Zn^{2+}$  (0-100  $\mu$ M) y por GSH (0-40 mM) para obtener los parámetros cinéticos  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$ .

Finalmente, los gráficos fueron realizados en Excel 2013 (Paquete Office), las pruebas estadísticas por R Project 3.2.3. y los ajustes por regresión no lineal en Microcal origin 5.0.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 6.1. Análisis *in vivo* de las secuencias *EgPCS* truncas

---

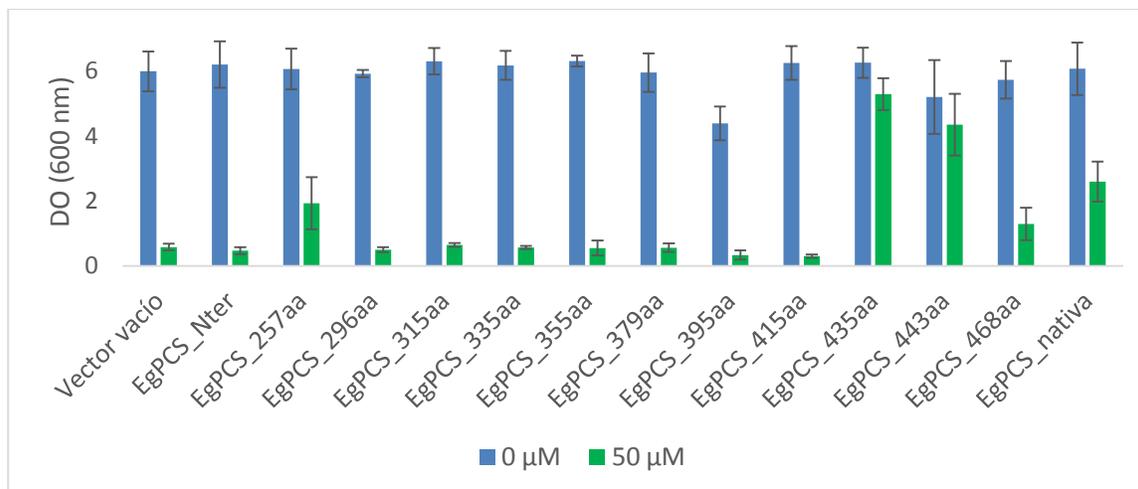
#### 6.1.1. Crecimiento de las células transformadas con las variantes de la *EgPCS*

Para determinar la importancia del extremo C-terminal de la *EgPCS* en el fenotipo protector contra la toxicidad a  $\text{Cd}^{2+}$ , se utilizó *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$ , que es una cepa sensible a  $\text{Cd}^{2+}$  porque carece del gen *Yeast Cadmium Factor* (*yfc1*). Este gen codifica para un transportador vacuolar tipo ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) que transporta glutatión-S-conjugados, como el bis-glutationato de cadmio ( $\text{Cd-GS}_2$ ), lo que confiere resistencia a cadmio al secuestrarlo dentro de la vacuola (Li *et al.* 1996; Li *et al.* 1997). Una ventaja de usar a *S. cerevisiae* es que no existen reportes de que posea un gen que codifique para una PCS, por lo que el fenotipo protector contra  $\text{Cd}^{2+}$  y la producción de PCs puede atribuirse a la expresión heteróloga de las secuencias de la PCS de interés (Vatamaniuk *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2014).

El crecimiento de las células transformadas con las secuencias truncas de la *EgPCS* fue relativamente uniforme cuando no fueron expuestas a  $\text{CdCl}_2$ ; pero en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  se observó un claro abatimiento en el crecimiento de las células transformadas con una *EgPCS* menor a 435 aminoácidos (**Figura 6**). Las células transformadas con el vector vacío y con la *EgPCS\_Nter* no presentaron una diferencia significativa en el crecimiento ( $p = 0.044$ ) durante el estrés con  $\text{Cd}^{2+}$ , como fue previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (García-García *et al.*, 2014).

El fenotipo de resistencia a  $\text{Cd}^{2+}$  se observó en las células transformadas con la *EgPCS\_nativa* y las mutantes de 435 y 443 aminoácidos. Además, las células transformadas con la mutante de 435 aminoácidos crecieron más que las transformadas con la enzima nativa ( $p = 0.002$ ). Estos resultados sugieren que dichas enzimas son capaces de sintetizar fitoquelatinas que forman complejos

con el cadmio; de modo que puede contrarrestarse la inhibición en el crecimiento que induce el metal (**Secciones 1.2. y 1.3.**).

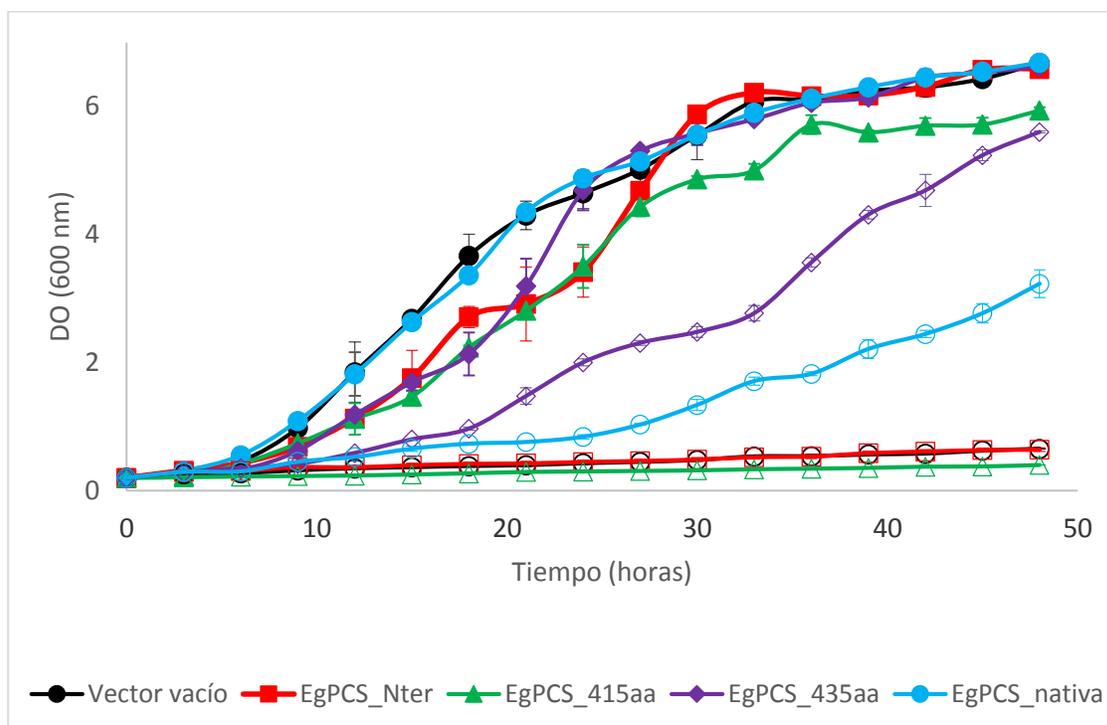


**Figura 6. Sensibilidad a Cd<sup>2+</sup> de las células *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$  transformadas con las variantes *EgPCS* truncas.** En el tratamiento con 50 μM de CdCl<sub>2</sub> no existe una diferencia significativa en el crecimiento de las células con el vector vacío y las *EgPCS\_Nter* ( $p = 0.044$ ); mientras que sí existe una diferencia significativa en el crecimiento de las células *EgPCS\_435aa* y *EgPCS\_nativa* ( $p = 0.002$ ). Medio de cultivo YNB-URA+Galactosa+Rafinosa; 48 horas;  $n = 4 - 25$ ;  $\bar{X} \pm DE$ , *Wilcoxon test*.

Para hacer una cinética de crecimiento más detallada, se seleccionaron las células que presentaron cambios importantes en el crecimiento en presencia de 50 μM de CdCl<sub>2</sub>. Las células seleccionadas fueron las transformadas con la *EgPCS\_415* (no resistentes) y la *EgPCS\_435* (resistentes), como controles se incluyeron las células transformadas con la *EgPCS\_nativa* (resistente), la *EgPCS\_Nter* y las transformadas con el vector vacío (ambas no resistentes). Estos cinco tipos celulares se utilizaron para determinar el crecimiento celular en presencia de Cd<sup>2+</sup> desde el tiempo 0 hasta las 48 horas (**Figura 7**).

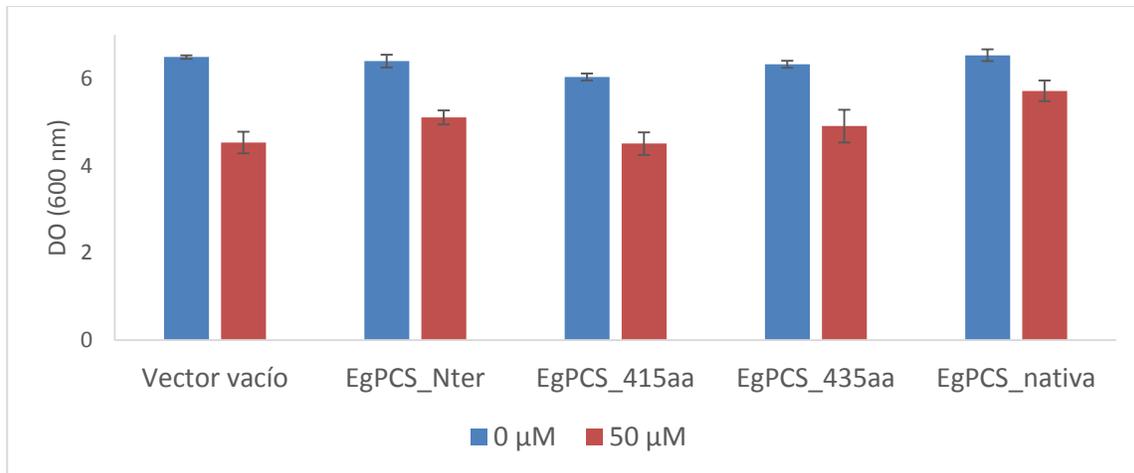
Los resultados muestran que en ausencia de Cd<sup>2+</sup>, las células presentan un crecimiento con fases lag, exponencial y estacionaria similares. Por otra parte, ante la exposición a Cd<sup>2+</sup>, las células no resistentes al metal sólo presentan la fase lag, es decir, la exposición al metal inhibe el crecimiento celular; mientras

las que son resistentes llegan hasta la fase exponencial siendo la *EgPCS\_435* la que presenta la mayor tasa de crecimiento.

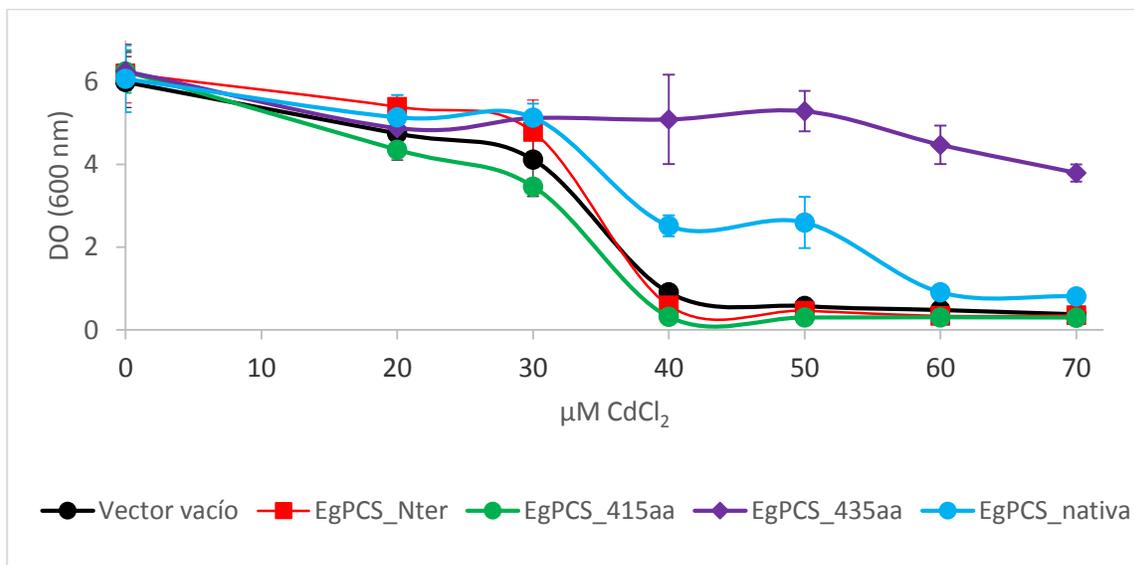


**Figura 7. Curva de crecimiento de las células *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$  transformadas con las variantes en longitud de la *EgPCS*.** Los símbolos con relleno corresponden a la condición sin  $\text{CdCl}_2$  y los vacíos a la condición con  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Medio YNB-URA+Galactosa+Rafinosa;  $n = 4 - 25$ ,  $\bar{x} \pm \text{DE}$ .

Para determinar si la diferencia en el crecimiento celular (**Figura 6**), durante la exposición a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , era debida a la *EgPCS* con que fueron transformadas, se crecieron las células con 2% de glucosa que es un inhibidor del promotor *GALI* del vector pYES2 con el que fueron transformadas. Bajo esta condición y para un  $\alpha = 0.01$ , no existe diferencia en el crecimiento de los diferentes tipos celulares a una concentración de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , este resultado sugiere que la diferencia en el crecimiento sí es debido a la *EgPCS* que sobreproducen (**Figura 8**). Cabe añadir que las células expuestas a  $\text{CdCl}_2$  crecieron más en 2% de glucosa que en galactosa+rafinosa (2 y 1 %, respectivamente).



**Figura 8. Crecimiento de las células *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$  transformadas con las variantes en longitud de la *EgPCS* en medio con glucosa. No se presentó una diferencia significativa en el crecimiento celular ( $\alpha = 0.01$ ) en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ .**



**Figura 9. Efecto del  $\text{CdCl}_2$  sobre el crecimiento de las células *S. cerevisiae*  $\Delta ycf1$ . Medio de cultivo YNB-URA+Galactosa+Rafinosa; tiempo de cultivo 48 horas;  $n = 4 - 25$ ;  $\bar{X} \pm \text{DE}$ .**

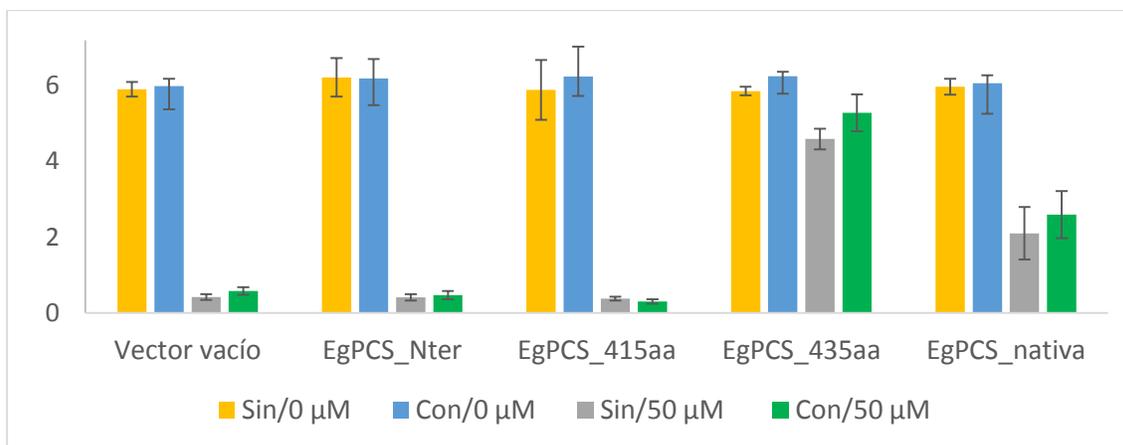
Se realizaron curvas de crecimiento con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  añadidas, lo que mostró que a concentraciones por debajo de 30  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  no hay diferencia en el crecimiento celular, pero que a partir de 40  $\mu\text{M}$  se empieza a manifestar el fenotipo resistente y el no resistente a  $\text{Cd}^{2+}$ . Además, en

concentraciones  $\geq 40 \mu\text{M}$  las células transformadas con la *EgPCS\_435* mostraron una mejor capacidad para contender frente a la inhibición del crecimiento que las células con la *EgPCS\_nativa* (**Figura 9**).

Para dilucidar a qué se debe la diferencia en el crecimiento celular (**Figura 6**), y específicamente para buscar evidencia que demuestre que es debido al efecto protector que ejerce la *EgPCS* que se produjo, se determinó el contenido de cadmio intracelular y de PCs. Para realizar estas determinaciones se necesitan volúmenes muy grandes de medio cultivo, por lo que se decidió optimizar el costo del medio de cultivo de inducción al eliminar la adición de rafinosa. Se ha reportado que la rafinosa promueve una sobre-producción de proteínas más rápida pero que no es inductor del promotor *GALI* del vector pYES2 (Invitrogen user manual).

Debido a que el fin de los experimentos era caracterizar el efecto protector que proveen las diferentes *EgPCSs* y no la rapidez de sobre-producción de las proteínas, las células se expusieron a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , en medio YNB-URA+Galactosa (**Figura 10**). Los resultados mostraron que para un  $\alpha = 0.05$  no existió una diferencia significativa en el crecimiento de las levaduras al poner o no rafinosa en el medio de inducción.

Por lo tanto, los experimentos para determinar cadmio intracelular y el contenido de PCs se realizaron en medio de inducción sin rafinosa, es decir, en YNB-URA+Galactosa. De este modo, el cambio en el protocolo representó un ahorro económico aproximado del 43% al disminuir el costo del medio de cultivo de \$516.00 a \$292.00 por litro.



**Figura 10. Comparación en el crecimiento celular en medio sin/con rafinosa y sin/con  $\text{CdCl}_2$  añadidos.** No se observó una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) en el crecimiento celular al adicionar o no rafinosa al medio de inducción.  $n = 4 - 25$ ,  $\bar{X} \pm \text{DE}$ .

### 6.1.2. Cuantificación del cadmio intracelular

Para demostrar que la diferencia en el crecimiento de las diferentes células se debe al efecto protector que proveen las diferentes mutantes de la *EgPCS* y no a la entrada diferencial de  $\text{Cd}^{2+}$  a la célula, se midió el cadmio intracelular total por Espectrometría de absorción atómica (EEA; **Tabla 1**).

**Tabla 1. Cuantificación de cadmio intracelular en las células expuestas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , en medio de inducción YNB-URA+Galactosa.**

Vector vacío	$1.2 \pm 1.9$
<i>EgPCS_Nter</i>	$0.4 \pm 0.5$
<i>EgPCS_415</i>	$1.5 \pm 2.6$
<i>EgPCS_435</i>	$1.0 \pm 1.7$
<i>EgPCS_nativa</i>	$1.3 \pm 1.8$

nmol/l  $\times 10^7$  células.  $n = 3$ ,  $\bar{X} \pm \text{DE}$ ,  $p = 0.959$ , *Kruskal-Wallis test*.

Para la determinación de cadmio intracelular en las células tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de dicho metal, se tomó la señal del EEA de las células no expuestas como cero. El número de células se determinó por hemocitómetro y microscopio óptico con un aumento total de 400 $\times$ .

Como lo denotan las cifras reportadas en la **Tabla 1**, los resultados ( $\bar{x} \pm DE$ ) no muestran diferencias significativas. Esto pudo deberse a errores acumulados por el operador y a que los niveles de cadmio medidos pudieron encontrarse por debajo del límite de detección del EEA que se utilizó. Sin embargo, los datos fueron analizados mediante la prueba *Kruskal-Wallis* que es una alternativa no paramétrica al ANOVA de un solo factor. La prueba no requiere que los datos se distribuyan de manera normal, y para el análisis no utiliza el valor real de los datos sino que los clasifica en rangos. Mediante este análisis, los resultados muestran que la cantidad de cadmio intracelular en las diferentes transformantes no varió ( $p = 0.959$ ), por lo que la diferencia en el crecimiento celular debe atribuirse a otra variable.

### 6.1.3. Determinación y cuantificación de péptidos -SH intracelulares por HPLC

Para examinar si la diferencia en el crecimiento en presencia de  $Cd^{2+}$  se debió a la producción de Cys,  $\gamma$ -Glu-Cys, GSH y polímeros de GSH, se hizo un análisis por HPLC de las levaduras transformadas con las distintas versiones de la *EgPCS* y expuestas a 50  $\mu M$  de  $CdCl_2$  (**Tablas 2 y 3**). Las moléculas tioladas son importantes porque se han postulado como los ligandos intracelulares más favorables para el  $Cd^{2+}$  (Clemenés, 2006) y ante una exposición a este metal se activa la síntesis de PCs, lo que incrementa la demanda en la producción de metabolitos precursores como lo son Cys,  $\gamma$ -Glu-Cys y GSH (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2004).

Los resultados indican que sí hubo un aumento notorio en el contenido de moléculas con grupos -SH en presencia de  $Cd^{2+}$  (**Tabla 3**). Estos resultados sugieren que las células transformadas con la *EgPCS\_435* y la *EgPCS\_nativa* fueron más resistentes a la exposición a  $Cd^{2+}$  debido a que presentan un contenido de moléculas con grupos -SH superior a las células no resistentes. Además, estos tipos celulares resistentes son capaces de sintetizar  $PC_2$  (valor que se agrupa en la categoría Pol-GSH).

**Tabla 2. Identificación y cuantificación de moléculas con grupos -SH en medio de inducción YNB-URA+Galactosa sin exposición a Cd<sup>2+</sup>.**

	Cys	GSH	$\gamma$ -Glu-Cys	Pol-GSH
Vector vacío	3.7 $\pm$ 1.5	41.0 $\pm$ 13.9	14.7 $\pm$ 7.0	0.6 $\pm$ 0.3
<i>EgPCS</i> N-ter	3.8 $\pm$ 2.0	42.5 $\pm$ 16.4	19.5 $\pm$ 8.4	0.7 $\pm$ 0.4
<i>EgPCS</i> _415	5.4	52.4	23.9	0.8
<i>EgPCS</i> _435	4.4 $\pm$ 3.2	39.2 $\pm$ 13.0	16 $\pm$ 6.0	1.2 $\pm$ 0.8
<i>EgPCS</i> _nativa	3.5 $\pm$ 2.3	35.5 $\pm$ 12.5	15 $\pm$ 5.1	1.1 $\pm$ 0.4

nmol / mg de proteína,  $n = 2 - 3$ ;  $\bar{X} \pm$  DE. GSH,  $\gamma$ -Glu-Cys y Pol-GSH se determinaron como equivalentes de Cys.

**Tabla 3. Identificación y cuantificación de moléculas con grupos -SH en medio de inducción YNB-URA+Galactosa expuestas a 50  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>.**

	Cys	GSH	$\gamma$ -Glu-Cys	Pol-GSH
Vector vacío	13.7	128.9	67.7	6.7*
<i>EgPCS</i> _Nter	10.9	89.0	44.0	4.4*
<i>EgPCS</i> _415	13.3	57.3	26.2	1.8*
<i>EgPCS</i> _435	9.3	87.6	52.0	18.8**
<i>EgPCS</i> _nativa	11.6	98.9	57.5	11.7**

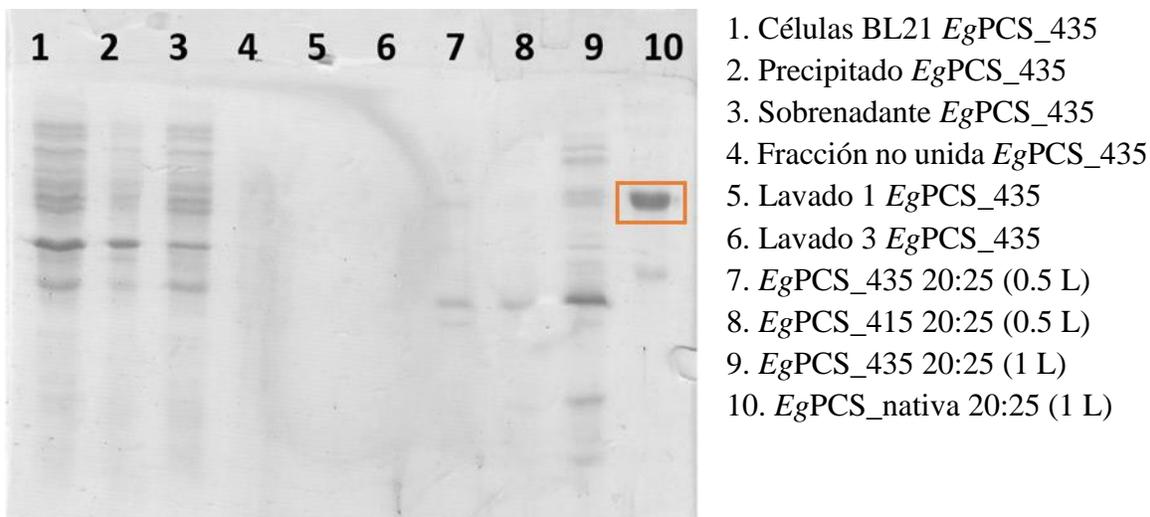
nmol / mg de proteína,  $n = 2$ ,  $\bar{X}$ . GSH,  $\gamma$ -Glu-Cys y Pol-GSH se determinaron como equivalentes de Cys. \* No se identificó la presencia de PC<sub>2</sub>; \*\* sí se identificó la presencia de PC<sub>2</sub>. Debido a la interferencia con otros análisis en el cromatograma, no se cuantificó la cantidad de PC<sub>2</sub>.

## 6.2. Análisis *in vitro* de las secuencias *EgPCS* truncas

### 6.2.1. Sobre-producción y aislamiento de enzimas recombinantes

Para complementar el análisis que se hizo a nivel celular, se realizó la caracterización cinética de las enzimas *in vitro*. Se seleccionaron las enzimas *EgPCS*\_415 y *EgPCS*\_435 debido a que el fenotipo y el contenido de Pol-GSH que proveen son altamente contrastantes. La *EgPCS*\_435 proveyó el fenotipo resistente a Cd<sup>2+</sup> en la caracterización *in vivo* y su secuencia comprende a la triada catalítica y los residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 (**Figuras 6 y 18; Tabla 3**).

La *EgPCS\_nativa* fue sobre-producida y aislada con una pureza promedio de 95%. Sin embargo, hubo complicaciones para obtener las enzimas *EgPCS\_415* y *EgPCS\_435* con una pureza aceptable como para considerarlas “enzimas puras” debido a que su nivel de sobre-producción fue muy bajo (**Figura 11**).

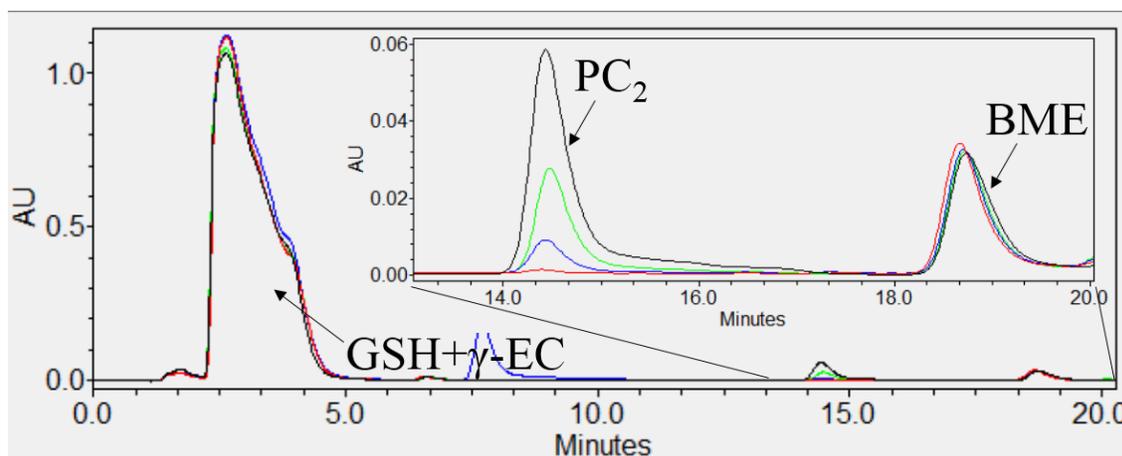


**Figura 11. Purificación de enzimas recombinantes.** Gel de poliacrilamida con los diferentes pasos de la purificación de la *EgPCS\_435* (carriles 1-6), así como el producto final de los procesos para las *EgPCSs* 415, 435 y nativa (carriles 7-10). Los porcentajes de pureza se calcularon mediante el software ImageJ 1.48v y fueron del 41 y 95% para la *EgPCS\_435* y *EgPCS* nativa, respetivamente. Por otra parte, no se detectó la presencia de la *EgPCS\_415* en ninguno de los ensayos. Entre paréntesis se indica el volumen de medio de cultivo celular utilizado. En cada carril se inyectó un volumen final de 7  $\mu$ L.

Para obtener un nivel aceptable de sobre-producción, se probaron diferentes condiciones (densidades celulares, temperaturas y tiempos de inducción), se ensayó el método de autoinducción (Studier, 2005), e incluso se utilizaron otras cepas de *E. coli*. Sin embargo, no hubo un aumento en el nivel de sobre-producción ni en el grado de pureza. A pesar de los niveles de sobre-producción y purificación bajos de la *EgPCS\_435*, la caracterización cinética se realizó tomando en consideración que la muestra analizada era una enzima parcialmente purificada.

### 6.2.2. Determinación de la preferencia por metal de la EgPCS\_435

La PCS es una enzima que requiere la presencia de diferentes metales que funcionen como activadores y/o sustratos para que pueda llevar a cabo la catálisis. En la literatura se ha reportado que los iones  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  que provienen de la disociación de sales de cloruro, nitrato y sulfato, activan a la enzima en diferente grado (Grill *et al.*, 1989; García-García *et al.*, 2014). La adición de  $\text{Cd}^{2+}$  al medio de reacción generalmente provee el mayor grado de activación para la mayoría de las PCSs; sin embargo, para la EgPCS\_nativa se determinó que el  $\text{Zn}^{2+}$  era un mejor activador que el  $\text{Cd}^{2+}$  (García-García *et al.*, 2014). Para determinar si la falta de los residuos 436 al 476 de la EgPCS\_435 no tuvo efecto en la preferencia por metal, se hicieron ensayos bajo las mismas condiciones que se utilizaron para caracterizar a la EgPCS\_nativa (Figura 12 y Tabla 4; García-García *et al.*, 2014).



**Figura 12. Producción de  $\text{PC}_2$  por la EgPCS\_435 versus EgPCS\_nativa con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$  o 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína incubados por 60 minutos. ● EgPCS\_435 +  $\text{Cd}^{2+}$ , ● EgPCS\_435 +  $\text{Zn}^{2+}$ , ● EgPCS\_nativa +  $\text{Cd}^{2+}$ , ● EgPCS\_nativa +  $\text{Zn}^{2+}$ .**

Como resultado se obtuvo que la EgPCS\_435 conserva la preferencia por  $\text{Zn}^{2+}$  sobre  $\text{Cd}^{2+}$ . Sin embargo, la producción de  $\text{PC}_2$  de la EgPCS\_435 con respecto a la EgPCS\_nativa es aproximadamente 38 y 7 veces menor al añadir 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , respectivamente. Esto podría deberse a que la EgPCS\_435 tenga menor actividad que la EgPCS\_nativa, lo que se discute en

la **Sección 7**. En adelante, los experimentos se realizaron únicamente con ZnSO<sub>4</sub>.

**Tabla 4. Producción de PC<sub>2</sub> por la *EgPCS\_435* versus *EgPCS\_nativa* con 50 μM de ZnSO<sub>4</sub> o 50 μM de CdCl<sub>2</sub> y 4 μg/mL de proteína añadidos al medio de reacción.**

Enzima	Metal	μmol PC <sub>2</sub> /(mg proteína * min)
<i>EgPCS_435</i>	Cd <sup>2+</sup>	0.0029
<i>EgPCS_435</i>	Zn <sup>2+</sup>	0.0418
<i>EgPCS_nativa</i>	Cd <sup>2+</sup>	0.1099
<i>EgPCS_nativa</i>	Zn <sup>2+</sup>	0.2762

### 6.2.3. Relación entre el pH y la actividad la enzima *EgPCS\_435*

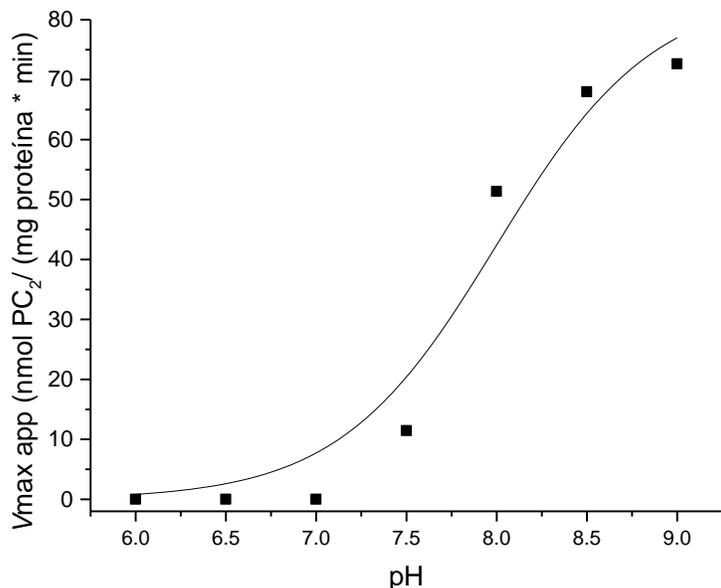
Puesto que la actividad las enzimas varía con los cambios en el pH debido a los grados de protonación de los aminoácidos involucrados en la estabilidad y/o la catálisis de las enzimas, se determinó el perfil de pH de la enzima *EgPCS\_435* para determinar bajo qué condición es activa. Los resultados muestran que la *EgPCS\_435* es capaz de sintetizar PC<sub>2</sub> en valores de pH alcalinos (**Figura 13**), tal como se observó con la *EgPCS\_nativa* ([García-García \*et al.\*, en preparación](#)).

Mediante el análisis por regresión no lineal se ajustaron los datos a la **Ecuación 4** mediante la cual se obtuvo un valor de pKa de 7.99 ± 0.16 (**Figura 13**). Debido a que en el sitio activo de en la *EgPCS* se encuentran los residuos Cys-70, His-179 y Asp-197 ([García-García \*et al.\*, 2014](#)), el valor de pKa obtenido podría corresponder al de la cisteína puesto que el valor de su pKa en solución es muy cercano (8.3); aunque cabe destacar que los valores de pKa de los aminoácidos en general, pueden cambiar debido al microambiente proporcionado por el plegamiento de la proteína ([Witt \*et al.\*, 2008](#)).

$$V_{\max \text{ app}} = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Si la propuesta anterior es cierta, el hecho de que la *EgPCS\_435*, muestre una actividad considerable a pH alcalino no es de sorprender, puesto que la catálisis

de las PCSs requiere que la Cys reactiva esté en su forma de tiolato ( $-S^-$ ) para ser reactiva (**Sección 1.5**).



**Figura 13. Perfil de pH de la EgPCS\_435 con Zn-GS<sub>2</sub> y 13  $\mu$ g/mL de proteína incubados por 60 minutos.**

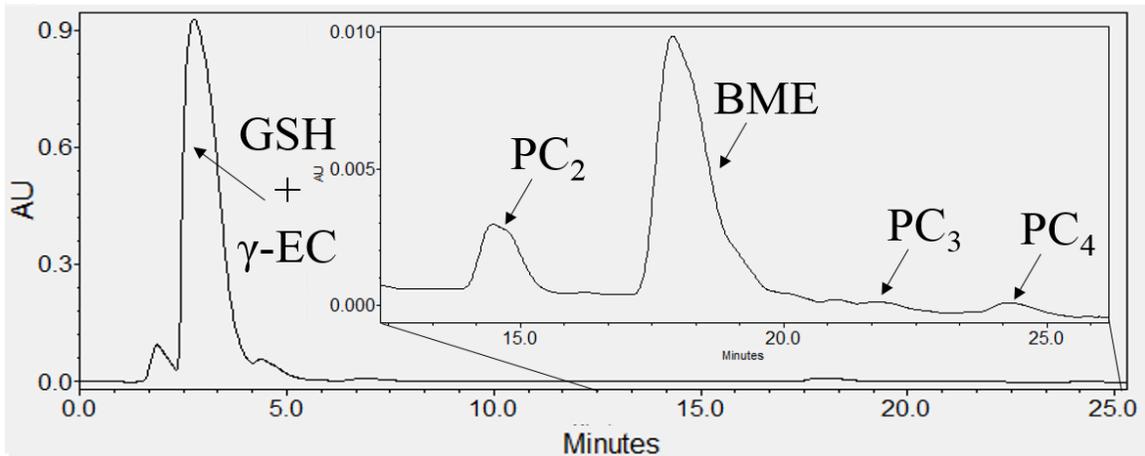
$$V_{max} = 84.64 \text{ nmol } PC_2 / (\text{mg proteína} * \text{min})$$

$$pK_a = 7.99$$

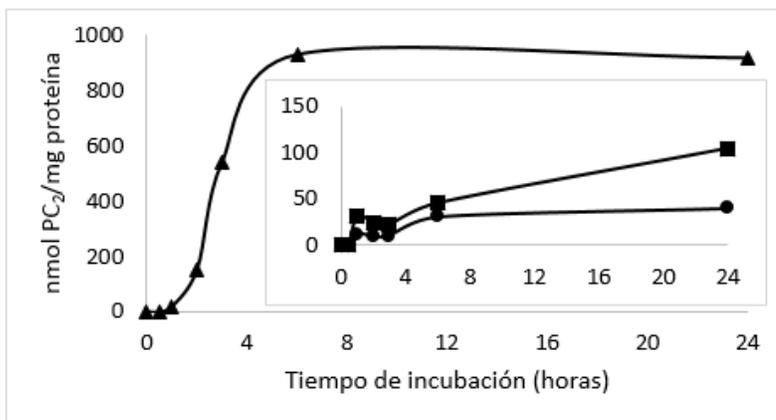
Los puntos representan el promedio de dos mediciones.

#### 6.2.4. Obtención de los parámetros $V_{max}$ , $K_m$ y $V_{max}/K_m$ por Zn-GS<sub>2</sub> de la EgPCS\_435

Para la obtención de los parámetros cinéticos se realizó un curso temporal de la producción de  $PC_2$  para determinar el tiempo en el que la cinética de la reacción es lineal y así obtener los valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$ . Se identificó la síntesis de  $PC_2$  a partir de una hora de incubación así como la producción de  $PC_{2-4}$  (**Figuras 14 y 15**). Puesto que en una hora de reacción, la cantidad de  $PC_3$  y  $PC_4$  es despreciable respecto a la cantidad de  $PC_2$ , se puede considerar que los parámetros cinéticos de  $PC_2$  no se ven afectados significativamente por la presencia de  $PC_3$  y  $PC_4$ .



**Figura 14. Producción de PC<sub>2-4</sub> por la *EgPCS\_435* en presencia de Zn-GS<sub>2</sub>.** Cromatograma representativo que se obtuvo a partir de 60 minutos de incubación.



**Figura 15. Curso temporal de la producción de PCs por la *EgPCS\_435* en presencia de Zn-GS<sub>2</sub>.**  
 ▲ PC<sub>2</sub>, ● PC<sub>3</sub> y ■ PC<sub>4</sub>.

La saturación de una enzima por su sustrato se estudia variando la concentración de sustrato, [S], y graficando la velocidad de formación de producto,  $v$ , en función de [S]. Típicamente, la relación  $v$  vs [S] se puede describir mediante una hipérbola rectangular (**Ecuación 5**; Segel, 1975). Por otra parte, muchas enzimas son inhibidas por sus propios sustratos, lo que origina curvas de velocidad que alcanzan un máximo y luego decrecen a medida que la concentración de sustrato aumenta (Reed *et al.*, 2010).

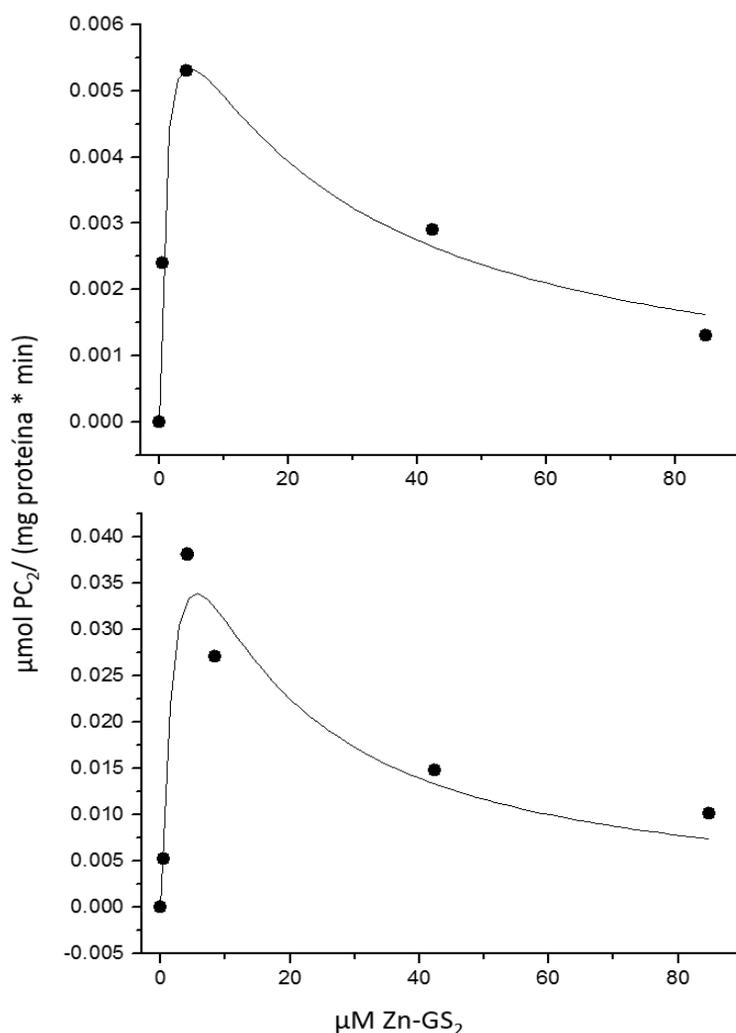
Este comportamiento de inhibición por sustrato se observó en los experimentos de la *EgPCS\_435* con GSH 40 mM fijo y ZnSO<sub>4</sub> variable (0-100  $\mu$ M; **Figura 16**). La hipótesis más sencilla para explicar este comportamiento es que una

segunda molécula de Zn-GS<sub>2</sub> (sustrato) se unió al complejo *EgPCS*\_435-(Zn-GS<sub>2</sub>) (enzima-sustrato), originando un complejo *EgPCS*\_435-(Zn-GS<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (sustrato-enzima-sustrato) que es catalíticamente inactivo, es decir, que no forma producto. Con base en esta hipótesis, los datos se ajustaron por regresión no lineal a la **Ecuación 6**.

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[Zn - GS_2]}{k_i}\right)} [Zn - GS_2]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[Zn - GS_2]}{k_i}\right)} + [Zn - GS_2]} \quad \text{Ecuación 6}$$

En contraste, se reportó que en la *EgPCS*\_nativa, concentraciones mayores a 400 μM Zn-GS<sub>2</sub> no tienen un efecto inhibitor ([García-García et al., 2014](#)). Este hallazgo sugiere que la inhibición de la *EgPCS*\_435 por el Zn-GS<sub>2</sub> se debe a una baja en la estabilidad de la enzima provocada por la falta de los residuos 436 a 476. Por ejemplo: la mutación pudo provocar que el sitio de unión al Zn-GS<sub>2</sub> quedara más expuesto al medio de reacción y por lo tanto que fuera más susceptible a altas concentraciones de Zn-GS<sub>2</sub>. Estas posibles explicaciones podrían ser examinadas con precisión mediante la obtención de la estructura tridimensional de la *EgPCS* por cristalización.



**Figura 16.** Curva de saturación de la *EgPCS\_435* con 40 mM de GSH y Zn-GS<sub>2</sub> variable. El ajuste por regresión no lineal se hizo de manera individual para cada serie de datos.

$V_{max} = 0.0074$  y  $0.072 \mu\text{mol PC}_2 / (\text{mg proteína} * \text{min})$ ;

$K_m(\text{Zn-GS}_2) = 0.9$  y  $3.1 \mu\text{M}$ ;

$V_{max}/K_m = 0.0083$  y  $0.0233 \text{ min}^{-1}$ ;

$K_i(\text{Zn-GS}_2) = 23.9$  y  $9.7 \mu\text{M}$ ;

#### 6.2.6. Obtención de los parámetros $V_{max}$ , $K_m$ por GSH de la *EgPCS\_435*

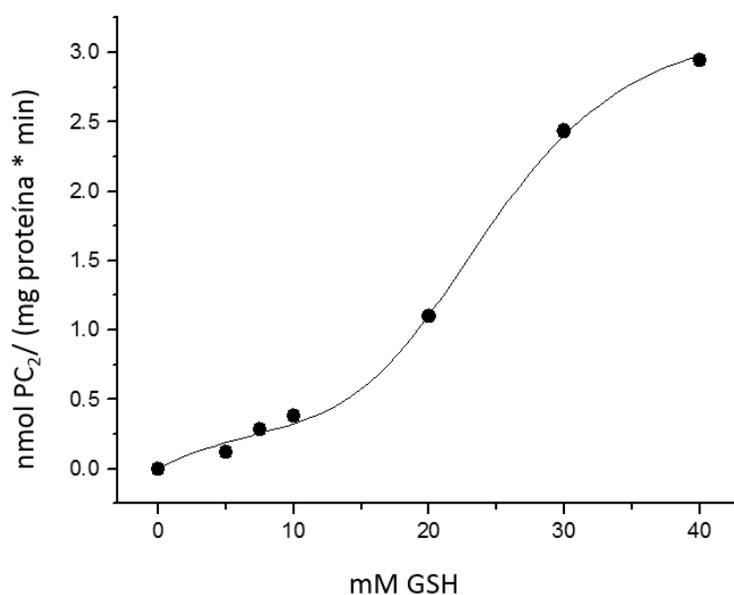
Los datos obtenidos de la *EgPCS\_435* expuesta a una concentración fija de 8.5  $\mu\text{M}$  de Zn-GS<sub>2</sub> (concentración no inhibitoria) y con concentración de GSH variable (0-40 mM; **Figura 17**), se ajustaron mediante regresión no lineal a una ecuación compuesta por una hipérbola rectangular más una sigmoide (**Ecuación 7**); misma ecuación que se utilizó para la *EgPCS\_nativa* ([García-García et al., 2014](#)).

$$v_0 = \frac{V_{max1} [S]}{K_{m1} + [S]} + \frac{V_{max2} [S]^n}{S_{0.5}^n + [S]^n}$$

### Ecuación 7

El comportamiento dual (hiperbólico-sigmoide) de las enzimas *EgPCS\_435*, *EgPCS\_nativa* y *AtPCS*, sugiere que la enzima presenta dos afinidades por GSH (Vatamaniuk *et al.*, 2001; García-García *et al.*, 2014).

No se puede hacer una comparación cuantitativa entre los resultados obtenidos con la *EgPCS\_435* y la *EgPCS\_nativa* al variar el GSH, debido al número de repeticiones y grado de pureza de la enzima mutada; sin embargo, resulta interesante que la modificación en la enzima trunca sigue mostrando un comportamiento que sugiere que la enzima aún conserva los dos sitios de unión a sustrato.



**Figura 17. Curva de saturación de la *EgPCS\_435* con 8.5  $\mu$ M de Zn-GS<sub>2</sub> y GSH variable.**

Se muestra una serie de experimentos.

$V_{max1} = 0.6$  nmol PC<sub>2</sub> / (mg proteína \* min);

$K_{m1(GSH)} = 11.8$  mM;

$V_{max2} = 2.7$  nmol PC<sub>2</sub> / (mg proteína \* min);

$S_{0.5(GSH)} = 24.9$  mM;

$n = 4.8$ .

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

A partir del análisis *in vivo* de las secuencias truncas de la *EgPCS*, se identificó que el cambio entre el fenotipo no resistente y resistente a  $\text{Cd}^{2+}$  de las levaduras, se encuentra en las células transformadas con las secuencias *EgPCS\_415* y *EgPCS\_435* (**Figura 6**). Así mismo, la determinación de moléculas con grupos  $-\text{SH}$  demostró que los extractos celulares de levaduras transformadas con la *EgPCS\_415* no contenían PCs; mientras los extractos con la *EgPCS\_435* sí. De esta manera, se relacionó el fenotipo resistente a  $\text{Cd}^{2+}$  con la producción de PCs y el incremento en la concentración de sus precursores, Cys,  $\gamma$ -Glu-Cys y GSH (**Tablas 2 y 3**).

Por otra parte, el análisis *in vitro* mostró que la enzima trunca, *EgPCS\_435*, presenta un cinética dual de hipérbola-sigmoide (**Figura 17**); este comportamiento que no se modificó respecto a la enzima nativa, se ha postulado como la representación gráfica de los dos sitios de unión a sustrato que posee la enzima para la producción de PCs. En contraste con la *EgPCS* nativa, la enzima de 435 aminoácidos presentó inhibición por el sustrato  $\text{Zn-GS}_2$ ; este hecho sugiere que la falta de los aminoácidos 436-476, provoca que la enzima sea susceptible a uno de sus co-sustratos (**Figura 16**).

Los análisis *in vitro* y *ex vitro*, plantearon la posibilidad de que dentro de la secuencia comprendida entre los residuos 416 y 476 de la *EgPCS*, existen aminoácidos indispensables para la actividad de la enzima. Dicha secuencia comprende los residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430) (**Figura 18**).

Como fue expuesto en la **Sección 1.5.3.**, el sitio donde se lleva a cabo la interacción con el metal libre y el complejo metal- $\text{GS}_2$  en las PCs sigue siendo incierto; pero se ha postulado que el extremo C-terminal de la enzima puede servir como sensor del metal. Se ha descrito que los sitios de unión a metales consisten en pequeñas y contiguas secuencias de residuos de aminoácidos que se encuentran en muchas proteínas que interaccionan con iones metálicos ([Maier et al., 2003](#)).

1	MATMWAAARV	GRLGARGFAS	KFKVQLPPGV	IPFASPEGKR	VFREALLAGG
51	LGNFFEVAEQ	FHTQNDPAYC	GPGTIVMALN	SLGLDPQRMW	KAPWRWFSEE
101	MLMSCVPIEY	AKRDGINFDE	FACICEANGA	RARSYRADAT	TKEQFQKHVE
151	DVTAQTDPVE	TQMVVSYSRS	SLKQTGDGHY	SPIGGYHKER	QLVLVMDVAR
201	FKYPPHWVPL	DALWEAMLQK	DAETNRSRGY	VLLSASSEKI	NVEMCDHSGS
251	PQLHWERVKE	FFAITLPIKT	GDHFIAHYEQ	ERPRYGSALE	YFIPVWTAAI
301	SPAVLASLRS	HLTILAAEKP	SEAAEDVAEL	QQNLRQCSLW	PTVQAVFGKE
351	DSIRTLHPCL	TVADVMFLLL	VFAPVMRRKA	VPAEMLDCAH	RLELLQAEPP
401	GLRRLVRRVR	EHLLSLRLE	CCGHPHNHHH	KPSCVGLLSA	DHEPRPSLPP
451	LRAGRRPAAA	SQSQTRALTT	GVCASG		

**Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la *EgPCS*** (GeneBank Accession Number KF491480.1). La secuencia completa de la *EgPCS* consta de 476 aminoácidos y el extremo N-terminal de 235. En azul se señalan los residuos Cys-421 y Cys-422, en rojo los residuos His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 y en rosa los residuos que corresponden a la triada catalítica Cys-70, His-179 y Asp-197.

El  $Zn^{2+}$  es considerado como un metal ácido intermedio, mientras el grupo imidazol (grupo ionizable de la His), es una base también de carácter intermedio; además, el  $Cd^{2+}$  es un ácido suave y el grupo tiol (grupo ionizable de la Cys), es una base suave. Los sitios ricos en histidinas se han asociado a la unión de  $Zn^{2+}$  en diversas proteínas, por ejemplo, los transportadores de metales ZIP (Nishida *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que sitios que poseen cisteínas e histidinas en proteínas como TFIIIA, pueden quelar al  $Zn^{2+}$  para la formación de dedos de zinc (Evans y Hollenbergt, 1988). Si lo anterior puede aplicarse a la *EgPCS*, los residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 que posee, podrían formar el sitio de unión del Me-GS<sub>2</sub>, con preferencia por Zn-GS<sub>2</sub> sobre Cd-GS<sub>2</sub>.

## 8. CONCLUSIONES

La transformación de células *S. cerevisiae* con las enzimas *EgPCS* nativa y de 435 aminoácidos contrarresta la inhibición del crecimiento provocada por la exposición a cadmio.

Los primeros 435 aminoácidos de la *EgPCS* representan la secuencia mínima necesaria para la formación de una enzima catalíticamente activa.

Entre los aminoácidos 416 y 435 de la *EgPCS*, se encuentra una secuencia que posibilita que la enzima sea catalíticamente activa.

La falta de los residuos 436 a 476 del extremo C-terminal de la *EgPCS* no influye en la pérdida de los dos sitios de unión a GSH; pero sí provoca que la enzima se inhiba por el co-sustrato Zn-GS<sub>2</sub>.

## 9. PERSPECTIVAS

Hacer construcciones, vía mutagénesis sitio dirigida, que permitan analizar la función de los residuos Cys-421, Cys-422, His-424, His-426, His-428, His-429 e His-430 de la *EgPCS*.

Obtener un modelo cristalográfico de la *EgPCS* que permita dilucidar la ubicación de los residuos involucrados en la unión y estabilización del Me-GS<sub>2</sub>.

Realizar un estudio cinético a profundidad que permita determinar el mecanismo cinético de la enzima así como el mecanismo químico.

## 9. REFERENCIAS

1. Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399
2. Bánfalvi, G. (2011). Cellular effects of heavy metals. *Springer*. pp. 3-28.
3. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman. p. 853.
4. Bjerrum, N. (1936). Bjerrum's inorganic chemistry, 3rd ed., London, United Kingdom: Danish edn.
5. Chang, Raymond. (2011). Fundamentos de química. México: Mc Graw Hill. p. 195.
6. Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of plant physiology*, 163, 319-332.
7. Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 211-216.
8. Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159-182.
9. Dwyer, F. (1964.). Chelating agents and metal chelates. London, United Kingdom: Academic Press. pp. 1-3.
10. El-Shahawi, M. S., Alwael, H., Arafat, A., Al-Sibaai, A. A., Bashammakh, A. S., Al-Harbi, E. A. (2015). Kinetics and thermodynamic characteristics of cadmium (II) sorption from water using procaine hydrochloride physically impregnated polyurethane foam. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28, 147-152.
11. Evans, R. M., Hollenbergt, S. M. (1988). Zinc fingers: gilt by association. *Cell*, 52, 1-3.
12. Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L., Rudisill, C. (2012). Toxicological profile of cadmium, agency for toxic substances and disease registry. *Atlanta*, 273-274.
13. Frassinetti, S., Bronzetti, G., Caltavuturo, L., Cini, M., Croce, C. D. (2006). The role of zinc in life: a review. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, 25, 597.
14. García-García, J. D., Girard, L., Hernández, G., Saavedra, E., Pardo, J. P., Rodríguez-Zavala, J. S., Encalada, R., Reyes-Prieto, A., Mendoza-Cózatl, D. G., Moreno-Sánchez, R. (2014). Zn-bis-glutathionate is the best co-substrate of the monomeric phytochelatin synthase from the

- photosynthetic heavy metal-hyperaccumulator *Euglena gracilis*. *Metallomics*, 6, 604-616.
15. García-García, J. D., Sánchez-Thomas, R., Moreno-Sánchez, R. (2016). Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra-and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnology Advances*, 34, 859-873.
  16. Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E. L., Zenk, H. H. (1986). Homophytochelatinins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS letters*, 205, 47-50.
  17. Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1989). Phytochelatinins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6838-6842.
  18. Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1985). Phytochelatinins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230, 674-676.
  19. Harada, E., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S. (2004). A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to  $\gamma$ -glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry*, 65, 3179-3185.
  20. Harrison, J. J., Ceri, H., Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 928-938.
  21. International Agency for Research on Cancer, IARC. (1993). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 58, *International Agency for Research on Cancer, Lyon, France*, 41-11.
  22. Klapheck, S., Fliegner, W., Zimmer, L. (1994). Hydroxymethyl-phytochelatinins [( $\gamma$ -Glutamylcysteine)<sub>n</sub>-Serine] are metal-induced peptides of the poaceae. *Plant Physiology*, 104, 1325-1332.
  23. Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., Hayashi, Y. (1984). Cadystin a and b, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Letters*, 25, 3869-3872.
  24. Lemire, J. A., Harrison, J. J., Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371-384.
  25. Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczyepka, M., Thiele, D. J., Rea, P. A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis

- (glutathionato) cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 42-47.
26. Li, Z. S., Szczyepka, M., Lu, Y. P., Thiele, D. J., Rea, P. A. (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 6509-6517.
  27. Lushchak, V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012.
  28. Maier, T., Yu, C., Küllertz, G., Clemens, S. (2003). Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta*, 218, 300-308.
  29. Meister, A. (1995). [1] Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology*, 251, 3-7.
  30. Mendoza-Cózatl, D. (2005). Mecanismo de resistencia a cadmio mediado por tioles en *Euglena gracilis*. (Tesis de doctorado). UNAM.
  31. Mendoza-Cózatl, D., Avilés-Rodríguez, C., Hernández-Navarro, A., Loza-Tavera, H., Moreno-Sánchez, R. (2001). Metabolismo del glutatión en microorganismos y plantas. *Boletín de Educación Bioquímica*. 20: 213-221.
  32. Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R. (2004). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 653-671.
  33. Montero, D., Tachibana, C., Winther, J. R., Appenzeller-Herzog, C. (2013). Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biology*, 1, 508-513.
  34. Moreno-Sánchez, R., Díaz-Barriga, F., Devars, S. (1999). Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. *En Contaminación ambiental por metales pesados: impacto en los seres vivos*. AGT Editor, S.A. México.
  35. Murasugi, A., Wada, C., Hayashi, Y. (1981). Purification and unique properties in UV and CD spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 103, 1021-1028.
  36. Nishida, S., Mizuno, T., Obata, H. (2008). Involvement of histidine-rich domain of ZIP family transporter TjZNT1 in metal ion specificity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 601-606.
  37. Pal, R., Rai, J. P. N. (2010). Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 945-963.

38. 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.
39. Rauser, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell biochemistry and biophysics*, *31*, 19-48.
40. Rea, P. A., Vatamaniuk, O. K., Rigden, D. J. (2004). Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiology*, *136*, 2463-2474.
41. Reed, M. C., Lieb, A., Nijhout, H. F. (2010). The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays*, *32*, 422-429.
42. Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A., Ottonello, S. (2004). Domain organization of phytochelatin synthase functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 14686-14693.
43. Sánchez-Thomas, R., Moreno-Sánchez, R., García-García, J. D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*, *131*, 19-31.
44. Segel, I. H. (1975). Multisite and allosteric enzymes En: *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. John Willey & Sons. California.
45. Serra-Majem, L., Aranceta-Bartrina, J. (2006). Nutrición y salud pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones. 2da edición. *Elsevier*. pp. 16-19.
46. Song, W. J., Sontz, P. A., Ambroggio, X. I., Tezcan, F. A. (2014). Metals in protein-protein interfaces. *Annual review of biophysics*, *43*, 409-431.
47. Stohs, S. J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*, *18*, 321-336.
48. Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*, *41*, 207-234.
49. Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Matsumoto, S., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, K., 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.
50. Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, Hirata, K., Miyamoto, K. (2004). Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp.

- PCC 7120. *Biochemical and biophysical research communications*, 315, 751-755.
51. 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  $\gamma$ -glutamylcysteine during catalysis stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 22449-22460.
  52. Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 7110-7115.
  53. Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 31451-31459.
  54. Vivares, D., Arnoux, P., Pignol, D. (2005). A papain-like enzyme at work: Native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18848-18853.
  55. Witt, A. C., Lakshminarasimhan, M., Remington, B. C., Hasim, S., Pozharski, E., Wilson, M. A. (2008). Cysteine pKa Depression by a Protonated Glutamic Acid in Human DJ-1. *Biochemistry*, 47, 7430-7440.
  56. Zenk, M. H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants, a review. *Gene*, 179, 21-30.