



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"Análisis *in vivo* de las interacciones entre SecY,
YidC y FtsY en *Escherichia coli*"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JOSÉ LUIS AGUILAR LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

VOCAL: Dra. Marina Gavilanes Ruiz

SECRETARIO: Dra. Soledad Funes Argüello

1er. SUPLENTE: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

2do. SUPLENTE: Dr. José de Jesús García Trejo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Soledad Funes Argüello

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda

SUSTENTANTE:

José Luis Aguilar López

Este trabajo se realizó en el laboratorio 204 Sur del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por los donativos 105631 y 121611 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) número IN215810.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda por la ayuda técnica brindada y por su valiosa participación en este trabajo.

Al Dr. Eli O. van der Sluis y al Dr. Roland Beckmann miembros de la Universidad de Munich, Alemania por los plásmidos proporcionados.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por la síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de plásmidos.

A Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por su ayuda técnica.

A los miembros del jurado, Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo, Dra. Marina Gavilanes, Ruiz, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, y Dr. José de Jesús García Trejo, les agradezco profundamente el tiempo que dedicaron a la revisión de esta Tesis, así como sus valiosos comentarios y sugerencias al trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCIÓN	4
1. <i>Escherichia coli</i>	4
2. Envoltura bacteriana	4
2.1. Membrana externa	5
2.2. Membrana plasmática	5
3. Translocación e inserción de proteínas	5
4. Sistema SEC	7
4.1. Estructura del Complejo SEC	8
4.2. Apertura del canal e inserción de proteínas	10
4.3. Puerta lateral de SEC	11
4.4 Oligomerización de SEC	12
5. Mantenimiento de la permeabilidad	13
6. Transporte postraduccional	13
6.1. <i>Trigger Factor</i>	14
6.2. SecB y SecA	15
6.3 SecDF-YajC	17
7. Transporte cotraduccional	18
7.1. Partícula de Reconocimiento de Señal (SRP)	18
7.2. FtsY	20
8. Energía de translocación	21
9. YidC	22
9.1 Oligomerización de YidC	23
9.2 Sustratos de YidC	23
9.3 Interacción de YidC con SecY	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
III. HIPÓTESIS	27

IV. OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Particulares	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	28
Vectores utilizados	28
Oligonucleótidos utilizados	29
Soluciones y Medios de Cultivo utilizados	30
Antibióticos, Inductores y Represores	32
Condiciones de esterilización	32
Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	32
Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	33
Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico	34
Transformación de cepas <i>E. coli</i> por electroporación	34
Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> (midipreps)	35
Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> (minipreps)	36
Purificación de ADN de geles de agarosa y reacciones de PCR	36
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
Reacción de ligación	37
Proporción Vector:Inserto	38
Nanogramos de Inserto	38
Volumen de inserto	38
Mutagénesis sitio dirigida	39
Separación electroforética de ácidos nucleicos	40
Ensayos de crecimiento	40
Secuenciación de ADN	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
1. Construcción de la fusión YidC-SecY	42
1.1 Amplificación por PCR del gen <i>yidC</i> de <i>E. coli</i>	42

1.2 Fusión del gen <i>yidC</i> río arriba del gen <i>secY</i>	43
1.3 Clonación de la fusión <i>yidC-secY</i> en un plásmido de expresión en <i>E. coli</i>	45
2. Construcción de la fusión SecY-FtsY	48
2.1 Fusión del gen <i>secY</i> río arriba del gen <i>ftsY</i>	48
2.2 Análisis funcional de la interacción física entre SecY y FtsY	49
3. Análisis funcional de las fusiones YidC-SecY y Sec-FtsY en mutantes dobles de <i>E. coli</i>	52
3.1 Clonación del gen <i>secYts</i> en el plásmido pKD13	53
3.2 Generación de fragmento de recombinación <i>secYts-kanr</i>	54
3.3 Transformación de cepas IY28 y TY22 con el fragmento de recombinación <i>secYts-kan</i>	54
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	56
VIII. APÉNDICE	57
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMEN

En bacterias Gram negativas la principal ruta de inserción de proteínas a membrana plasmática está mediada por el sistema SEC, un complejo heterotrimérico de proteínas de membrana formado por tres proteínas denominadas SecY, SecE y SecG. La función esencial de este complejo es translocar proteínas en estado desplegado a través de la membrana e integrar segmentos transmembranales dentro de la fase lipídica.

En el mecanismo cotraduccional de inserción de proteínas se identifica a la maquinaria de síntesis de proteínas en etapas muy tempranas de la traducción, con el fin de guiarla hacia la membrana donde se localiza el sistema de translocación. La translocación cotraduccional de proteínas en *Escherichia coli* inicia con una fase de reconocimiento donde el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica, que emerge del túnel de salida del ribosoma, es reconocido por la partícula de reconocimiento de señal (SRP, por sus siglas en inglés). Posteriormente, el complejo ribosoma-cadena nascente-SRP es dirigido hacia la membrana, en donde SRP interacciona con su receptor (FtsY). En un paso siguiente, la maquinaria de traducción es entregada al complejo SEC con el fin de translocar, plegar o promover el ensamblaje de la proteína membranal. Este mecanismo asegura que la síntesis de la proteína y su inserción pueda ocurrir de manera acoplada.

YidC es una proteína esencial de membrana que facilita la inserción de un grupo de proteínas de membrana interna en *E. coli*. YidC funciona en forma cooperativa con el complejo SEC estabilizando las alfa hélices transmembranales hidrofóbicas después de que estas son insertadas en la membrana, con el fin de liberarlas como una proteína plegada correctamente en la bicapa lipídica. YidC parece funcionar principalmente en la inserción de pequeñas proteínas de membrana que necesitan ensamblarse en grandes complejos proteicos membranales.

Muy poco se conoce acerca de las interacciones físicas o dinámicas entre el complejo SEC y YidC o el receptor FtsY. Con el fin de abordar esta cuestión funcional, fusionamos SecY a YidC o FtsY y evaluamos si las interacciones entre estos componentes son estables o no mediante un enfoque *in vivo*.

Para determinar la relación funcional entre estas proteínas, se construyeron dos quimeras que expresaban la fusión SecY-FtsY o la fusión YidC-SecY. Estas construcciones fueron hechas en vectores de clonación, y posteriormente subclonadas en vectores de expresión de *E. coli* para evaluar su función *in vivo* en cepas en las cuales es posible regular la expresión de SecY, YidC o FtsY.

Una vez obtenida la construcción con la proteína quimérica SecY-FtsY, se decidió evaluar su función en las cepas de *E. coli* IY28 y TY22. La cepa IY28, en la cual se puede regular la expresión de FtsY por inducción con arabinosa o represión con glucosa, nos permitió determinar que la proteína FtsY, perteneciente a la fusión SecY-FtsY es funcional *in vivo*, y por lo tanto es capaz de restaurar la función de la proteína FtsY endógena. De la misma manera, se logró determinar que la proteína SecY de la fusión es funcional *in vivo* al expresarse y restaurar la función de la proteína SecY endógena sensible a temperatura presente en la cepa TY22.

A pesar de que aún falta evaluar la función *in vivo* de la fusión SecY-FtsY en una cepa de *E. coli* en la que se pueda regular la expresión de ambas proteínas, los resultados preliminares sugieren que probablemente estas proteínas interactúan durante el proceso de inserción cotraduccional de proteínas de membrana interna en *E. coli*.

Aún, es necesario realizar estudios para evaluar la función *in vivo* de la proteína quimérica YidC-SecY que permitan determinar si existe o no una interacción física entre estas dos proteínas.

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
Ara	Arabinosa
ATP	Trifosfato de Adenosina o Adenosín Trifosfato
CTL	siglas en inglés de <i>C-terminal linker</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
EDTA	siglas en inglés de Ácido Etilendiaminotetracético
HEPES	siglas en inglés de Ácido Hidroietil-piperazinetanosulfónico
HSD	siglas en inglés de <i>Helical Scaffold Domain</i>
HTM	Hélice transmembranal
Kan	Kanamicina
LB	siglas en inglés de Lysogeny Broth o Luria Bertani
MOPS	siglas en inglés de Ácido morfolin propanosulfónico
NBD	siglas en inglés de <i>Nucleotide Binding Domains</i>
NBF	siglas en inglés de <i>Nucleotide Binding Folds</i>
OD	siglas en inglés de Densidad Óptica
PCR	siglas en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPXD	siglas en inglés de <i>Polypeptide-Cross-Linking Domain</i>
SDS	siglas en inglés de Docecil Sulfato de Sodio
SRP	siglas en inglés de <i>Signal Recognition Particle</i>
Tet	Tetraciclina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
ts	Termosensible

I. INTRODUCCIÓN

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia de las enterobacterias. Usualmente posee flagelos peritricos para su movilidad, no forma esporas y algunas cepas presentan cápsula (Sussman, 1997). La cápsula es una capa de polisacáridos y polipéptidos que desempeña varias funciones en las bacterias, tales como adherencia o fijación a hospederos, resistencia contra las células fagocíticas del sistema inmune y resistencia a la desecación (Madigan et al., 2003).

E. coli puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno (aeróbica o anaeróbicamente), habilidad que la categoriza como un microorganismo anaerobio facultativo (Manning, 2010). Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en los 37°C y es capaz de crecer rápidamente tanto en medio rico como en medio sintético. En medio sólido las colonias son no pigmentadas, pueden tener una apariencia suave o rugosa y generalmente son circulares con borde entero (Sussman,1997).

2. Envoltura bacteriana

E. coli posee una delgada membrana celular (membrana plasmática) que envuelve a la bacteria, un ambiente acuoso denominado periplasma y la membrana externa (Manning, 2010). Dentro del periplasma se encuentra una pared celular rígida que actúa como barrera protectora contra el ambiente externo. La pared celular es una capa delgada y rígida de peptidoglicano que constituye una red de polisacáridos (*N*-acetilglucosamina y ácido-*N*-acetilmurámico) entrecruzados con aminoácidos como la *L*-alanina, *D*-alanina, *D*-glutámico y lisina o ácido diaminopimélico (Madigan et al., 2003).

2.1. Membrana externa

La membrana externa está compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos se extienden hacia afuera de la pared celular y representan una de las características más importantes de identidad en las células Gram negativas: el antígeno O, el cual actúa como endotoxina responsable de muchos de los efectos dañinos de las bacterias Gram negativas (Moat et al., 2002).

2.2. Membrana plasmática

La membrana plasmática o membrana interna es una estructura hidrofóbica y fluida que funciona como barrera para prevenir la salida de componentes hidrofílicos del citoplasma. Juega un papel importante en el anclaje de muchas proteínas implicadas en el transporte hacia el exterior y hacia el interior de la célula, en respuestas de quimiotaxis y es el sitio de producción de energía en donde se genera y utiliza la fuerza protón motriz (Madigan et al., 2003). Entre las proteínas que se encuentran en la membrana interna bacteriana destacan las que forman parte de los complejos de la cadena respiratoria como deshidrogenasas, reductasas y citocromos, que le permiten a la bacteria producir la energía necesaria para muchas funciones y procesos celulares (Weiner et al., 2007).

3. Translocación e inserción de proteínas

Todas las proteínas que funcionan fuera del citosol y en la membrana plasmática necesitan ser insertadas o deben pasar la membrana plasmática para llegar a su destino final y ejercer su función.

En bacterias, la principal ruta de translocación e inserción de proteínas a la membrana plasmática es la vía mediada por el sistema SEC, un complejo proteico multimérico formado por las proteínas SecY, SecE y SecG.

La función esencial de éste complejo es la de translocar proteínas desplegadas a través de la membrana plasmática e integrar segmentos hidrofóbicos a la bicapa lipídica. Existen dos mecanismos generales que guían proteínas hacia el complejo SEC (Figura 1): *i*) postraduccional, que implica que las proteínas por ser translocadas son sintetizadas por completo antes de cruzar la membrana, y *ii*) cotraduccional, en el cual la maquinaria de síntesis de proteínas es identificada en una etapa muy temprana de la traducción y guiada hasta la superficie membranal en donde se encuentra SEC, de manera que la síntesis proteica se realice de forma acoplada con la inserción membranar (Xie y Dalbey, 2008).

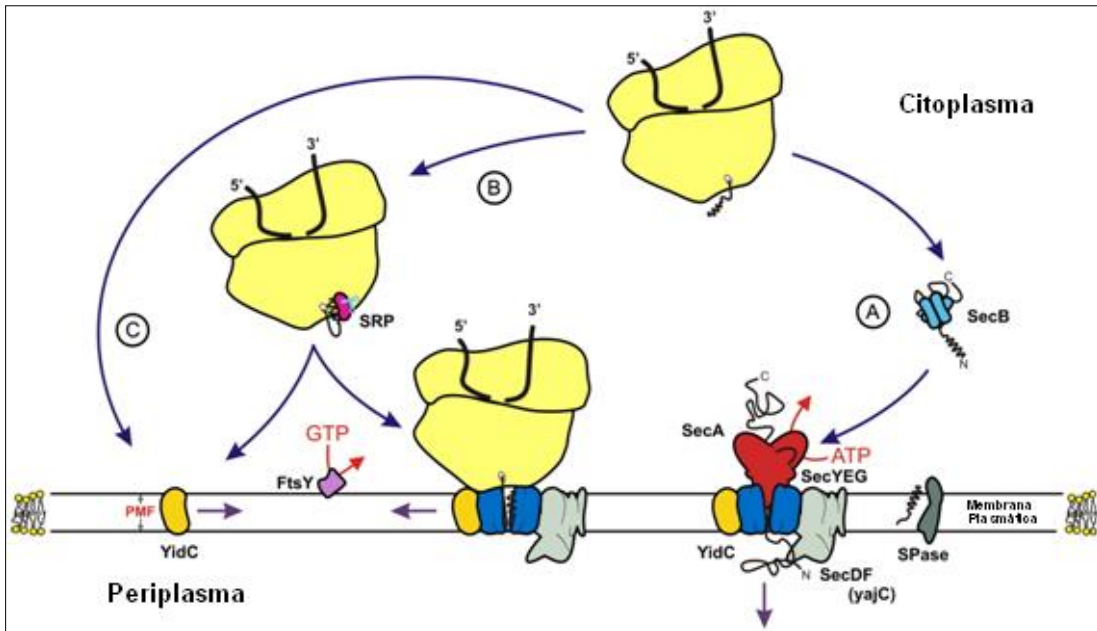


Figura 1. Representación esquemática de los mecanismos de transporte y translocación de proteínas a membrana interna en *E. coli*. (A) En la vía postraduccional, la proteína una vez sintetizada por completo es captada por la chaperona SecB que se encarga de dirigirla hacia la membrana donde es reconocida por la ATPasa SecA para su posterior translocación por el sistema SEC. (B) En la vía cotraduccional, la maquinaria de traducción es reconocida y dirigida hacia la membrana por SRP y su receptor FtsY, para la posterior síntesis y translocación de la proteína. YidC es una proteína de membrana que funciona de manera dependiente o independiente de SEC en la inserción de proteínas. (C) YidC puede insertar algunas proteínas de manera independiente de SRP (Tomada de du Plessis et al., 2011).

4. Sistema SEC

El sistema SEC está altamente conservado, existiendo homólogos en todos los procariontes (arqueas y eubacterias) y en las células eucariontes (en la membrana tilacoidal de los cloroplastos y en el retículo endoplásmico). El complejo se compone de tres subunidades:

- SecY (Sec61 α en eucariontes y SecY en arqueas) es una proteína formada por 10 alfa hélices transmembranales (HTMs) que forman dos dominios: el dominio amino que comprende de la hélice 1 a la 5 y el dominio carboxilo de la hélice 6 a la 10.
- SecE (Sec61 γ en eucariontes y SecE en arqueas) contiene tres HTMs y
- SecG (Sec61 β en eucariontes y Sec β en arqueas) contiene dos HTMs. SecG y Sec61 β son subunidades no homólogas, ambas de dos HTMs, sin embargo, existen estudios que sugieren que podrían tener funciones similares (Driessen y Nouwen, 2008).

Las subunidades SecY y SecE del complejo trimérico SEC son esenciales y están conservados en procariontes, eucariontes y arqueas, mientras que la subunidad SecG no (Rapoport, 2007).

SecY y SecE están en contacto íntimo a través de la hélice transmembranal 3 de SecE, en cambio SecG se localiza en la periferia del complejo y tiene contacto limitado con SecY (Driessen y Nouwen, 2008).

4.1. Estructura del Complejo SEC

La estructura del complejo SEC de *Methanocaldococcus jannaschii* determinada por cristalografía de rayos X muestra que la proteína SecY es la que constituye el poro que permite el paso de los péptidos que están siendo translocados (Figura 2, Van den Berg et al., 2004).

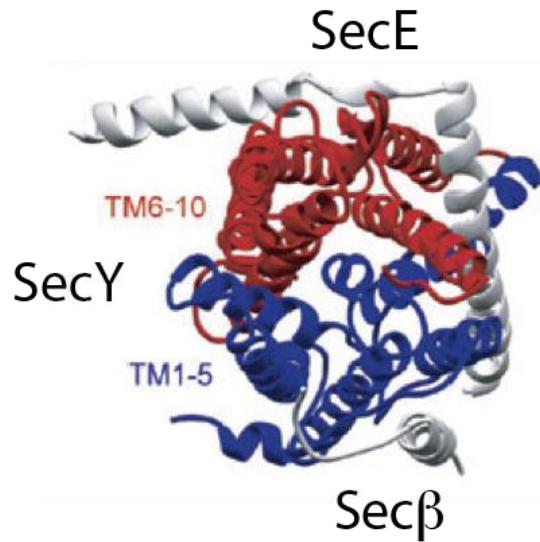


Figura 2. Vista superior del complejo SEC de *M. jannaschii*. En azul y rojo los dominios amino y carboxilo terminal respectivamente de la proteína SecY (del complejo SEC de *Methanocaldococcus jannaschii*), en la que se observa que dicha subunidad es la que forma el poro de translocación (Tomada de Van den Berg et al., 2004).

La estructura del sistema SEC es similar a un reloj de arena en cuyo centro se encuentra el poro de translocación y en la parte media de dicho poro se localiza un anillo hidrofóbico formado por seis residuos de aminoácidos que previene el paso de iones a través de la membrana. En su estado inactivo, el canal se encuentra cerrado por un alfa hélice (HTM2) que funciona como una compuerta (*plug*). En el estado activo esta hélice es desplazada por la cadena nascente que está siendo insertada (Figura 3) (Rapoport, 2007).

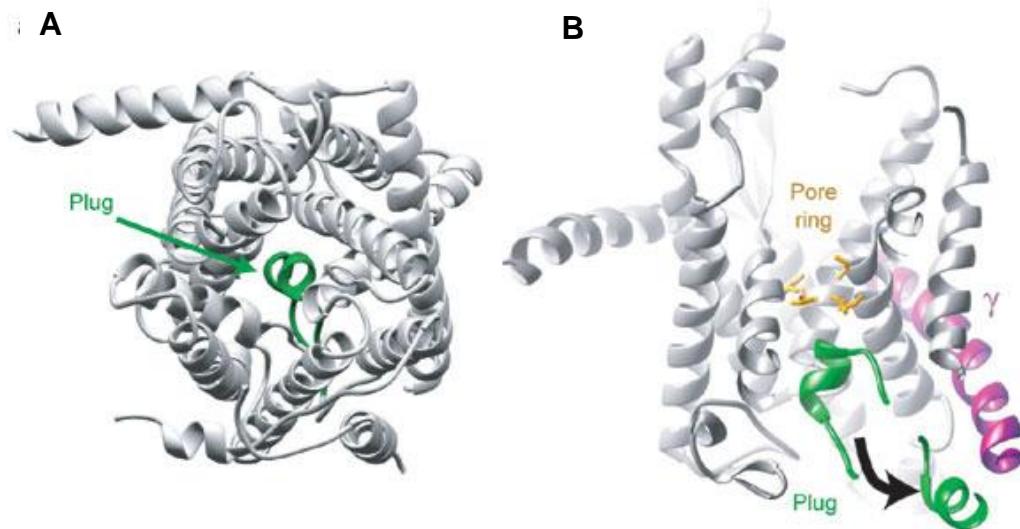


Figura 3. Vista superior (A) y lateral (B) del complejo SEC de *M. jannaschii*. En verde se muestra la hélice transmembranal 2 de SecY que funciona como compuerta para permitir el paso de la cadena polipeptídica a través de la membrana interna. En (B) se observa que cuando la compuerta se abre esta se mueve hacia la hélice transmembranal de la subunidad γ . En dorado se muestra el anillo hidrofóbico que limita el paso de cierto tipo de moléculas a través del canal de translocación (Tomada de Van den Berg et al., 2004).

Experimentos con SecY y SecE reconstituidas en proteoliposomas muestran que SecY es esencial para la translocación de proteínas, y experimentos de entrecruzamientos con péptidos que están siendo translocados aportan evidencia de que su homólogo en eucariontes, Sec61 α , también forma el canal del complejo SEC (Nishiyama et al., 1991; Mothes et al., 1994).

Experimentos de entrecruzamiento basados en la estructura de la translocasa SEC de *M. jannaschii* y ensayos de translocación *in vitro* con proteínas marcadas con fluorescencia confirman que el péptido nascente pasa por el poro que se forma a través del complejo SEC (Cannon et al., 2005; Bol et al., 2007). A partir de la estructura determinada por cristalografía de rayos X se ha determinado que la dimensión máxima del poro es de $\sim 15\text{-}20 \text{ \AA}$ (Van den Berg et al., 2004).

4.2. Apertura del canal e inserción de proteínas

La estructura de SEC indica que una sola copia de dicho complejo es suficiente para formar el poro o canal de translocación (Breyton et al., 2002).

Los estudios realizados hasta el momento sobre los mecanismos de inserción de proteínas tanto en eucariontes como en procariontes, permiten establecer un probable modelo para la apertura del canal y la inserción de proteínas (Figura 4):

El polipéptido se inserta como un asa y la secuencia señal se localiza en una de las paredes del canal, permitiendo que un segmento distal de la proteína se ubique en el poro (Figura 4, panel 3) (Rapoport, 2007). Se cree que la translocación ocurre en dos pasos: i) En el primero de ellos la unión del ribosoma o de la ATPasa SecA desestabiliza la interacción que mantiene al *plug* en el centro de SecY (Figura 4, panel 2). Tanto el ribosoma como SecA interactúan con las asas citosólicas del dominio carboxilo de SecY y generan cambios conformacionales en el complejo que originan que el *plug* se desplace y la puerta lateral del canal se abra y cierre (Raden et al., 2000). ii) En el segundo paso, el segmento hidrofóbico de la secuencia señal se intercala en la puerta lateral de SecY causando el movimiento del *plug* hacia la región posterior del complejo (cercano a SecE) para abrir el canal y permitir así la translocación de la cadena polipeptídica (Rapoport, 2007, Figura 4, panel 3).

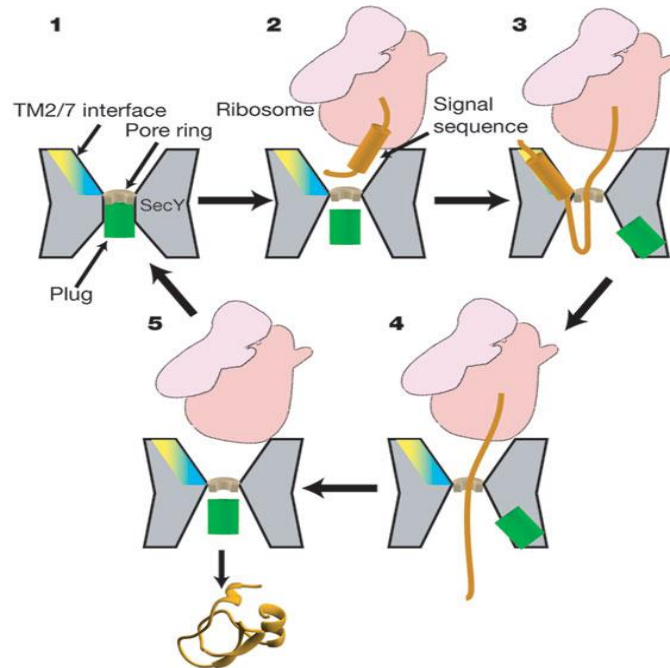


Figura 4. Modelo de translocación de proteínas y apertura del poro de SecY. (1) El canal se encuentra cerrado por el *plug*. (2) El complejo ribosoma-péptido nascente se une a SecY. (3) La secuencia señal del péptido nascente se intercala entre la HTM2 y 7 de SecY. (4) El péptido señal es eliminado por la peptidasa de secuencia señal, la región madura del polipéptido es transportada a través del poro y la secuencia señal es editada. (5) Una vez que el polipéptido se transloca por completo, el *plug* regresa a su posición en estado inactivo (Tomada de Van den Berg et al., 2004).

4.3. Puerta lateral de SEC

La estructura del complejo sugiere que el dominio amino terminal y el dominio carboxilo terminal de SecY se asocian como si fueran las conchas de una almeja, de manera que la bisagra formada facilita la apertura de los dominios a manera de una compuerta lateral que permite la inserción de los cruces transmembranales entrantes a la bicapa lipídica. Dicha compuerta, está formada por los HTMs 2, 3, 7 y 8 de SecY. Este modelo asume que dada la hidrofobicidad de los cruces transmembranales, estos son insertados de manera pasiva a la bicapa (Van den Berg et al., 2004).

El tamaño del canal indica que las hélices transmembranales podrían ser liberadas lateralmente en la membrana una a una o en pares. Durante la inserción cotraduccional las asas hidrofílicas entre las HTMs podrían moverse alternadamente desde el ribosoma a través del canal acuoso hacia el lado externo de la membrana o emerger entre el ribosoma y el canal hacia el citosol (Ménétré et al., 2005).

Estudios recientes revelan que durante la translocación postraduccional de proteínas precursoras, la apertura de la puerta lateral del complejo SEC y la activación de la ATPasa SecA ocurren de manera coordinada. La actividad ATPasa de SecA induce cambios conformacionales necesarios en SecY para que las HTM2 y 7 de SecY que forman parte de la puerta lateral puedan abrirse lo suficiente y permitan el paso de las proteínas a través del canal (du Plessis et al., 2009).

4.4 Oligomerización de SEC

Una gran cantidad de datos estructurales y bioquímicos demuestran que el complejo SEC puede oligomerizarse formando tetrámeros y dímeros, siendo estos últimos la forma predominante. Por medio de cristales en dos dimensiones se ha visto que SEC puede dimerizar adoptando dos conformaciones, una en la que dos complejos SEC se asocian “frente a frente” y otra en la que el complejo se dimeriza en una conformación “espalda a espalda” (Driessen y Nouwen, 2008).

En el estado cerrado o inactivo los dos complejos SEC están sellados por el *plug* que bloquea el canal. Durante la translocación de proteínas la inserción de un asa de la proteína naciente desplaza al *plug* para abrir el poro, posteriormente el ribosoma genera arreglos conformacionales en el canal para que el HTM insertado se libere hacia la fase lipídica y el poro se cierre. El poro del otro complejo SEC permanece abierto, pero el canal permanece sellado en la parte lipídica por un muro que forma el otro complejo SEC (Driessen, 2005).

5. Mantenimiento de la permeabilidad

En procariontes es muy importante prevenir el movimiento transmembranal libre de iones y metabolitos, ya que el gradiente de protones a través de la membrana es la principal fuente de energía que es utilizada por acarreadores que transportan selectivamente a los solutos. El anillo hidrofóbico y el *plug* contribuyen a mantener este gradiente evitando el paso de moléculas hidrofílicas a través del poro (Junne et al., 2006).

Deleciones en el *plug* de *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli* no comprometen la viabilidad celular, sin embargo producen defectos moderados en la translocación, ya que se forman *plugs* alternativos a partir de segmentos polipeptídicos vecinos, como lo muestran las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X de proteínas mutantes que carecen de una parte o de todo el *plug* (Li et al., 2007). Estos *plugs* alternativos todavía pueden sellar el canal, sin embargo no recuperan del todo la función de la proteína silvestre ya que pierden muchas de las interacciones que normalmente mantiene SecY, ocasionando la desregulación en la apertura y cierre del poro, además de permitir la translocación de proteínas con secuencias señal defectuosas o sin secuencia señal (Junne et al., 2006; Maillard et al., 2007).

6. Transporte postraduccional

En bacterias, la vía de translocación postraduccional está favorecida hacia proteínas que serán secretadas o proteínas con péptido señal. Dicha vía requiere de una chaperona denominada SecB y de una ATPasa llamada SecA. Las proteínas precursoras (o preproteínas) se caracterizan por ser sintetizadas con una secuencia amino terminal que se edita después de translocarse. La estructura de la secuencia señal puede dividirse en tres dominios:

Dominio N: Formado por tres aminoácidos positivos. Adopta la estructura de un alfa hélice.

Dominio H: Región del núcleo hidrofóbico formado por 10 a 15 aminoácidos.

Dominio C: Región polar flexible, sitio de corte de la peptidasa de secuencia señal (SPasa) (Nielsen et al., 1997).

Las proteínas integrales de membrana en general no contienen una secuencia señal, sus HTMs funcionan como señales internas para la translocación e inserción por la vía cotraduccional (Driessen et al., 2008).

En bacterias la distribución de cargas sigue la regla *positivo adentro* postulada por von Heijne, en la que residuos básicos como la arginina y la lisina se encuentran en mayor proporción en las asas que están orientadas hacia el citoplasma, mientras que residuos ácidos como el aspartato y el glutamato se encuentran en mayor proporción en las asas orientadas hacia el periplasma. La integración de las proteínas en la membrana depende de la fuerza de interacción entre los cruces transmembranales y la membrana, y de la barrera en la energía de activación asociada a la translocación de las asas periplásmicas (von Heijne, 1986).

6.1. *Trigger Factor*

El primer paso en el mecanismo postraduccional de translocación de proteínas es el reconocimiento de la secuencia señal del péptido recién sintetizado. Dicho reconocimiento se lleva a cabo por una chaperona peptidil-prolil cis-trans isomerasa también denominada *trigger factor* (TF) (Hesterkamp et al., 1996). Esta chaperona se ha visto asociada a ribosomas mediante la proteína ribosomal L29, pero su papel en el reconocimiento y plegamiento de proteínas aún no está claro. El modelo de Merz y colaboradores (2008), establece que el TF en estado activo se asocia al ribosoma en el túnel de salida para recibir al péptido naciente, el cual una vez plegado en un dominio se acomoda dentro de una cavidad protectora dentro de TF. Estudios de entrecruzamiento identifican a TF como la primera chaperona que interacciona con los péptidos nacientes (Beck et al., 2000). Lo anterior sugiere que TF tiene un papel discriminatorio en el

reconocimiento gracias a una interacción específica con la región sintetizada inicialmente de las proteínas secretoras, reduciendo la afinidad de la secuencia señal por la partícula de reconocimiento de señal (SRP). Sin embargo existen resultados opuestos que indican que SRP es la que discrimina en el reconocimiento de las proteínas (ver sección 7.1, Beck et al., 2000).

6.2. SecB y SecA

Una vez que las proteínas secretoras son seleccionadas por la chaperona TF, entra en acción una segunda chaperona citosólica llamada SecB que entrega a la proteína a la ATPasa SecA en el complejo SEC para insertar a la proteína en la membrana interna (Figura 1, Driessen y Nouwen, 2008).

SecB está presente en las alfa, beta y gamma proteobacterias, es una proteína homotetramérica (dímero de dímeros) de 17 kDa y posee dos sitios de reconocimiento a proteínas y a SecA (van der Sluis et al., 2006).

Se desconoce como SecB discrimina entre proteínas que deben ser secretadas y aquellas que deben permanecer en la célula, pero se sabe que sólo interacciona con proteínas desplegadas a través de un motivo de unión formado por nueve aminoácidos aromáticos y básicos que se encuentran en SecB. SecB también interacciona con una gran variedad de proteínas citosólicas, se propone que estas interacciones ocurren con el fin de prevenir la agregación de proteínas (Knoblauch et al., 1999).

SecB reconoce y se une a SecA a través de un dominio de 22 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de SecA de manera dependiente a un átomo de zinc. La transferencia de la proteína sustrato de SecB a SecA-SEC ocurre de manera independiente de energía, sin embargo, para liberar a SecB de la membrana se requiere la unión de ATP a SecA (Fekkes et al., 1997).

SecA es una proteína citoplasmática de 102 kDa asociada a la membrana plasmática. Posee un dominio CTL (*C-terminal linker*) esencial que participa en la

unión a lípidos y a SecB. Ensayos *in vitro* demuestran que SecA estimula la agregación de vesículas lipídicas cargadas negativamente a través de su dominio carboxilo terminal, y que la presencia de SecB reduce esta agregación. A pesar de que aún no se determinan los residuos responsables de estas interacciones, los resultados anteriores sugieren que los sitios de unión de SecA a lípidos y a SecB están relacionados o se encuentran muy cerca (Breukink et al., 1995).

En el citosol, SecA existe en un equilibrio monómero-dímero y hasta la fecha es tema de debate el estado oligomérico en el que ejerce su función. Como monómero SecA tiene baja afinidad por SecB, mientras que como dímero tiene una alta afinidad por la misma proteína (Driessen, 1993). La estructura dimérica de SecA contiene a los protómeros en un arreglo antiparalelo y está regulada por proteínas no plegadas, SEC, SecB y fosfolípidos ácidos de la membrana (Driessen y Nouwen, 2008).

La estructura determinada por cristalografía de rayos X del complejo ATPasa SecA y el canal de translocación SecY de *Thermogata maritima* muestra a SecA como monómero, en donde sólo una molécula de SecA se une a una molécula de SecY. SecA posee dos dominios de unión a nucleótido NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domains*), que como su nombre lo indica, están involucrados en la unión e hidrólisis de ATP. NBD1 es el sitio catalítico y NBD2 regula a NBD1. La unión de SecA a SecY genera importantes cambios conformacionales en ambas proteínas: en el caso de SecA, al unirse a SecY adopta una conformación abierta en donde su dominio de unión a polipéptido: el dominio PPXD (*Polypeptide-Cross-Linking Domain*), rota hacia el dominio NBD2 haciendo contacto con él. Los cambios conformacionales en SecY ocurren en la compuerta lateral, la cual está formada por las HTMs 2, 3, 7 y 8. SecA provoca que la HTM7 se desplace hacia la HTM8 formando una ventana en el centro de la capa lipídica con el fin de facilitar la inserción del polipéptido que está siendo translocado (Zimmer et al., 2008).

El ciclo de hidrólisis de ATP sólo es activo cuando SecA se une a SEC. SecA contiene diferentes sitios de unión para la secuencia señal y para el dominio maduro de las proteínas (Sianidis et al., 2001).

SecA posee un surco entre su dominio PPXD y NBD2 que se abre cuando se hidroliza ATP liberando al péptido, el cual se desplaza por el canal para ser sujetado nuevamente por SecA (Rapoport, 2007).

Por estudios de entrecruzamiento se ha encontrado que SecA también participa en la inserción cotraduccional de proteínas facilitando la inserción de asas periplásmicas hidrofílicas grandes, como la de la proteína híbrida Momp2 que posee un HTM y que se construyó a partir de la fusión de la secuencia señal de MtlA y la porción madura de la proteína OmpA de *E. coli* (Neumann-Haefelin et al., 2000).

SecG está cerca del asa citoplásmica 3 y del HTM3 de SecY, región con la que también se propone interactúa SecA, lo que explica el hecho de que SecG tenga un papel facilitando los cambios conformacionales de SecA. Cuando el complejo SEC está activo, SecG invierte la topología con respecto a la membrana de sus dos hélices transmembranales, el amino y el carboxilo terminales de SecG se exponen hacia el lado citoplásmico de la membrana y su región hidrofóbica se encuentra expuesta hacia el periplasma. Este cambio topológico está ligado a los ciclos de inserción y salida de SecA en la membrana: cuando SecG invierte su topología, SecA permanece insertada en la membrana para favorecer la inserción de proteínas (Nishiyama et al., 1996).

6.3 SecDF-YajC

SecDF-YajC es un complejo heterotrimérico que se asocia a SEC. Se cree que su probable función es participar en los pasos finales de la translocación, cuando las proteínas se liberan de SEC o en la remoción de secuencias señal en el poro de translocación (Figura 1A y B, Matsuyama et al., 1993). También se postula que podría regular la oligomerización de SEC y la translocación de proteínas controlando la actividad de SecA (Duong y Wickner et al).

SecD y SecF son proteínas politópicas de seis HTMs cada una y YajC tiene un solo cruce transmembranal. El complejo es funcional sin YajC, mientras que la ausencia de SecDF genera células sensibles a bajas temperaturas y provoca defectos en la translocación de proteínas (Nouwen y Driessen, 2005).

7. Transporte cotraduccional

La inserción cotraduccional es esencial para proteínas de membrana que contienen al menos un segmento transmembranal (von Loeffelholz et al., 2011).

El transporte cotraduccional de proteínas de membrana en *E. coli* es mediado por una ribonucleoproteína conocida como SRP (por las siglas en inglés de *Signal Recognition Particle*), la cual reconoce el extremo amino terminal hidrofóbico de un péptido nascente formando un complejo que detiene la traducción para posteriormente ser dirigido hacia la membrana donde es reconocido por su receptor (FtsY) en una reacción que es dependiente de GTP. Una vez reconocido el complejo SRP-proteína nascente-ribosoma, se lleva a cabo una hidrólisis de GTP la cual libera a SRP y deposita a la maquinaria de traducción (o ribosoma traduccionalmente activo) sobre el complejo SEC permitiendo que la proteína nascente sea translocada a través de la membrana lipídica (Figura 1C, Seluanov y Bibi, 1996; Bahari et al., 2007).

7.1. Partícula de Reconocimiento de Señal (SRP)

En *E. coli*, SRP está compuesta de una molécula 4.5S de RNA y una GTPasa de 48 kDa denominada Ffh (por las siglas en inglés de *Fifty five homolog*, por su homóloga SRP54 en eucariontes (Doudna y Batey, 2004).

Ffh está formada por tres dominios (Figura 5):

N- Dominio de unión al ribosoma a través de la proteína ribosomal L23.

G- Dominio de GTPasa, que activa la hidrólisis de GTP mediante su dominio IBD (*Insertion Box Domain*) una vez formado el complejo SRP-FtsY.

M- Dominio rico en metioninas que funciona como sitio de unión para el RNA y la secuencia señal (Gu et al., 2003).

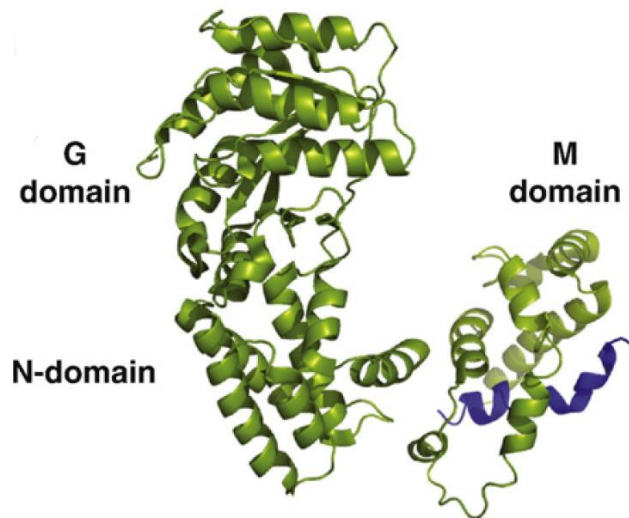


Figura 5. Estructura cristalina de la proteína Ffh de la arquea hipertermofílica *Sulfolobus solfataricus* en complejo con un péptido señal de levadura (en azul) (Tomada de Bibi, 2011).

Estudios de entrecruzamiento *in vitro* apuntan a que cuando el complejo ribosoma-péptido naciente reconoce al translocón SEC, la longitud de la cadena polipeptídica es aproximadamente la misma que cuando SRP reconoce la secuencia señal (Ullers et al., 2003). Lo anterior, y el hecho de que la afinidad de los ribosomas por el complejo SEC es similar en *E. coli* y en eucariontes son fuertes evidencias de que la inserción mediada por SRP ocurre de manera cotraduccional (Prinz et al., 2000; Doudna y Batey, 2004).

Hasta la fecha no se sabe cómo es que SRP reconoce de manera correcta al complejo ribosoma-péptido naciente. Las secuencias señal reconocidas por SRP carecen de un motivo consenso y son altamente divergentes en cuanto a longitud se refiere (von Loeffelholz et al., 2011).

7.2. FtsY

Es la proteína que funciona como receptor membranal de SRP en *E. coli*. Se ha propuesto que FtsY tiene una función directa de reconocimiento, sin embargo el mecanismo de asociación con la membrana no está claro. FtsY está compuesta por dos dominios hidrofílicos: un dominio amino terminal muy cargado (el dominio A) y un dominio carboxilo terminal de unión a GTP (el dominio NG) (Driessen y Nouwen, 2008). Los dominios homólogos N y G de FtsY y Ffh forman el sitio activo para la unión de dos moléculas de GTP (von Loeffelholz, 2011).

El dominio A es único en eubacterias, su función aún es desconocida ya que su eliminación no altera la función del FtsY *in vitro*, sin embargo, se cree que este dominio ácido favorece la unión a lípidos y que también interacciona con el complejo SEC (Erez et al., 2010).

Para regular el proceso de inserción cotraduccional tanto SRP como FtsY adoptan diferentes estados conformacionales durante su interacción, que culminan en una activación recíproca de sus actividades de GTPasa. El complejo SRP-FtsY es estabilizado por el 4.5S RNA, que interacciona directamente con el dominio GTPasa de FtsY (Estrozi et al., 2011). En etapas tempranas de la translocación, el complejo ribosoma-péptido naciente, FtsY y SRP forman un intermediario independiente de GTP estabilizado por el ribosoma. En presencia del translocón adoptan una conformación cerrada en un paso dependiente de GTP, seguido de un estado activado que se caracteriza por rearrreglos en las asas catalíticas de sus dominios N y G para activar la hidrólisis de GTP y liberar a FtsY y SRP (Figura 6, Zhang et al., 2009).

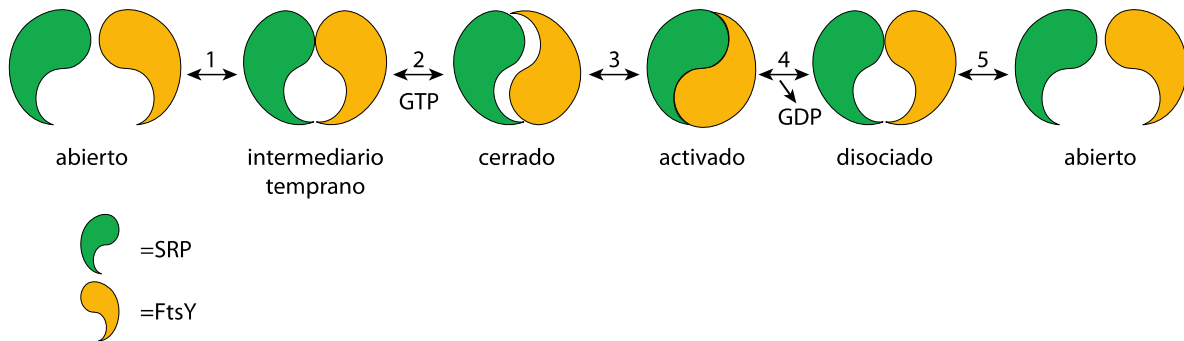


Figura 6. Cambios conformacionales durante la formación del complejo SRP-FtsY. 1 SRP y FtsY forman un intermediario temprano independiente de GTP. 2 En presencia de GTP el intermediario temprano pasa a ser un complejo en estado cerrado más estable. 3 Rearreglos en las asas catalíticas activan la hidrólisis de GTP. 4 y 5 La hidrólisis de GTP provoca la disociación del complejo SRP (Modificado de Zhang et al., 2008).

8. Energía de translocación

Mientras que la inserción depende de la elongación del péptido durante la inserción cotraduccional, la translocación requiere ATP y fuerza protón motriz (Driessen y Nouwen, 2008).

Cuando SecA se encuentra en estado inactivo, residuos específicos de la preproteína están en la proximidad de dos alfa hélices del dominio HSD (*Helical Scaffold Domain*) de SecA que se asemejan a puntas de dedos. Al unirse ATP se genera un cambio conformacional en SecA que provoca que estas hélices se muevan, se inserten en SecY y empujen a los residuos dentro del canal de translocación (Zimmer et al., 2008; Economou, 2008).

El ATP se une a SecA al inicio de la translocación; su hidrólisis promueve la liberación de SecA de la cadena polipéptica y la inserción del péptido en el complejo SEC translocando de 2 a 2.5 kDa por cada ciclo de unión-hidrólisis (van der Wolk et al., 1997). Se requieren varios ciclos de unión-hidrólisis de ATP para que la toda proteína sea empujada por SecA a través de SecY (Economou, 2008).

La fuerza protón motriz también estimula la inserción de la secuencia señal en el poro, al afectar la orientación de la secuencia señal que se inserta formando un asa que se intercala en las HTMs 2 y 7 de SecY. Dicha fuerza estimula la liberación de ADP desde SecA y modula la apertura del canal de translocación (Driessen, 1992).

Además de funcionar como translocasa, el complejo SEC es capaz de integrar segmentos hidrofóbicos dentro de la bicapa lipídica. No está del todo claro cómo es que posterior a la translocación, la región hidrofóbica de la proteína se libera en la bicapa lipídica. Estudios recientes sugieren que el reconocimiento de los segmentos transmembranales por el canal de translocación del complejo SEC está determinado por interacciones lípido-proteína, si el segmento de la proteína que está siendo insertada es suficientemente hidrofóbico podrá ser integrado dentro de la membrana y funcionar como dominio de transferencia (Xie y Dalbey, 2008).

9. YidC

YidC es una proteína esencial en *E. coli* que participa en la inserción y ensamblaje de proteínas de membrana interna. Funciona como insertasa y tiene un papel fundamental en el plegamiento correcto y ensamblaje de los dominios transmembranales de proteínas de membrana (Hatzixanthis et al., 2003). Se ha planteado que YidC interacciona con los dominios hidrofóbicos de las proteínas de dos maneras diferentes: i) para proteínas con dos hélices transmembranales lo hace mediante un modelo conocido como “modelo secuencial”, en el que los dominios transmembranales entran a la membrana lipídica uno a uno; y ii) para proteínas con más de dos hélices transmembranales, YidC agrupa dichos dominios y los inserta a la bicapa lipídica al mismo tiempo, en un modelo conocido como de “sitio-ensamblaje” (Xie y Dalbey, 2008).

9.1 Oligomerización de YidC

YidC adopta una topología de seis HTMs, con una región soluble prominente, su dominio periplásmico, que une a las HTMs 1 y 2. Este dominio adopta una estructura tipo sándwich β y sólo está presente en bacterias Gram negativas. A pesar de que se conoce la estructura cristalina de este dominio periplásmico, su función aún es desconocida. Para las HTMs 2 y 3 de YidC, la misma estructura sugiere que están en contacto con las proteínas que se van a insertar (Oliver y Paetzel, 2008).

Aún no es claro si YidC forma oligómeros o si se asocia además a otras proteínas para promover la inserción de proteínas. Se ha reportado que YidC purificada con una etiqueta de histidinas corre como monómero y dímero en geles nativos (van der Laan et al., 2001). Recientemente, estudios de microscopía electrónica de YidC en la membrana y en complejo con el ribosoma sugieren que funciona como dímero formando un segundo canal conductor de proteínas en la membrana interna (Kohler et al., 2009).

9.2 Sustratos de YidC

Entre las proteínas que se han descrito son insertadas por YidC se encuentran: CyoA, F₀a, F₀c, FtsQ, LacY, LepA, MalF, MscL, NuoK, Pf3 y M13 (Revisado en Funes et al., 2011).

El hecho de que YidC actúe como una insertasa que promueve la integración de proteínas a la bicapa lipídica está claramente demostrado por experimentos de reconstitución *in vivo* e *in vitro* en los que se observó que YidC era suficiente para insertar a la proteína de la cubierta del fago Pf3 (Serek et al., 2004). Así mismo, estudios de espectroscopía de fluorescencia han demostrado que la unión de Pf3 induce cambios conformacionales en las tres asas periféricas de YidC (Imhof et al., 2011).

En general, YidC transloca principalmente proteínas pequeñas, con cadenas negativas o con asas orientadas hacia el lado trans de la membrana. Se ha propuesto que las proteínas YidC y los miembros eucariontes de la misma familia (Oxa1 y Alb3) interaccionan con intermediarios plegados y los estabilizan, como es el caso de la subunidad c del sector F_o de la ATPasa (Kol et al., 2008). Experimentos de inserción *in vitro* de la subunidad c (F_o c) de la F_oF_1 -ATPasa indican que se requiere de YidC para la inserción de dicha subunidad (van der Laan et al., 2004).

La lactosa permeasa (LacY) es uno de los sustratos reportados en los que se propone que más de una translocasa coopera, ya que es una proteína con múltiples HTMs. LacY de *E. coli* es inicialmente insertada de manera independiente de YidC, quien promueve su plegamiento posterior hasta alcanzar una estructura funcional (Revisado en Funes et al., 2011).

9.3 Interacción de YidC con SecY

Por estudios en vesículas lipídicas con YidC reconstituido, se sabe que YidC funciona de manera dependiente o independiente de SEC, y en ambos casos se ha demostrado que es capaz de insertar proteínas de membrana (Figura 1B, Chen et al., 2002). Estudios de entrecruzamiento y reconstitución *in vitro* indican que YidC y el complejo SEC están muy cerca, al menos durante los pasos iniciales de inserción de proteínas. Además YidC puede ser copurificado con el núcleo del translocón SEC, y la sobreexpresión de los componentes del translocón afectan positivamente la expresión de YidC, lo cual sugiere una relación funcional entre ambos componentes (de Gier y Luirink, 2003). YidC puede unir al ribosoma e insertar proteínas mediante el mecanismo cotraduccional de manera independiente de SEC y SRP (Figura 1C, Kohler et al., 2009).

YidC podría además de insertar HTMs, reposicionar dichos segmentos para que la proteína adopte su topología nativa durante su plegamiento en la membrana.

Estudios iniciales sugieren que la interacción de YidC con la translocasa SEC puede estar mediada por su dominio periplásmico, sin embargo, la naturaleza y dinámica de esta asociación es desconocida (Funes et al., 2011).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que se han realizado una gran cantidad de estudios funcionales para comprender cómo es que el proceso cotraduccional de inserción de proteínas de membrana ocurre, no ha podido estudiarse cómo es que las distintas translocasas interactúan físicamente, especialmente porque esta interacción es muy débil y ocurre sólo de manera transitoria.

Actualmente, el método que permite obtener un mayor detalle estructural de maquinarias moleculares es el de cristalografía de rayos X. Sin embargo, una de las limitaciones de este método es que se requieren grandes cantidades de proteína y con altos niveles de pureza. Para el caso de las maquinarias que estudiamos, no ha sido posible obtener este tipo de preparaciones utilizando métodos bioquímicos tradicionales de purificación, ya que *in vivo* el proceso cotraduccional de inserción de proteínas es extremadamente dinámico.

Utilizando una estrategia de fusión *in vitro* al fusionar la secuencia de aminoácidos de SecY, YidC y FtsY, será posible obtener de manera más sencilla la cantidad de material necesario para realizar los estudios estructurales.

Un inconveniente de este tipo de enfoque, es que al realizar una fusión artificial de dos proteínas, el polipéptido resultante no necesariamente se plegará de la misma manera que las proteínas individuales. De manera que, aun cuando en caso de obtener una conformación estable e información estructural, el modelo resultante no sería representativo de la topología funcional.

Por lo tanto, para poder validar los estudios estructurales derivados de la fusión de dos complejos proteicos involucrados en el proceso de inserción cotraduccional se realizarán análisis funcionales *in vivo* de cada una de las proteínas quiméricas.

III. HIPÓTESIS

Las proteínas quiméricas YidC-SecY y SecY-FtsY permiten el desarrollo correcto de los procesos de translocación e inserción de proteínas y por lo tanto la viabilidad celular.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la naturaleza de las interacciones físicas entre los componentes YidC, SecY y FtsY del sistema cotraduccional de inserción y translocación de proteínas en *E. coli*.

Objetivos Particulares

1. Construir una fusión YidC-SecY.
2. Clonar la fusión YidC-SecY en un vector de expresión para *E. coli*.
3. Generar una mutante en la que simultáneamente *yidC* se encuentre regulado por el promotor de arabinosa y *secY* tenga una mutación que haga que la proteína traducida sea sensible a temperatura.
4. Analizar el funcionamiento *in vivo* de la fusión YidC-SecY en células en donde cada uno de los componentes endógenos pueda ser suprimido de manera independiente o en la misma cepa de manera simultánea.
5. Construir la fusión SecY-FtsY.
6. Clonar la fusión SecY-FtsY en un vector de expresión para *E. coli*.
7. Generar una mutante en la que simultáneamente *ftsY* se encuentre regulado por el promotor de arabinosa y *secY* tenga una mutación que haga que la proteína traducida sea sensible a temperatura.
8. Analizar el funcionamiento *in vivo* de la fusión SecY-YidC en células en donde cada uno de los componentes endógenos pueda ser suprimido de manera independiente o en la misma cepa de manera simultánea.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla I. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

NOMBRE	RESISTENCIA/AUXOTROFÍA	REFERENCIA
DH5 α	-	INVITROGEN
IY28	Kanamicina Tetraciclina	Luirink et al.,(1994) EMBO J. 13, 2289-2296.
TY22	Arabinosa	Baba et al., (1990) J. Bacteriology. 172(12):7005-7010.
FTL10	Arabinosa	Hatzixanthis et al., (2003) Molecular Microbiology. 49(5): 1377-1390.
BW25141	-	Datsenko y Wanner, (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640

Tabla II. Vectores utilizados

NOMBRE	RESISTENCIA	Descripción	REFERENCIA
pJL01	Ampicilina	Vector de clonación que contiene la secuencia del gen <i>yidC</i> silvestre	Este trabajo
pJL02	Ampicilina	Vector de clonación que contiene la secuencia del gen <i>yidC</i> sin el sitio endógeno de reconocimiento de la enzima NcoI	Este trabajo
pJL03	Ampicilina	Vector de clonación que contiene la secuencia de los genes fusionados <i>yidC</i> y <i>secY</i>	Este trabajo
pJL03.1	Ampicilina	Vector pGEM®-T Easy que contiene la secuencia de los genes fusionados <i>yidC</i> y <i>secY</i>	Este trabajo
pJL04	Ampicilina	Vector de clonación que contiene la secuencia de los genes fusionados <i>yidC</i> y <i>secY</i> , y de <i>secE</i> y <i>secG</i>	Este trabajo
pJL05	Kanamicina	Vector de clonación que contiene la secuencia de los genes <i>secY</i> y <i>kanR</i> utilizado para generar fragmento de recombinación	Este trabajo
pEK1	Ampicilina	Vector de clonación que contiene la secuencia del gen <i>secY</i> silvestre entre los sitios de restricción NcoI y ClaI	E. O. van der Sluis (no publicado)

pEK20	Ampicilina	Vector de expresión que contiene la secuencia de los genes <i>secY</i> , <i>secE</i> y <i>secG</i>	E. O. van der Sluis, FEBS Letters. 2002
pEM21	Ampicilina	Vector de expresión que contiene la secuencia de los genes fusionados <i>secY</i> , <i>ftsY</i> , <i>secE</i> y <i>secG</i>	E. O. van der Sluis (no publicado)
pET324	Ampicilina	Vector vacío de expresión en donde se realizaron las clonaciones del complejo SEC	van der Does et al., Mol. Microbiol. 1999
pFtsY-ANG	Ampicilina	Vector de expresión que contiene la secuencia de los A, N y G de FtsY	Powers y Walter, EMBO J. 1997
pKD13	Kanamicina Ampicilina	Vector de clonación con marcador de kanamicina para generar fragmento de recombinación.	Datsenko et al., 2000
pKD46	Ampicilina	Vector de expresión de la recombinasa Red	Datsenko et al., 2000

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados

NOMBRE	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
YidC-NcoI F	5' ATT <u>CCATGG</u> ATTCGCAACGCA ATCTTTTAGTCATCG 3'	Oligo sentido para amplificar el gen <i>yidC</i> + sitio de restricción de NcoI
YidC-PciI R (SIGMA)	5' CTC <u>ACATGT</u> ATCCCTGAAAATACAGGTTTTCGGCT TTGTC 3'	Oligo antisentido para amplificar el gen <i>yidC</i> + sitio de restricción de PciI
es105	5' TCATG <u>CCATGG</u> ATTCGCAACGCAATCTTTTAGTCA TCGCTGCTATAA 3'	Oligo sentido para amplificar el gen <i>yidC</i> + sitio de restricción de NcoI
es106	5' GG <u>ACTAGT</u> GGATTTTTTCTTCTCGCGGCTTGACCA 3'	Oligo antisentido para amplificar el gen <i>yidC</i> + sitio de restricción de SpeI
sc01	5' GCG <u>CCATGG</u> ATCCCTGAAAATACAGGTTTTCGGCTTTG TCATCGTCATCGTGATGGTGATGGTGATGCATGGATTTTTTC TTCTCGCGGCTATGC 3'	Oligo antisentido para amplificar el gen <i>yidC</i> + sitio de restricción de NcoI + etiqueta His + sitio TEV
es109	5' GCGCAGTACACCTCGATGGCGAAGATGCGTATGC ACCA 3'	Oligo sentido para eliminar sitio de restricción endógeno de NcoI en el gen <i>yidC</i>

es110	5' CGCATCTTCGCCATCGAGGTGTA CTGCGCTATGCA CCA 3'	Oligo antisentido para eliminar sitio de restricción NcoI en el gen <i>yidC</i>
SecY-Sall F	5' CTCGTCGACATGGCTAAACAACCGGGATTAGATTTTC 3'	Oligo sentido para amplificar el gen <i>secY</i> + sitio de restricción de Sall
SecY-Sall R	5' CTCGTCGACTTATCGGCCGTAGCCTTTCAGGTTTCGCC 3'	Oligo antisentido para amplificar el gen <i>secY_{ts}</i> + sitio de restricción de Sall
SecY-Clal R	5' CTCATCGATTTATCGGCCGTAGCCTTTCAGGTTTCGCC 3'	Oligo antisentido para amplificar el gen <i>secY_{ts}</i> + sitio de restricción de Clal
SecY-H1 F	5' GTAGCAGATGGCTAAACAACCGGGATTAG 3'	Oligo sentido para clonar marcador <i>secY_{ts}-KAN</i>
SecY-H2 R	5' TTACTCTCCGTA ACTTCTCGGGCGACCAATT ATCGGCCGTAGCCTTTCAG 3'	Oligo sentido para amplificar el gen <i>secY_{ts}</i>
Kan-P1 L36 R	5'TTACTCTCCGTA ACTTCTCGGGCGACCAAGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC 3'	Oligo antisentido para clonar marcador <i>secY_{ts}-KAN</i>
K1	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'	Oligo antisentido para comprobar la orientación de <i>secY_{TS}</i> en pKD13

Soluciones y Medios de Cultivo utilizados

LB (Lysogeny Broth o Luria Bertani)

Componente	Concentración
NaCl	1% p/v
Bacteriptona	1% p/v
Extracto de levadura	0.5% p/v
Agar	1.5%

Para medio sólido se agregó Agar-Agar 1.5% p/v a la formulación anterior.

TB (Terrific Broth)

Componente	Concentración
Bactotripton	1.2% p/v
Extracto de Levadura	2.4% p/v
Glicerol	0.5% p/v
10x TB sales	1x

10x TB sales pH 7.5 (1L)

Componente	Concentración
KH ₂ PO ₄	23.12 g
K ₂ HPO ₄	125.41 g
H ₂ O desionizada c.b.p. 1L	

50x TAE (1L)

Componente	Cantidad
Tris base	242.0 g
Ácido Acético Glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL
H ₂ O desionizada c.b.p. 1L	

Solución amortiguadora TENS

Componente	Concentración
Tris base pH 7.5	10 mM
EDTA	1 mM
NaOH	0.1 N
SDS	0.5% p/v

6X Solución amortiguadora de carga

Componente	Concentración
Azul de Bromofenol	0.25% p/v
Xilen Cianol	0.25% p/v
Glicerol	10% v/v

Antibióticos, inductores y represores

Suplementos	Solución Madre	En medio de cultivo
Ampicilina (Amp)	100 mg/mL en H ₂ O desionizada	100 µg/mL
Kanamicina (Kan)	20 mg/mL en H ₂ O desionizada	20 µg/mL
Tetraciclina (Tet)	25 mg/mL en etanol	25 µg/mL
Arabinosa (Ara)	20% p/v en H ₂ O desionizada	0.2%
Glucosa (Glu)	20% p/v en H ₂ O desionizada	0.5%

Condiciones de esterilización

Los medios de cultivo y soluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C, a 15 libras de presión por 15 o 20 min. Los antibióticos se esterilizaron por filtración.

Preparación de células competentes de *E. coli*

1. Inocular las células de *E. coli* de la cepa de interés en medio LB sólido para obtener colonias aisladas.
2. Crecer una colonia fresca en 5 mL de medio LB + glucosa a 37°C, con agitación vigorosa (200 rpm) por 16 h.
3. Transferir 1 mL del cultivo anterior a 50 mL de medio LB y crecer por 2 o 3 h más. Medir la densidad óptica (OD₆₀₀) a las 2 h y detener crecimiento al llegar a una OD₆₀₀ de entre 0.5 y 0.6.
4. Centrifugar las células a 600 x g por 10 min a 4°C.
5. Resuspender el botón en 40 mL de solución TfbI fría, agitando suavemente.
6. Dejar reposar en hielo por 2 h.
7. Centrifugar las células a 600 x g por 10 min a 4°C.
8. Resuspender el botón en 4 mL de solución TfbII fría.
9. Dejar reposar en hielo por 1 h.
10. Las células están listas para usarse. Probar la calidad de las células por transformación con un plásmido circularizado.
11. Para almacenar, alicuotar las células en volúmenes pequeños (0.2 a 0.4 mL) y congelar a -70°C.

Amortiguadores de Transformación (Tfb)

Tfb I	En 45 mL	Concentración Final
CH ₃ CO ₂ K 1 M	1.35 mL	30 mM
MnCl ₂ 1 M	2.25 mL	50 mM
RbCl 1 M	4.50 mL	100 mM
CaCl ₂ 1 M	0.45 mL	10 mM
Glicerol 100%	5.40 mL	12 %
H ₂ O desionizada	31.0 mL	

Tfb II	En 5 mL	Concentración Final
MOPS 1 M	50 µL	10 mM
CaCl ₂ 1 M	375 µL	75 mM
RbCl 1 M	50 µL	10 mM
Glicerol 100%	600 µL	12%
dH ₂ O	3.93 mL	

Esterilizar por filtración (0.2 µM) las soluciones TfbI y TfbII

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

1. Inocular las células de *E. coli* de la cepa de interés en medio LB sólido para obtener colonias aisladas.
2. Crecer una colonia fresca en 5 mL de medio LB a 37°C, con agitación vigorosa (200 rpm) por 16 h.
3. Transferir 0.5 mL del cultivo anterior a 50 mL de medio LB y crecer por 2 o 3 h más. Medir la densidad óptica (OD₆₀₀) a las 2 h y detener crecimiento al llegar a una OD₆₀₀ de entre 0.5 y 1.0.
4. Cosechar las células manteniéndolas en hielo de 15 a 30 min.
5. Centrifugar las células a 4000 x g por 15 min a 4°C.
6. Resuspender el botón en 25 mL de solución HEPES fría 10 mM pH 7.
7. Centrifugar las células a 4000 x g por 15 min a 4°C.
8. Resuspender el botón en 25 mL de H₂O desionizada.
9. Centrifugar las células a 4000 x g por 15 min a 4°C.
10. Repetir desde el paso 8 y 9 dos veces más.
11. Resuspender el botón en 500 µL de glicerol 10%.
12. Hacer alícuotas del volumen deseado y congelar a -70°C.

Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico

1. Colocar 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5α en un tubo Eppendorf®.
2. Añadir 1 μ L del plásmido (100-300ng) o producto de ligación de interés.
3. Incubar 30 min en hielo.
4. Incubar 1.5 min a 42°C.
5. Incubar en hielo aproximadamente 5 min.
6. Añadir 1 mL de medio de cultivo LB.
7. Incubar en agitación vigorosa (600-800 rpm) de 1 a 3 h a 37°C.
8. Centrifugar brevemente a 8600 x *g*.
9. Decantar el sobrenadante.
10. Resuspender las células en el medio restante.
11. Plaquear en medio de cultivo sólido de selección (LB + antibiótico).
12. Incubar toda la noche a 37°C.

Transformación de cepas *E. coli* por electroporación

1. Colocar 100 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* de la cepa de interés en un tubo Eppendorf®.
2. Añadir 1 μ L del plásmido de interés.
3. Incubar 1 min en hielo.
4. Programar el electroporador: a 25 μ F y 2.5 kV y el controlador de pulso a 200 Ω .
5. Transferir la mezcla células-ADN a una cubeta de electroporación fría (cubeta de 0.2 cm).
6. Dar el pulso.
7. Remover la cubeta del electroporador .
8. Añadir 1 mL de medio de cultivo LB y resuspender cuidadosamente.
9. Transferir la suspensión de transformantes a un Eppendorf® estéril e incubar 1 h a 37°C a 225-250 rpm.

10. Centrifugar brevemente a 8600 x *g*.
11. Decantar el sobrenadante.
12. Resuspender las células en el medio restante.
13. Plaquear en medio de cultivo selectivo sólido (LB + antibiótico).
14. Incubar toda la noche a 37°C.

Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* (minipreps)

1. Tomar 1 mL de cultivo bacteriano con 16 h de crecimiento y colocar en un tubo Eppendorf®.
2. Centrifugar 5 min a 10000 x *g*, descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón en 50 µL de dH₂O.
4. Agregar 300 µL de solución amortiguadora TENS.
5. Agitar brevemente.
6. Agregar 150 µL de solución de CH₃COONa 3 M pH 4.9.
7. Centrifugar 20 min a 15000 x *g* a 4°C.
8. Durante el tiempo de centrifugación, preparar un nuevo tubo Eppendorf®.
9. Transferir el sobrenadante al nuevo tubo Eppendorf®.
10. Agregar al sobrenadante recuperado 900 µL de etanol 100%.
11. Centrifugar 10 min a 15000 x *g* a 4°C.
12. Descartar el sobrenadante lo más pronto posible.
13. Lavar con 250 µL de etanol 70%.
14. Centrifugar 10 min a 15000 x *g* a 4°C.
15. Descartar el sobrenadante lo más pronto posible.
16. Centrifugar 30 s a 10000 x *g* a temperatura ambiente.
17. Eliminar el etanol sobrante de la parte inferior del tubo Eppendorf®.
18. Dejar secar el botón aproximadamente 10 min a temperatura ambiente.
19. Resuspender el botón en 100 µL de H₂O desionizada.

Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* (midipreps)

Para la extracción de ADN plasmídico (utilizado para reacciones de PCR, de secuenciación y de subclonación) de cepas de *E. coli* se utilizó el kit comercial PureYield™ Plasmid Midiprep de la marca Promega

Purificación de ADN de geles de agarosa y reacciones de PCR

Los fragmentos de productos de PCR o de digestión que se corrieron en un gel de agarosa se purificaron utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la marca Promega.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

De manera general y para checar características de los vectores utilizados, las reacciones de PCR realizadas se hicieron utilizando la enzima (Taq ADN polimerasa) y otros reactivos de la marca Fermentas. Se realizaron en un volumen final de 20 μ L en condiciones de $MgCl_2$ 2 mM, 1.5 U de polimerasa, 1x de amortiguador de la enzima, 200 μ M de dNTPs, 20 μ M de oligodesoxinucleótidos y 300 ng de ADN.

Ciclos de PCR estándar*

Desnaturalización inicial	5 min a 94°C	
Desnaturalización	1 min a 94°C	} 25 ciclos
Alineamiento	1 a 2.5 min a $T_m-5^\circ C$	
Extensión	1 min/kb a 72°C	
Extensión final	10 min a 72°C	

Para el cálculo de la temperatura de fusión (T_m) de los oligodesoxinucleótidos se utilizó la siguiente ecuación:

$$T_m = 69.3 + 0.41 (\%GC) - 650/N$$

De manera general para la clonación de genes se realizaron reacciones de PCR utilizando el kit Phusion[®] Flash High-Fidelity PCR Master Mix de la marca Finnzymes. Se realizaron en un volumen final de 50 μ L en condiciones de 25 μ M de oligodesoxinucleótidos y 700 ng de ADN.

Ciclos de PCR estándar*

Desnaturalización inicial	30 s a 98°C	} 25 ciclos
Desnaturalización	10 s a 98°C	
Alineamiento	30 s a 60°C	
Extensión	30 s/kb a 72°C	
Extensión final	10 min a 72°C	

*Las condiciones de alineamiento y extensión se modificaron de acuerdo al tamaño de los oligonucleótidos utilizados y al tamaño del producto esperado.

Reacción de Ligación

Las reacciones de ligación se hicieron utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (New England Biolabs).

Se realizaron en un volumen final de 20 μ L en condiciones de 800 U de T4 ADN Ligasa, 1x de amortiguador de la enzima y de 30 a 50 ng de ADN.

Proporción Vector:Inserto

Se utilizó la siguiente ecuación para determinar la concentración adecuada vector:inserto en las reacciones de ligación (Ken, 1996).

Nanogramos de Inserto

$$\text{Nanogramos de inserto (ng)} = \frac{\text{volumen de vector } \mu\text{L} \times \text{concentración vector } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times \text{longitud del inserto (kb)}}{\text{longitud del vector (kb)}} \times \frac{\text{partes de inserto}}{\text{partes de vector}}$$

*Para las reacciones de ligación realizadas se utilizaron 2 μL de vector linearizado

Partes de Inserto/Partes de vector= Para este trabajo se hicieron reacciones de ligación bajo las proporciones inserto:vector de 3:1 o 5:1.

Volumen de inserto

$$\text{Volumen de inserto } \mu\text{L} = \frac{\text{ng de inserto}}{\text{concentración vector } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}}$$

Una vez calculado el volumen de inserto necesario para la reacción de ligación, proseguir de la siguiente manera:

1. Colocar en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL:

ADN vector linearizado y defosforilado 2 μL

ADN inserto μL calculados en el paso anterior

T4 ADN Ligasa (New England Biolabs) 10 U

Amortiguador de la enzima 10x 1 μL

H₂O desionizada c.b.p. para 20 μL

2. De manera paralela al paso anterior, preparar un tubo Eppendorf® con la misma cantidad de reactivos, excepto inserto. Dicho tubo funcionará como control de la reacción.

3. Incubar los tubos de ligación y control a 16°C durante toda la noche.
4. Una vez transcurrido el tiempo de ligación proseguir a transformar el contenido de cada tubo en células de *E. coli* DH5α como se indica en el apartado de Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico.

Mutagénesis sitio dirigida

Las reacciones de mutagénesis sitio dirigida se hicieron utilizando el kit Phusion® Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes).

Se realizaron en un volumen final de 50 μL en condiciones de 25 μM de oligodesoxinucleótidos y 250 ng de ADN.

1. Preparar la muestra y hacer una reacción de PCR para generar la mutagénesis sitio dirigida deseada

Ciclos de PCR

Desnaturalización inicial	30 s a 98°C	
Desnaturalización	10 s a 98°C	
Alineamiento	30 s a 60°C	} 25 ciclos
Extensión	30 s/kb a 72°C	
Extensión final	5 min a 72°C	

2. Inmediatamente después del paso de extensión final del PCR colocar la muestra en hielo para favorecer el alineamiento de las hebras de ADN.
3. Una vez enfriada la muestra, centrifugar unos segundos para bajar todo el contenido al fondo del tubo de reacción.
4. Tomar 1 μL de la reacción de PCR y colocar en un Eppendorf® de 1.5 mL. Etiquetar el tubo como –DpnI. Esta muestra servirá como control.
5. Añadir al resto de la reacción 0.5 μL de la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) para digerir todo el ADN metilado presente en la muestra.

6. Incubar 1 a 3 h a 37°C.
7. Tomar 1 μ L de la digestión y transferir a un tubo Eppendorf®. Etiquetar tubo como +Dpnl 1.
8. Tomar 5 μ L de la digestión y transferir a un tubo Eppendorf®. Etiquetar tubo como +Dpnl 5.
9. Agregar 50 μ L de células competentes DH5 α de *E. coli* a cada tubo de reacción (-Dpnl, +Dpnl 1 y +Dpnl 5), más un control negativo.
5. Proceder con la transformación *E. coli* DH5 α como se indica en el apartado de Transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico.
6. Seleccionar colonias resultado de la transformación para extracción de ADN plasmídico como se indica en el apartado de Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* (midipreps).
7. Determinar plásmidos que adquirieron la mutación, por reacciones de digestión o por PCR.

Separación electroforética de ácidos nucleicos

La separación y purificación de los productos de PCR y de las digestiones de plásmidos se hicieron mediante geles de agarosa (Mo Bio) al 1.5% y 1.3%, en solución amortiguadora TAE1X a 100 mV durante 45 a 60 min.

Ensayos de crecimiento

1. Inocular las células de *E. coli* de la cepa de interés en medio LB sólido para obtener colonias aisladas.
2. Crecer una colonia fresca en 5 mL de medio LB a 37°C, con agitación vigorosa (200 rpm) por 16 h.
3. Hacer una dilución a 0.3 OD del cultivo anterior y crecer por 2 h más. Medir la densidad óptica (OD_{600}) a las 1.5 h y detener crecimiento al llegar a una OD_{600} de 1.0.
4. Centrifugar 1.0 OD de células a 8600 $\times g$ por 2 min.

5. Lavar el botón resuspendiendo en 1 mL de H₂O desionizada.
6. Centrifugar células a 10000 x g por 2 min.
7. Resuspender el botón en 1 mL de H₂O desionizada.
8. Hacer diluciones seriadas 1:10 con H₂O desionizada a partir del tubo anterior.
9. Depositar de 3.0 a 3.5 µL de cada una de las diluciones en placas del medio de cultivo deseado.
10. Incubar a 37°C durante 12 h.

Secuenciación de ADN

Todos los plásmidos resultado de este trabajo fueron secuenciados en secuenciadores automáticos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Ciudad de México, México).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Construcción de la Fusión YidC-SecY

Para determinar la relevancia funcional de las interacciones entre el complejo SEC y la insertasa YidC, se realizó una fusión artificial de los genes que codifican a SecY y YidC de manera que ambos complejos permanecieran permanentemente asociados.

1.1 Amplificación por PCR del gen *yidC* de *E. coli*

Se diseñaron los oligonucleótidos es105 y es106 para amplificar el gen *yidC* de *E. coli* por reacción de PCR de alta fidelidad. Una vez amplificado el gen, se insertó en el plásmido de clonación pGEM®-T Easy (Promega) creando el plásmido pJL01 (Figura 7, panel A). El plásmido pJL01 fue secuenciado para determinar la presencia de la secuencia del gen *yidC*. La secuencia obtenida fue analizada con los programas computacionales 4Peaks Versión 1.7.2 y Serial Cloner 2.1 encontrando una similitud del 100% comparada con la secuencia de *yidC* encontrada en las bases de datos. La secuencia completa se encuentra en el Apéndice.

Dado que posteriormente se utilizó a la enzima NcoI para pasos subsecuentes de clonación, se eliminó por mutagénesis dirigida en el plásmido pJL01 el sitio de reconocimiento de dicha enzima que se encuentra en el marco de lectura abierto del gen *yidC*, utilizando los oligonucleótidos es109 y es110; el cambio que se introdujo no altera a secuencia de aminoácidos de la proteína YidC una vez traducida. A este plásmido se le denominó pJL02 (Figura 7, panel B). Se hicieron digestiones de ambos plásmidos con la enzima de restricción NcoI para corroborar la inserción de la mutación así como su integridad. Al digerir pJL01 con NcoI se producen tres fragmentos de aproximadamente 3041, 1137 y 570 pares de bases, correspondientes al vector pGEM®-T Easy y al corte del gen *yidC* respectivamente (Figura 7, panel C). Al realizar la misma digestión en el plásmido pJL02 se producen sólo dos fragmentos de aproximadamente 1707 y 3041 pares de bases,

correspondientes a la liberación del gen *yidC* y al vector pGEM®-T Easy respectivamente (Figura 7, panel C). La secuencia de pJL02 se encuentra en el apéndice.

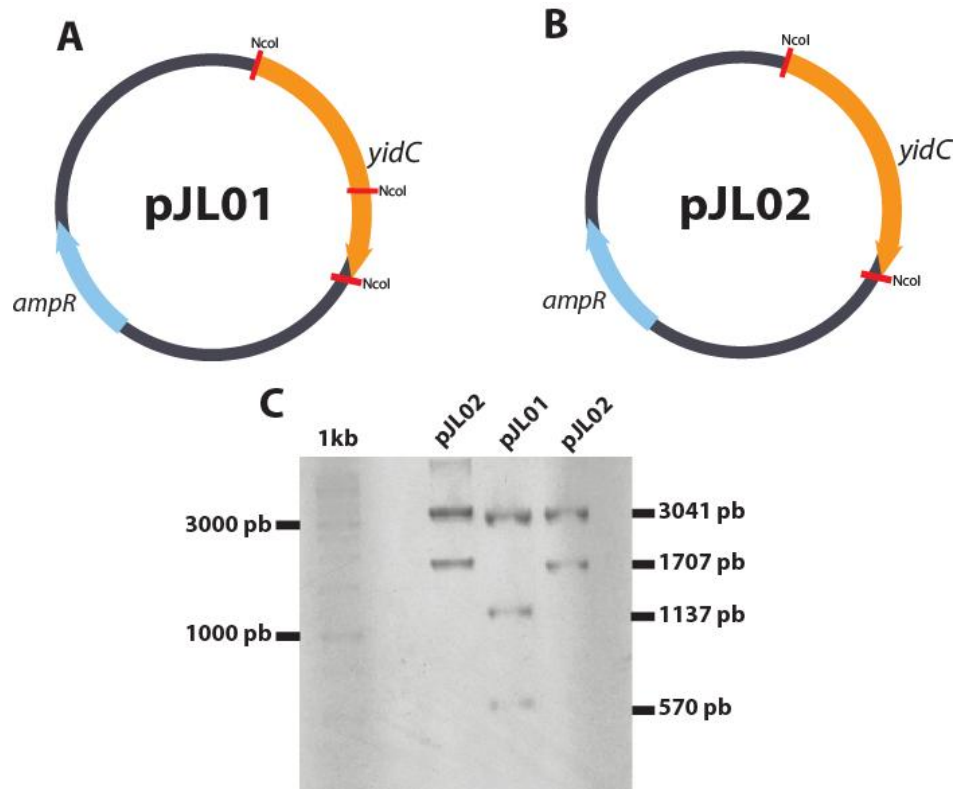


Figura 7. Clonación del gen *yidC* de *E. coli*. (A) Diagrama del plásmido pJL01 en donde se representa al gen *yidC* con su sitio endógeno de *NcoI*. (B) Diagrama del plásmido pJL02 producto de la mutagénesis dirigida del plásmido pJL01 para eliminar el sitio endógeno de *NcoI*. (C) Ensayos de digestión con la enzima de restricción *NcoI* de los plásmidos pJL01 y pJL02. La separación de fragmentos se llevó a cabo en un gel de agarosa 1.3%.

1.2 Fusión del gen *yidC* río arriba del gen *secY*

El plásmido que contiene la secuencia para el gen *secY* (pEK1, Figura 8, panel A) fué proporcionado por el Dr. Eli O. van der Sluis (Universidad de Munich, Alemania).

Los plásmidos que codifican para las proteínas YidC y SecY fueron purificados por medio de la técnica de lisis alcalina utilizando el kit PureYield™ Plasmid Midiprep. Para realizar la fusión del gen *yidC* en el extremo 5' de *secY*; se amplificó por PCR de alta fidelidad el gen *yidC* presente en el plásmido pJL02 utilizando los

oligonucleótidos YidC-NcoIF y sc01, este último para añadir una etiqueta de 6 histidinas y un sitio de reconocimiento ENLYFQG de la proteasa del virus de tabaco (TEV), elementos necesarios para la purificación de la proteína y para realizar ensayos inserción membranal. El producto de la reacción de PCR se separó en un gel de agarosa, obteniendo un fragmento de aproximadamente de 1700 pb (dato teórico= 1719 pb) el cual fue purificado utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos).

Una vez purificado, dicho producto se utilizó como templado en una segunda reacción de PCR para agregar el sitio de restricción de la enzima Pcil en el extremo 3' de *yidC*. Para esta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos YidC-NcoI F y YidC-Pcil R. El producto de la reacción de PCR se separó en un gel de agarosa, y se purificó utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos).

Para fusionar este producto de PCR en el extremo 5' de *secY* se hicieron dos reacciones de digestión, en la primera, se digirió el producto de PCR con las enzimas de restricción NcoI y Pcil (NEB). En la segunda se digirió el plásmido pEK1 con la enzima de restricción NcoI (NEB), generando así extremos cohesivos. El extremo cohesivo generado por la enzima Pcil es compatible con el de NcoI, de esta manera al ocurrir la ligación, ambos sitios se eliminan.

Después de correr ambas digestiones en un gel de agarosa, se purificó la banda correspondiente a *yidC* y de manera paralela la banda correspondiente al plásmido pEK1 linearizado. La fusión se realizó mediante una reacción de ligación. Posteriormente se transformaron células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* con el producto de la reacción anterior.

Al generarse los mismos extremos cohesivos, el producto de PCR generado y digerido con NcoI y Pcil, puede ser clonado en cualquier orientación en el plásmido pEK1 digerido con NcoI. Por lo tanto, para verificar la clonación y orientación de *yidC* con respecto a *secY* se hicieron reacciones de PCR a partir de

colonias, utilizando la enzima Taq ADN Polimerasa y los oligonucleótidos YidC-NcoI F y SecY-SalI R. Las colonias que resultaron positivas para la amplificación de un producto de 3053 pb (Figura 8, panel B) correspondiente a la fusión *yidC-secY* fueron seleccionadas para extraer y purificar el plásmido utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos, Midipreps). Al plásmido generado se le llamó pJL03 (Figura 8, panel C).

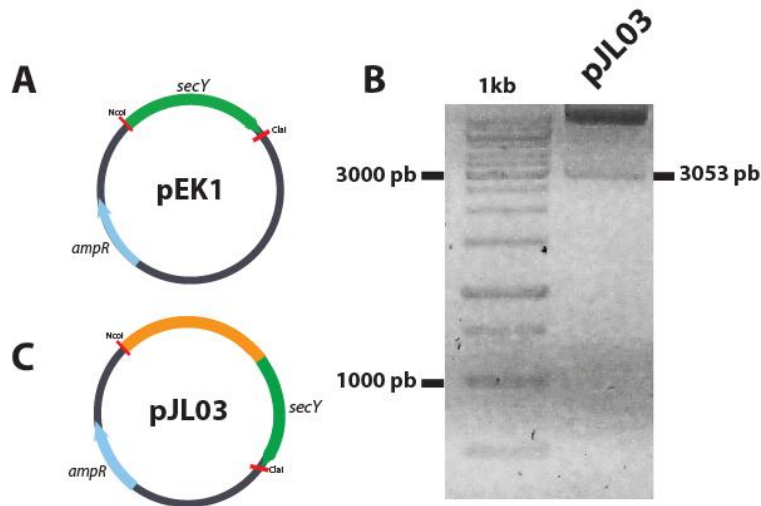


Figura 8. Fusión de *yidC* río arriba de *secY*. (A) Diagrama del plásmido pEK1 en donde se representa el gen *secY* flanqueado por los sitios NcoI y ClaI. (B) Reacción de PCR de la fusión *yidC-secY*. (C) Diagrama del plásmido pJL03 en donde se representa la fusión *yidC-secY* en el plásmido pEK1. La separación de fragmentos se llevó a cabo en un gel de agarosa 1.3%.

1.3 Clonación de la fusión *yidC-secY* en un plásmido de expresión en *E. coli*

Para poder clonar la fusión *yidC-secY* en un plásmido de expresión en *E. coli* se decidió insertar la fusión *yidC-secY* del plásmido pJL03 en un plásmido comercial de clonación pGEM®-T Easy (Promega), para posteriormente clonarlo en un plásmido de expresión que tuviera los genes *secE* y *secG* del complejo SEC y poder evaluar *in vivo* la viabilidad de la fusión.

Utilizando los oligonucleótidos YidC-NcoI F y SecY-ClaI R para una reacción de PCR de alta fidelidad y agregando la enzima Taq ADN Polimerasa en los últimos 5 ciclos de la reacción, se amplificó un producto de 3053 pb correspondiente a la

fusión *yidC-secY*. La Taq ADN polimerasa se añadió con el fin de generar un fragmento con extremos salientes 3' por la adición de una adenina que pueda ligarse en el vector pGEM®-T Easy, que posee una timina en sus extremos salientes. Dicho producto se clonó en el plásmido pGEM®-T Easy mediante una reacción de ligación generando el plásmido pJL03.1 (Figura 9, panel A).

Posteriormente, se transformaron células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* con el producto de la reacción anterior y se extrajo ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina para corroborar la clonación y la presencia de los sitios de restricción NcoI y ClaI en la fusión *yidC-secY*. La presencia del sitio de restricción de NcoI se demostró mediante una reacción de secuenciación del plásmido pJL03.1 utilizando el oligonucleótido T7, el cual se alinea en la región promotora T7 del mismo plásmido; la secuencia completa se encuentra en el Apéndice. Para demostrar la generación del sitio ClaI en el plásmido pJL03.1 (ausente en el plásmido pGEM®-T Easy), se hizo una digestión triple con las enzimas de restricción NcoI, ClaI y PciI. Las enzimas NcoI y ClaI liberan la fusión *yidC-secY*, mientras que la enzima PciI reconoce un sitio interno en *secY*, diferente al sitio eliminado en la ligación y un sitio en otra región del plásmido fuera de la fusión (Figura 9, panel B). Los fragmentos esperados de esta reacción se calculan de 2535, 1902, 1139 y 462 pb.

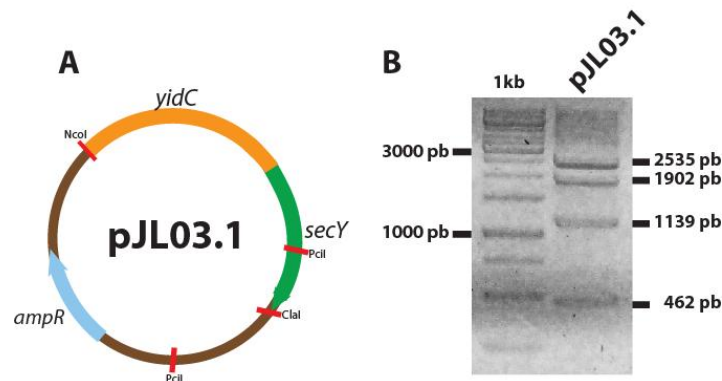


Figura 9. Clonación de la fusión *yidC-secY* en pGEM-T Easy. (A) Diagrama del plásmido pJL03.1 en donde se representa la fusión *yidC-secY*. (B) Digestión del plásmido pJL03.1 con las enzimas de restricción NcoI, ClaI y PciI como confirmación del sitio de restricción de ClaI. La separación de fragmentos se llevó a cabo en un gel de agarosa 1.3%.

Para expresar la proteína quimérica YidC-SecY en cepas de *E. coli*, la fusión de los genes *yidC-secY* se clonó en el plásmido de expresión pEM21 (Eli O. van der Sluis, Universidad de Munich, Alemania) que contenía los genes *secY*, *ftsY*, *secE* y *secG*. Dicha clonación se realizó generando un fragmento de PCR de la fusión *yidC-secY* bajo los sitios de restricción de las enzimas NcoI y ClaI. Una vez purificado por columna, el producto de PCR se clonó en el plásmido pEM21 - previamente digerido con las enzimas de restricción NcoI y ClaI para eliminar los genes *secY* y *ftsY* y para generar extremos cohesivos a la fusión *yidC-secY*- por medio de una reacción de ligación. Posteriormente, se transformaron células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* con el producto de la reacción anterior. Para verificar la presencia de plásmidos con la nueva construcción se hicieron reacciones de PCR de colonia utilizando la enzima Taq ADN Polimerasa y los oligonucleótidos YidC-NcoI F y SecY-ClaI R. De las dieciocho colonias probadas (Figura 10, panel A), cinco (colonias 4, 6, 9, 12 y 14) resultaron positivas para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 3053pb correspondiente a la fusión *yidC-secY*. Estas cepas fueron seleccionadas para extraer y purificar el plásmido utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos, Midipreps). Al plásmido generado se le llamó pJL04.

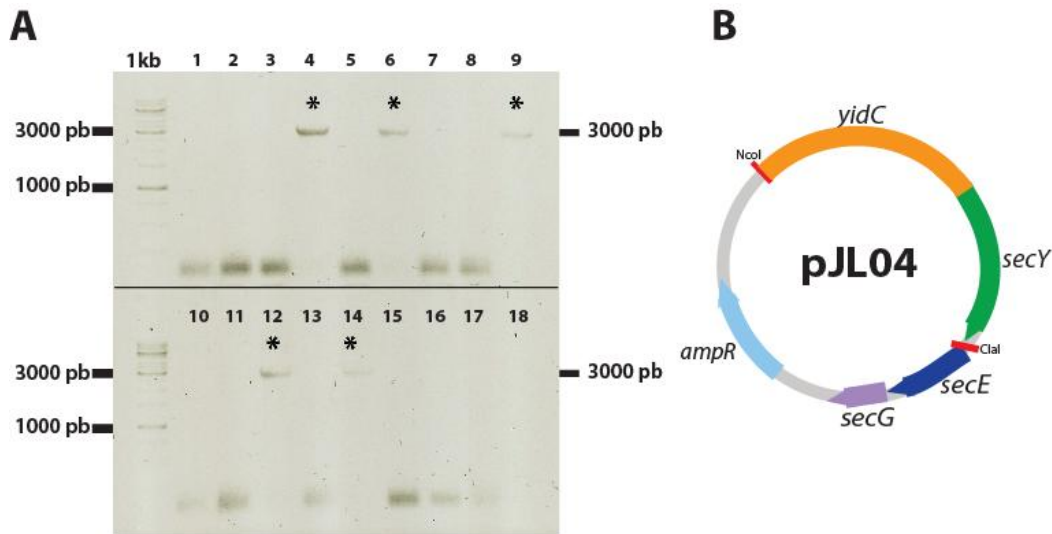


Figura 10. Clonación de la fusión *yidC-secY* en el plásmido de expresión pEM21. (A) PCR de colonia para verificar colonias positivas (indicadas con asteriscos) a la clonación de la fusión *yidC-secY* en el plásmido pEM21. (B) Diagrama del plásmido pJL04 en donde se representa la fusión de los genes *yidC-secY* en el plásmido pEM21. La separación de fragmentos se llevó a cabo en un gel de agarosa 1.3%.

2. Construcción de la Fusión SecY-FtsY

Para determinar la relevancia funcional de las interacciones entre el complejo SEC y la proteína FtsY, se realizó una fusión artificial de manera que ambos complejos permanecieran permanentemente asociados.

2.1 Fusión del gen *secY* río arriba del gen *ftsY*

El plásmido que contiene la secuencia para la fusión de los genes *secY-ftsY* (pEM21, Figura 11, panel B) fue proporcionado por el Dr. Eli O. van der Sluis (Universidad de Munich, Alemania).

La fusión SecY-FtsY se realizó a partir del plásmido de expresión pEK20 en el que los genes que codifican para cada una de las subunidades del complejo SEC (*secY*, *secE* y *secG*) se encuentran clonados, y se insertó la región correspondiente a los dominios N y G más la metionina inicial (NG+1) de FtsY en el extremo carboxilo de SecY sin modificar el marco de lectura. Para corroborar la presencia de la fusión de *secY-ftsY* se hizo una reacción de digestión del plásmido pEM21 con las enzimas de restricción NcoI y ClaI. De esta reacción se produjeron

dos fragmentos de aproximadamente 5185 y 2307 pares de bases, correspondientes al plásmido pEK20 y a la fusión *secY-ftsY*, respectivamente (Figura 11, panel A).

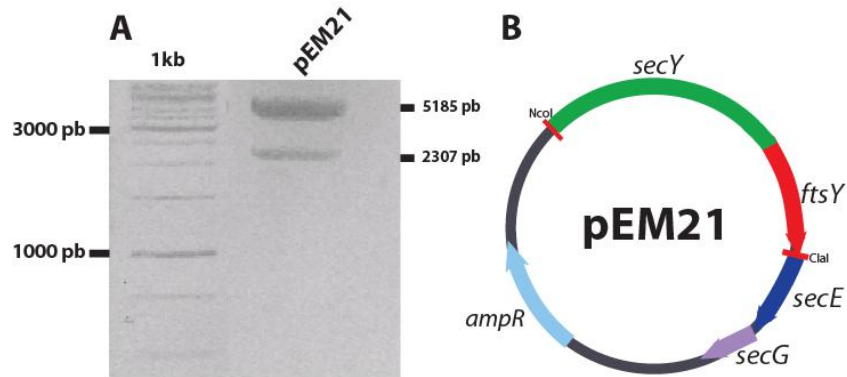


Figura 11. Fusión del gen *secY* río arriba de *ftsY*. (A) Digestión del plásmido pEM21 con las enzimas de restricción *NcoI* y *ClaI*. La separación de fragmentos se llevó a cabo en un gel de agarosa 1.3%. (B) Diagrama del plásmido pEM21 en donde se muestra la fusión *secY-ftsY*, así como los genes *secE* y *secG* del complejo SEC.

2.2 Análisis funcional de la interacción física entre SecY y FtsY

Una vez obtenida la fusión de SecY-FtsY (pEM21), el plásmido se insertó en la cepa TY22 de *E. coli* en la que la expresión de la proteína SecY se inhibe a una temperatura de 25°C (Baba et al., 1990).

En la Figura 12 se observan ensayos de crecimiento de la cepa TY22 transformada con el plásmido vacío pET324, el plásmido pEM21 o el plásmido pEK20 (plásmido que expresa al complejo SEC) a 37 y 25°C.

La cepa que contiene el plásmido vacío funcionó como control; en esta se observó un crecimiento favorable a 37°C, y una inhibición del mismo a 25°C debido a la inestabilidad de SecY.

En el caso de las cepas que contenían al plásmido pEK20 o la fusión SecY-FtsY (pEM21), a 37°C y 25°C el crecimiento fue similar al control (a 37°C), por lo que el complejo SEC y la fusión SecY-FtsY de los plásmidos de expresión son capaces de complementar la inhibición de SecY.

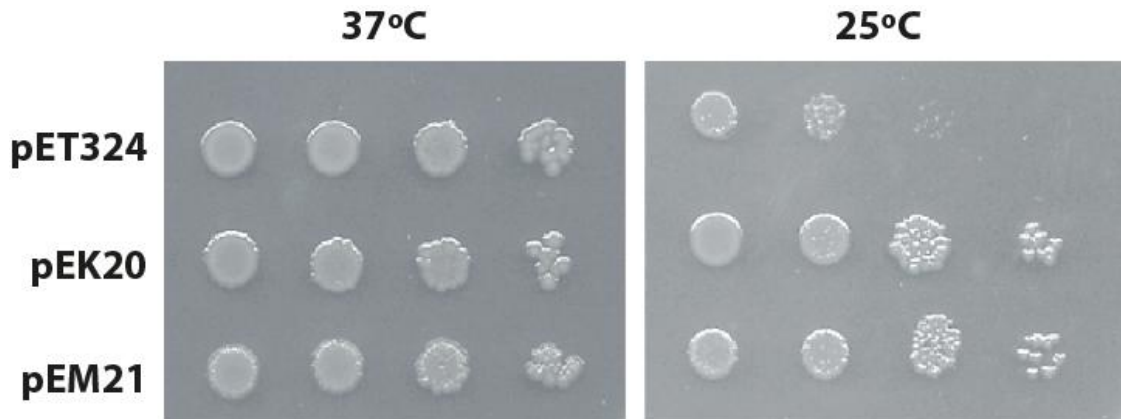


Figura 12. SecY conserva su función cuando FtsY está fusionada a su extremo carboxilo. La cepa TY22 con el plásmido vacío (pET324) o plásmidos expresando el complejo SEC (pEK20) o el plásmido que expresa la fusión SecY con FtsY (pEM21) se crecieron en medio líquido y muestras de una serie de diluciones 1:10 fueron colocadas en medio LB-ampicilina sólido a 37 o 25°C.

Para determinar si la proteína FtsY conserva sus funciones cuando se encuentra asociada permanentemente al complejo SEC, la fusión SecY-FtsY se transformó en la cepa IY28 de *E. coli* en la que el gen *ftsY* se encuentra regulado bajo el promotor de arabinosa (Luirink et al., 1994).

Se transformó la cepa IY28 con el plásmido vacío, el plásmido pFtsY-ANG que expresa a los tres dominios (A, N y G) del receptor FtsY, el plásmido pEK20 o el plásmido con la fusión Sec-FtsY (pEM21) y se evaluó su crecimiento en medio LB+arabinosa 0.2% y LB+glucosa 0.5% (Figura 13).

La cepa que contiene el plásmido vacío (pET324) funcionó como control; en esta se observó un crecimiento favorable en medio con arabinosa, y una inhibición del mismo en medio con glucosa debido a la represión de FtsY.

En el caso de las cepas que contenían al plásmido pFtsY-ANG o la fusión SecY-FtsY (pEM21), tanto en medio con glucosa como con arabinosa el crecimiento fue similar al control (en medio con glucosa), por lo que la FtsY-ANG y la fusión SecY-FtsY de los plásmidos de expresión son capaces de complementar la inhibición de FtsY. En el caso de la cepa transformada con el plásmido pEK20 no se observa complementación en medio con glucosa, ya que este plásmido es incapaz de

producir FtsY y por lo tanto no se puede suplir la ausencia de FtsY reprimido por glucosa.

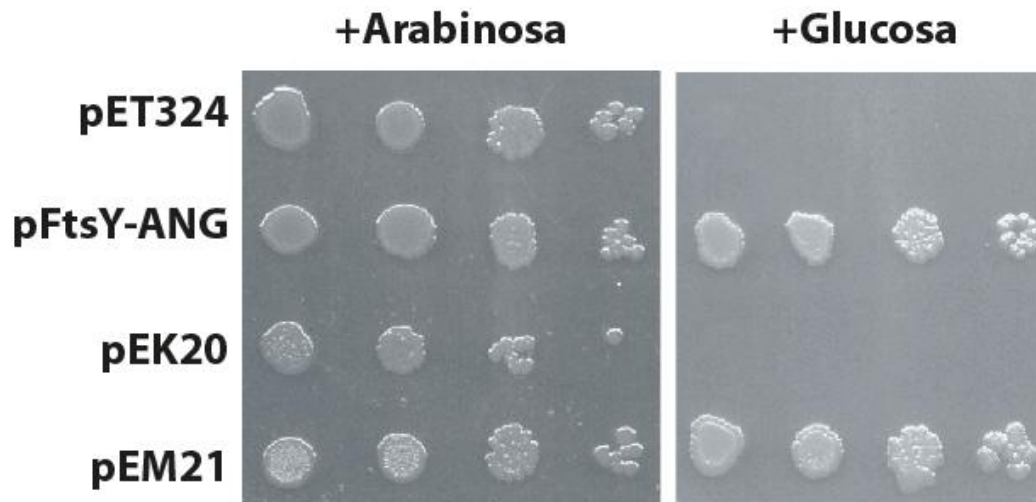


Figura 13. FtsY conserva su función cuando se encuentra anclada permanentemente al complejo SEC. La cepa IY28 con el plásmido vacío (pET324) o el plásmido expresando el receptor FtsY (pFtsY-ANG) o el complejo SEC (pEK20) o el complejo que expresa la fusión SecY con FtsY (pEM21) se creció en medio líquido y muestras de una serie de diluciones 1:10 fueron colocadas en medio LB-ampicilina-arabinosa y LB-ampicilina-glucosa sólido a 37°C.

El análisis funcional de la interacción entre SecY y FtsY muestra que el complejo quimérico SecY-FtsY es capaz de complementar la ausencia de SecY. Sin embargo, en la cepa TY22 sólo se puede regular la expresión de SecY y no la expresión de FtsY, por lo que se desconoce si el efecto de complementación observado sea debido a la fusión SecY-FtsY o a la presencia de FtsY endógena que se sigue sintetizando dentro de la célula (Figura 14, panel A).

Así mismo, los resultados obtenidos indican que FtsY conserva sus funciones cuando se encuentra anclado permanentemente al complejo SEC y es capaz de complementar la ausencia de FtsY. Sin embargo aún se desconoce el papel que juega el complejo SEC endógeno que se sigue sintetizando en la cepa IY28 de *E. coli* (Figura 14, panel C).

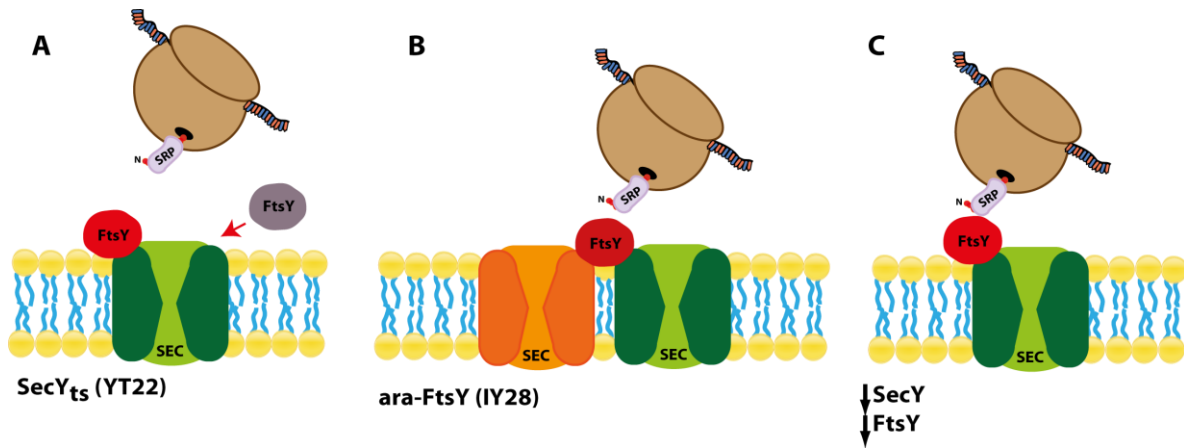


Figura 14. Análisis funcional de la fusión *secY-ftsY*. (A) La fusión SecY-FtsY (en verde y rojo) es capaz de complementar el crecimiento de la cepa TY22 donde SecY es inestable a bajas temperaturas. Sin embargo se desconoce el efecto de la proteína FtsY (en gris) endógena de la cepa TY22 al expresar la fusión *secY-ftsY*. (B) la fusión SecY-FtsY (en verde y rojo) es capaz de rescatar el fenotipo de crecimiento en medios con glucosa de la cepa IY28. Sin embargo, se desconoce el efecto de la proteína SecY (en naranja) endógena de la cepa IY28 al expresar la fusión *secY-ftsY*. (C) Para descartar la influencia de las proteínas endógenas, la expresión de la fusión *secY-ftsY* en una cepa doble mutante ($\downarrow\downarrow$) en donde sea posible regular la expresión de ambas proteínas, SecY y FtsY, permitirá evaluar de mejor manera la funcionalidad de la fusión.

3. Análisis funcional de las fusiones YidC-SecY y Sec-FtsY en mutantes dobles de *E. coli*

Para un estudio posterior, en el que se pretende determinar la función de las proteínas quiméricas YidC-SecY y Sec-FtsY en cepas de *E. coli* en donde se regule simultáneamente la expresión de las proteínas presentes en cada una de las fusiones, se utilizará el sistema de Recombinación Red de Fago Lamba (Datsenko y Wanner, 2000). Dicho sistema está basado en la sustitución por recombinación homóloga de un gen por un marcador de resistencia; en este caso se hará una modificación para que por recombinación homóloga se reemplace el gen endógeno de *secY* de las cepas IY28 y FTL10 (cepas en las que los genes *ftsY* y *yidC* respectivamente, se encuentran regulados bajo el control transcripcional de la proteína AraC; Hatzixanthis et al., 2003.) de *E. coli* por el gen *secY* termosensible de la cepa TY22 acoplado a un gen de resistencia a kanamicina.

3.1 Clonación del gen *secY_{ts}* en el plásmido pKD13

Para poder sustituir el gen endógeno *secY* de la cepa IY28 o FTL10 por el gen *secY_{ts}* y un marcador de resistencia a kanamicina se construyó de un fragmento de recombinación formado por el gen *secY_{ts}* y el gen *kan* del plásmido pKD13 (Datsenko et al., 2000) para poder seleccionar a la mutante por su resistencia al antibiótico kanamicina.

A partir de la cepa TY22 de *E. coli* en la que la expresión de la proteína SecY se inhibe a una temperatura de 25°C, se hizo una reacción de PCR de alta eficiencia utilizando los oligonucleótidos SecY-Sall F y SecY-SallR para amplificar la región en el genoma correspondiente al gen *secY_{ts}*. El producto de la reacción de PCR se separó en un gel de agarosa, obteniendo un fragmento de aproximadamente 1300 pb el cual se purificó utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos,).

Una vez purificado, el producto amplificado de *secY_{ts}* se digirió con la enzima de restricción Sall (NEB) para clonarse en el plásmido pKD13, previamente linearizado con la enzima de restricción Sall (NEB) y desfosforilado con Fosfatasa Alcalina de Ternero –CIP- (NEB).

Los productos de las reacciones de ligación fueron usados para transformar células de *E. coli* DH5α por choque térmico y la verificación de las colonias positivas a la reacción de ligación se hizo mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos SecY-H1 F y k1. Las colonias que resultaron positivas para la amplificación de un producto de aproximadamente 1826 pb correspondiente al fragmento *secY_{ts}-kan* fueron seleccionadas para extraer y purificar el plásmido utilizando un kit comercial (ver Materiales y Métodos, Midipreps).

Los plásmidos extraídos se sometieron a la misma reacción de PCR para corroborar la amplificación de un producto de aproximadamente 1826 pb (Figura 15, panel A). Al plásmido generado se le llamó pJL05 (Figura 15, panel B).

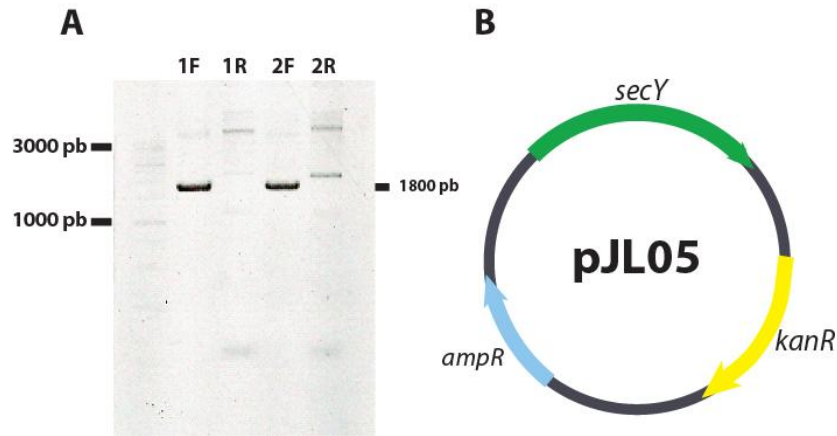


Figura 15. Amplificación del gen *secY_{ts}* clonado en el plásmido pKD13. (A) Se hicieron reacciones de PCR para dos muestras de plásmido utilizando dos juegos de oligonucleótidos, el primero con SecY-H1 F y k1 en donde se espera un fragmento de 1826 pb si *secY_{ts}* está clonado en la orientación correcta (1F y 2F), y el segundo con k1 y SecY-H2 R como reacción control negativa para la amplificación de *secY_{ts}* (1R y 2R). (B) Diagrama del plásmido pJL05 donde se muestra la clonación de *secY* en el plásmido pKD13.

3.2 Generación de fragmento de recombinación *secY_{ts}-kanr*

Mediante una reacción de PCR de alta fidelidad usando como templado el plásmido pJL05 y los oligonucleótidos SecY-H1 F y Kan-P1 L36 R se amplificó un producto de 2659 pb correspondiente al fragmento de recombinación *secY_{ts}-kan* el cual se separó en un gel de agarosa al 1.3% y se purificó utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la marca Promega.

3.3 Transformación de cepas IY28 y TY22 con el fragmento de recombinación *secY_{ts}-kan*

Para poder hacer la sustitución del gen *secY* endógeno de las cepas IY28 y FTL10 con el fragmento de recombinación *secY_{ts}-kanr* generado, es necesario transformar previamente dichas cepas con el plásmido pKD46, de expresión de la recombinasa Red que permite que el fragmento *secY_{ts}-kanr* recombine con el ADN genómico.

El plásmido pKD46 es un plásmido termosensible a 37°, por lo que el método de elección para su integración en las cepas IY28 y TY22 es la electroporación.

Actualmente nos encontramos estandarizando condiciones de transformación de la cepas IY28 y FTL10 por electroporación; se ha intentado insertar el plásmido pKD46 y el fragmento *secY_{ts}-kanr* tanto por transformación por choque térmico como por electroporación sin tener un resultado positivo hasta la fecha.

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La proteína quimérica sintetizada SecY-FtsY fue funcional *in vivo* en *E. coli*, y capaz de complementar tanto a SecY como a FtsY aunque de manera independiente.

En el caso de la proteína quimérica YidC-SecY aún falta determinar su función *in vivo*; se está revisando y corroborando la clonación en el vector de expresión pEM21 para su posterior transformación en la cepa FTL10 de *E. coli*, la cual tiene el gen *yidC* bajo el promotor *ara*.

Para evaluar de mejor manera estas interacciones funcionales se continuará con la construcción de proteínas quiméricas en un fondo mutante doble, que permita analizar la naturaleza de las interacciones entre las translocasas SecY y YidC, y entre el receptor FtsY y SecY; así como su capacidad en la translocación y ensamblaje de proteínas de membrana interna de *E. coli*.

Una vez evaluada su función, se evaluará la expresión y localización de las proteínas quiméricas por ensayos de tipo Western-blot con el fin de corroborar que las proteínas permanecen fusionadas y que su orientación en la membrana es correcta.

El objetivo a largo plazo será obtener la estructura por cristalografía de rayos X de cada una de las fusiones, con el fin de obtener un modelo que nos ayude a entender cómo es que las interacciones entre estas proteínas juegan un papel en la inserción cotraduccional en la membrana interna de *E. coli*.

VIII. APÉNDICE

Secuencia del gen *yidC* del plásmido pJL01

>NcoI
AT TCC ATG GAT TCG CAA CGC AAT CTT TTA GTC ATC GGT TTG CTG TTC GTG TCT TTC ATG ATC TGG CAA GCC TGG GAG CAG GAT AAA AAC CCG CAA CCT CA < 100
S M D S Q R N L L V I A L L F V S F M I W Q A W E O D K N P Q P Q
TA AGG TAC CTA AGC GTT GCG TTA GAA AAT CAG TAG CCA AAC GAC AAG CAC AGA AAG TAC TAG ACC GTT CCG ACC CTC CTC CTA TTT TTG GGC GTT GGA GT
10 20 30 40 50 60 70 80 90

G GCC CAA CAG ACC ACG CAG ACA ACG ACC ACC GCA GCG GGT AGC GCC GCC GAC CAG GGC GTA CCG GCC AGT GGC CAG GGG AAA CTG ATC TCG GTT AAG ACC < 200
A Q O T T Q T T T T A A A G S S A A A D Q G V P A S G Q G K L I S V K T
C CGG GTT GTC TGG TGC GTT GTC TGG TGG CGT GCG CCA TCG CCG GCG CTG CTC CCG CAT GGC CCG TCA CCG GTC CCC TTT GAC TAG AGC CAA TTC TGG
110 120 130 140 150 160 170 180

GAC GTG CTT GAT CTG ACC ATC AAC ACC CGT GGT GGT GAT GTT GAG CAG GCC CTG CTG CCG GCT TAC CCG AAA GAG CTG AAC TCT ACC CAG CCG TTC CAG C < 300
D V L D L T I N T R G G D V E Q A L L P A Y P K E I N S T Q P F Q L
CTG CAC GAA CTA GAC TGG TAG TTG TGG GCA CCA CTA CCA CTC GTC CCG GAC GGC CGA ATG GGC TTT CTC GAC TTG AGA TGG GTC GGC AAG GTC G
210 220 230 240 250 260 270 280 290

TG CTG GAA ACT TCA CCG CAG TTT ATT TAT CAG GCA CAG AGC GGT CTG ACC GGT GAT GGC CCG GAT AAC CCG GCT AAC GGC CCG CGT CCG CTA TAT AA < 400
L E T A S P Q F I Y O A Q S G L T G R D G P D N P A N G P R P L Y N
AC GAC CTT TGA ACT GAC GTC AAA TAA ATA GTC CGT GTC TGA ACT GAC CCA GAC TGG CCA GCA CTA CCG GGC CTA TTG GGC CGA TTG CCG GGC GCA GGC GAT ATA TT
310 320 330 340 350 360 370 380 390

C GTT GAA AAA GAC GCT TAT GTG CTG GCT GAA GGT CAA AAC GAA CTG CAG CTG CCG ATG ACG TAT ACC GAC GCG GCA GGC AAC ACG TTT ACC AAA ACG TTT < 500
V E K D A Y V L A E G Q N E L Q V P M T Y T D A A G N T F T K T F
G CAA CTT TTT CTG CGA ATA CAC GAC CGA CTT CCA GTT TTG CTT GAC GTC CAC GGC TAC TGC ATA TGG CTG CCG CGT CCG TTG TGC AAA TGG TTT TGC AAA
410 420 430 440 450 460 470 480 490

GTG CTG AAA CGT GGT GAT TAC GCT GTC AAC GTC AAC TAC AAC GTG CAG AAC GCT GGC GAG AAA CCG CTG GAA ATC TCC ACC TTT GGT CAG TTG AAG CAA T < 600
Y L K R R G D Y A V N V N Y N V Q N A G E K P L E I S T F G Q L K Q S
CAG GAC TTT GCA CCA CTA ATG CCA CAG TTG ATG TTG CAC GTC TTG CGA CCG CTC TTT GGC GAC CTT TAG AGG TGG AAA CCA GTC AAC TTC GTT A
510 520 530 540 550 560 570 580 590

CC ATC ACT CTG CCA CCG CAT CTC GAT ACC GGA AGC AGC AAC TTC GCA CTG CAC ACC TTC CGT GGT GCG GCG TAC TCC ACG CCT GAC GAG AAG TAC GAG AA < 700
I T L P P H L D T G S S N F A L H T F R R G A A Y S T P D E K Y E K
GG TAG TGA GAC GGT GGC GTA GAG CTA TGG CCT TCG TCG TTG AAG GCT GAC GTG TGG AAG GCA CCA CCG CGC ATG AGG TGC GGA CTG CTC TTC ATG CTC TT
610 620 630 640 650 660 670 680 690

A TAC AAA TTC GAT ACC ATT GCC GAT AAC GAA AAC CTG AAC ATC TCT TCG AAA GGT GGT TGG GTG GCA ATG CTG CAA CAG TAT TTC GCG ACG GCG TGG ATC < 800
Y K F D T I A D N E N L N I S S K G S W V A M L Q Q Y F A T A W I
T ATG TTT AAG CTA TGG TAA CCG CTA TTG CTT TTG GAC TTG TAG AGA AGC TTT CCA CCA ACC CAC CGT TAC GAC GTT GTC AEA AAG CCG TGC GCG ACC TAG
710 720 730 740 750 760 770 780 790

CCG CAT AAC GAC GGT ACC AAC AAC TTC TAC ACC GCT AAT CTG GGT AAC GGC ATC GCC GCT ATC GGC TAT AAA TCT CAG CCG GEA CTG GTT CAG CCT GGT C < 900
P H N D G T N N F Y T A N L G N G I A A I G Y K S Q P V L V Q P G O
GGC GTA TTG CTG CCA TGG TTG AAG ATG TGG CGA TTA GAC CCA TTG CCG TAG CCG CGA TAG CCG ATA TTT AGA GTC GGC CAT GAC CAA GTC GGA CCA G
810 820 830 840 850 860 870 880 890

AG ACT GGC GCG ATG AAC AGC ACC CTG TGG GTT GGC CCG GAA ATT CAG CAG AAA ATG GCA GCT GTT GCT CCG CAC CTG GAT CTG ACC GTT GAT TAC GGT TG < 1000
T G A M N S T L W V G P E I Q D K M A A V A P H L D L T V D Y G W
TC TGA CCG CCG TAC TTG TCG TGG GAC ACC CAA CCG GGC CTT TAA GTC CTC TTT TAC CGT CCA CAA CCA GGC GTG GAC CTA TGG CAA CTA ATG CCA AC
910 920 930 940 950 960 970 980 990

G TTG TGG TTC ATC TCT CAG CCA CTG TTC AAA CTG CTG AAA TGG ATC CAT AGC TTT GTG GGT AAC TGG GGC TTC TCC ATT ATC ATC ATC ACC TTT ATC GTT < 1100
L W F T S Q P L F K L L K W I H S F V G N W G F S I I I I T F I V
C AAC ACC AAG TAG AGA GTC GGT GAC AAG TTT GAC GAC TTT ACC TAG GTA TCG AAA CAC CCA TTG ACC CCG AAG AGG TAA TAG TAG TAG TGG AAA TAG CAA
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

>NcoI
CGT GGC ATC ATG TAC CCG CTG ACC AAA GCG CAG TAC ACC TCC ATG CCG AAG ATG CAG CCA ATG CCG GAT GAT TAC GGT TG < 1200
R G I M Y P L T K A Q Y T S M A K M R M L Q P K I Q A M R E R L G D
GCA CCG TAG TAC ATG GGC GAC TGG TTT GCG GTC ATG TGG AGG TAC CCG TTT TAC TAC GAC GTC GGC TTC TAA GTC CGT TAC GCA CTC GCA GAC CCG C
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

AT GAC AAA CAG CCG ATA AGC CAG GAA ATG ATG GCG CTG TAC AAA GCT GAG AAG GTT AAC CCG CTG GGC GGC TGC TTC CCG CTG CTG ATC CAG ATG CCA AT < 1300
D K Q R I S Q E M M A L Y K A E K V N P L G G C F P L L I Q O M P I
TA CTG TTT GTC CCG TAT TCG GTC CTT TAC TAC CCG GAC ATG TTT CGA CTC TTC CAA TTG GGC GAC CCG CCG ACG AAG GGC GAC GAC TAG GTC TAC GGT TA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

C TTC CTG CCG TAC TAC ATG CTG ATG GGT TCC GTT GAA CTA CGT CAG GCA CCG TTT GCA CTG TGG ATC CAC CTG TCT GCA CAG CAG CCG TAC TAC < 1400
F L A L Y Y M L M G S V E L R O A P F A L W I H D L S A O D P Y Y
G AAG GAC CCG AAC ATG ATG TAC GAC TAC CCA AGG CAA CTT GAT GCA GTC CGT GGC AAA CGT GAC ACC TAG GTG CTG GAC AGA CGT GTC CTG GGT ATG AG
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

ATC CTG CCG ATC CTG ATG GGC GTA ACG ATG TTC TTC ATT CAG AAG ATG TCG CCG ACC ACT GTG ACC GAC CCG ATG CAG CAG AAG ATC ATG ACC TTT ATG C < 1500
I L P I L M G V T M P F I O K M S P T T V T D P M Q O K I M T F M P
TAG GAC GGC TAG GAC TAC CCG CAT TGC TAC AAG AAG TAA GTC TTC TAC AGC GGC TGG TGA CAC TGG CTG GGC TAC GTC TTC TAG TAC TGG AAA TAC G
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

CG GTC ATC TTC ACT GTG TTC TTC CTG TGG TTC CCG TCA GGT CTG GTG CTG TAC TAT ATC GTC AGC AAC CTG GTA ACC ATT ATT CAG CAG CAG CTG ATT TA < 1600
V I F T V F F L W F P S G L V L Y Y I V S N L V T I I Q O L I I
GC CAG TAG AAG TGA CAC AAG AAG GAC ACC AAG GCG AGT CCA GAC CAC GAC ATG ATA TAG CAG TCG TTG GAC CAT TGG TAA TAA GTC GTC GAC TAA AT
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

C CGT GGT CTG GAA AAA CCG GTC CAT AGC CCG CAG AAG AAA AAC TCC A < 1650
R G L E K R G L H S R E K K S
G GCA CCA GAC CTT TTT GCA CCG AAC GTA TCG GCG CTC TTC TTT TTT AGG T
1610 1620 1630 1640

Secuencia del gen *yidC* del plásmido pJL02

>NcoI

AT TCC ATG GAT TCG CAA CGC AAT CTT TTA GTC ATC GCT TTG CTG TTC GTG TCT TTC ATG ATC TGG CAA GCC TGG GAG CAG GAT AAA AAC CCG CAA CCT CA < 100
 S M D S Q R N L L V I A L L F V S F M I W Q A W E Q D K N P Q P Q
 TA AGG TAC CTA AGC GTT GCG TTA GAA AAT CAG TAG CGA AAC GAC AAG CAC AGA AAG TAC TAG ACC GTT CCG ACC CTC GTC CTA TTT TGG GGC GTT GGA GT
 10 20 30 40 50 60 70 80 90

G GCC CAA CAG ACC ACG CAG ACA ACG ACC ACC GCA GCG GGT AGC GCC GCC CAG CAG GGC GTA CCG GCC AGT GGC CAG GGG AAA CTG ATC TCG GTT AAG ACC < 200
 A Q Q T T Q T T T T T A A G S A A D Q G V P A S G Q G K L I S V K T
 C CGG GTT GTC TGG TGC TGT TGT TGC TGG TGG CGT CGC CCA TCG CCG CGG CGG GTC CCG CAT GGC CGG TCA CCG GTC CCC TTT GAC TAG AGC CAA TTC TGG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190

GAC CTG CTT GAT CTG ACC ATC AAC ACC CGT GGT GAT GTT GAG CAG GCC CTG CTG CCG GCT TAC CCG AAA GAG CTG AAC TCT ACC CAG CCG TTC CAG C < 300
 D V L D L T I N T R G G D V E Q A C A L L P A V P K E L N S T Q P F Q L
 CTG CAC GAA CTA GAC TGG TAG TTG TGG GCA CCA CTA CAA CTC GTC CGG GAC GAC GGC CGA ATG GGC TTT CTC GAC TTG GAA TGG GTC GGC AAG GTC G
 210 220 230 240 250 260 270 280 290

TG CTG GAA ACT TCA CCG CAG TTT ATT TAT CAG GCA CAG AGC GGT CTG ACC GGT GAT GGC CCG GAT AAC CCG GCT AAC GGC CCG CGT CCG CTA TAT AA < 400
 L E T S P Q P I Y O A Q S G L T G R D G P D N P A N G P R P L Y N
 AC GAC CTT TGA AGT GGC CTC AAA TAA ATA GTC CGT GTC TCG CCA GAC TGG CCA CCA CTA CCG GGC CTA TTG GGC CGA TTG CCG GGC GCA GGC GAT ATA TT
 310 320 330 340 350 360 370 380 390

C GTT GAA AAA GAC GCT TAT CTG CTG GCT GAA GGT CAA AAC GAA CTG CAG GTG CCG ATG ACG TAT ACC GAC GCG GCA GCC AAC ACG TTT ACC AAA ACG TTT < 500
 V E K D A Y V L A E G Q N E L Q V P M T Y T D A A G N T F T K T F
 G CAA CTT TTT CTG CGA ATA CAC GAC CCA CTT CCA GTT TTG CTT GAC GTC CAC GGC TAC TGG CTA TGG CTG CCG CGT CCG TTG TGC AAA TGG TTT TGC AAA
 410 420 430 440 450 460 470 480 490

GTC CTG AAA CGT GGT GAT TAC GCT GTC AAC GTC AAC TAC AAC GTG CAG AAC GGT GGC GAG AAA CCG CTG GAA ATC TCC ACC TTT GGT CAG TTG AAG CAA T < 600
 V L K R E D Y A V N V N Y N V Q N A G E K P L E I S T F G Q L K Q S
 CAG GAC TTT CCA CCA CTA ATG CGA CAG TTG ATG TTG CAC GTC TTG CGA CCG CTC TTT GGC GAC CTT TAG AGG TGG AAA CCA GTC AAC TTC GTT A
 510 520 530 540 550 560 570 580 590

CC ATC ACT CTG CCA CCG CAT CTC GAT ACC GGA AGC AGC AAC TTC GCA CTG CAC ACC TTC CGT GGT GCG GCG TAC TCC ACG CCT GAC GAG AAG TAC GAG AA < 700
 I T L P P H L D T G S S N F A L H T F R G A A Y S T P D E K Y E K
 GG TAG TGA GAC GGT GGC GTA GAG CTA TGG CTT TCG TCG TTG AAG CGT GAC GTG TGG AAG GCA CCA CGC CGC ATG AGG TGC GGA CTG CTC TTC ATG CTC TT
 610 620 630 640 650 660 670 680 690

A TAC AAA TTC GAT ACC ATT GCC GAT AAC GAA AAC CTG AAC ATC TCT TCG AAA GGT GGT TGG GTG GCA ATG CTG CAA CAG TAT TTC GCG ACG GCG TGG ATC < 800
 Y K F D T I A D N E N L N I S S K G G W V A M L Q Q Y F A T A W I
 T ATG TTT AAG CTA TGG TAA CCG CTA TTG CTT TTG GAC TTG TAG AGA AGC TTT CCA CCA ACC CAC CGT TAC GAC GTT GTC ATA AAG CGC TGC CGC ACC TAG
 710 720 730 740 750 760 770 780 790

CCG CAT AAC GAC GGT ACC AAC AAC TTC TAC ACC GCT AAT CTG GGT AAC GGC AEC GGC GCT ATC GGC TAT AAA TCT CAG CCG GTA CTG GTT CAG CCT GGT C < 900
 P H N D S T N N F Y T A N L G N G I A A I G Y K S Q P V L V Q P G Q
 GGC GTA TTG CTG CCA TGG TTG TTG AAG ATG TGG CGA TTA GAC CCA CTG CCG TAG CCG CGA TAG CCG ATA TTT AGA GTC GTC CAT GAC CAA GTC GGA CCA G
 810 820 830 840 850 860 870 880 890

AG ACT GGC GCG ATG AAC AGC ACC CTG TGG GTT GCG GAA ATT CAG GAC AAA ATG GCA GCT GTT GCT CCG CAC CTG GAT CTG ACC GTT GAT TAC GGT TG < 1000
 T G A M N S T L W V G P E I Q D R M A A P H L D L T V D Y G W
 TC TGA CUG CUC CTA TTG TCG TGG GAC ACU CAA CUG GGC CTT TAA GTC CTG TTT TAC CGT CCA CAA CAA GGC CUG GAC CTA GAC TGG CAA CTA ATG CCA AC
 910 920 930 940 950 960 970 980 990

G TTG TGG TCT ATC TCT CAG CCA CTG TTC AAA CTG CTG JAA TGG ATC CAT AGC TTT GTG GGT AAC TGG GGC TTC TCC ATT ATC ATC ACC TTT AEC GTT < 1100
 L W P I S Q P L F K L L K W I H S F V G N W G F S I I I I T F I V
 C AAC ACC AAG TAG AGA GCT GGT GAG AAG TTT GAC GAC TTT ACC TAG GTA TCG AAA CAC CCA TTG ACC CCG AAG AGG TAA TAG TAG TAG TGG AAA TAG CAA
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

+Mutacin Puntsal

CGT GGC ATC ATG TAC CCG CTG ACC AAA GCG CAG TAC ACC TCG ATG GCG AAG ATG CGT ATG CTG CAG CCG AAG ATT CAG GCA ATG COT GAG CGT CTG GGC G < 1200
 R G I M Y C L T K A Q Y T S M A K M R M L Q P K I Q A M R E R L G D
 GCA CCG TAG TAC ATG GGC GAC TGG TTT CCG GTC ATG TGG AGC TAC CCG TTC TAC GCA TAC GAC GTC GGC TTC TAA GTC COT TAC GCA CTC GCA GAC CCG C
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

AT GAC AAA CAG CCG ATA AGC CAG GAA ATG ATG GCG CTG TAC AAA GCT GAG AAG GTT AAC CCG CTG GGC GGC TGC TTC CCG CTG CTG ATC CAG ATG CCA AT < 1300
 D K Q R I S Q E M M A L Y K A E K V N P L G G C F P L L I Q M P I
 TA CTG TTT GTC GCG TAT TCG CTT TAC TAC CGC GAC ATG TTT CGA CTC TTC CAA TTG GGC GAC CCG CCG ACG AAG GGC GAC GAC TAG CTC TAC GST TA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

C TTC CTG GCG TTG TAC TAC ATG CTG ATG GGT TCC GTT GAA CTA COT CAG GCA CCG TTT GCA CTG TGG ATC CAC GAC CTG TCT GCA GAC GAC CCG TAC TAC < 1400
 F L A L Y Y M L M G S V E L R Q A P F A L W I H D L S A Q D F Y Y Y
 G AAG GAC CCG AAC ATG ATG TAC GAC TAC CCA AGG CAA CTT GAT GCA GTC COT GGC AAA COT GAC ACC TAG GTG CTG GAC AGA COT GTC CTG GCG ATG ATG
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

ATC CTG CCG ATC CTG ATG GGC GTA ACG ATG TTC TTC ATT CAG AAG ATG TCG CCG ACC ACT GTG ACC GAC CCG ATG CAG CAG AAG ATC ATG ACC TTT ATG C < 1500
 I F I M G V F M P F I Q K M S D T T V T D P M O C K T M T F M P
 TAG GAC GGC TAG GAC TAC CCG CAT IGC TAC AAG AAG TAA GTC TTC TAC ACG GCG TGG TGA CAC TGG CTG GGC TAC GTC CTC TTC TAG TAC TGG AAA TAC G
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490

CG GTC ATC TTC ACT GTG TTC TTC CTG TGG TTT CCG TCA GGT CTG GTG CTG TAC TAT ATC GTC AGC AAC CTG GTA ACC ATT ATT CAG CAG CAG CTG ATT TA < 1600
 V I F T V P F L W F P S G L V L Y Y I V S N L V T I I I Q O Q L I Y
 GC CAG TAG AAG TGA CAC AAG AAG GAC ACC AAG GGC AGT CCA GAC CAC GAC ATG ATA TAG CAG TCG TTG GAC CAT TGG TAA TAA GTC GTC CTC GAC TAA AT
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

C CGT GGT CTG GAA AAA COT GGC TTT CAT AGC CCG GAG AAG AAA AAA TCC A < 1650
 R G L E K R G L H S R E X K K S
 G GCA CCA GAC CTT TTT GCA CCG AAD GTA TCG GCG CTC TTC TTT TTT AGG T
 1610 1620 1630 1640

Secuencia del gen *yidC* del plásmido pJL03.1 para determinar sitio de Sitio de NcoI

```

      >NcoI
TGG GTA CCG GCC ATG GAT TCG CAA CGC AAT CTT TTA GTC ATC GCT TTG CTG TTC GTG TCT TTC ATG ATC TGG CAA GCC TGG GAG CAG GAT AAA AAC CCG C < 100
W V P A M D S Q R N L L V I A L L F V S F M I W Q A W E Q D K N P Q
ACC CAT GGC CGG TAC CTA AGC GGT GCG TTA GAA AAT CAG TAG CGA AAC GAC AAG CAC AGA AAG TAC TAG ACC GTT CGG ACC CTC GTC CTA TTT TTG GGC G
      10      20      30      40      50      60      70      80      90

AA CCT CAG GCC CAA CAG ACC ACG CAG ACA ACG ACC ACC GCA GCG GGT AGC GCC GCC GAC CAG GGC GTA CCG GCC AGT GGC CAG GGG AAA CTG ATC TCG GT < 200
P Q A Q Q T T Q T T T T A A G S A A A D Q G V P A S G Q G K L I S V
TT GGA GTC CGG GTT GTC TGG TGC GTC TGT TGC TGG TGG CGT CGC CCA TCG CGG CGG CTG GTC CCG CAT GGC CGG TCA CCG GTC CCC TTT GAC TAG AGC CA
      110      120      130      140      150      160      170      180      190

T AAG ACC GAC GTG CTT GAT CTG ACC ATC AAC ACC CGT GGT GGT GAT GTT GAG CAA GCT CTG CTG CCT GCT TAC CCG AAA GAG CTG AAC TCT ACC CAG CCG < 300
K T D V L D L T I N T R G G D V E Q T A L L P A Y P K E L N S T Q P
A TTC TGG CTG CAC GAA CTA GAC TGG TAG TGG TGG GCA CCA CCA CTA CAA CTC GTT CGA GAC GAC GGA CGA ATG GGC TTT CTC GAC TTG AGA TGG GTC GGC
      210      220      230      240      250      260      270      280      290

TTC CAG CTG TTG GAA ACT TCA CCG CAG TTT ATT TAT CAG GCA CAG AGC GGT CTG ACC GGT CGT GAT GGC CCG GAT AAC CCG GCT AAC GGC CCG CGT CCG C < 400
F Q L L E T S F Q F I Y Q A Q S G L Q V P M T Y T D A A G N T F T K
AAG GTC GAC AAC CTT TGA AGT GGC GTC AAA TAA ATA GTC CGT GTC TCG CCA GAC TGG CCA GCA CTA CCG GGC CTA TTG GGC CGA TTG CCG GGC GCA GGC G
      310      320      330      340      350      360      370      380      390

TG TAT AAC GTT GAA AAG GAC GCT TAT GTG CTG GCT GAA GGT CAA AAC GGA CTG CAG GTG CCG ATG ACG TAT ACC GAC GCG GCA GGC AAC ACG TTT ACC AA < 500
Y N V E K D A Y V L A E G Q N G L Q V P M T Y T D A A G N T F T K
AC ATA TTG CAA CTT TTC CTG CGA ATA CAC GAC CGA CTT CCA GTT TTG CCT GAC GTC CAC GGC TAC TGC ATA TGG CTG CCG CGT CCG TGC AAA TGG TT
      410      420      430      440      450      460      470      480      490

A ACG TTT GTC CTG AAA CGT GGT GAT TAC GCT GTC AAC GTC AAC TAC AAC GTG CAG AAC GCT GGC GAG AAA CCG CTG GAA ATC TCC TCG TTT GGT CAG TTG < 600
T F V L K R G D Y A V N V N Y N V Q N A G E K P L E T S S F G Q L
T TGC AAA CAG GAC TTT GCA CCA CTA ATG CGA CAG TTG CAG TTG ATG TTG CAC GTC TTG CGA CCG CTC TTT GGC GAC CTT TAG AGG AGC AAA CCA GTC AAC
      510      520      530      540      550      560      570      580      590

AAG CAA TCC ATC ACT CTG CCA CCG CAT CTC GAT ACC GGA AGC A < 643
K Q S I T L P P H L D T G S
TTC GTT AGG TAG TGA GAC GGT GGC GTA GAG CTA TGG CCT TCG T
      610      620      630      640

```

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baba, T., Jacq, A., Brickman, E., Beckwith, J., Taura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y., et al. (1990). Characterization of cold-sensitive *secY* mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172(12), 7005–7010.

Bahari, L., Parlitz, R., Eitan, A., Stjepanovic, G., Bochkareva, E. S., Sinning, I., y Bibi, E. (2007). Membrane targeting of ribosomes and their release require distinct and separable functions of FtsY. *The Journal of biological chemistry*, 282(44), 32168–32175.

Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J., y Müller, M. (2000). Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *The EMBO journal*, 19(1), 134–143.

Bibi, Eitan. (2011). Early targeting events during membrane protein biogenesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(3), 841–850.

Bol, R., de Wit, Janny G, y Driessen, A. J. M. (2007). The active protein-conducting channel of *Escherichia coli* contains an apolar patch. *The Journal of biological chemistry*, 282(41), 29785–29793.

Breukink, E., Nouwen, N., van Raalte, A., Mizushima, S., Tommassen, J., y de Kruijff, B. (1995). The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. *The Journal of biological chemistry*, 270(14), 7902–7907.

Breyton, C., Haase, W., Rapoport, Tom A, Kühlbrandt, W., y Collinson, I. (2002). Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature*, 418(6898), 662–665.

Cannon, K. S., Or, E., Clemons, W. M., Shibata, Y., y Rapoport, Tom A. (2005). Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *The Journal of cell biology*, 169(2), 219–225.

Chen, M., Xie, K., Jiang, F., Yi, L., y Dalbey, R. E. (2002). YidC, a newly defined evolutionarily conserved protein, mediates membrane protein assembly in bacteria. *Biological chemistry*, 383(10), 1565–1572.

Datsenko, K. A., y Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.

de Gier, J.-W. L., y Luirink, Joen. (2003). The ribosome and YidC. New insights into the biogenesis of *Escherichia coli* inner membrane proteins. *EMBO reports*, 4(10), 939–943.

Doudna, J. A., y Batey, R. T. (2004). Structural insights into the signal recognition particle *Annual review of biochemistry*, 73, 539–557.

Driessen, A. J. M. (1992). Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *The EMBO journal*, 11(3), 847–853.

Driessen, A. J. M. (1993). SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is functional as a dimer. *Biochemistry*, 32(48), 13190–13197.

Driessen, A. J. M. (2005). Cell biology: two pores better than one. *Nature*, 438(7066), 299–300.

Driessen, A. J. M., y Nouwen, Nico. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual review of biochemistry*, 77, 643–667.

du Plessis, D. J. F., Berrelkamp, G., Nouwen, Nico, y Driessen, A. J. M. (2009). The lateral gate of SecYEG opens during protein translocation. *The Journal of biological chemistry*, 284(23), 15805–15814.

du Plessis, D. J. F., Nouwen, Nico, y Driessen, A. J. M. (2011). The Sec translocase. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(3), 851–865.

Duong, F, y Wickner, W. (1997). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *The EMBO journal*, 16(16), 4871–4879.

Economou, A. (2008). Structural biology: Clamour for a kiss *Nature*, 455(7215), 879–880.

Erez, E., Stjepanovic, G., Zelazny, A. M., Brugger, B., Sinning, I., y Bibi, E. (2010). Genetic evidence for functional interaction of the *Escherichia coli* signal recognition particle receptor with acidic lipids in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 285(52), 40508–40514.

Estrozi, L. F., Boehringer, D., Shan, S.-O., Ban, N., y Schaffitzel, C. (2011). Cryo-EM structure of the *E. coli* translating ribosome in complex with SRP and its receptor. *Nature structural y molecular biology*, 18(1), 88–90.

Fekkes, P., van der Does, C., y Driessen, A. J. (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *The EMBO journal*, 16(20), 6105–6113.

Funes, S., Kauff, F., van der Sluis, E. O., Ott, M., y Herrmann, J. M. (2011). Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biological chemistry*, 392(1-2), 13–19.

Gu, S.-Q., Peske, F., Wieden, H.-J., Rodnina, M. V., y Wintermeyer, W. (2003). The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the *Escherichia coli* ribosome. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(5), 566–573.

Hatzixanthis, K., Palmer, T., y Sargent, F. (2003). A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Molecular microbiology*, 49(5), 1377–1390.

Hesterkamp, T., Hauser, S., Lütcke, H., y Bukau, B. (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(9), 4437–4441.

Imhof, N., Kuhn, A., y Gerken, U. (2011). Substrate-dependent conformational dynamics of the *Escherichia coli* membrane insertase YidC Biochemistry, 50(15), 3229–3239.

Junne, T., Schwede, T., Goder, V., y Spiess, M. (2006). The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. Molecular biology of the cell, 17(9), 4063–4068.

Knoblauch, N. T., Rüdiger, S., Schönfeld, H. J., Driessen, A. J., Schneider-Mergener, J., y Bukau, B. (1999). Substrate specificity of the SecB chaperone. The Journal of biological chemistry, 274(48), 34219–34225.

Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., y Ban, N. (2009). YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. Molecular cell, 34(3), 344–353.

Kol, Stefan, Nouwen, Nico, y Driessen, A. J. M. (2008). Mechanisms of YidC-mediated insertion and assembly of multimeric membrane protein complexes. The Journal of biological chemistry, 283(46), 31269–31273.

Li, W., Schulman, S., Boyd, D., Erlandson, K., Beckwith, J., y Rapoport, T. A. (2007). The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *Molecular cell*, 26(4), 511–521.

Luirink, J, Hagen-Jongman, ten, C. M., van der Weijden, C. C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B., y Kusters, R. (1994). An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *The EMBO journal*, 13(10), 2289–2296.

Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. (P. Education, Ed.) (10th ed. p. 1011).

Maillard, A. P., Lalani, S., Silva, F., Belin, D., y Duong, Franck. (2007). Deregulation of the SecYEG translocation channel upon removal of the plug domain. *The Journal of biological chemistry*, 282(2), 1281–1287.

Manning, S. D. (2010). *Escherichia coli* Infections. In I. Publishing (Ed.), *Deadly Diseases and Epidemics* (2nd ed.). Chelse House.

Matsuyama, S., Fujita, Y., y Mizushima, S. (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 12(1), 265–270.

Ménétrez, J.-F., Hegde, R. S., Heinrich, S. U., Chandramouli, P., Ludtke, S. J., Rapoport, T. A., y Akey, C. W. (2005). Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *Journal of molecular biology*, 348(2), 445–457.

Merz, F., Boehringer, D., Schaffitzel, C., Preissler, S., Hoffmann, A., Maier, T., Rutkowska, A., et al. (2008). Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome. *The EMBO journal*, 27(11), 1622–1632.

Moat, A. G., Foster, J. W., y Spector, M. P. (2002). *Microbial Physiology*. (Wiley-Liss, Ed.) (4th ed.). John Wiley & Sons, INC.

Mothes, W., Prehn, S., y Rapoport, T. A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *The EMBO journal*, 13(17), 3973–3982.

Neumann-Haefelin, C., Schäfer, U., Müller, M., y Koch, H. G. (2000). SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *The EMBO journal*, 19(23), 6419–6426.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., y Heijne, von, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering*, 10(1), 1–6.

Nishiyama, K., Kabuyama, Y., Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H., y Mizushima, S. (1991). SecY is an indispensable component of the protein secretory machinery of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1065(1), 89–97.

Nishiyama, K., Suzuki, T., y Tokuda, H. (1996). Inversion of the membrane topology of SecE coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell*, 85(1), 71–81.

Nouwen, Nico, y Driessen, A. J. M. (2005). Inactivation of protein translocation by cold-sensitive mutations in the *yajC-secDF* operon. *Journal of bacteriology*, 187(19), 6852–6855.

Oliver, D. C., y Paetzel, M. (2008). Crystal structure of the major periplasmic domain of the bacterial membrane protein assembly facilitator YidC. *The Journal of biological chemistry*, 283(8), 5208–5216.

Osman, C., Merkwirth, C., y Langer, T. (2009). Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *Journal of cell science*, 122(Pt 21), 3823–3830.

Potting, C., Wilmes, C., Engmann, T., Osman, C., y Langer, T. (2010). Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *The EMBO journal*, 29(17), 2888–2898.

Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T A, Hartmann, E., y Kalies, K. U. (2000). Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *The EMBO journal*, 19(8), 1900–1906.

Raden, D., Song, W., y Gilmore, R. (2000). Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *The Journal of cell biology*, 150(1), 53–64.

Rapoport, Tom A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), 663–669.

Seluanov, A., y Bibi, E. (1997). FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins. *The Journal of biological chemistry*, 272(4), 2053–2055.

Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., y Kuhn, A. (2004). *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *The EMBO journal*, 23(2), 294–301.

Sianidis, G., Karamanou, S., Vrontou, E., Boulias, K., Repanas, K., Kyrpides, N., Politou, A. S., et al. (2001). Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *The EMBO journal*, 20(5), 961–970.

Sussman, M. (1997). *Escherichia coli*. Mechanisms of Virulence. (Cambridge University Press, Ed.) (p. 639).

Ullers, R. S., Houben, E. N. G., Raine, A., Hagen-Jongman, ten, C. M., Ehrenberg, M., Brunner, J., Oudega, B., et al. (2003). Interplay of signal recognition particle and trigger factor at L23 near the nascent chain exit site on the *Escherichia coli* ribosome. *The Journal of cell biology*, 161(4), 679–684.

Van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., y Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel *Nature*, 427(6969), 36–44.

van der Laan, Martin, Bechtluft, P., Kol, Stef, Nouwen, Nico, y Driessen, A. J. M. (2004). F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *The Journal of cell biology*, 165(2), 213–222.

van der Laan, M, Houben, E. N., Nouwen, N, Luirink, J, y Driessen, A. J. (2001). Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO reports*, 2(6), 519–523.

van der Sluis, E. O., Nouwen, N., y Driessen, A. J. M. (2002). SecY-SecY and SecY-SecG contacts revealed by site-specific crosslinking *FEBS letters*, 527(1-3), 159–165.

van der Sluis, E. O., y Driessen, A. J. M. (2006). Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria. *Trends in microbiology*, 14(3), 105–108.

van der Wolk, J. P., de Wit, J G, y Driessen, A. J. (1997). The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *The EMBO journal*, 16(24), 7297–7304.

von Heijne, G. (1986). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology *The EMBO journal*, 5(11), 3021–3027.

von Loeffelholz, Otilie, Botte, Matthieu, and Schaffitzel, Christiane (2011) *Escherichia coli* Cotranslational Targeting and Translocation. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Weiner, Joel H, and Rothery, Richard A (2007) *Bacterial Cytoplasmic Membrane*. In: eLS. John Wiley y Sons Ltd, Chichester.

Xie, K., y Dalbey, R. E. (2008). Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nature reviews. Microbiology*, 6(3), 234–244.

Zhang, X., Kung, S., y Shan, S.-O. (2008). Demonstration of a multistep mechanism for assembly of the SRP x SRP receptor complex: implications for the catalytic role of SRP RNA *Journal of molecular biology*, 381(3), 581–593.

Zimmer, J., Nam, Y., y Rapoport, Tom A. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*, 455(7215), 936–943.