



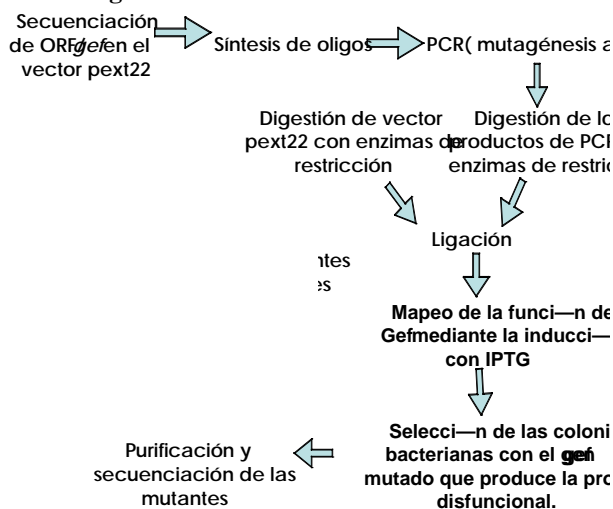
Determinación de la asociación estructura-función de la proteína tóxica Gef

Pablo Benjamín León Rosario y Gabriel Del Río Guerra. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Ciudad Universitaria s/n CP. 04510, México DF. Fax 56225630, ce: ponyfonos@yahoo.com.mx

Palabras clave: gen *gef*, Proteína Gef, muerte celular programada (MCP).

Introducción. En este estudio nos enfocamos en un sistema de muerte celular programada de tipo toxina-antitoxina poco explorado presente en *E.coli*. De este sistema nos hemos centrado en el gen *gef*, el cual codifica para la proteína toxica Gef, que consta de 50 aminoácidos (Poulsen *et al.*, 1991a). Gef es una proteína dimérica de membrana citoplasmática, con su extremo N-terminal en el espacio citoplásmico y el extremo C-terminal en el espacio periplásmico. El dímero de Gef se estabiliza mediante un puente disulfuro. Solo mutaciones reportadas en la porción periplásmica (porción C-terminal) previenen la acción tóxica de Gef, indicando que esta región y no el N-terminal, contiene al dominio tóxico de la proteína. Sin embargo, no se ha descrito la relevancia de la toxicidad de Gef *in vivo*. Para abordar este problema, estudiaremos la relación estructura-función de Gef mediante mutagénesis al azar y su expresión en *E. coli* y células eucariotas.

Metodología.



Mut3 inserta 5 aminoácidos al extremo N-terminal de Gef, y al mismo tiempo elimina 14 aminoácidos del Gef largo. Gef esta inmerso en un ORF de 210 nucleótidos e incluye 3 ATG y 2 sitios de unión a ribosoma bacterianos (RBS). El primer RBS precede a Gef-largo y el segundo RBS al Gef reportado. En curvas de crecimiento de *E. coli* expresando a Gef y Gef largo silvestres observamos que Gef es más tóxico que Gef largo. Nuestros datos sugieren una regulación post-trascricional de la actividad de Gef y muestran que la función tóxica de Gef largo está codificada en el N-terminal.

orf/gef	MLNTRCVPLDRKVKKEKRAMKQHKAMIVALVICITAVVAALVTRKDLCEVHI RTGQTEVAVFTAYESE-COOH
Mut 1	MLNTRCVPLPDRKVKKEKRAMKQHKAMIVALVICITAVVAALVTRKDLCEVHI RTGQTEVAVFTAYESE-COOH
Mut 2	MLNTRCVPLDRKVKKEKRAMKQHKAMIVALDICITAVVAALVTRKDLCEVHI RTGQTEVAVFTAYESE-COOH
Mut 3	KEKRAMKQHKAMIVALVICITAVVAALVTRKDLCEVHI RTGQTEVAVFTAYESE-COOH

Se muestra la secuencia de aminoácidos de las mutantes contrastando con la wild type (orf/gef), en azul se observa la región que se ha reportado como no codificante, en rojo la región codificante, en negro las mutaciones y en mut 3 se observa la delección al inicio de la secuencia.

Conclusiones y Perspectivas. Hemos identificado mutaciones en Gef largo que eliminan su función. Estamos en proceso de aislar mutantes en Gef y validar que Gef largo puede ser traducido y ser tóxico.

Agradecimientos. Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de CONACYT, proyecto No 47399/A-1

Bibliografía.

- Poulsen LK, Larsen NW, Molin S and Andersson KP. (1989). A family of genes encoding a cell killing function maybe conserved in all gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*. 3(11): 1463 - 1472.
- Poulsen LK, Refn A, Molin S. and Andersson P. (1991a). Topographic analysis of the toxic Gef protein from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 5(7): 1639 - 1648.
- Poulsen LK, Larsen NW, Molin S and Andersson P. (1992). Analysis of an *Escherichia coli* mutant strain resistant to the cell-killing function encoded by the *gef* gene family. *Molecular Microbiology*. 6(7): 895 - 905.
- Gerdes K, Bech FW, Jorgensen ST, *et al.* (1986). Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. *The EMBO journal*; 5(8): 2023 - 2029.

Resultados y Discusión. Se aislaron tres mutantes que eliminan la toxicidad de Gef, de las cuales 2 (Mut 1, Mut 2), tiene una mutación con sentido equivocado, mientras que en Mut 3 hay una delección en gran parte del extremo 5' del orf/gef que deja debido a una mutación que promovió la formación de un nuevo sitio de corte *EcoRI*. Todas estas mutaciones alteran la región río-arriba del ORF reportado para Gef. La mutación en Mut 1, (+Thr10Pro), cae 30 nucleótidos río-arriba de la región que se ha reportado como codificante, lo que sugiere que en el sistema de expresión empleado pueda estar traducándose una variante mas larga de Gef. La mutación Mut 2 (Val13Asp) cae en el N-terminal de la región codificante reportada para Gef, y modifica la hidrofobicidad en esta región.