

## ¿Qué es, cómo es y para qué sirve CutA?

**¿Qué es CutA?** CutA, un polipéptido de 112 residuos, es en los casos bien estudiados un homotrímero. Se anota "*Divalent cation tolerance protein*" por haberse identificado su gen en ensayos de pérdida de tolerancia a  $\text{Cu}^{2+}$  en mutantes de *Escherichia coli*, pero hemos concluido (ver más adelante) que esta anotación es errónea. Muy termoestable, resiste casi ebullición en mesófilos e incluso en psicrófilos (que viven a  $0^{\circ}\text{C}$ ), como hemos probado para CutA de *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Miembro no canónico de la superfamilia de PII, proteína que señala para abundancia de nitrógeno, CutA no parece implicada en ese tipo de señalización. Desconocemos la función de CutA. Apoyan su importancia su amplia distribución (arqueas, bacterias, hongos, algas unicelulares, protistas, plantas, animales invertebrados y vertebrados) y elevada conservación de secuencia.

**¿Cómo es CutA?** Mediante cristalización y difracción de rayos X hemos determinado la estructura de CutA de la cianobacteria *Synechococcus elongatus*, y hemos producido cristales de CutA de *P. haloplanktis*. Produjimos ambas proteínas recombinantemente en *E. coli* a partir de sus genes, clonados en plásmidos. Tras purificar, cristalar y difractar sus cristales en el Sincrotrón ALBA obtuvimos su estructura (de *S. elongatus*) a resolución de  $1,17\text{\AA}$ . La superposición de las estructuras de PII y CutA prueba la identidad de sus "folds", diferenciándose en la no existencia en CutA del gran lazo T flexible que media las interacciones de PII con sus dianas. En el trímero de CutA se observa, en la interfase entre cada dos subunidades, una cavidad (tres por trímero) que corresponde a la cavidad donde une PII sus efectores, pero es más pequeña que ella. Cada cavidad alberga en nuestra estructura una molécula de Bis-Tris, tomada de la solución de cristalización. Pensamos que este sitio une algún poliol natural y que es clave para la función de CutA.

**¿Qué función tiene CutA?** Hemos reproducido el aumento descrito de sensibilidad al  $\text{Cu}^{2+}$  en un mutante de *E. coli* al que supuestamente le falta sólo *cutA*. Sin embargo, su transformación con un plásmido que portaba *cutA* no restauró la resistencia al  $\text{Cu}^{2+}$ , cosa que sí sucedió al usar el plásmido que portaba el gen *cutA2*, contiguo a *cutA*. La secuenciación demostró que en el mutante la delección incluía *cutA* y las primeras bases de *cutA2*, corroborando la importancia de *cutA2* pero no de *cutA* para la resistencia a  $\text{Cu}^{2+}$ . Así, la pérdida de resistencia al  $\text{Cu}^{2+}$  del mutante es un efecto polar sobre *cutA2*, excluyendo en *E. coli* un papel de *cutA* en esta resistencia. En experimentos de doble híbrido en levadura con CutA como cebo hemos identificado parejas potenciales de interacción con CutA, estudiando ahora si tales interacciones son genuinas.

**¿Hacia dónde vamos?** Hacia la identificación estructural de complejos de CutA con sus ligandos naturales y parejas, y la determinación de los efectos de la eliminación de CutA en animales modelo.



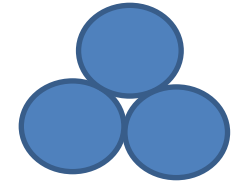
UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# ¿Qué es, cómo es y para qué sirve CutA?

Lorena Tremiño Agulló

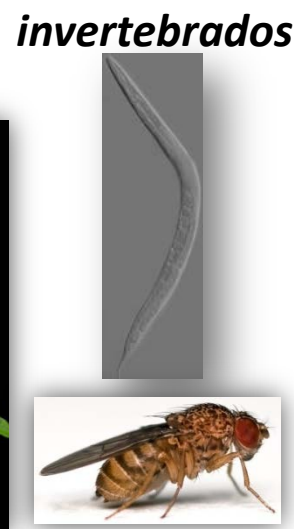
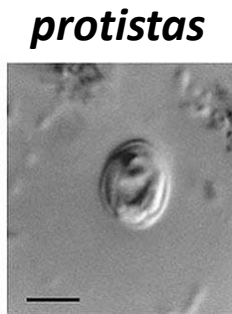
[ltremino@ibv.csic.es](mailto:ltremino@ibv.csic.es)

# ¿Qué es CutA?



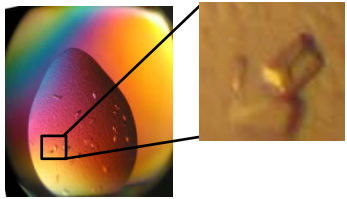
- Una proteína de sólo unos 112 aminoácidos
- Cuando se ha caracterizado bien (como en el caso nuestro, de una bacteria verde-azulada), se ha visto que forma trímeros
- Miembro lejano de la familia de proteínas PII (PII clásica señala para nitrógeno, CutA no parece hacerlo)
- Excepcionalmente estable (resiste casi 100°C en organismos que viven a temperatura normal (mesófilos) e incluso en los que viven a baja temperatura (psicrófilos))
- Secuencia de aminoácidos muy conservada
- Amplia distribución en el árbol de la vida

**¡PROTEÍNA IMPORTANTE!**

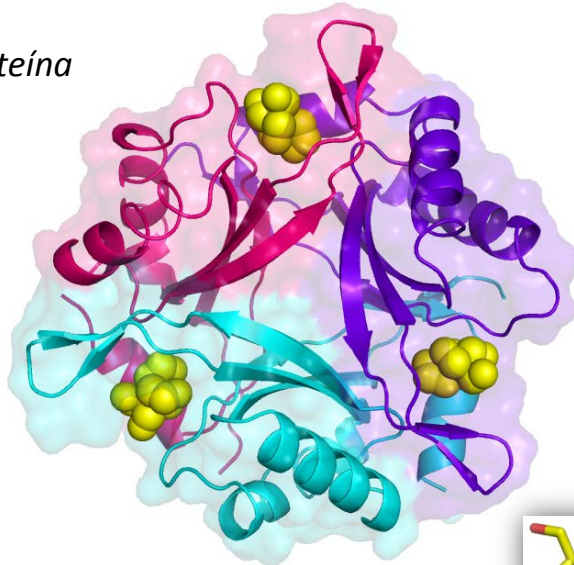


# ¿Cómo es CutA?

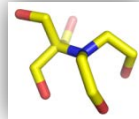
Nuestra estructura a 1,17Å



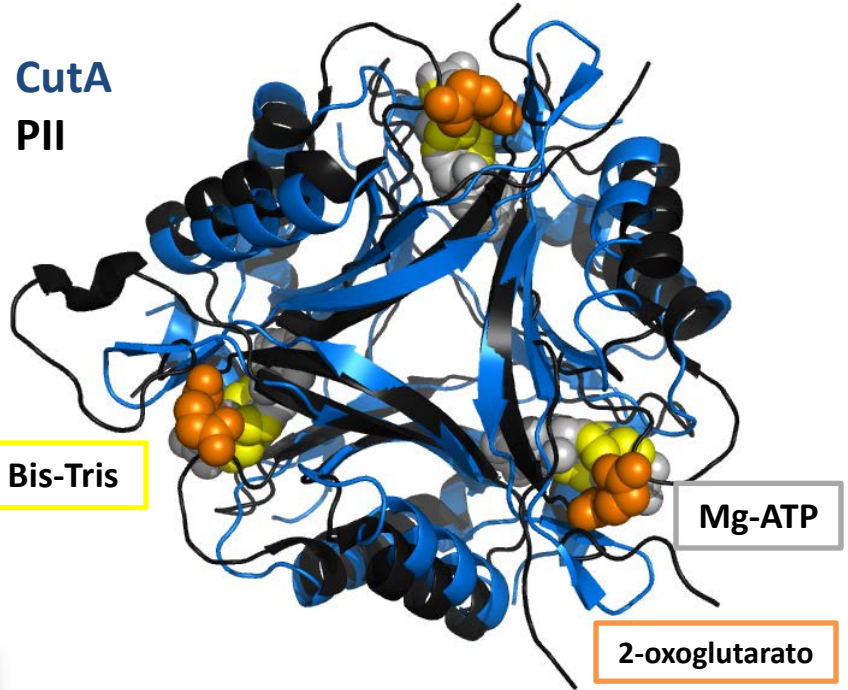
Cristales de proteína



**Bis-Tris unido en cavidad conservada:  
primera evidencia estructural de función**



Superposición de las estructuras de  
CutA y PII de *S. elongatus*.



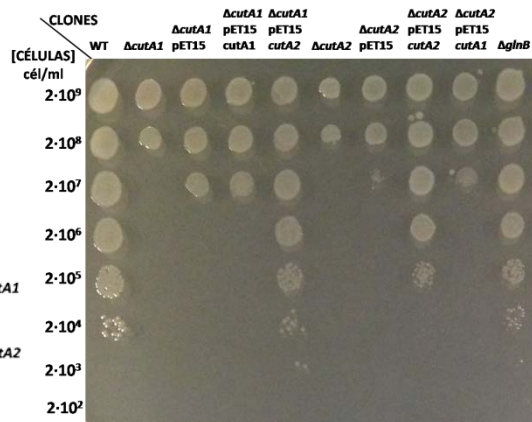
Cristalografía de proteínas por difracción de rayos-X

# ¿Para qué sirve CutA?

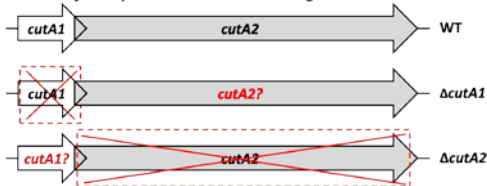
En contraposición con lo que todo el mundo piensa, no está implicada en los mecanismos de tolerancia al cobre en *Escherichia coli*

**cutA1:** codifica CutA  
**cutA2:** codifica DsbD (DipZ), implicada en la formación de puentes disulfuro.  
**glnB:** codifica PII.

El crecimiento de los mutantes carentes de *cutA1* y *cutA2* es menor que el del WT en LB-agar con 3mM CuSO<sub>4</sub>.



Efecto polar en los mutantes generados.



**Test de complementación: cutA1 no complementa pero cutA2 sí.**

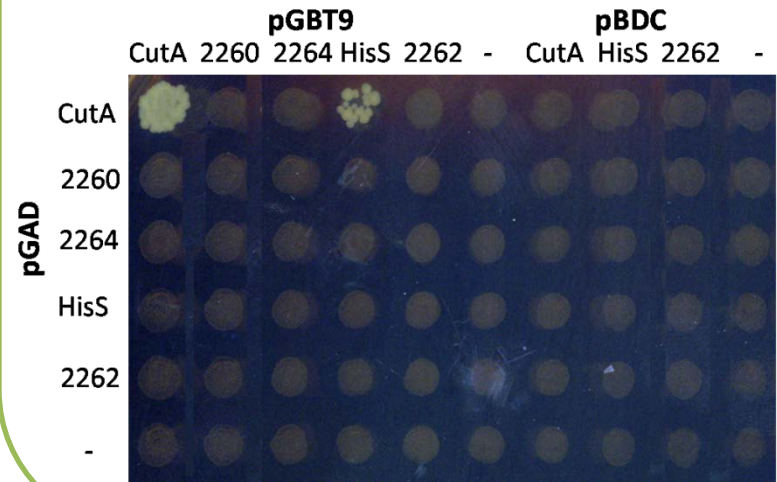
Concentración mínima de células inoculadas a la que se produce crecimiento celular en medio LB-agar suplementado con 3mM CuSO<sub>4</sub>.

SD: sin datos

Gen delecionado \ Gen introducido	Ninguno (WT)	cutA1	cutA2
Ninguno (WT)	2·10 <sup>4</sup>	2·10 <sup>7</sup>	2·10 <sup>7</sup>
cutA1	SD	2·10 <sup>7</sup>	2·10 <sup>7</sup>
cutA2	SD	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>4</sup>

Ensayos de tolerancia al cobre con mutantes carentes de *cutA*

¿Señalización celular mediante interacción con otras proteínas?



Doble híbrido de levadura

y qué más.....

**MÁS  
ESTRUCTURA...**

**y complejos con  
análogos de Bis-  
Tris de  
relevancia  
biológica**

**KNOCK-OUTS  
ANIMALES**

*C. elegans*  
(colaboración con  
lab. Dra. Nuria  
Flames, IBV)  
*¿Drosophila?*

Muchas gracias



Instituto de Biomedicina de Valencia  
Departamento de genómica y proteómica  
Unidad de Enzimopatología Estructural  
Prof. Dr. Vicente Rubio



Becaria FPI: BFU2011-30407



Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología  
Dra. Asunción Contreras  
Dr. Javier Espinosa