

Study of Reductive Proteins of Chromium in Escherichia coli

^{1,3}Rosa Baldiris, PhD, ^{2,3}Ricardo Vivas, PhD, ³Natali Acosta, Estudiante Programa de Ingeniería de Procesos, ¹Alfredo Montes, Estudiante Programa de Biología. ¹Grupo de Microbiología Clínica y Ambiental. Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa de Biología. Campus de San Pablo. Cartagena-Colombia. ²Grupo de Química Cuántica y Teórica, Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa de Química. Campus de San Pablo. Cartagena-Colombia. ³Grupo de investigación CIPTEC. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería de Procesos. Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco. Cartagena - Colombia.

Abstract- The boom in industrialization has contributed to the increase of contaminants in the environment. Chromium, in particular, a toxic metal, which in its hexavalent form is an agent that is capable of provoking damage at the cellular level. There are microorganisms with the capacity to reduce this metal to a less toxic mobile form (chromium III) as is the case of E. coli. A comparative study was conducted between some of the reductive proteins of chromium in the E. coli bacteria (YieF, Nema y NfsA), as well as the construction of a protein-protein interactive network aided by Cytoscape 3.3.0 software. This allowed the observation of variances in the characteristics related with the reduction of cromato Felicitated d by these enzymes.

Keywords-- Chromium, oxidoreductase, Cytoscape 3.3.0, E. coli.

Digital Object Identifier (DOI): <http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2016.1.1.337>
ISBN: 978-0-9822896-9-3
ISSN: 2414-6390

Estudio de proteínas reductoras de cromo en *Escherichia coli*

^{1,3}Rosa Baldiris, PhD, ^{2,3}Ricardo Vivas, PhD, ³Natali Acosta, Estudiante Programa de Ingeniería de Procesos, ¹Alfredo Montes, Estudiante Programa de Biología.

¹Grupo de Microbiología Clínica y Ambiental. Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa de Biología. Campus de San Pablo. Cartagena-Colombia.

²Grupo de Química Cuántica y Teórica, Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa de Química. Campus de San Pablo. Cartagena-Colombia.

³Grupo de investigación CIPTEC. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería de Procesos. Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco. Cartagena - Colombia.

Resumen - *El auge de la industria ha contribuido al aumento de contaminantes en el medio ambiente, el cromo en particular, es un metal tóxico que en su forma hexavalente representa un agente capaz de provocar daños en las células. Existen microorganismos con la capacidad de reducir este metal a una forma menos móvil o tóxica (cromo III), como es el caso de E. coli. Se realizó un estudio comparativo entre algunas de las proteínas reductoras de cromo en la bacteria E. coli (YieF, Nema y NfsA), así como la construcción de una red de interacción proteína-proteína, con ayuda del software Cytoscape 3.3.0. A través de lo cual, se pudo observar la variación en las características relacionadas con la reducción de cromato mediada por estas enzimas.*

Palabras Clave: Cromato, Oxido reductasas, Cytoscape 3.3.0, E. coli.

I. INTRODUCCIÓN

La modernidad ha traído una serie de ventajas a los seres humanos si las comparamos con lo que le tocó vivir a las generaciones anteriores, pero estas mismas ventajas han traído consigo toda una serie de problemas relacionados con estos avances. Es así como hoy en día existe una gran preocupación por los problemas que impactan negativamente el medio ambiente.

Entre estos problemas tenemos un inusitado aumento de los metales pesados con graves consecuencias para la salud humana, pues estos metales pesados se encuentran presentes en el aire, en la tierra y en los cuerpos de agua afectando, en todos los casos la cadena alimenticia y por tanto la salud humana. El incremento de la industria de manufactura y metal-mecánica exige la extracción

Existen diversos métodos químicos para la reducción de Cr (VI), pero la aplicación de los mismos resulta poco ventajosa dado que su costo es elevado y son poco eficientes cuando las

exhaustiva de metales pesados como materia prima, lo que conlleva a un aumento en las concentraciones de metales que exceden los criterios de calidad [5]. Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez volcados al ambiente, solo pueden distribuirse entre los entornos aire-agua-suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o incorporarse a los seres vivos [18].

El cromo es un elemento metálico que se encuentra generalmente en el medio ambiente en forma trivalente (Cr (III)) y hexavalente (Cr (VI)). Es común encontrar la primera en vegetales, carnes, granos y levaduras, mientras que la forma hexavalente es producida, en su mayoría, en procesos industriales, que mediante descargas de residuos constituye una de las fuentes principales de cromo (VI) en el agua potable [10]. El Cr (VI) por ser un poderoso oxidante de sustancias orgánicas, es peligroso para los organismos vivos y para la salud humana [11]. Está presente en soluciones formando los oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), dependiendo del pH, y puede persistir en el agua por largos periodos. Debido a su solubilidad, entra a las células donde es reducido a Cr (III) formando especies reactivas de oxígeno que afectan macromoléculas importantes en los organismos [12].

El EPA regula el Cr (VI) como parte de la norma total para el cromo en el agua desde 1992. El estándar es de 100 partes por mil millones. La regulación del EPA asume que las muestras son 100% Cr (VI), pues es la especie que representa un mayor riesgo para la salud humana.

Concentraciones de Cr (VI) son bajas, en relación a altos volúmenes de agua, por lo cual, en estos casos se hace necesario la utilización de una mayor cantidad de reactivos, que además de elevar el costo, representa una forma de contaminación secundaria, dándole pasó a los métodos biológicos que son:

económicos, seguros, sostenibles y libres de problemas de contaminación secundaria [7].

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de remediación) para limpiar terrenos o aguas contaminadas. También se puede definir como un grupo de tratamientos, contra la contaminación de un medio, que aplica sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de compuestos químicos en otros menos tóxicos [6].

En síntesis, consiste en el aprovechamiento de microorganismos para restablecer las condiciones naturales del medio afectado por contaminantes. “A partir de la década de los ochentas se empezaron a demostrar las capacidades que tienen varios microorganismos para remover grandes cantidades de metales pesados de efluentes líquidos” [13]. En la actualidad se conocen mecanismos desarrollados por bacterias para la reducción de Cr (VI), que están relacionados con metabolismos propios de los organismos o se dan en respuesta a las condiciones del medio. Principalmente, son cometabolismos en los cuales el Cr (VI) participa como aceptor de electrones. Sin embargo, algunos son más eficientes que otros, entendiéndose por eficiencia la capacidad de reducir más Cr (VI) a (III), frente a la generación de especies reactivas de oxígeno. Hasta el momento

la proteína más eficiente en la reducción de Cr (VI) en *E. coli K-12*, es YieF (Cromato reductasa), la cual cataliza la transferencia de 3 electrones donados por dos moléculas de NAD(P)H al Cr (VI), produciendo una mínima cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) [7]. El propósito de esta investigación fue realizar un rastreo conceptual que permitiera comparar algunas características de las enzimas reductoras de Cr (VI) en *E. coli*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la base de datos Yellaboina, extraída de Bacteriome en EcoCyc [8], se tuvo acceso a la red de interacción de las proteínas de la bacteria *E. coli* en Cytoscape 3.3.0 [19]. Se realizó una limpieza de la red, extrayendo los nodos de interés y sus interacciones directas con nodos secundarios. Adicionalmente se alimentó la red con información suministrada por las bases de datos EcoCyc [8], UniProt [15], NCBI [9] y literatura científica fiable, con lo cual se establecieron parámetros cualitativos en la misma y la construcción de tablas dinámicas en el software Excel para fundamentar la comparación de las características de las enzimas, como las secuencias de aminoácidos, ubicación y tipo de reducción.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características correspondientes a las tres enzimas evaluadas aparecen descritas en la Tabla 1.

TABLA 1
CARACTERÍSTICAS DE ALGUNAS ENZIMAS DE *E. COLI*, CON ACTIVIDAD REDUCTORA DE CROMO VI

Enzima	Clase	Tipo	Función	Cofactor	Reducción	Km	Ubicación	Peso	Longitud
nemA	1	Cromato-reductasa	Cataliza la reducción de N-etilmaleimida (NEM) a N-etilsuccimida	FMN	-	23µM, con (Kcat/Km)= 0.091 S-1 µM-1	Citosol	40KD	365 aa
YieF	1	Flavoproteína, cromato-reductasa <i>in vitro</i>	Actividad oxidoreductasa	FMN	Transfiere 3 e ⁻ a Cr (VI) (sin Cr(V) como intermediario)	376µM (pH 7, 37 °C); 200µM (pH 5, 35°C)	Citosol	50 KD	188 aa
NfsA	2	Nitroreductasa	Reducción de compuestos nitroaromaticos, no sensible al oxígeno	FMN	Transfiere 1e ⁻ a Cr (VI)	11,8 µM	Citosol	47 KD	240 aa

La similitud estructural del cromato y el sulfato es la razón por la cual el Cr (VI) ingresa a las células.

Dado que lo hace a través del sistema de transporte de sulfato, lo que genera estrés oxidativo [4]. A

pesar de ello, los microorganismos han desarrollado la capacidad de poner en funcionamiento ciertos mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales [13], como lo son el flujo de salida de metales, la adsorción, la metilación del ADN y la biotransformación del metal, ya sea directamente por reducción enzimática a formas menos móviles y tóxicas o indirectamente a través de la formación de complejos con metabolitos como el H₂S [7].

En este caso, el tipo de reducción de interés es la mediada por enzimas, en particular la llevada a cabo por las enzimas YieF, nemA y NfsA, las dos primeras, como se observa en la tabla 1 hacen parte de las enzimas tipo 1, es decir, aquellas que catalizan reacciones de oxidoreducción, mientras que NfsA es una enzima tipo 2 o transferasa [17]. Al encontrarse estas enzimas en el citosol, juegan un papel de intermediario entre donadores de electrones como NAD(P)H y aceptores de electrones. Su capacidad para reducir cromo está relacionada con el tipo de reacción que llevan a cabo [7]. En el caso de NfsA, se tiene al Cr (V) como producto intermediario de la reacción [1], el cual reacciona con el peróxido de hidrógeno produciendo cantidades significativas de radicales hidroxilos que pueden causar alteraciones directas en el ADN [3]. Mientras que la enzima YieF, realiza una reducción más eficiente, puesto que cataliza la transferencia de tres electrones al Cr (VI) y un electrón al oxígeno molecular, sin generar Cr (V) como intermediario de la reacción, con lo cual la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es mínima [2], lo que confirma que el hecho de que la enzima sea capaz de reducir cromo no implica que esta lo haga de una forma eficiente.

Si bien es importante, que estas moléculas tengan la capacidad de desarrollar mecanismos de remediación de ambientes contaminados por cromo, también se hace necesario que el microorganismo pueda sobrevivir a pesar de las implicaciones que este proceso conlleva, bajo determinados parámetros. Es aquí donde la resistencia de las bacterias juega un papel importante, puesto que, existen microorganismos capaces de reducir Cr (VI) hasta ciertos niveles de concentración del mismo, es decir, que si el nivel de cromo supera esta barrera es probable que el microorganismo muera. Luego, “la resistencia y la reducción de cromo no necesariamente tienen una relación directa. No todas las bacterias resistentes pueden reducir Cr (VI) a Cr (III)” [7].

Estas enzimas utilizan al Flavin Mononucleotido como cofactor para catalizar las reacciones de oxidoreducción. Sin embargo, como se observa en las

Tablas 2 y 3, los sitios de unión de este cofactor están constituidos por secuencias de aminoácidos distintas, lo cual repercute en la estructura de las proteínas, dado que estas se pliegan en base a los impedimentos estéricos que su secuencia de aminoácidos presente.

TABLA 2
CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA DE NEMA

NemA	Posición	Aminoácido	Descripción
Sitio de unión	101	Q	FMN
Segmento	182-185	HSAH	Unión sustrato
Sitio Activo	187	Y	Donador de Protones
Sitio de unión	234	R	FMN
Sitio de unión	325	R	FMN

Ref. [8]

TABLA 3
CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA DE YIEF

YieF	Posición	Aminoácido	Descripción
Sitio de unión	117	S	FMN
Unión de nucleótido	13-20	SLRKGGSFN	FMN
Unión de nucleótido	82-85	EYNY	FMN

Ref. [8]

Otro aspecto a tener en cuenta es la afinidad de presenten las enzimas por el sustrato (Cr (VI)), relacionada en la constante de Michaelis, que “indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima” [16]. Es decir, que la relación Km Vs afinidad por el sustrato, es inversamente proporcional, a mayor Km, menor es la afinidad de la enzima por el sustrato. Como se observa en la tabla 1, a pesar de que yieF reduce cromo eficientemente en relación a NfsA, esta última presenta mayor afinidad por el cromo que YieF, es decir que para que yieF alcance la mitad de la velocidad de reducción frente a NfsA y NemA, se requiere de una mayor concentración de cromo en el medio. Cabe destacar, que a pesar de que las Km se midieron al mismo pH, la temperatura fue distinta y por lo tanto, para establecer una comparación fiable, las pruebas deben realizarse a las mismas condiciones. Puesto que, la temperatura óptima para la reducción de YieF es 35 °C y el pH de 5.0 [2].

Ademas del Km, existe una constante que relaciona la capacidad de la enzima para transformar el sustrato y viene dada por K_{cat}/K_m . En el caso de Nema esta constante tiene un valor de $0,091 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ a 22°C y un pH de 7.0 [14], mientras que en YieF es de $0,0185 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ a 35°C y un pH de 5.0, y una K_{cat}/K_m de 0,077 a 37°C y un pH de 7.0. [2], y en NfsA un valor de $6,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ [1]. Con lo cual se puede inferir que de los cromatos captados por las enzimas, la Nema tiene mayor capacidad de transformación a Cr (III), seguida de YieF y NfsA.

En la Fig. 1 se observa la red de interacción proteína-proteína, creada en el software Cytoscape version 3.3.0. Donde las enzimas de interes, se encuentran representadas por los nodos de color amarillo. Esta subred, se obtuvo a partir de la

limpieza de la red de de interacción global de proteínas en *E. coli*. En la cual se obtuvo una baja conectividad principalmente en los nodos de interes, puesto que, estos no se encuentran directamente relacionados, a pesar de que comparten nodos vecinos; atendiendo al hecho de que la conectividad de la red, esta relacionada con el numero de interacciones que presentan los nodos y a su vez las interacciones presentes entre su vecindario. Esto trasladado al escenario biologico, podria traducirse en que, las proteínas realizan su función de manera independiente, es decir, en procesos celulares distintos.

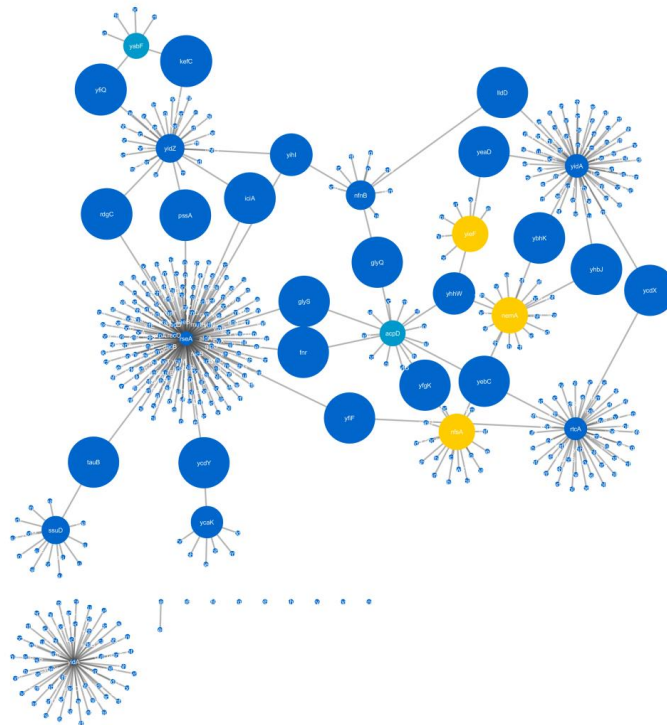


Fig 1. Red de interacción proteína - proteína de algunas enzimas reductoras de Cr (VI) en *E. coli*.

IV. CONCLUSIÓN

A pesar de que las proteínas comparten el mismo cofactor, catalizan como función principal, en YieF, Nema, y como función secundaria para NfsA, reacciones de óxido-reducción, la capacidad reductora es distinta en todos los casos y no es posible afirmar cuál de todas es más eficiente atendiendo a un solo parámetro. Por lo tanto a pesar

de que NfsA posee una mayor afinidad por el cromato, su capacidad para transformarlo es menor en comparación a las otras enzimas, además de que el mecanismo empleado para reducir el cromato no favorece al microorganismo. Nema presenta una afinidad intermedia por el Cr (VI) y de las proteínas la mayor capacidad para transformar Cr (VI) a Cr (III) y YieF presenta una baja afinidad, una capacidad intermedia de transformación y una producción

mínima de ROS. Por lo que hasta el momento estas últimas poseen claras ventajas frente a NfsA.

REFERENCIAS

- [1] Ackerley, D. F., Gonzales, C. F., Keyhan, M., Blake, R., & Matin, A. (2004). Mechanism of chromate reduction by *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology*, 851-860.
- [2] Ackerley, D., Gonzales, C., ParK, C., Blake, R., Keyhan, M., & Matin, A. (2003). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 873-882.
- [3] Azario, R., Salvarezza, S., Ibarra, A., & García, M. (2010). Efecto del Cromo Hexavalente y Trivalente sobre el Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218. *Información Tecnológica*, 51-56.
- [4] Cervantes, C., & Campos García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. *Springer*, 407-419.
- [5] Cuizano, N. A., & Navarro, A. E. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Real Sociedad Española de Química*, 120-125.
- [6] Gonzáles Rojas, E. H. (2011). Concepto y Estrategias de Bioremediación. *INGE@UAN*.
- [7] Hrudayanath, T., Sasmita, D., Jigni, M., Bhagwat Prasad, R., & Nigamananda, D. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management*, 383-399.
- [8] Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martinez, C., Fulcher, C., Huerta, A.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Muniz-Rascado, L., Ong, Q., Paley, S., Schroder, I., Shearer, A., Subhraveti, P., Travers, M., Weerasinghe, D., Weiss, V., Collado-Vides, J., Gunsalus, R.P., Paulsen, I., and Karp, P.D. (2013). EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Research* 41:D605-612.
- [9] National Center for Biotechnology Information. PubMed. [En línea]. Consultado: enero de 2016. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- [10] Oficina de Agua de EPA. (Diciembre de 2010). EPA. Obtenido de http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/upload/Cromo-VI-enelaguapotable_QAs.pdf
- [11] Otiniano, M., Tuesta, L., Robles, H., Luján, M., & Chavéz, M. (2007). Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp* y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev. Med. Vallejiana*.
- [12] Ramírez Díaz, M. I., Riveros Rosas, H., Campos García, J., & Cervantes, C. (2009). Reducción Bacteriana de Cromo Hexavalente: Mecanismos y Aplicaciones. *REB*, 73-79.
- [13] Reyes Toriz, E. D., Cerino Córdova, F. d., & Suárez Herrera, M. A. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*.
- [14] Robins, K. J., Hooks, D. O., Rehm, B. H., & Ackerley, D. F. (2013). *Escherichia coli* NemaA is an efficient chromate reductase that can be biologically immobilized to provide a cell free system for remediation. *PLoS One*.
- [15] Uniprot, C. (2010). Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue): D214–D219.
- [16] Universidad de Huelva. (2005). Obtenido de http://www.uhu.es/08007/documentos%20de%20texto/apuntes/2005/pdf/tema_08_enzimas_2.pdf
- [17] Voet, D., & Voet, J. (2006). *Bioquímica, 3a ed.*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- [18] Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y Metales Pesados: Una Interacción en Beneficio del Medio Ambiente. *Química Viva*.
- [19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13(11):2498-504.