

2. RESUMEN

La contaminación del suelo por metales pesados es un problema latente en México y a nivel mundial. Técnicas no tradicionales y econonómicamente viables para la remoción de metales pesados como la fitorremediación, han cobrado importancia y despertado interés. En la naturaleza existen pocas plantas hiperacumuladoras e hipertolerantes, las cuales acumulan metales y los secuestran a través de transportadores específicos presentes en el tonoplasto (membrana de la vacuola). La capacidad de diseñar genéticamete una planta a través de la alteración de la especificidad de transportadores, es una poderosa herramienta para mejorar la capacidad de la toma de metales y mejorar su potencial como fitoremediadora.

Recientemente se ha descrito e identificado una familia de intercambiadores catión/ H^+ , la familia CAX en *Arabidopsis thaliana* (Shigaki et al. 2003; Pittman et al., 2001; Cheng et al., 2002). *AtCAX1* es miembro de esta familia que transporta Ca^{2+} acoplado al transporte de H^+ . Como el calcio es un metal, este intercambiador, que está bien caracterizado, es un buen candidato para tratar de manipular y alterar su selectividad catiónica. Se mutó la 4ª histidina (posición 338) por una asparagina en CAX1. Dicho residuo está localizado dentro del dominio C-2, que proponen funciona como filtro de selectividad (Kamiya & Maeshima, 2004). Utilizando la levadura *S. cerevisiae* como sistema heterólogo, se estudió la función de este transportador mutado comparándolo con la proteína CAX1 tipo silvestre.

Ensayos de crecimiento mostraron que la cepa de levadura con la mutación en la histidina, H338N, perdió su capacidad de crecer en presencia de calcio, pero mostró mayor crecimiento en la presencia de los metales pesados Cd^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} , sugiriendo un cambio

en la selectividad del transporte. Se obtuvo la confirmación para estos resultados al medir de forma directa el intercambio de metal dependiente del pH en vesículas de vacuola de levadura que expresan heterológicamente a sCAX1 y H338N. Se observan tasas de transporte elevadas de la cepa H338N en comparación con la sCAX1 para los metales Cd^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} . Cinéticas de transporte para Cd^{2+} y Zn^{2+} muestran que la afinidad del transportador mutado para estos metales aumenta.

Se corrobora con los resultados que la secuencia C-2 es un filtro de selectividad de CAX1 y que las mutaciones en el residuo de histidina clave dentro de este dominio, cambian la especificidad iónica del intercambiador, lo que hace posible el futuro uso de H338N para plantas útiles en la fitorremediación.