



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA ChrA
DE *Pseudomonas aeruginosa* en *Neurospora crassa*”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
LUIS JOSÉ FLORES ALVAREZ

ASESOR:
DR. CARLOS CORTES PENAGOS

COASESORES:
**DR. CARLOS CERVANTES VEGA
DR. ANTONIO CERVANTES CHAVEZ**

MORELIA , MICHOACÁN, MARZO DEL 2008.



RESUMEN

El cromo es un elemento químico que en los seres vivos es considerado tóxico como ión hexavalente, ya que puede provocar modificaciones en estructuras proteicas o hasta interaccionar y alterar el DNA. Existen diferentes mecanismos en bacterias que permiten contrarrestar los efectos producidos por este ión, tales como proteínas reparadoras de DNA o proteína transportadoras. La proteína transmembranal ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* tiene la función de expulsar cromato como un mecanismo bacteriano de destoxificación. El análisis filogenético de ChrA reveló que forma parte de la súper familia de transportadores CHR, esta súper familia se divide en la familia LCHR la cual tiene un tamaño promedio de 400aa y contiene 10 segmentos transmembranales. Esta familia incluye varias docenas de proteínas de diversas especies bacterianas así como de algunos hongos y levaduras (*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis*, *Gibberella zeae*). En el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no existe homólogo para esta proteína.

Con excepción de dos proteínas bacterianas, se desconoce la función de los miembros de la familia LCHR. Como parte de un estudio filogenético se identificó en el genoma de *Neurospora crassa*, un homólogo de ChrA denominado ChrNC. Este gen de 1745nt tiene dos intrones y codifica para una proteína de 508 aa. El análisis conformacional para determinar su topología mostró que es una proteína con ocho ó nueve dominios transmembranales y que contiene 6 segmentos o asas de las cuales 3 son periplasmáticas y 3 citoplasmáticas. El extremo carboxilo terminal se localizó en el citoplasma mientras que para el amino terminal no se determinó con certeza su ubicación. Con el fin de determinar la función de esta proteína se diseñó una estrategia para expresar el gen *chrNC* en *S. cerevisiae*, para ello el gen ChrNC fue clonado en un vector de expresión para levadura y utilizado para obtener las transformantes correspondientes. Varias de estas transformantes fueron seleccionadas, y analizadas para determinar la expresión del gen *chrNC* y su efecto en la resistencia al cromato.

ÍNDICE DE CONTENIDO

A. RESUMEN.....	I
B. INDICE.....	II
C. INDICE DE FIGURAS.....	V
D. INDICE DE FIGURAS DE APENDICE.....	V
E. INDICE DE TABLAS.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cromo: formas iónicas, transporte y toxicidad.....	1
1.2. Sistema ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.3. Análisis filogenético de la proteína ChrA.....	5
1.4. <i>Neurospora crassa</i> como modelo biológico.....	8
II. JUSTIFICACIÓN.....	9
III. HIPÓTESIS.....	10
IV. OBJETIVO.....	10
4.1. Generales.....	10
4.2. Específicos.....	10
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	11
VI. MATERIALES Y METODOS.....	12
6.1. Cepas empleadas.....	12

6.2.	Medios de cultivo.....	12
6.3.	Reactivos.....	13
6.4.	Plásmidos.....	13
6.5.	Análisis y manipulación de ácidos nucleídos.....	14
6.5.1.	Aislamiento de DNA plasmídico.....	14
6.5.2.	Aislamiento de DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
6.5.3.	Aislamiento de DNA genómico de <i>Neurospora crassa</i>	15
6.5.4.	Extracción de RNA.....	15
6.5.5.	Electroforesis en geles de agarosa.....	16
6.5.6.	Aislamiento del DNA de geles de agarosa.....	16
6.6.	Procedimientos enzimáticos del DNA.....	16
6.6.1.	Restricción con endonucleasas.....	16
6.6.2.	Ligaciones.....	17
6.7.	Diseño de oligonucleótidos.....	17
6.8.	PCR. (Reacción de la Polimerasa en Cadena).....	17
6.9.	Generación del plásmido pECNC1.....	17
6.10.	Generación de plásmido pSCNC2.....	18
6.11.	Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
6.12.	Secuenciación.....	19
6.12.1.	Secuenciación de las muestras de DNA.....	19
6.12.2.	Análisis de la secuencia.....	19
6.13.	Análisis tipo Southern blot.....	19
6.13.1.	Tratamiento de la muestra.....	19
6.13.2.	Southern blot.....	19
6.14.	Análisis tipo Northern blot.....	19
6.14.1.	Preparación de la muestra de RNA.....	19
6.15.	Preparación de la sonda radiactiva.....	20
6.16.	Análisis de la expresión del gen <i>chrNC</i> en <i>S. cerevisiae</i>	20
6.17.	Prueba de susceptibilidad a cromato transformante <i>S. cerevisiae</i>	20

VII. RESULTADOS.....	22
7.1. Amplificación del gen <i>chrNC</i> mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
7.2. Construcción y análisis del plásmido pECNC1.....	23
7.3. Construcción y análisis del plásmido pSCNC2.....	25
7.4. Análisis e identificación de transformantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con el plásmido pSCNC2.....	27
7.5. Análisis de la expresión del gen <i>chrNC</i> en las transformantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
7.6. Ensayo de susceptibilidad a cromato de las transformantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
VIII. DISCUSIÓN.....	30
IX. CONCLUSIONES.....	34
X. PERSPECTIVAS.....	34
XI. BIBLIOGRAFIA.....	35
XII. APENDICE.....	39
12.1. Pruebas de susceptibilidad a cromato en <i>Neurospora crassa</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
12.1.1. Pruebas de susceptibilidad a cromato a <i>Neurospora crassa</i>	39
12.1.1.1. MEDIO MINIMO.....	39
12.1.1.2. MEDIO ENRIQUECIDO.....	40
12.1.2. Pruebas de susceptibilidad a cromato a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42

12.1.2.1. MEDIO MINIMO.....	42
12.1.2.2. MEDIO ENRIQUECIDO.....	43
12.2. Extracción de DNA genómico de <i>Neurospora crassa</i>	45
12.3. Extracción de DNA total de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para análisis Southern blot.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de transporte de cromato al interior de una célula bacteriana....	2
Figura 2. Sistema ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
Figura 3. Representación topológica de la proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
Figura 4. Árbol filogenético de la familia LCHR.....	7
Figura 5. Amplificación del gen <i>chrNC</i> mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
Figura 6. Análisis y clonación del gen <i>chrNC</i>	24
Figura 7. Generación del plásmido pSCNC2.....	26
Figura 8. Análisis tipo Southern blot para las clonas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	27
Figura 9. Northern blot de las clonas LJC1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Figura 10. Efecto del cromato a transformantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29

INDICE DE FIGURAS DE APENDICE

Figura I. Efecto del cromato de potasio en la cepa de <i>N. crassa</i> en medio mínimo.....	40
Figura II. Efecto del cromato de potasio en la cepa de <i>N. crassa</i> en medio enriquecido.....	41
Figura III. Efecto del cromato de potasio en la cepa (JCY100) de <i>S. cerevisiae</i> en medio.....	42
Figura IV. Efecto del cromato de potasio en la cepa (JCY100) de <i>S. cerevisiae</i> en medio enriquecido.....	44
Figura V. DNA genómico de <i>Neurospora crassa</i>	45
Figura VI. Extracción de DNA total de clonas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>chrNC</i>	17
---	----

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Cromo : formas iónicas, transporte y toxicidad

En la naturaleza el cromo se encuentra en diferentes estados de oxidación que van desde -2 hasta +6 (Mertz, 1969), pero los más comunes son Cr (0), Cr (III) y el Cr (VI) (ATSDR, 2000). Dependiendo del estado de oxidación del cromo indicará la toxicidad, siendo el cromo (VI) alrededor de 100 veces más tóxico que el cromo (III) (Venier y col., 1982). Dependiendo de las condiciones del pH el cromo (VI) se encontrará en diferentes formas y en donde una de ellas es la forma de cromato (CrO_4^{2-}) (McGrath y Smith, 1990) y su importancia radica en que su estructura molecular tetraédrica y sus enlaces son muy similares al ion esencial sulfato (SO_4^{2-}), de 1.64Å del cromato y 1.54Å del sulfato (Pardee y cols, 1966). El sulfato como fuente de azufre a la célula para la síntesis de proteínas, en bacterias se ha observado la presencia de un sistema transportador específico de sulfato (Dreyfuss, 1964) por el cual el cromo en su forma hexavalente (Cr VI) es como ingresa a la célula procarionte (Arslan y col., 1987), y que por ejemplo el Cr(III) no puede ingresar a la célula ya que el sistema de transporte no lo reconoce y además de que el cromo en esta forma es impermeable a la membrana plasmática (Alcedo y Wetterhahn, 1990).

(Fig.1)

Una vez dentro de la célula el cromo (VI) puede ser reducido a cromo (III) por efecto de agentes tales como el FADH₂, NADPH, ciertas pentosas, glutatión dando como resultado la formación de algunos complejos de Cr (V) (Shi y Dalal, 1990), que en presencia de peróxido de hidrógeno reaccionan y producen radicales libres hidroxilo (OH⁻), los cuales pueden dar como resultado interacciones dañinas con el DNA (Shi y Dalal, 1990). Por otra parte el cromo (III) en el interior de la célula puede interactuar con los grupos fosfato del DNA con lo que provoca daños en procesos como la replicación, transcripción o hasta provocar mutagénesis (Nishio y Vyeki, 1985), además de que puede interactuar con grupos tales como carboxilo o sulfhidrilo de proteínas dando como resultado alteraciones en la estructura y funcionalidad

(Levis y Bianchi, 1982), como por ejemplo en la polimerasa tipo I (Sow, 1994) y en la topoisomerasa tipo II en bacterias (Plaper, Raspor, col., 2002).

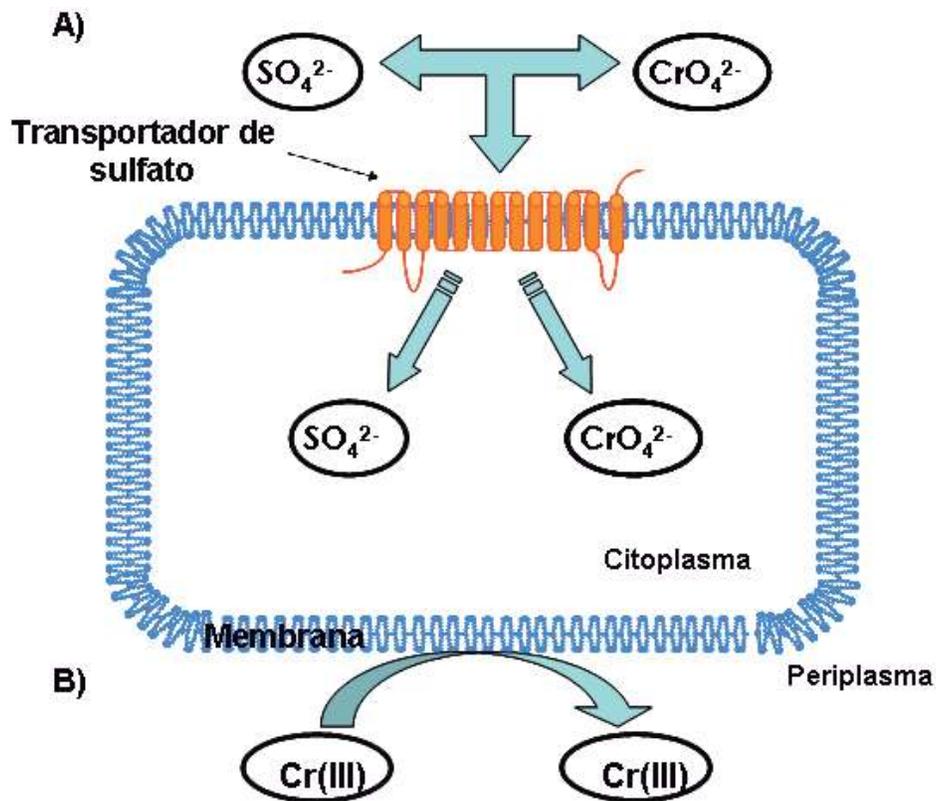


Figura 1. Mecanismo de transporte de cromato al interior de una célula bacteriana. A) El cromato (CrO_4^{2-}) ingresa al interior de la célula por medio del transportador de sulfato debido a su similitud con el ion sulfato (SO_4^{2-}) B) El cromo (III) no puede ingresar a la célula por su baja solubilidad en medios acuosos. Modificada de Pérez 2001.

1.2. Sistema ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*

ChrA es una proteína que confiere resistencia al ion cromato, mediante un sistema de expulsión, el cual transporta al ion del interior al exterior de la célula (Pimentel y col., 2002). Este mecanismo depende del potencial de membrana generado en el proceso de bombeo de protones por la cadena respiratoria (Alvarez y col., 1999). (Fig. 2)

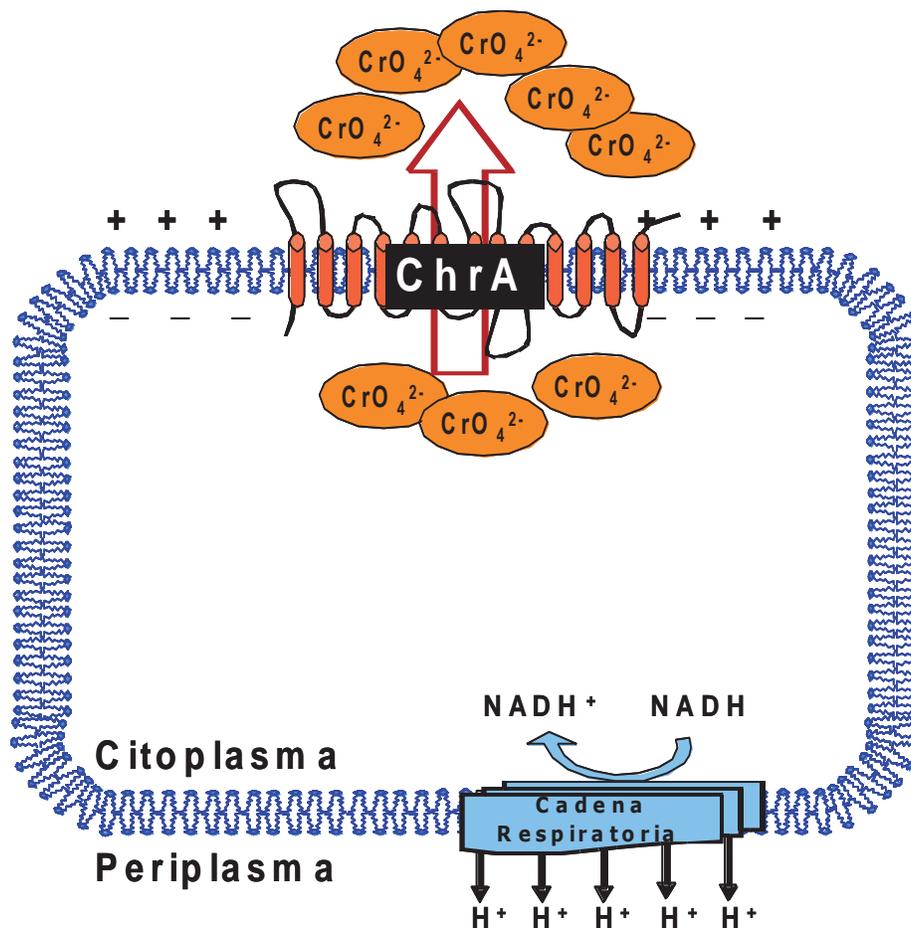


Figura 2. Sistema ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. La forma en la que la proteína ChrA expulsa el cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma hacia el exterior es empleando el potencial de membrana generado durante el bombeo de protones en la cadena respiratoria.

Esta proteína de 416 aminoácidos, codificada por el gen *chrA* del plásmido pUM505 de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990). Generando así el sistema ChrA por las características de los aminoácidos que la conforman (63% de los cuales son hidrofóbicos) y a su perfil hidropático encontrados se determinó que es una proteína transmembranal (Cervantes y Silver., 1992). Jiménez en el 2006 confirmó que la proteína consta de 13 segmentos transmembranales unidos a 6 asas periplasmáticas y en donde los extremos amino y carboxilo terminal se encontraban en el citoplasma y periplasma respectivamente. **(Fig.3)**

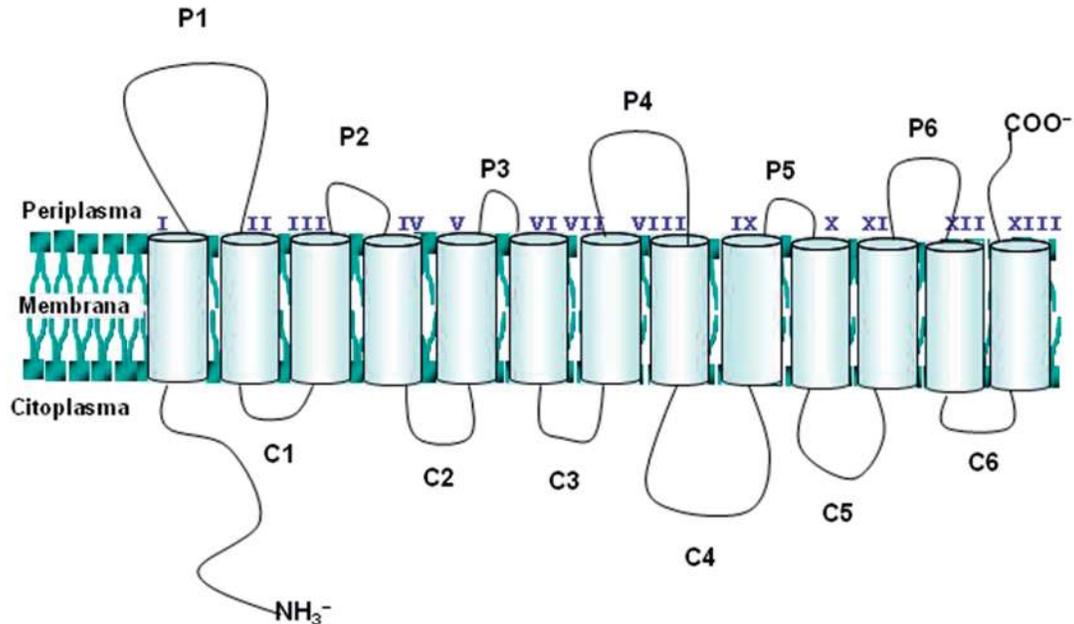


Figura 3. Representación topológica de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. De acuerdo a los 416 aminoácidos la estructura predicha contiene trece segmentos transmembranales unidos por seis asas periplasmáticas. El extremo amino terminal se encuentra en el citoplasma y el extremo carboxilo terminal en el periplasma.

1.3. Análisis filogenético de la proteína ChrA.

El término “filogenia”, acuñado por Haeckel (1866), se refiere a la clasificación de los seres vivos basado en la historia evolutiva de cada uno de ellos. Con la aparición de las ciencias genómicas, este término fue modificado y denominado “filogenética”, refiriéndose a una rama de la Biología que estima el pasado evolutivo de una especie basado en las comparaciones de secuencia de proteínas o de ácidos nucleicos (Baldauf, 2003). En la actualidad para entender los procesos evolutivos de los seres vivos, las secuencias de proteínas nos proporcionan una herramienta para comprender el parentesco entre dos especies mostrando la relación entre función y evolución (Thornton, Pearl y col., 1999; Cai, Grishin y col., 2004). A partir del advenimiento de los proyectos cuyo fin era conocer la secuencia genómica de los organismos se generó una explosión de información respecto a la secuencia del material genético (DNA y RNA) y consecuentemente de los productos del mismo (proteínas). Actualmente se han secuenciado en total 50 genomas de arqueas, 582 genomas de bacterias y 80 genomas de eucariontes, todos ellos o la mayoría de libre acceso en diferentes bases de datos. La secuencia del genoma humano y los varios organismos modelos han proporcionando una vista notable de la genética fundamental y las bases de la evolución que gobiernan las características de los organismos (Ruan, Liu y col., 2004), además de dar la llave de la comprensión del funcionamiento de cada uno de los genes y de las proteínas (Skolnick, Fetrow., 2000).

A partir de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) pudo determinarse que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* y de *C. metallidurans* forma parte de la superfamilia CHR de transportadores de cromato que originalmente fue descrita por Niels y colaboradores en 1998 como un grupo reducido de proteínas procariontes involucradas en el transporte de sulfato o cromato. Cabe mencionar que solo en los dos organismos antes mencionados se ha demostrado la función de transportar cromato (Cervantes y Campos-García., 2007). Un análisis filogenético mas detallado sobre ChrA determinó que las proteínas CHR pueden ser derivadas

de un evento de duplicación génica, que es muy común especialmente en bacterias. Adicionalmente se encontró que en homólogos CHR existen en dos tamaños: proteínas de cadena corta (SCHR) de longitud variable entre 123 – 234 aminoácidos y con un solo dominio, y proteínas de cadena larga (LCHR), de longitud variable entre 345-495 aminoácidos con dos dominios homólogos. Dentro de estas proteínas de cadena larga se encontró un grupo perteneciente a diferentes hongos cuya la longitud de la cadena polipeptídica es de 495 a 502 aminoácidos. De las 135 secuencias de proteínas homólogas analizadas, 77 están dentro de la familia de proteínas grandes LCHR. Esta familia dentro del árbol filogenético generado contiene subfamilias (LCHR1 a LCHR6) y una subfamilia LCHR de hongos (que incluyen a *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis*, *Gibberella zeae* y a *Magnaporthe grisea*), la cual está estrechamente relacionado con la subfamilia LCHR1. Las 58 secuencias restantes de la familia de proteínas pequeñas SCHR contienen 3 subfamilias (SCHR1 a SCHR2). El transporte de cromato solo se ha demostrado en proteínas LCHR (LCHR5- *Pseudomonas aeruginosa*, LCHR2- *Cupriavidus metallidurans*), por lo que se propone que las proteínas SCHR forman un grupo parálogo en la familia CHR (Díaz-Pérez, 2006; Cervantes y Campos-García, 2007). **(Fig.4)**

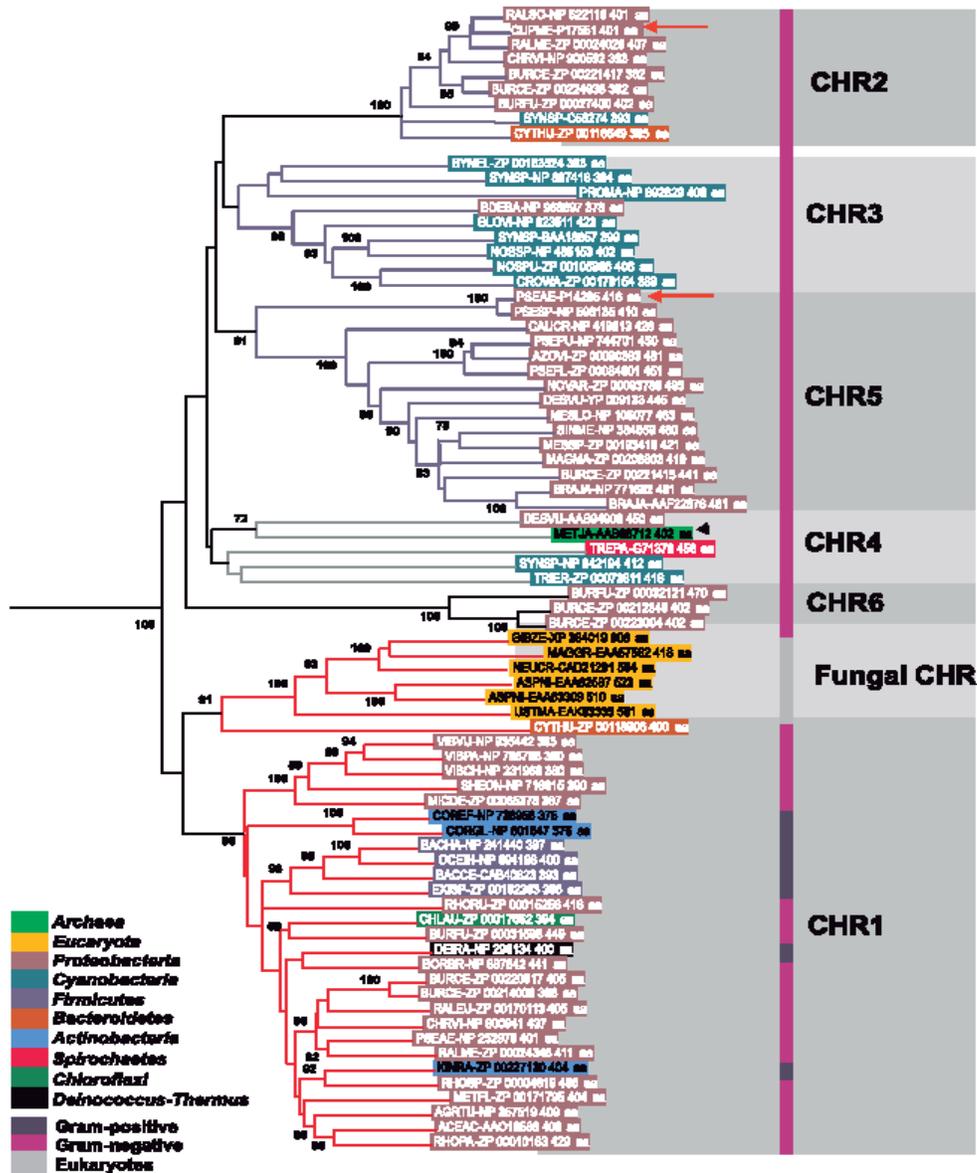


Figura 4. Árbol filogenético de la familia LCHR. Esquema donde se muestran las siete subfamilias LCHR (LCHR1 al LCHR6) y la subfamilia de hongos (LCHR fúngica). El color en la leyenda indica la distribución taxonómica de los grupos. La barra derecha muestra la clasificación Gram de las bacterias. Las flechas rojas indican a las dos proteínas caracterizadas funcionalmente, ChrA de *P. aeruginosa* y ChrA de *C. metallidurans*. Tomada de Cervantes y Campos-García, 2007.

1.4. *Neurospora crassa* como modelo biológico

Los hongos desde hace mucho tiempo se han utilizado como un modelo biológico de estudio, organismos tales como *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* entre otros, se han utilizado para el avance de áreas como la genética molecular, bioquímica, fisiología, biología celular, ecología y evolución. Estos organismos a lo largo del tiempo se han ganado su lugar por tener ciertas características: a) un rasgo en particular que los distinga; b) su tamaño pequeño que facilita su manipulación; c) su rápido crecimiento que permite hacer varios experimentos con mínimos requerimientos y d) lo mas importante y esencial es que estos organismos tienen procesos fundamentales similares al de los organismos superiores. Un organismo modelo utilizado mucho antes que *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* fue *Neurospora crassa*. En este hongo filamentoso se llevaron a cabo investigaciones que proporcionaron información clave para la genética, ejemplo de ello son los trabajos realizados por George W. Beadle y Edward L. Tatum en 1941, los cuales determinaron aquellos genes involucrados en el metabolismo. De estos trabajos también se obtuvo la primera mutante bioquímica. Al pasar los años este hongo fue pasando a un segundo plano y no fue hasta hace poco que como consecuencia de la secuenciación de su genoma completo publicado recientemente (Galagan, Birren y col., 2003) resurgió el interés por este organismo. *Neurospora* es ahora considerado un excelente modelo para los eucariotes superiores en muchos aspectos de la biología celular, incluyendo la multicelular (Osiewacz., 2002), al grado de ser denominado como un organismo central en la historia en el siglo XX para la genética, bioquímica y biología molecular.

El genoma de *N. crassa* consta de 7 cromosomas (42 megabases) y codifica para cerca de 10000 proteínas, mas que en *Schizosaccharomyces pombe* y poco menos que *Drosophila melanogaster*. Se han identificado potenciales genes asociados a la fotobiología, metabolismo secundario y en la señalización mediada por Ca^{+} . (Galagan, Birren., 2003).

II. JUSTIFICACIÓN

Estudios filogenéticos realizados sobre el sistema ChrA establecieron una alta posibilidad de que muchos de los miembros de la familia LCHR tuvieran la función de expulsar cromato, aparte de los ya descritos y bien caracterizados de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Cupriavidus metallidurans*. La presencia de este tipo de proteínas en un sistema transmembranal homólogo a ChrA específicamente en el organismo modelo *Neurospora crassa*. El conocer la función de la proteína homóloga en *N. crassa* es de suma importancia debido a que este hongo ha sido un organismo modelo en el que muchos procesos y mecanismos biológicos son extrapolables hacia la comprensión de procesos básicos de la biología molecular de otros organismos. Adicionalmente, la caracterización de la función de esta proteína ampliaría el conocimiento de la biología celular y molecular de *N. crassa*.

III. HIPÓTESIS

La proteína ChrNC de *Neurospora crassa* homologa de ChrA en *P. aeruginosa* participa como mecanismo de resistencia a cromato.

IV. OBJETIVO

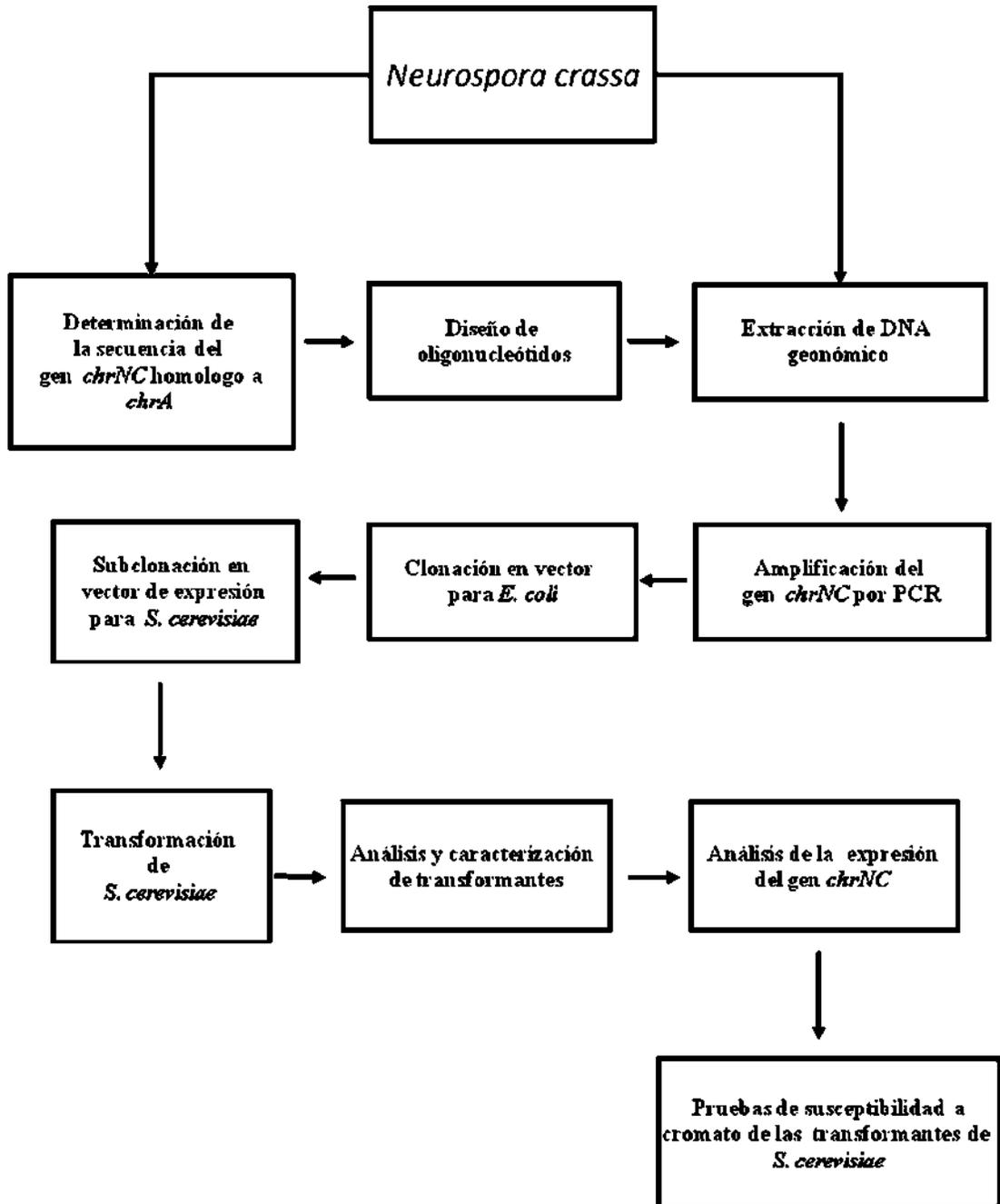
4.1. General:

- Determinar la funcionalidad de la proteína ChrNC homóloga a ChrA de *P. aeruginosa* en *Neurospora crassa*.

4.2. Específicos:

- Caracterizar el gen *chrNC* de *N.crassa*.
- Expresar el gen *chrNC* en la levadura *S. cerevisiae*.
- Determinar el nivel de resistencia a cromato de las transformantes de *S. cerevisiae* que expresan el gen *chrNC*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. MATERIALES Y METODOS

6.1. Cepas empleadas

- *Neurospora crassa* :
 - Cepa Silvestre 74-A (wt A), mat A
- *Escherichia coli*:
 - TOP10: F⁻ *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)
Φ80*lacZ*Δ*M15*Δ*lacX74**recA1* *araD139*Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK*
rpsL (Str^R) *endA1 nupG*
- *Saccharomyces cerevisiae*:
 - JCY100: Mat A, *leu::HisG*, *his3Δ::hisG*, *trp::hisG*, *ura3-52*
 - PHY80: Mat α, *ura3-52*, *lys2-*, *ade3Δ*, *his-*, *trp-*

6.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivos y sus componentes se adquirieron de los Laboratorios Bioxon® de México S.A., Merck®-México S.A. o Sigma Chemical Corporation® y fueron:

- Caldo Luria Bertani (LB): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- Agar Luria Bertani (AL): NaCl 1%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y agar bacteriológico 1.5%.
- Medio Mínimo Sintético: Bacto – Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos, sulfato de amonio 0.5% dextrosa ó glucosa 2%, agar bacteriológico 2%.
- Aminoácidos:

Aminoácido	Concentración Stock	g/100ml	ml/litro
Leucina	100mM	1.31	20
Lisina	100mM	1.827	10
Histidina	100mM	1.55	3
Triptófano	40mM	0.8	10
Adenina	10mM	0.1351	15

- PDA (Papa- Dextrosa- Agar): Preparado según las especificaciones del proveedor.
- YPD: Extracto de levadura 1%, peptona caseína 2%, dextrosa 2%, agar bacteriológico 2%.
- Medio Vogel líquido: Sacarosa 1.5g/L, 1X sales de Vogel (50X sales de Vogel: citrato de sodio $\cdot 5H_2O$ 150g, KH_2PO_4 anhidro 250g, NH_4NO_3 anhidro 100g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5g), 5ml de solución de elementos traza, 2.5ml solución de botina (0.1mg/ml). Lo anterior se aforó a 1Lt de H_2O . *Solución de elementos traza:* En 195ml de agua destilada se disolvió: 5g de ácido cítrico $\cdot 1H_2O$, 5g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, 0.25g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.05g $MnSO_4 \cdot 1H_2O$, 0.05g H_3BO_3 anhidro y 0.05g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (tomado del Fungal genetic Stock Center- www.fgsc.net)
- Medio Vogel solido: Al Medio Vogel líquido se le adiciona agar bacteriológico al 1.5%
- Medio PDB (Papa Dextrosa Broth): Preparado según las especificaciones del proveedor.

6.3. Reactivos

- K_2CrO_4 (Merck). La sal de cromato fue utilizada a partir de una solución stock 1M preparada en agua destilada y mantenida a temperatura ambiente.

6.4. Plásmidos

- pCR®2.1 - TOPO® Invitrogen®: Plásmido para clonación, AmpR, KanR, f1 ori, pUC ori, Plac-lacZ α
- pYES2® Invitrogen®: Plásmido para clonación, promotor GAL1, sitio promotor T7, múltiples sitios de clonación, terminador transcripcional CYC1, origen pUC, AmpR, gen URA3, f1ori.

6.5. Análisis y manipulación de ácidos nucleídos

6.5.1. Aislamiento de DNA plasmídico.

El aislamiento de DNA plasmídico se empleó el método de lisis alcalina (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979; Ish-Horowicz y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo: A partir de un cultivo bacteriano de 18-20h, se centrifugó y la pastilla se resuspendió con una solución STE (sacarosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0 y EDTA 10mM) con lisozima (20mg/ml). Se mezcló y se incubó a 37°. Posteriormente se agregó un volumen de solución II recién preparada [NaOH 0.2N y SDS 1%(dodecilsulfato de sodio)], se agitó y se incubó en hielo. Enseguida se le adicionó acetato de potasio 5M (acetato de potasio 5M y ácido acético glacial pH4.8), se mezcló y se incubó en hielo. Se centrifugó y el sobrenadante se extrajo con fenol- cloroformo (mezcla 1:1). La fase acuosa superior se recuperó y se le adicionó etanol absoluto frío incubando brevemente a -20°C. El DNA fue recuperado por centrifugación y resuspendido en agua desionizada estéril. Estas muestras se almacenaban a -20°.

6.5.2. Aislamiento de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*.

De un cultivo de 24h las células fueron recuperadas por centrifugación y resuspendieron con TE (0.121% base Trizma, 0.0372% ácido acético tetra- etilendiamina "EDTA" a pH8 ajustando con ácido clorhídrico). Se adicionaron perlas de vidrio y solución TSNTTE (2% Triton X-100, 1%SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA). Esta mezcla se agitó y se incubó en hielo. Se adicionó fenol y se colocó en el vortex. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó acetato de sodio 3M mezclando suavemente. Se agregó etanol 100% frío y se incubó a -20°C por 20min. Posteriormente se centrifugó y la pastilla se resuspendió en H₂O conteniendo RNAasa (10mg/ml). Se incubó a 37°C en agitación por 30min. Después se le agregó acetato de amonio 4M y etanol al 100%

frío, se incubó a -20°C hasta que precipitara. Se centrifugó y la pastilla se lavo con etanol 70%. La pastilla seca se resuspendió con H_2O destilada estéril.

6.5.3. Aislamiento de DNA genómico de *Neurospora crassa*.

Para la extracción de DNA se realizó un cultivo de *N. crassa* en medio Vogel. Se recuperó el micelio y se pulverizó en un mortero (estéril) usando nitrógeno líquido. El micelio pulverizado se extrajo con buffer de urea (Urea 7M, NaCl 0.35M, Tris 0.05mM pH 8.0, EDTA 0.02M, Salcosina N-lauril 1%, H_2O cbp 50ml), se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente. Posteriormente se hizo una extracción con fenol y cloroformo dos veces. Se centrifugó y se recuperó el sobrenadante para después agregarle isopropanol y etanol frío más 1/10 del volumen de acetato de sodio 2M, se mezcló suavemente y se centrifugo. Se lavó la partilla 2 veces con etanol al 70% y se dejo secar para posteriormente ser resuspendida con H_2O destilada desionizada estéril.

6.5.4. Extracción de RNA.

Se pulverizaron las células en un mortero con nitrógeno líquido y se le adicionó NTES (NaCl 1M, Tris 1M pH7.5, EDTA 0.5mM pH 8.0, SDS 10%) así como Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamilico 25: 24: 1, se colocó en el vortex para su extracción. Se centrifugó a 4°C y se recupero la fase acuosa a la cual se le hizo una segunda extracción fenolica. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y etanol 100% incubandose a -20°C . Se centrifugó a 4°C , la pastilla se resuspendió en H_2O DEPC y acetato de litio 4M y se incubó 4°C de 3-12h. Pasado este tiempo se centrifugó a 4°C para recuperar la pastilla con H_2O DEPC (DEPC 0.1%) adicionando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y etanol 100%. El RNA fue recuperado por centrifugación, se lavó con etanol

70% para finalmente dejarlo secar. La pastilla de RNA fue resuspendida con H₂O DEPC.

6.5.5. Electroforesis en geles de agarosa.

Las muestras de DNA se sometieron a un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.40M y EDTA0.001M) a 100 voltios. Las muestra de DNA se mezclaron antes de ser corridas en el gel con amortiguador de carga [azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1M pH 8.0, SDS 0.5%, sacarosa 40%]. El desarrollo del gel se visualizó a través de tinción con una solución de bromuro de etidio al 0.01%. El DNA así teñido, se observó en un transluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc. ®). Como marcador de tamaño molecular se utilizó el DNA del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y/o *HindIII*.

6.5.6. Aislamiento del DNA de geles de agarosa.

Para la purificación del DNA empleado en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System ®” de Promega ®. Siguiendo las indicaciones kit, la banda de interés se corto del gel de agarosa y se le adicionó la solución de unión a membrana. Se mezcló bien en un agitador y se incubó a 60°C hasta disolver todo el fragmento del gel. La mini columna SV se insertó en un tubo de colección y se transfirió la solución disuelta en la columna y se incubó a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó y se lavó dos veces. La elución del DNA se hizo adicionando agua grado HPLC y centrifugando.

6.6. Procedimientos enzimáticos del DNA.

6.6.1. Restricción con endonucleasas.

Muestras de DNA fueron digeridas con endonucleasas empleando 1U de enzima de restricción (Invitrogen ®) por cada microgramo de DNA.

6.6.2. Ligaciones.

2µl del vector linearizado se mezcló con 10µl de buffer de ligasa, 8-9µl del fragmento de interés y 1µl de T4 DNA ligasa (Promega ®).

6.7. Diseño de oligonucleótidos.

Con el número de acceso de la proteína homólogo a ChrA de *Neurospora crassa* CAD21291 utilizando la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> se obtuvo la secuencia del gen homólogo *chrA*. A partir de esta se diseñaron los oligonucleótidos AC125 de 36 nucleótidos (incluyendo un sitio de restricción *BamHI*) y NCHR2 de 24 nucleótidos (Tabla I).

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *chrNC*.

Oligonucleótido	Secuencia
AC125	5'GGATCC ATG TCA CCT CAA CCT CCA GTA CCT AAC AGT3'
NCHR2	5'CTA ACT CGC AAA GCC ATC GAA AGC 3'

6.8. PCR. (Reacción de la Polimerasa en Cadena)

Se preparó el volumen por cada reacción necesario indicado en el manual del proveedor (Invitrogen®): buffer de PCR 10X (Invitrogen ®), MgCl₂ 50mM; dNTPs 10mM; primer directo y primer reverso (10 µM cada uno), Taq DNA polimerasa, y DNA templado. Las condiciones de amplificación fueron: 2min 94°C; 35 ciclos de 30seg a 94°C, 1min a 66°C y 2 min a 72°C. Finalmente se le dio una extensión final de 10min a 72°C.

6.9. Generación del plásmido pECNC1.

El producto de PCR resultado de la amplificación del fragmento homólogo a ChrA de *N. crassa* se clonó en el vector pCR®2.1 - TOPO® Invitrogen® siguiendo las especificaciones del proveedor: se

mezclaron partes iguales del producto de PCR y vector pCR®2.1 - TOPO® Invitrogen®, en solución de sales diluida (50mM NaCl, 10mM MgCl₂), se incubó y después se dializó por 10min usando membrana MILIPORE® de poro de 0.025µm. La mezcla, se utilizó para transformormar *E. coli* siguiendo la metodología descrita en el manual del vector pCR®2.1 - TOPO® Invitrogen®.

6.10. Generación de plásmido pSCNC2.

Para la subclonación del gen *chrNC*, el vector pECNC1 fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI* (Invitrogen®), el fragmento liberado fue purificado y ligado en el vector pYES2 ® Invitrogen® linearizado con las mismas enzimas. La mezcla se dializó por 1h usando membrana MILIPORE® de poro de 0.45µm misma que se utilizó para transformormar *E. coli* siguiendo la metodología descrita en el manual del vector pYES2 ® Invitrogen®.

6.11. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las células de *S. cerevisiae* fueron transformadas siguiendo las especificaciones del manual del vector pYES2 ® Invitrogen®: un cultivo de células crecidas en YPD con D.O. a 600nm, se utilizó como preinóculo para obtener un subcultivo de D.O. de 0.4. Las células se recuperaron por centrifugación a 2500rpm por 10min y se resuspendió la pastilla con 1X TE (10mM Tris pH7.5, 1mM EDTA), enseguida se centrifugo y se resuspendió la pastilla con 1X Acetato de Litio / 0.5X TE (100mM acetato de litio pH7.5, 5mM Tris-HCl pH 7.5 y 0.5mM EDTA). Las células se incubaron a 28°C con agitación. Para la transformación se mezclaron el DNA del plásmido pSCNC2 y DNA de esperma desnaturalizado de salmón con células tratadas con el 1X Acetato litio / 0.5X TE. A esta mezcla se le adicionó 1X acetato de Litio/ 40% PEG-3350/ 1X TE (100mM acetato de litio pH7.5, 40% PEG-3350, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) y se mezclo muy bien. Se incubo a 30°C por 30min, transcurrido el tiempo

se le adiciono 88µl DMSO (DMSO 7%), se mezcló y se le dio un choque de calor. Las células se recuperaron por centrifugación resuspendiendo la pastilla con 1XTE y sembrando las células en cajas de Medio Mínimo Sintético.

6.12. Secuenciación.

6.12.1. Secuenciación de las muestras de DNA

El DNA fue secuenciado utilizando el método Dideoxitermination Chain empleando un equipo ABI PRISM 377 DNA Perkin Elmer.

6.12.2. Análisis de la secuencia.

El alineamiento de las secuencias se realizó empleando el programa Clustal W.

6.13. Análisis tipo Southern blot

6.13.1. Tratamiento de la muestra.

Veinticinco microgramos de DNA genómico fueron sometido a restricción con endonucleasa *Pst*I utilizando 1U de enzima de restricción (Invitrogen) por microgramo de DNA. Se incubo por 4h a 37°C agregando después de este tiempo 1U de enzima adicional. Esta mezcla se incubó 12h más para posteriormente ser concentradas a 70°C. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1.4%.

6.13.2. Southern blot

El protocolo para el análisis tipo Southern blot se hizo siguiendo las especificaciones del proveedor Amersham HybondTM-XL membrane GE® Healthcare.

6.14. Análisis tipo Northern blot.

6.14.1. Preparación de la muestra de RNA

Treinta microgramos de de RNA cuantificados a 260nm fueron mezclados con 66.7% formamida desionizada, 13.3% MOPS10X, 21.3% formaldehído y 2.3% bromuro de etidio (0.1µg/ml) e incubos a 65°/5min. Esta muestra se mezclo con el buffer de carga para ser analizado por electroferisi en gel agarosa al 1.6% (73% H₂O-DEPC, 11% MOPS10X, 16% formaldehído).

Northern blot.

El protocolo para el análisis tipo Northern blot se hizo siguiendo las especificaciones del proveedor Amersham Hybond™-XL membrane GE® Healthcare.

6.15. Preparación de la sonda radiactiva.

Para preparar la sonda radiactiva se utilizo el protocolo descrito por GE® healthcare, el cual utiliza el método Rideprime II Random Prime Labelling System

6.16. Análisis de la expresión del gen *chrNC* en *S. cerevisiae*.

Las células de un cultivo de *S. cerevisiae* de Medio Mínimo de 24h, se recuperaron por centrifugación a 2800rpm/6min. La pastilla de células se resuspendió con H₂O destilada estéril, y fue transferida a Medio Mínimo fresco para ser incubadas a 28°C/1500rpm. Este procedimiento se repitió 2 veces más y las células así obtenidas se transfirieron a Medio Mínimo conteniendo galactosa y rafinosa al 2% (inducción) o glucosa 2% (represión). Alicuotas de estos cultivos se tomaron a las 15 y 28h. Las células se recuperaron por centrifugación a 12000rpm/3min, y se congelaron a -70°C.

6.17. Prueba de susceptibilidad a cromato transformante *S. cerevisiae*

A partir de un preinoculo de 12h en Medio Mínimo con dextrosa 2%, se concentraron las células por centrifugación a 2800rpm/6min mismas que fueron transferidas a Medio Mínimo sin fuente glucosa e incubadas con agitación a 1800rpm por 6h a 28°C. La mitad del

volumen obtenido se transfirió a medio mínimo con dextrosa 2% (control) y la otra mitad al mismo medio conteniendo galactosa al 2%. Los cultivos fueron incubados por 12h a 28°C/1800rpm. A partir de estos cultivos se inocularon tubos conteniendo medio mínimo adicionado de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mM de cromato de potasio utilizando la misma fuente de carbono que el cultivo original. Se incubaron a 28°C/1800rpm, y el crecimiento se cuantificó a las 24h a través de la absorbencia a 600nm.

VII. RESULTADOS

7.1. Amplificación del gen *chrNC* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de DNA genómico de *N.crassa* (ver apéndice Fig. V) se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos AC125 y NCHR2. Una alícuota del producto de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (ver Matariles y Métodos) observándose un único producto correspondiente a un fragmento de aproximadamente de 1.76kb. (Fig.5)

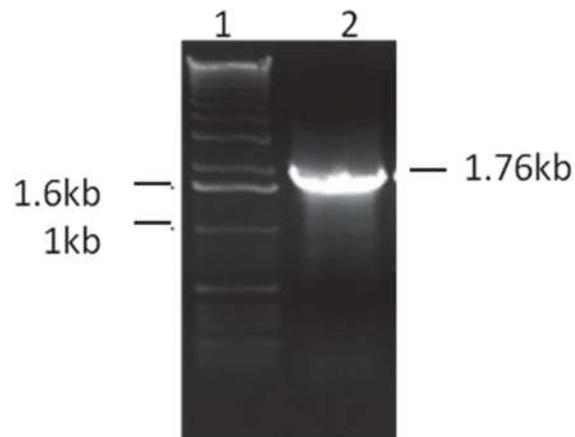


Figura 5. Amplificación del gen *chrNC* mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Fotografía del producto de amplificación del gen *chrNC*. Carriles: 1.- marcador de peso molecular; 2.- producto de PCR del gen *chrNC*.

7.2. Construcción y análisis del plásmido pECNC1

El fragmento correspondiente a la amplificación por PCR del gen *chrNC* se clonó en el vector pCR®2.1 - TOPO® Invitrogen® de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos generando el plásmido pECNC1 (Fig.6A). Para verificar la identidad del plásmido generado, el DNA plasmídico fue sometido a una restricción con las enzimas *BamHI* y *NotI*, el gen *chrNC* clonado esta flanqueado por los sitios de restricción de estas enzimas. En la figura 6B se muestra el análisis de la restricción de pECNC1. En el carril 2, correspondiente a la restricción, se observa un fragmento de 1.8kb y otro de 3.8kb correspondiente al gen *chrNC* y al vector respectivamente. Con el fin de confirmar la identidad del fragmento clonado, el plásmido pECNC1 fue secuenciado utilizando como oligonucleótido directo el primer Universal y el oligonucleótido NCHR2 como primer reverso. La secuencia obtenida se utilizó para llevar a cabo un análisis tipo CLUSTAL W teniendo como secuencia de referencia aquella obtenida del *Neurospora crassa* Data Base (locus NCU01055.3, <http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/GeneDetails.html?sp=S7000000693076221>). Este análisis mostró que la secuencia del fragmento clonado en pECNC1 obtenida con el oligonucleótido Universal tenía una identidad del 90% con la secuencia de referencia, mientras que la secuencia derivada del oligonucleótido NCHR2 era de solo el 75%. De acuerdo con la secuencia de referencia, el ORF correspondiente es de 1745nt y codifica para una proteína de 508 aa cuya función hipotética es similar a ChrA de *P. aureoginosa*. La secuencia esta interrumpida por dos intrones localizados a +43 y +350 (Fig. 6C).

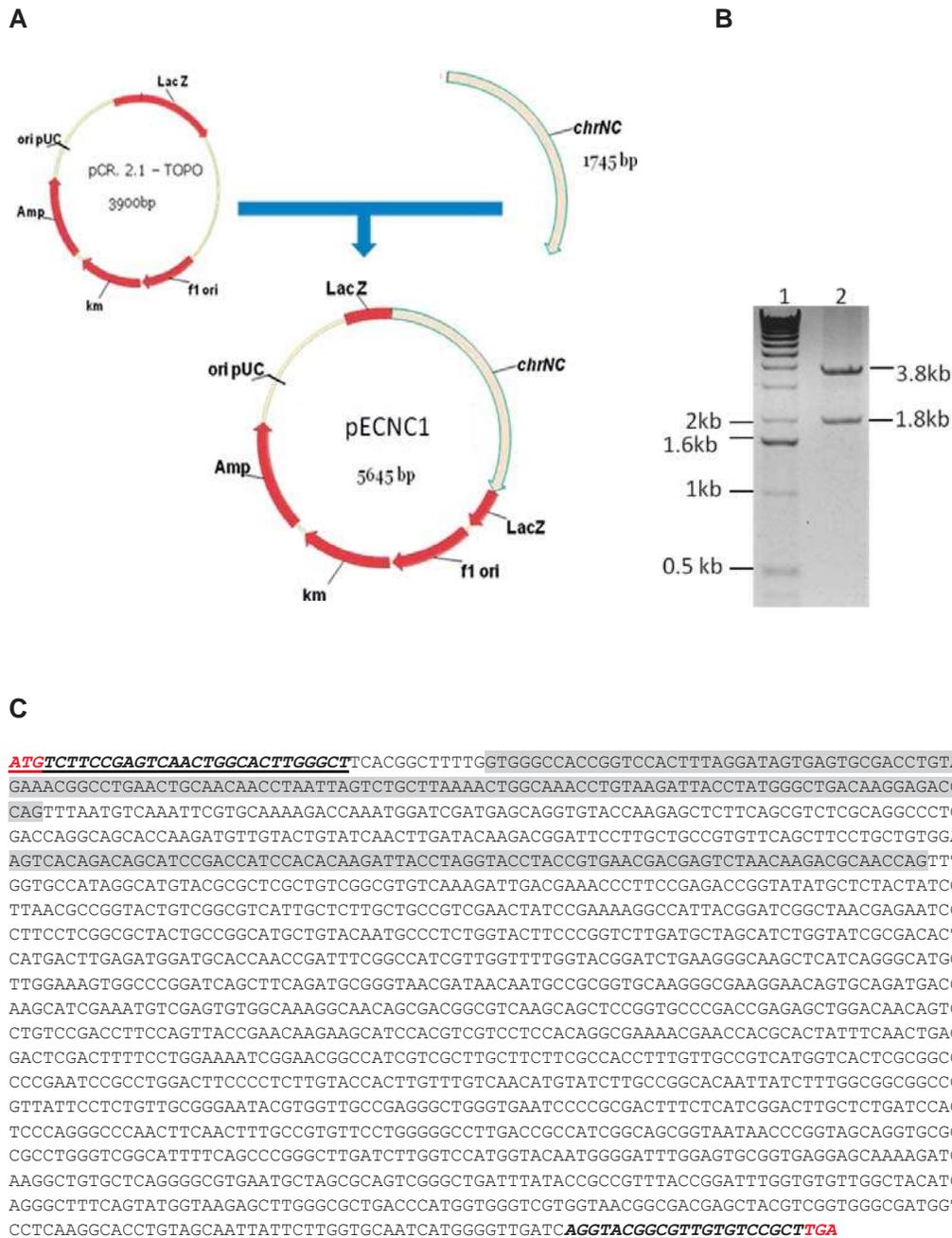


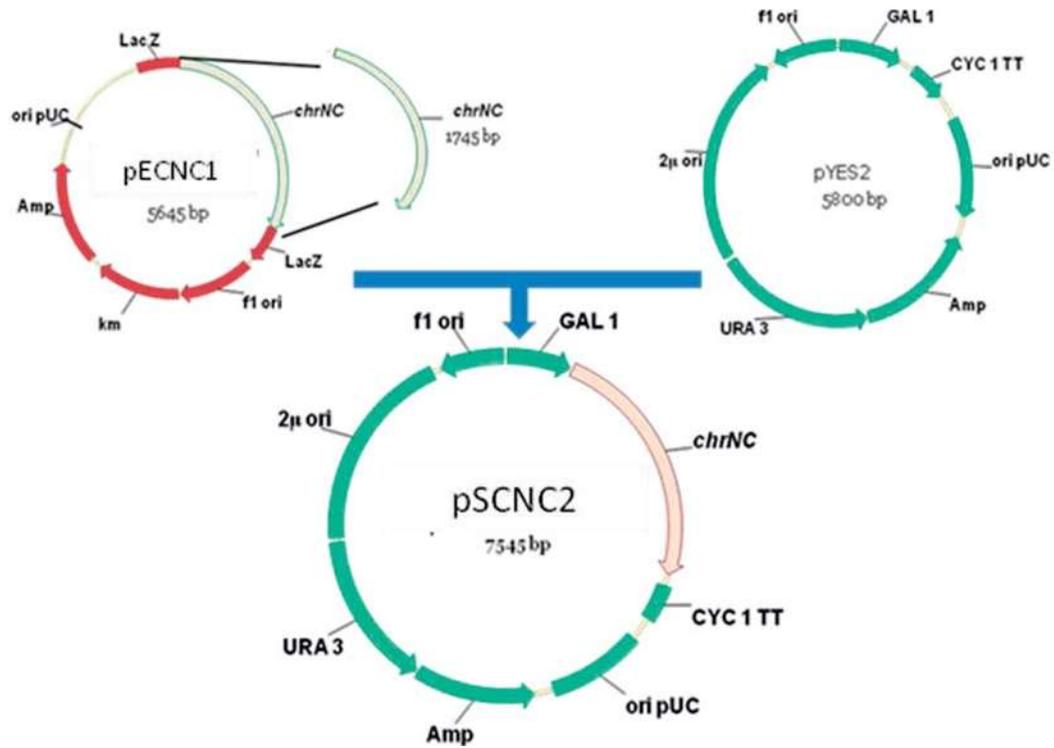
Figura 6. Análisis y clonación del gen *chrNC*. A) Estrategia para la generación del plásmido pECNC1. El producto de amplificación correspondiente al gen *chrNC* fue clonado en el vector pCR2.1 ® B) Análisis de restricción de pECNC1. Fotografía del producto de restricción pECNC1 con endonucleasas *Bam*HI y *Not*I (carril 2) y marcador de peso molecular (carril 1). C) Secuencia del gen *chrNC* obtenida del *Neurospora crassa* Data Base. En color rojo se

destacan tanto el codón de inicio como el de terminación, en color gris se indican las secuencias correspondientes a los intrones y subrayado esta la localización de los oligonucleótidos AC125 y NCHR2.

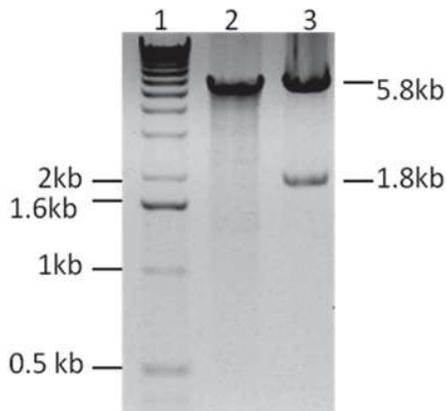
7.3. Construcción y análisis del plásmido pSCNC2

Con el fin de subclonar el fragmento *chrNC* del plásmido pECNC1 en el un plásmido de expresión para *S. cerevisiae*; el fragmento *BamHI/NotI* purificado a partir del gel de agarosa se ligó con el vector pYES2® linearizando con las mismas enzimas de acuerdo al protocolo que se describió en Materiales y Métodos (Fig. 7A). El producto de esta ligación fue utilizada para transformar *E. coli* y a partir de las clonas seleccionadas como positivas se verificó la correcta clonación del fragmento a través de un análisis de restricción con las enzimas *BamHI* y *NotI*. El resultado de la digestión fue analizado observándose el fragmento de 1.8kb correspondiente al gen *chrNC* y el fragmento de 5.8kb correspondiente al vector pYES2® (Fig. 7B carril 3). Como control de este ensayo se utilizó el plásmido pYES2® digerido con las mismas enzimas (Fig. 7B carril 2). Adicionalmente al análisis de restricción de la clona seleccionada, el DNA plasmídico fue utilizado como templado en una reacción de PCR donde fueron utilizados los oligonucleótidos T7 y NCHR2. Resultado de este amplificación se obtuvo un solo producto cuyo peso molecular estimado a través de un análisis electroforético en gel de agarosa fue de 1.8kb (Fig. 7C carriles 2 y 3).

A



B



C

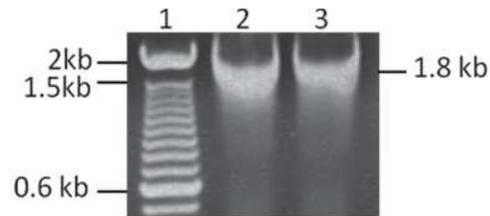


Figura 7. Generación del plásmido pSCNC2. A) Estrategia para la construcción del plásmido pSCNC2. A partir de la digestión del plásmido pECNC1 con las enzimas *Bam*HI y *Not*I, se rescató el fragmento correspondiente al gen *chrNC*, mismo que fue ligado en el vector pYES2[®] que previamente había sido digerido con las mismas enzimas. **B)** Análisis de restricción de pSCNC2. Fotografía del producto de restricción pSCNC2 con endonucleasas *Bam*HI y *Not*I (carril 3), marcador de peso molecular (carril 1) y plásmido pYES2[®] digerido con *Bam*HI y

NotI (carril 2) **C)** Fotografía del producto de la amplificación por PCR del gen *chrNC* (carriles 2 y 3) y marcador de peso molecular (carril 1).

7.4. Análisis e identificación de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* con el plásmido pSCNC2.

A partir de clonas de *S. cerevisiae* identificadas como positivas después de ser transformadas con el plásmido pSCNC2, se llevó a cabo un análisis tipo Southern blot a fin de confirmar su identidad positiva. DNA genómico de las clonas LJC1 y LPHY2 fue digerido con *PstI* y separado en un gel de agarosa (Fig. 8A). La hibridación de este DNA fijado a la membrana de nylon utilizando el fragmento de 1.7kb correspondiente al gen *chrNC* identificó un fragmento del mismo peso molecular en las clonas analizadas (Fig. 8B, carriles 3, 4, 6 y 7). Como control positivo se utilizó DNA del plásmido pSCNC1 (Fig. 8B, carril 9). Los controles negativos corresponden a DNA de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pYES2® sin inserto (Fig. 8B, carriles 2 y 5).

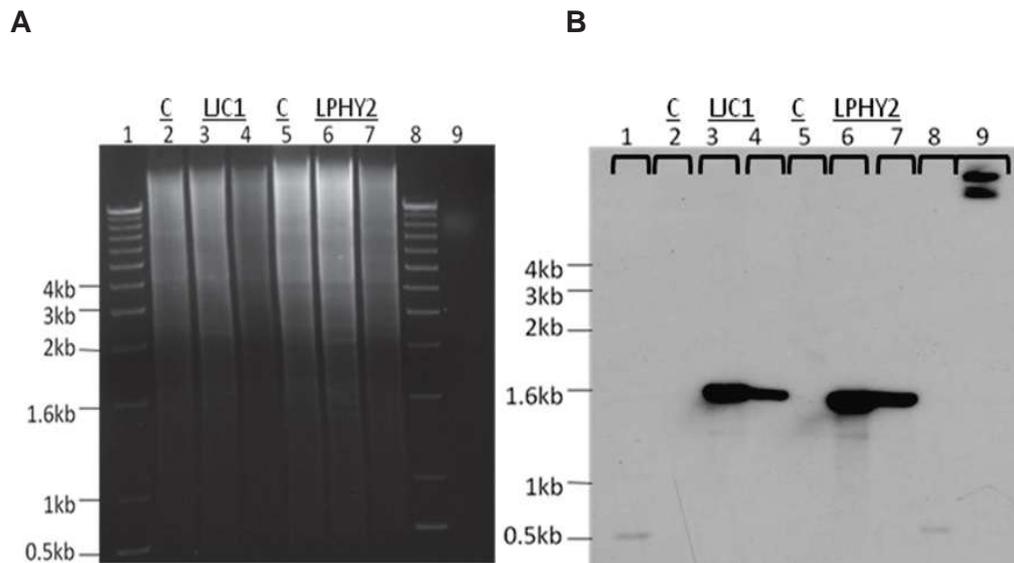


Figura 8. Análisis tipo Southern blot para las clonas de *Saccharomyces cerevisiae* A) Fotografía del DNA total digerido con *PstI* de las transformantes de *S. cerevisiae* control (carril 2 y 5) clona LJC1 (carriles 3 y 4) y clona LPHY2 (carriles 6 y 7), marcador de peso molecular (carril 1 y 8) B) Fotografía de placa de rayos X de Southern blot. Carriles: 1y 8 Marcadores de

peso molecular; 2 Control LJC1; 3 y 4 clona LJC1; 5, Control LPHY2; 6 y 7 Clona LPHY2; 9 Plásmido clonado LJC1 diluido sin digerir.

7.5. Análisis de la expresión del gen *chrNC* en las transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Con la finalidad de determinar si el gen *chrNC* era expresado por las cepas transformantes de *S. cerevisiae* LJC1 y LPHY2 se llevó a cabo un ensayo de inducción de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este ensayo consistió en dejar crecer las clonas 15 y 28h en Medio Mínimo que contenían glucosa 2% (Represor de la expresión del gen) y otro con galactosa 2% (Inductor de gen por el promotor GAL1). El RNA de la cepa LJC1 se obtuvo de cada una de las condiciones y la expresión del gen *chrNC* se analizó a través de un ensayo tipo Northern blot utilizando como sonda el fragmento de 1.7kb correspondiente al gen *chrNC* derivado del plásmido pECNC1 (Fig.9). La señal correspondiente a la expresión del gen es solo evidente en las clonas LJC1 siendo mas intensa la señal bajo condiciones de no represión (galactosa), mientras que la señal proveniente de condiciones de represión (glucosa) no presenta señal.

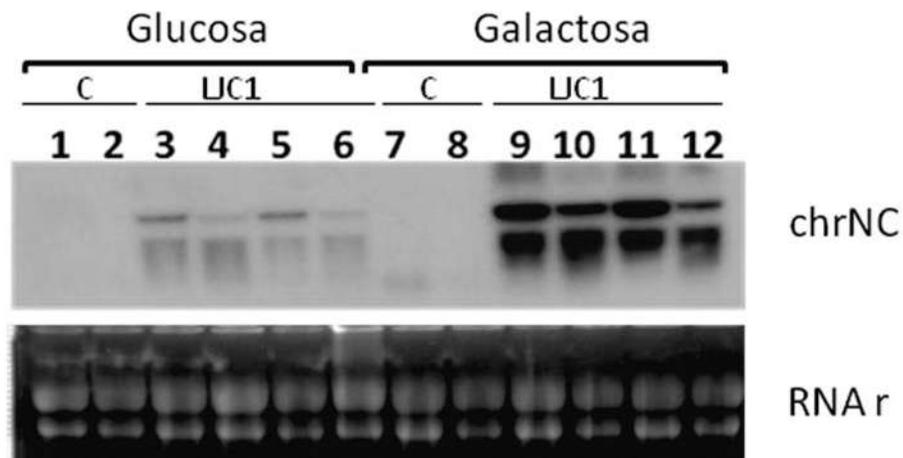


Figura 9. Northern blot de las clonas LJC1 de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Fotografía del gel de agarosa 1.6% (inferior) y placa de rayos X de Southern blot (superior), muestras cargadas con buffer de carga Orange G. Carriles: 1, Control Glucosa 15h, 2, Control Glucosa 28h; 3 y 5, clonas LJC1 Glucosa 15h, 4 y 6, clonas LJC1 Glucosa 28h; 7, Control 15h, 8, Control Galactosa 28h; 9 y 11, clonas LJC1 Galactosa 15h, 10 y 12, clonas LJC1 Galactosa 28h.

7.6. Ensayo de susceptibilidad a cromato de las transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Comprobada la expresión del gen *chrNC*, las clonas positivas de la cepa JCY100 se sometieron a una curva de susceptibilidad a cromato descrita en Materiales y Métodos, con la finalidad de determinar la posible función del gen *chrNC* en *S. cerevisiae*. Los resultados mostraron que las clonas (control y LJC1) provenientes de dextrosa eran sensibles al cromato disminuyendo su crecimiento al aumentar la concentración de cromato (Fig. 10 líneas azul “control” y verde “LJC1”). Estas mismas clonas pero provenientes de galactosa mostraron, que la cepa control era sensible al cromato teniendo un comportamiento muy similar al las de dextrosa (Fig. 10 línea roja “Control”), Pero la clona LJC1 proveniente de galactosa mostro una susceptibilidad menor al cromato, presentando una resistencia aproximadamente de un 34% en comparación con la cepa control (Fig. 10 línea morada “LJC1”).

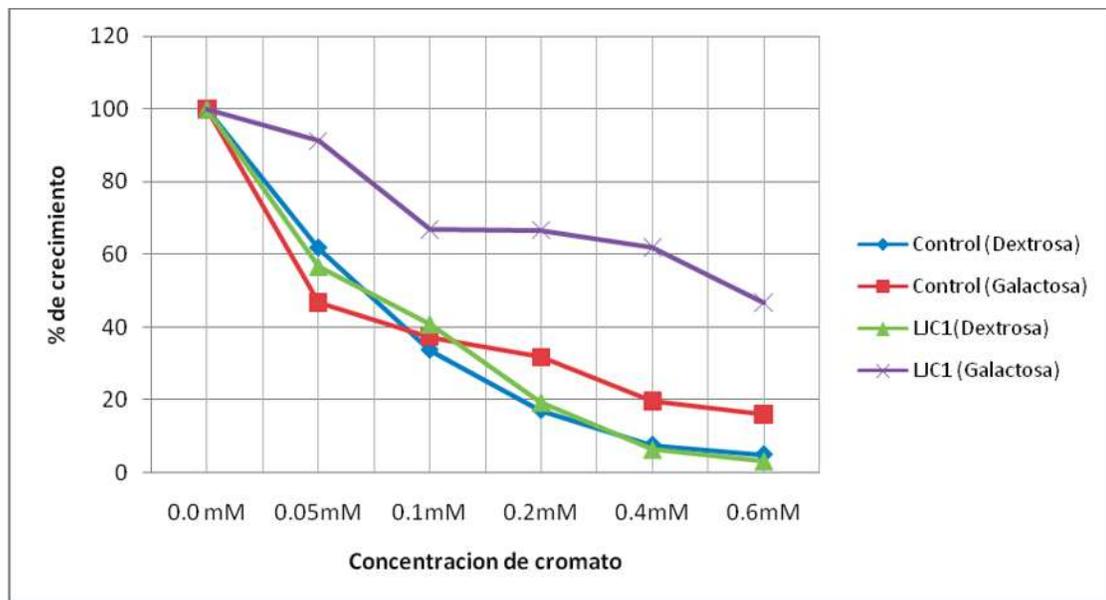


Figura 10. Efecto del cromato a transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Cepas de *S. cerevisiae* sometidas a diferentes concentraciones de cromato, utilizando cepa control (cepa con plásmido vacío) y a la cepa LJC1 (cepa con inserto). n=3

VIII. DISCUSIÓN

ChrA es una proteína transmembranal codificada por el plásmido pUM505 en *Pseudomonas aeruginosa* y pMOL28 en *Cupriavidus metallidurans* (Cervantes col. 1990, Nies col. 1990). Tiene como función la expulsión de cromato del interior hacia el exterior de la célula, mecanismo el cual solo ha sido reportada en estos dos organismos. ChrA de *P. aeruginosa* es de 416aa y con una topología de 13 segmentos transmembranales (Jiménez-Mejía et al. 2006) y ChrA de *C. metallidurans* es de 401aa y con topología de 10 segmentos transmembranales (Nies et al. 1998).

De acuerdo al estudio realizado por Díaz-Pérez (2006) la proteína ChrNC pertenece a la familia LCHR con probabilidad de tener una función ortóloga a las proteínas ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y cols., 1990) y *Cupriavidus metallidurans* (Nies, Silver., 1990). Esta inferencia esta basada también en el hecho que el perfil de hidrofobicidad para esta proteína presenta una alta probabilidad de ubicarla en la membrana plasmática, conteniendo 9 dominios transmembranales, característica de las proteínas CHR (Nies y cols., 1998). Establecer una función de ChrNC similar a la reportada para ChrA es un tanto aventurado ya que no existe en la literatura algún reporte de un mecanismo de resistencia a cromato en hongos por efecto de una proteína transportadora. Sin embargo, mutantes resistentes a cromato se han reportado en *N. crassa*; estas mutantes están afectadas en el mecanismo de transporte de sulfato (Marzluf, 1970 y Roberts, Marzluf., 1970).

El gen *chrNC* de *N. crassa* fue ubicado en la base de datos del NCBI (No. acceso CAD21291) y en la del *Neurospora crassa data base* (locus

NCU01055.3, <http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/GeneDetails.html?sp=S7000000693076221>) (Figura 6C). La secuencia del gen *chrNC* muestra las características comunes de genes eucariotas de contener su codón de inicio y de terminación. Así mismo se determinó la presencia de dos intrones localizados a +43 y +350. A partir de la secuencia reportada en el NCBI se diseñaron los oligonucleótidos AC125 (36nt) y NCHR2 (24nt). El oligo AC125 fue diseñado con sitio de restricción *BamHI* justo antes del codón de inicio a fin de hacer una clonación dirigida en el vector *pYES2* de expresión en *S. cerevisiae*. La amplificación del gen *chrNC* se realizó mediante el uso de DNA genómico de *N. crassa*. El resultado de la amplificación por PCR fue un único fragmento de aproximadamente 1.76kb, que coincide con el esperado (Fig. 5).

Con la finalidad de generar las herramientas que permitieran el estudio de la posible función hipotética propuesta para ChrNC, se generaron las siguientes construcciones: pECNC1 y pSCNC2. El vector pECNC1 es derivado del vector pCR2.1® TOPO® donde fue clonado el producto de PCR correspondiente al gen *chrNC*. Con el fin de determinar la identidad del vector, se analizó la construcción a través de un análisis con las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI* (Fig. 6B). La secuencia del plásmido pECNC1 mostró algo muy particular, esto es que al hacer el alineamiento usando como secuencia molde aquella derivada del NCBI presentaba muy poca identidad entre ellas. Esto llevo a pensar que el fragmento amplificado no correspondía al gen de interés. Sin embargo, al hacer uso de una base de datos mas especializada (*Neurospora crassa* Data Base) y haciendo una búsqueda utilizando la secuencia de nucleótidos o aminoácidos del NCBI dio como resultado un ORF correspondiente a un transportador de cromato hipotético de 1745 nucleótidos (con intrones) o de 1524 nucleótidos (sin intrones) que codificaba para una proteína de 508 aminoácidos. El alineamiento mediante el programa CLUSTAL W con la secuencia de nucleótidos con intrones nos mostro que existía un 95% de identidad con la secuencia obtenida en sentido directo y un 75% de identidad con aquella en sentido reverso. Es de destacarse que las secuencias de los oligos utilizados no fueron identificados plenamente en la secuencia

obtenida del *Neurospora crassa* Data Base. Este dato corrobora lo mencionado por Díaz-Pérez (2006) sobre la información disponible en las bases de datos, misma que se encuentra mal curada, es decir el grado de análisis esta en etapa inicial, como lo demuestra el grado de redundancia dentro de las bases de datos del NCBI, problema que se extiende a otras fuentes de información.

La propuesta sobre el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como organismo para determinar la funcionalidad del gen, se debió a que este organismo al igual que *N. crassa* tiene el genoma completamente secuenciado y además de que existen diversas técnicas muy bien estandarizadas para estudiar expresión de genes en este organismo. Este organismo tiene tres clases de expresión de vectores: episomal, plásmidos o vectores, vectores integrativos y cromosomas artificiales de levadura (Glick, Pasternak, 1998). Nuestra estrategia se basó en el uso de un vector de expresión inducible denominado *pYES2*[®]. El uso de los vectores *pCR*[®]2.1 - *TOPO*[®] Invitrogen[®] al igual que el *pYES2*[®]Invitrogen[®] tuvieron una razón muy particular de haberlos seleccionados. El vector *pCR*[®]2.1 - *TOPO*[®] se utilizó en primer lugar por las características las cuales contenía para clonar el fragmento del gen *chrNC* sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción para la clonación además de contener dentro del plásmido el gen *LacZ* lo cual proporciono de gran ayuda para poder seleccionar las clonas. El vector *pYES2*[®] al tener la característica de tener sitios de replicación tanto para *E. coli* y *S. cerevisiae* y un promotor *GAL1* antes del sitio de poli clonación proporcionaba una ventaja para poder estudiar la funcionalidad del gen usando galactosa como única fuente de carbono en un organismo sensible al cromato como *Saccharomyces*. En ambos vectores se utilizaron todas formas de selección que contenían los vectores, debido a esto no solo las resistencias a los antibióticos nos ayudaron a la selección de las clonas si no que además en el caso de *pYES2*[®] al tener el gen *URA3* se utilizaron dos cepas diferentes (*LJC1*, *LPHY2*) pero que contenían algo en común lo cual era de contener la auxotrofia a uracilo.

Con el vector *pSCNC2* se llevó a cabo la transformación de las cepas de *S. cerevisiae* (*LJC1*, *LPHY2*). Con el fin de corroborar la identidad de las colonias

transformantes se realizó un análisis tipo Southern blot utilizando *PstI*. El análisis mostró que el gen estaba presente en las clonas y además de mostrar una señal de un solo tamaño de aproximadamente de 1.7kb. Siendo el objetivo final determinar la función del gen *chrNC* en levadura, se tenía la duda de si este hongo podría expresar bien el gen y llevar a cabo la función predicha. Aun cuando ambos son hongos podrían diferir en los detalles de sus componentes estructurales. Sin embargo, existen antecedentes de haber hecho estudios de transportadores de membrana en ambos hongos mostrando funcionalidad del transportador sin ningún problema (Haro, Rodríguez- Navarro., 1999). Un análisis que determinó la correcta traducción del gen, fue el análisis tipo Northern blot, en el cual la clona seleccionada (LJC1) al crecerla en medio de galactosa en dos diferentes tiempos (15 y 28h) mostro señales muy intensas del mensajero en ambos tiempos usando como única fuente de carbono a la galactosa, mientras que cuando se utilizo la glucosa como única fuente de carbono se comprobó de que este azúcar era un represor del gen debido a que en el análisis no mostraba señal correspondiente al RNA mensajero. Los resultados que se obtuvieron en el Northern blot daban una amplia probabilidad de que la proteína pudiera ensamblarse y llevar a cabo la función. Durante los ensayos para determinar la funcionalidad de la proteína la clona se sometió a diferentes condiciones para poder asegurar la funcionalidad de la proteína. Un tratamiento a la clona con galactosa 2% antes de colocarla en cromato (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mM) le proveía la oportunidad de expresar la proteína. En los datos que se obtuvieron de la curva de susceptibilidad, la clona control y la LJC1 que provenían de un preinoculo de dextrosa al 2% tuvo un comportamiento muy similar en donde ambas se les inhibía el crecimiento al ir aumentando la concentración de cromato mostrando de que el gen por lo tanto se reprimía en presencia de esta fuente de carbono, mientras tanto que la clona control y la LJC1 provenientes de un inoculo de galactosa al 2% al colocarlas en cromato el control se comporto muy similar a su contraparte de dextrosa pero estas tenia una resistencia mayor de cerca de un 12%, pero la clona LJC1 se comporto con una resistencia al ion de 34%, mostrando que

probablemente el gen y la proteína se estaba expresando de manera correcta en la levadura. (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mM) (Fig.10).

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la transformante de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron que posiblemente el gen *chrNC* de *Neurospora crassa* le confiere resistencia al cromato por un mecanismo similar al de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

X. PERSPECTIVAS

1. Interrumpir el gen *chrNC* de *Neurospora crassa* y realizarle pruebas de susceptibilidad a cromato.
2. Determinar el mecanismo de dextoxificación de cromato en *Neurospora crassa*.
3. Determinar si el gen *chrNC* es expresado de forma constitutiva.
4. Realizar un análisis Western blot a la proteína expresada tanto en *Neurospora crassa* como en la transformante de *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Realizar un análisis de los genes asociados al gen *chrNC* en *Neurospora crassa*.

XI. BIBLIOGRAFIA

Alcedo, J. A. y K. E. Wetterhahn (1990). "Chromium toxicity and carcinogenesis." *Int Rev Exp Pathol* **31**: 85-108.

Alvarez, A. H., R. Moreno-Sanchez y C. Cervantes (1999). "Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **181**(23): 7398-400.

Arslan, P., M. Beltrame y A. Tomasi (1987). "Intracellular chromium reduction." *Biochim Biophys Acta* **931**(1): 10-5.

ATSDR (2000). *ToxFAQs™ for Chromium*. Update. Atlanta, GA; USA. Department of Health and Human Services, Public Health Service

Baldauf, S. L. (2003). "Phylogeny for the faint of heart: a tutorial." *Trends Genet* **19**(6): 345-51.

Beadle, G. W. y E. L. Tatum (1941). "Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**(11): 499-506.

Cai, W.; Pei, J; Grishin, N. V. 2004. Reconstruction of ancestral protein sequences and its applications. *BMC Evol Biol.* 4:33

Cervantes C, Campos – Garcia J. (2007) Reduction and efflux of chromate by bacteria In: Nies DH, Silver S (eds) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer – Verlag, Berlin, pp 407-420.

Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. K. Misra y S. Silver (1990). "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505." *J Bacteriol* **172**(1): 287-91.

Cervantes, C. y S. Silver (1992). "Plasmid chromate resistance and chromate reduction." *Plasmid* **27**(1): 65-71.

Díaz - Pérez, C. (2005) Filogenia y evaluación de aminoácidos conservados en la función de la proteína transportadora de cromato ChrA. Tesis de Maestría en Biología Experimental. IIQB – UMSNH.

Diaz-Perez, C., C. Cervantes, J. Campos-Garcia, A. Julian-Sanchez y H. Riveros-Rosas (2007). "Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily." *Febs J* **274**(23): 6215-27.

Dreyfuss, J. (1964). "Characterization of a Sulfate- and Thiosulfate-Transporting System in *Salmonella Typhimurium*." *J Biol Chem* **239**: 2292-7.

Galagan, J. E., S. E. Calvo, K. A. Borkovich, E. U. Selker, N. D. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L. J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C. B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Ianakiev, D. Bell-Pedersen, M. A. Nelson, M. Werner-Washburne, C. P. Selitrennikoff, J. A. Kinsey, E. L. Braun, A. Zelter, U. Schulte, G. O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R. L. Metzenberg, D. D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. Li, R. J. Pratt, S. A. Osmani, C. P. DeSouza, L. Glass, M. J. Orbach, J. A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D. O. Natvig, L. A. Alex, G. Mannhaupt, D. J. Ebole, M. Freitag, I. Paulsen, M. S. Sachs, E. S. Lander, C. Nusbaum y B. Birren (2003). "The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*." *Nature* **422**(6934): 859-68.

Jimenez-Mejia, R., J. Campos-Garcia y C. Cervantes (2006). "Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiol Lett* **262**(2): 178-84.

Glick, R.B, Pasternak, J.J. 1998. *Molecular Biotechnology Principles and applications of Recombinant DNA*. Ed. 2nd . Washigton, D.C, U.S.A.: ASM PRESS. 683p.

Haro, R, Sainz, L, Rubio, S, Rodríguez-Navarro, A, (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 31 (2) , 511–520 doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01192.x

Jiménez-Mejía R, Campos-García J, Cervantes C (2006) Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 262:178–184

Levis, A. G. y Bianchi, V. (1982) Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds. En: *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. Langard S. (Ed.) Elsevier, Ámsterdam. pp. 171-208

Marzluf GA. 1970. Genetic and Metabolic Controls for Sulfate Metabolism in *Neurospora crassa*: Isolation and Study of Chromate Resistant and Sulfate Transport-Negative Mutants
J Bacteriol. 102(3):716-21.

McGrath, S. P. and Smith (1990). Chromium and nickel. *Heavy Metals in Soils*. A. B. J. Glasgow, Blackie. 7:125-150

Mertz, W. (1969). "Chromium occurrence and function in biological systems." *Physiol Rev* **49**(2): 163-239.

Nies, A., D. H. Nies y S. Silver (1990). "Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*." *J Biol Chem* **265**(10): 5648-53.

Nies, D. H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch y M. H. Saier, Jr. (1998). "CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters." *J Bacteriol* **180**(21): 5799-802.

Nishio, A. y E. M. Uyeki (1985). Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J Toxicol Environ Health*. **15**: 237-44.

Osiewacz, H. D. (2002). "Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi." *Ageing Res Rev* **1**(3): 425-42.

Pardee, A. B., L. S. Prestidge, M. B. Whipple y J. Dreyfuss (1966). "A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*." *J Biol Chem* **241**(17): 3962-9.

Pimentel, B. E., R. Moreno-Sanchez y C. Cervantes (2002). "Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein." *FEMS Microbiol Lett* **212**(2): 249-54.

Plaper A, Jenko-Brinovec S, Premzl A, Kos J, Raspor P. 2002. Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. *Chem Res Toxicol*. **15**(7):943-9.

Roberts KR, Marzluf GA. 1970. The specific interaction of chromate with the dual sulfate permease systems of *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Volume 142, Issue 2.

Ruan Y, Le Ber P, Ng HH, Liu ET. 2004. Interrogating the transcriptome. *Trends Biotechnol*. **22**(1):23-30.

Shi, X. G. y N. S. Dalal (1990). "On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species." *Arch Biochem Biophys* **277**(2): 342-50.

Shi, X. L. y N. S. Dalal (1990). "Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of .OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media." *Arch Biochem Biophys* **281**(1): 90-5.

Skolnick, J. y J. S. Fetrow (2000). "From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era." *Trends Biotechnol* **18**(1): 34-9.

Snow, E. T, 1994. Effects of chromium on DNA replication in vitro. *Environ Health Perspect.* 102(Suppl 3): 41–44.

Thornton J.M.; Orengo C.A.; Todd A.E.; Pearl F.M.G. 1999. Protein folds, functions and evolution. *Journal of Molecular Biology.* Volume 293, Number 2, 22, pp. 333-342(10)

Venier, P.,A. Montaldi,F. Majone,V. Bianchi y A. G. Levis (1982). "Cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of industrial chromium compounds." *Carcinogenesis* **3**(11): 1331-8.

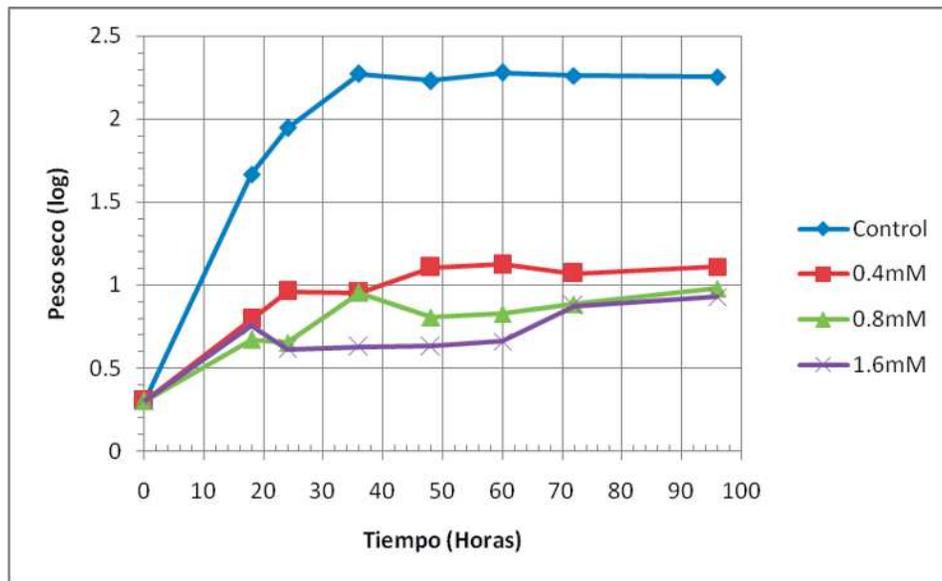
XII. APENDICE

12.1. Pruebas de susceptibilidad a cromato en *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*

12.1.1. Pruebas de susceptibilidad a cromato a *Neurospora crassa*.

12.1.1.1. MEDIO MINIMO

A)



B)

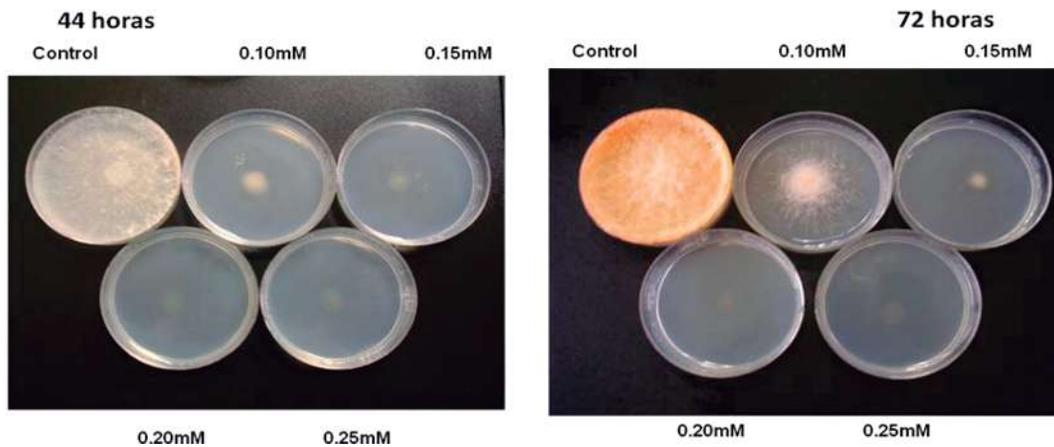


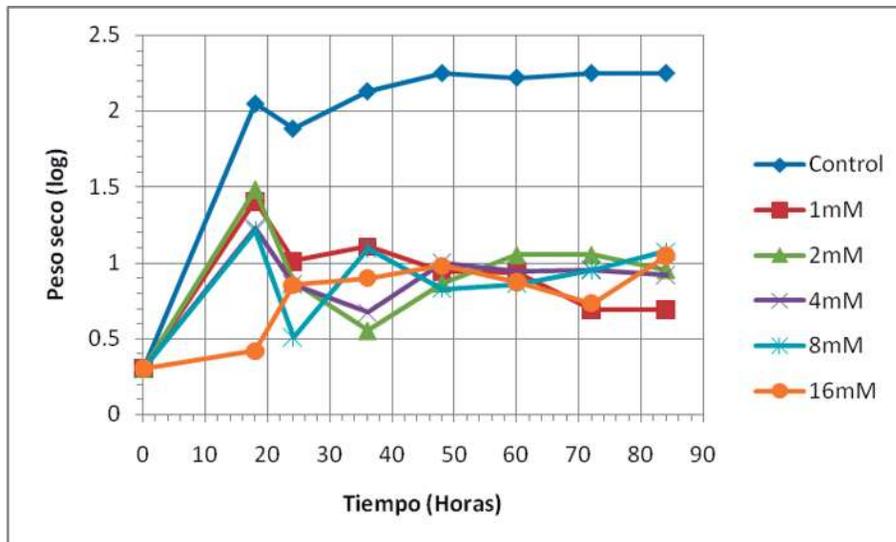
Figura I. Efecto del cromato de potasio en la cepa de *N. crassa* en medio mínimo. El hongo se sometió a concentraciones variables de cromato en medio mínimo Vogel. Para el medio líquido se empleo medio Vogel líquido con concentraciones variables de cromato. Se inoculo 1×10^6 esporas/mililitro, creciendo durante diferentes tiempos con agitación constante $28^\circ\text{C}/1800\text{rpm}$.. El cálculo se determinaba por el peso seco. **Fig. A)**, n=3

Para medio solido se empleo medio Vogel solido con concentraciones variables de cromato. Se agregaba una gota de $20\mu\text{l}$ con una concentración de 1×10^6 esporas/ml, creciendo a 28°C . La resistencia se midió de forma indirecta que consistía en dejar crecer el control y compararlo con las que contenían cromato y ver la diferencia de crecimiento. Fig. B), n=3

La cepa de *N.crassa* se inhibió en ambos medios a concentraciones de 1.5 – 1.6 mM de cromato de potasio.

12.1.1.2. MEDIO ENRIQUECIDO

A)



B)

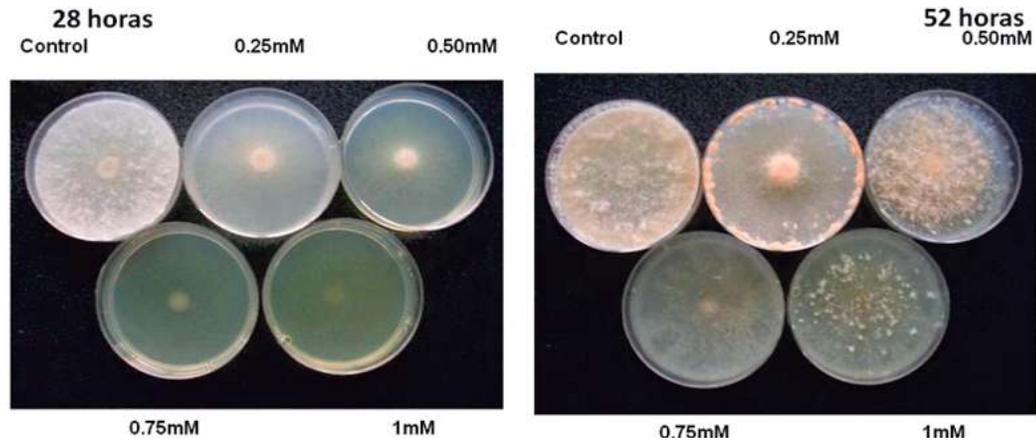


Figura II. Efecto del cromato de potasio en la cepa de *N. crassa* en medio enriquecido. Para el medio líquido se empleo medio PDB con concentraciones variables de cromato. Se inoculó 1×10^6 esporas/mililitro, creciendo durante diferentes tiempos con agitación constante $28^\circ\text{C}/1800\text{rpm}$.. El calculo se determino por peso seco. **(Fig.) n=3**

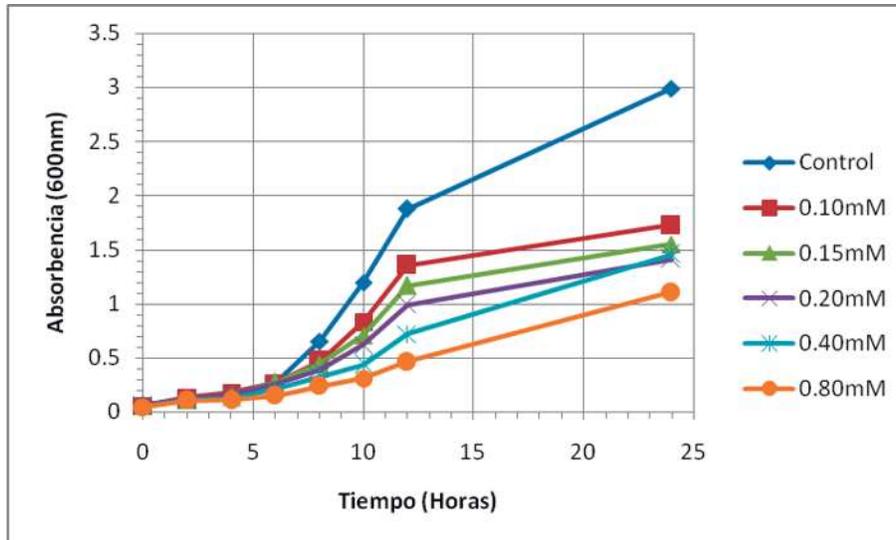
Para el medio solido se empleo medio PDA con concentraciones variables de cromato. Se agregaba una gota de $20\mu\text{l}$ con una concentración de 1×10^6 esporas/ml, creciendo a 28°C . La resistencia se media de forma indirecta, ya que consistía en dejar crecer el control y compararlo con las que contenían cromato y ver la diferencia de crecimiento. **(Fig.B) n=3**

La cepa de *N.crassa* se inhibió en medio líquido PDB a 1mM, pero con las concentraciones mas altas de cromato en los últimos puntos se mantuvo constante el valor final, indicando que hasta 16mM todavía existía crecimiento, mientras que en el medio solido en un menor tiempo fue que creció la cepa aun utilizando la concentración mas alta de 1mM.

12.1.2. Pruebas de susceptibilidad a cromato a *Saccharomyces cerevisiae*

12.1.2.1. MEDIO MINIMO

A)



B)

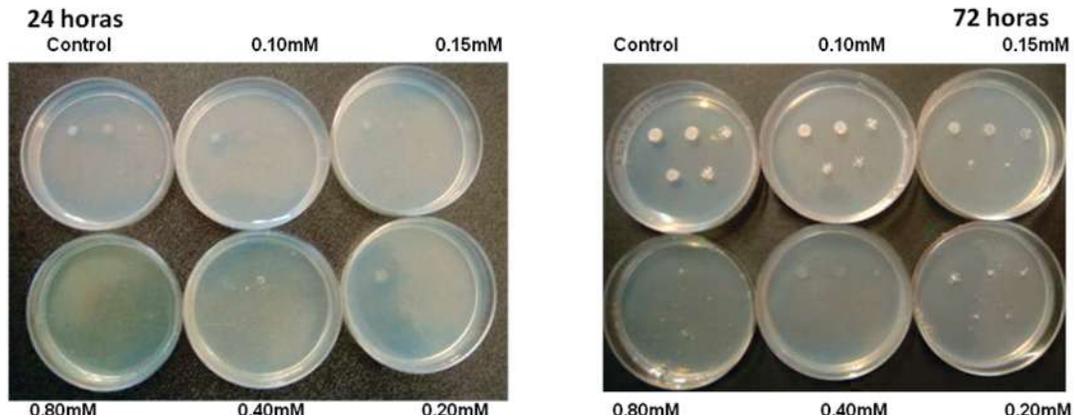


Figura III. Efecto del cromato de potasio en la cepa (JCY100) de *S. cerevisiae* en medio mínimo. Para medio líquido se empleó medio mínimo sintético líquido con concentraciones variables de cromato. Se agregó 1ml de un preinoculo de 12h, y se determinó el crecimiento a 600nm cada 2 h hasta las 24 h, con agitación constante 28°C/1500rpm.. **Fig. A)**, n=3

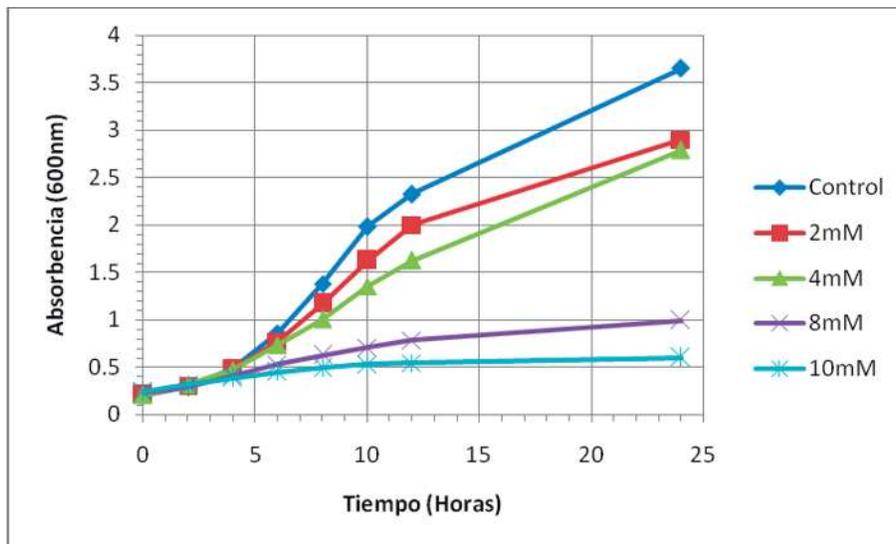
Para medio sólido se empleó medio mínimo sintético sólido con concentraciones variables de cromato. Se agregó 5 gotas, cada una de ellas con diferentes de diferentes concentraciones

(1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000), se prepararon a partir del preinoculo de 12h, llevándola a DO conocida y a partir de este se hacían las diluciones, se crecieron a 28°C. La resistencia se media de forma indirecta, ya que consistía en dejar crecer el control. **Fig. B)**, n=3

Se observo que aun en concentraciones un poco mas altas que en *N. crassa* esta aun seguía creciendo, se inhibió un poco el crecimiento a partir de 0.4mM pero aun en 0.8mM seguía creciendo, esto fue en el medio liquido, tanto en el medio solido se pudo observar que en concentraciones de 0.20mM de inhibía el crecimiento ya que existía un mínimo de crecimiento en todas las gotas de las diluciones y ya en la caja de 0.40mM ya no se observó crecimiento alguno a las 72h.

12.1.2.2. MEDIO ENRIQUECIDO

A)



B)

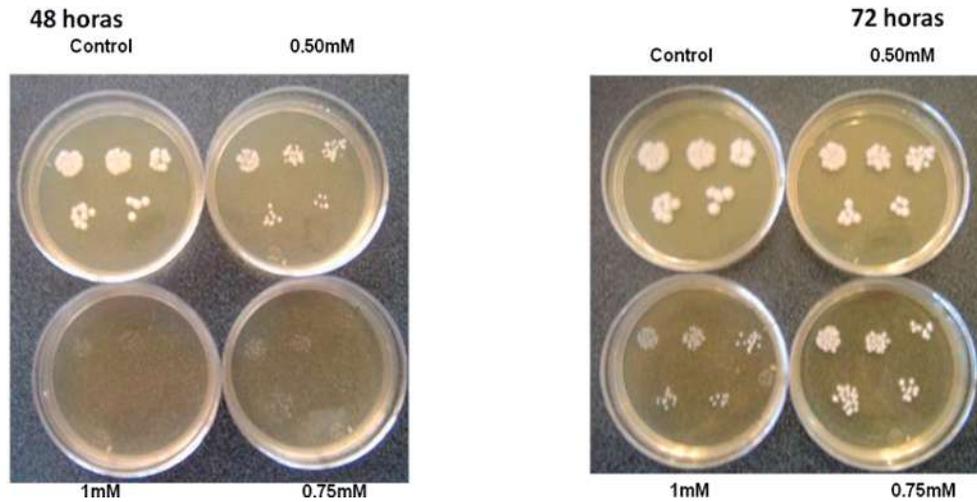


Figura IV. Efecto del cromato de potasio en la cepa (JCY100) de *S. cerevisiae* en medio enriquecido. En medio líquido se utilizó medio YPD líquido con concentraciones variables de cromato. Se le agregó 1ml de un preinoculo de 12h, determinando el crecimiento cada 2h hasta las 24h a 600nm, con agitación constante 28°C/1500rpm. **Fig. A)**, n=3

Para medio sólido se empleó medio YPD sólido con concentraciones variables de cromato. Se le agregó 5 gotas cada una de ellas con diferentes concentración (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000) a partir de un preinoculo de 12h que se llevo a una DO conocida y a partir de este se hacían las diluciones, creciendo a 28°C. La resistencia se media de forma indirecta, ya que consistía en dejar crecer el control. **Fig. B)**, n=3

En medio líquido se observó que la susceptibilidad fue desde la concentración 8mM ya que a 10mM se vio que desde las 6 h el crecimiento se mantuvo constante, y se observó que en las concentraciones de 2 y 4mM le afectaba muy poco el crecimiento por lo cual en la grafica se pudo comprobar el efecto del cromato en las células. En las cajas de medio YPD de logro observar que el crecimiento se inhibió un poco a concentraciones de 1mM, ya que en concentraciones mas bajas al tiempo de 72h obtuvimos un crecimiento de todas las diluciones que colocamos.

12.2. Extracción de DNA genómico de *Neurospora crassa*.

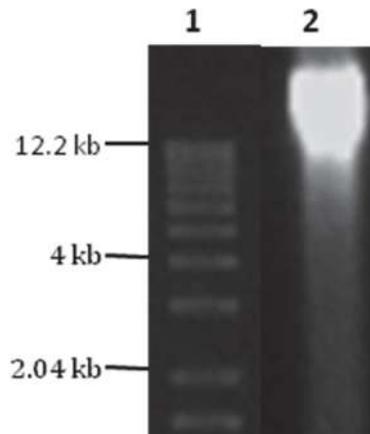


Figura V. DNA genómico de *Neurospora crassa*. Para poder estudiar la funcionalidad del gen *chrNC* se extrajo el DNA genómico de *N. crassa*, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Para comprobar que el DNA genómico no estuviera degradado se procedió a realizarle una separación por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observó una banda en el gel que indicó la integridad de DNA aislado. Carriles: 1, marcador de peso molecular; 2. Producto de la extracción de DNA de *N. crassa*

12.3. Extracción de DNA total de *Saccharomyces cerevisiae* para análisis Southern blot.

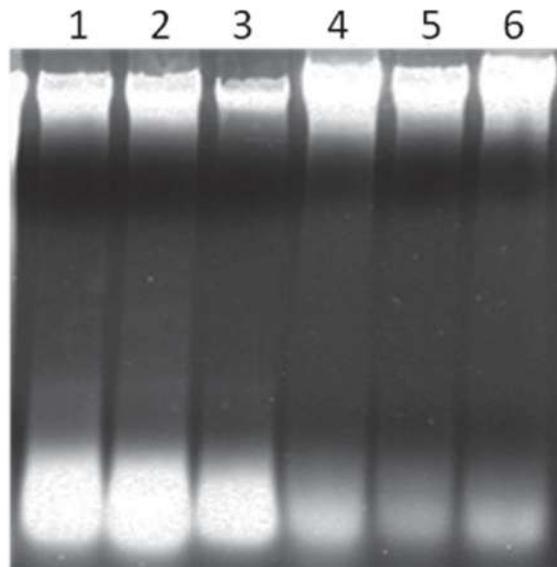


Figura VI. Extracción de DNA total de clones de *Saccharomyces cerevisiae*. Fotografía de un gel de agarosa 1% del producto de extracción de DNA total Carriles: 1, Control LJC1; 2 y 3 Clona LJC1; 6, Control LPHY2; 4 y 5 Clona LPHY2.