

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO- BIOLÓGICAS

**TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PARTICIPACIÓN DE RESIDUOS ÁCIDOS EN EL
FUNCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA ChrA
DE *Pseudomonas aeruginosa***

QFB. Ricarda Cortés Vieyra

Asesor: D.C. Carlos Cervantes Vega

Morelia, Mich., Septiembre 2007

RESUMEN

ChrA es una proteína de membrana que confiere resistencia al oxianión cromato en *Pseudomonas aeruginosa*, a través de la expulsión del cromato al exterior celular. La topología de ChrA en la membrana consiste de 13 segmentos transmembranales (STMs), unidos por seis asas citoplásmicas (C1-C6) y seis asas periplásmicas (P1-P6). ChrA pertenece a la familia de transportadores LCHR, a la cual también pertenece la proteína ChrA de *Cupriavidus metallidurans* y otras 75 proteínas homólogas no caracterizadas. Empleando la técnica de mutagénesis sitio dirigida se identificaron algunos residuos neutros y básicos esenciales para el funcionamiento de ChrA, a los cuales se les ha asignado un papel estructural o funcional. El objetivo de este trabajo fue identificar residuos ácidos (Aspartato y Glutamato) esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA. La selección de residuos ácidos como blanco de mutagénesis dirigida se hizo tomando en cuenta aquellos residuos que presentaran una conservación de su carga negativa igual o mayor al 50% en homólogos de ChrA. En total se mutaron ocho residuos ácidos por Alanina. Las mutantes obtenidas fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad a cromato, determinándose a partir de este ensayo la esencialidad para ChrA de los residuos mutados. Los residuos Glu60, Glu230 y Asp281 (ubicados en asas hidrofílicas) mostraron no ser importantes para el funcionamiento de ChrA. El residuo Asp59 (ubicado en el asa P1) resultó ser importante para el funcionamiento de la proteína. El residuo Glu56 (ubicado en el asa periplásmica P1), así como los residuos Glu83, Glu86 y Asp162 (ubicados en STMs), resultaron ser esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA. Los resultados indican que el asa P1 de ChrA participa de manera importante en el proceso de expulsión de cromato. Los datos también sugieren que los residuos ácidos presentes en STMs están involucrados en generar una estructura correcta de ChrA en la membrana, relacionada con su función como transportador de cromato.

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Transporte y toxicidad del cromo en bacterias.....	1
2. Resistencia bacteriana a cromato.....	3
a) Plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	3
b) Características de la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	3
3. Superfamilia CHR de transportadores.....	4
4. Aminoácidos con grupo R ácido.....	7
a) Propiedades de los aminoácidos con grupo R ácido.....	7
b) Participación de los aminoácidos ácidos en las proteínas de membrana.....	9
II. ANTECEDENTES	15
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	19
a) Objetivo general.....	19
b) Objetivos específicos.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VII. RESULTADOS	35
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. CONCLUSIÓN	65
X. PERSPECTIVAS	65
XI. BIBLIOGRAFÍA	66

I. INTRODUCCION

1. TRANSPORTE Y TOXICIDAD DEL CROMO EN BACTERIAS

El cromo (Cr) es un metal pesado que se encuentra en el ambiente en dos principales estados de oxidación: cromo trivalente Cr(III) y cromo hexavalente Cr(VI) (Othmer,1998).

La diferencia toxicológica de las especies de Cr(III) y Cr(VI) depende principalmente del hecho de que el Cr(VI), en la forma del anión cromato (CrO_4^{2-}), que predomina sobre el anión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) a pH fisiológico, es fácilmente transportado al interior celular a través de canales de aniones tales como el sistema de transporte de sulfato (De Flora y Wetterhahn, 1989) (Fig. 1). El transporte activo de cromato por la vía de entrada del sulfato ha sido demostrada en varias especies bacterianas (Cervantes y col., 2001). En contraste, en el ambiente extracelular el Cr(III) es relativamente inocuo debido a su insolubilidad y subsecuente incapacidad para atravesar las membranas celulares (Katz y Salem 1993) (Fig. 1).

En el citoplasma, la toxicidad del Cr está principalmente relacionada con los procesos de reducción del Cr(VI) a sus estados inferiores de oxidación Cr(V) y Cr(III) (**Fig. 1**); durante este proceso se generan radicales libres (Kadiiska y col., 1994) los cuales pueden provocar daño oxidativo en el DNA (**Fig. 1**) (Luo y col., 1996). Por su parte, el Cr(III) es capaz de formar complejos con el DNA, inhibiendo su replicación (Bridgewater y col, 1994) o provocando mutaciones (Kortenkamp y col., 1991). La interacción del Cr(III) con los grupos carboxilo y sulfhidrilo de péptidos y proteínas puede alterar su estructura y actividad (Levis y Bianchi, 1982) (**Fig. 1**).

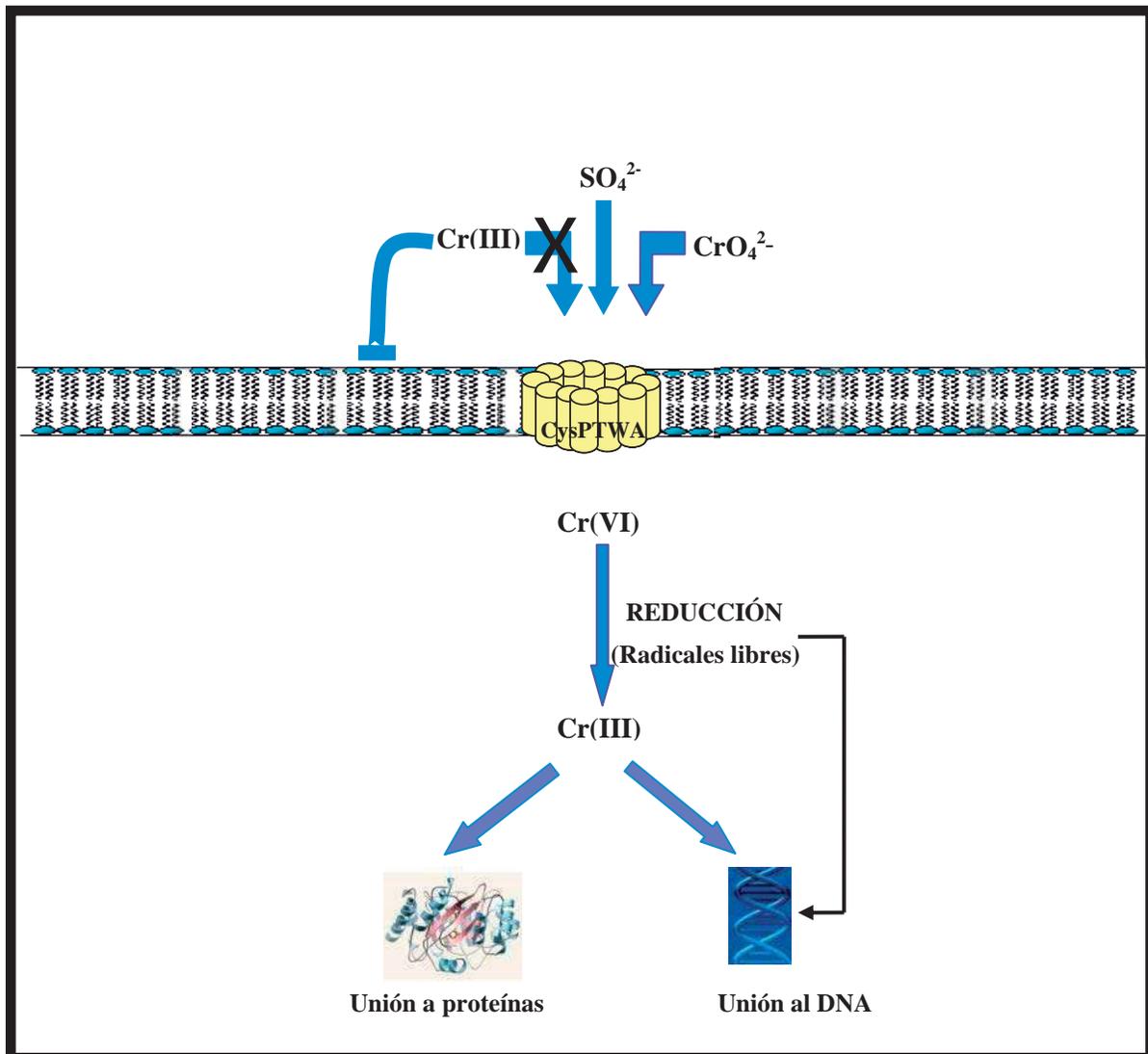


Fig. 1 Transporte y toxicidad del cromato. El cromo (VI) ingresa al interior celular en forma de cromato (CrO_4^{2-}) por el transportador de sulfato (SO_4^{2-}) denominado CysPTWA, mismo que no permite la entrada de la especie Cr(III) . Intracelularmente, el cromo (VI) puede ser reducido a Cr(III) generando durante el proceso radicales libres que pueden provocar daño oxidativo en el DNA. El Cr(III) reducido puede unirse al DNA o proteínas dañando su estructura y funcionalidad.

2. RESISTENCIA BACTERIANA A CROMATO

El uso excesivo del cromo en varias aplicaciones industriales ha causado una contaminación ambiental importante, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre algunos microorganismos y al mismo tiempo promoviendo la selección de variantes resistentes a este elemento. Una variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato han sido reportados, incluyendo cepas de ambientes naturales y clínicos; en estos aislados la tolerancia a cromato es usualmente asociada con plásmidos (Cervantes, 2001).

A nivel molecular se han analizado dos determinantes plasmídicos de resistencia a cromato: los determinantes de los plásmidos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans*, antes *Alcaligenes eutrophus* (Nies y col., 1990).

2.1 Plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*

El determinante de resistencia a cromato del plásmido conjugativo pUM505 de *P. aeruginosa* comprende un sólo gen. Por análisis de secuenciación y deleción, fue identificado un ORF (marco de lectura abierto) denominado *chrA*, que codifica un polipéptido hidrofóbico de 416 aminoácidos. El gen *chrA* fue clonado en un vector de replicación para un amplio rango de huéspedes, confiriendo resistencia a cromato de manera constitutiva en *P. aeruginosa* pero no en *Escherichia coli* (Cervantes y col. 1990).

2.2 Características de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*

Se ha demostrado, usando vesículas de membrana invertidas y células intactas, que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* funciona como una bomba expulsora de cromato del

citoplasma, usando para ello la fuerza protón motriz (Alvarez y col., 1999; Pimentel y col., 2002) (**Fig. 2**).

Recientemente, por análisis de fusiones traduccionales con las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa, fue determinada la topología de membrana de ChrA. De este trabajo se concluyó que ChrA consta de 13 segmentos transmembranales (STM), con el N-terminal localizado en el citoplasma y el C-terminal en el espacio periplásmico (Jiménez-Mejía y col., 2006) (**Fig. 3**).

Un alineamiento de las dos mitades de ChrA, cada una formada por seis STMs, mostró significativa homología de secuencias, aunque éstas se encuentran con orientaciones opuestas en la membrana. Esto sugiere que las dos mitades de la proteína pueden tener funciones distintas para el transporte de cromato (Jiménez-Mejía y col., 2006).

3. SUPERFAMILIA CHR DE TRANSPORTADORES

La superfamilia CHR de transportadores de membrana fue descrita primero por Nies y col., (1998) como un grupo pequeño de proteínas procariotes involucradas en el transporte de cromato o sulfato. En la actualidad, las bases de datos de proteínas contienen varias docenas de homólogos, incluyendo proteínas de eucariotes. Además de las proteínas ChrA de *P. aeruginosa* y de *C. metallidurans*, la función de otros homólogos CHR todavía no ha sido analizada con detalle (Cervantes y Campos-García, 2007).

Un análisis filogenético realizado por Díaz-Pérez (2006) sugiere que las proteínas CHR pueden ser derivadas de un evento de duplicación génica, como ha ocurrido con miembros de otras familias de transportadores. Los homólogos CHR existen en dos tamaños: proteínas de cadena corta (SCHR, de aproximadamente 200 aa) con un sólo dominio, y

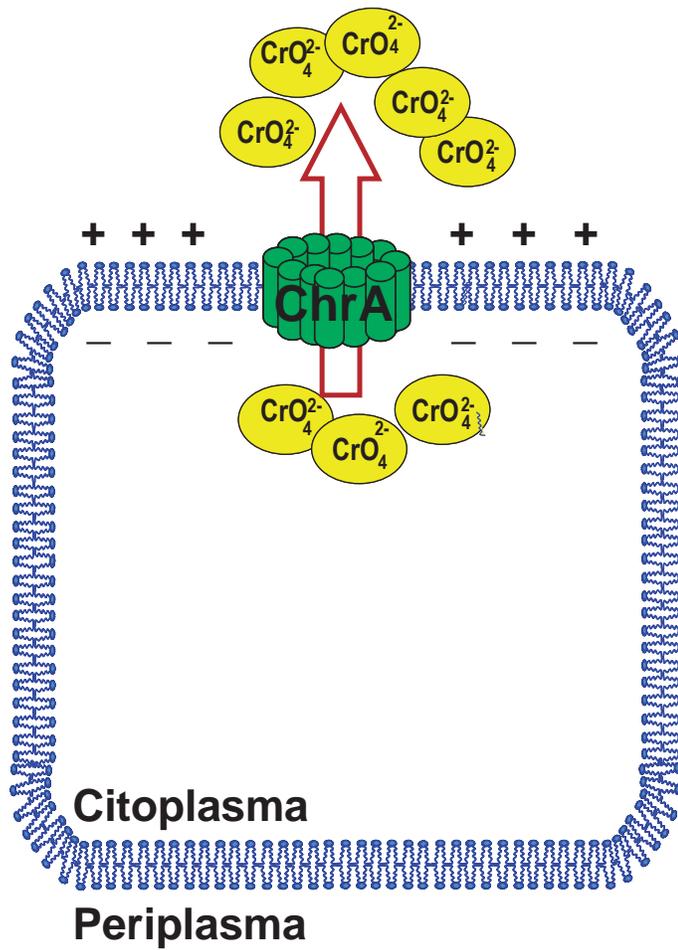


Figura 2.Proceso de expulsión de cromato conferido por la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. La proteína de membrana ChrA expulsa al ión cromato del citoplasma al periplasma utilizando para ello la energía generada por la fuerza protón motriz.

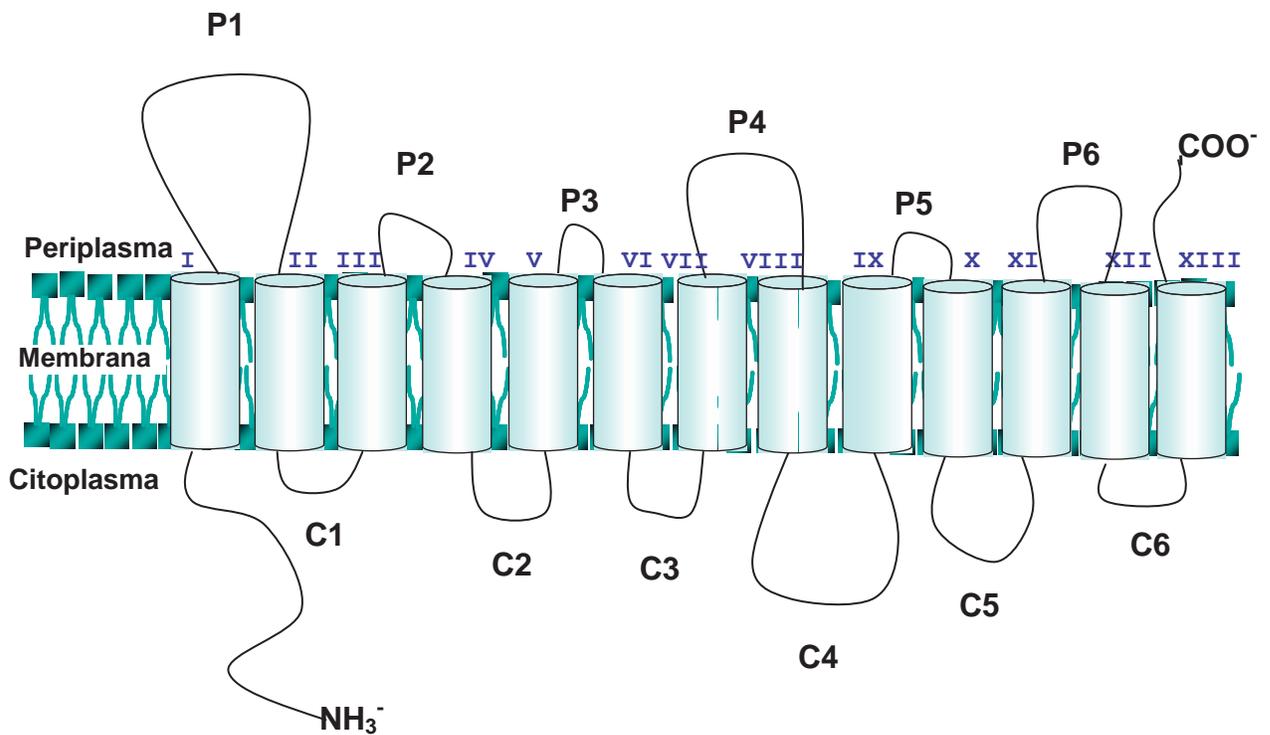


Figura 3. Representación esquemática de la topología de membrana de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. La proteína consta de 13 segmentos transmembranales (representados por los cilindros numerados del I al XIII), unidos por seis asas citoplásmicas (C1 a C-6) y seis asas periplásmicas (P1 a P6). El extremo amino se encuentra en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma. Adaptada de Jiménez-Mejía y col., 2006.

proteínas de cadena larga (LCHR, de aproximadamente 400 aa) con dos dominios homólogos (**Fig. 4**).

Del las 135 secuencias de proteínas homólogas analizadas, 77 consisten de proteínas LCHR, las cuales fueron colocadas en un árbol filogenético de siete subfamilias, conteniendo proteínas principalmente de bacterias (**Fig. 4**). Las subfamilias CHR2 y CHR5 incluyen proteínas principalmente de proteobacterias, entre las cuales se encuentran las dos proteínas ChrA con función demostrada de transporte de cromato. Estas dos subfamilias, y probablemente la subfamilia CHR3, pueden contener otros transportadores de cromato funcionales. La subfamilia CHR4 incluye la única proteína de una arquea (*Methanococcus jannaschii*). La subfamilia CHR de hongos contiene seis proteínas de especies fúngicas, estrechamente relacionadas con la subfamilia CHR1, que contiene todos los homólogos Gram positivos (**Fig. 4**) (Cervantes y Campos-García, 2007).

4. AMINOÁCIDOS CON GRUPO R ÁCIDO

4.1 Propiedades de los aminoácidos con grupo R ácido

El ácido aspártico (D) y el ácido glutámico (E) son los únicos aminoácidos que pueden llevar carga negativa en su grupo R a pH 7. Los valores de pK_a de los grupos R de los aminoácidos ácidos son tan bajos (D= 3.9 y E= 4.2), que incluso cuando los aminoácidos se incorporan en las proteínas la carga del grupo R se puede conservar en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se suele denominar a estos aminoácidos Aspartato (Asp) y Glutamato (Glu) (Mathews y col., 2002).

White y Wimley (1998) crearon una escala de hidrofobicidad que permite clasificar los

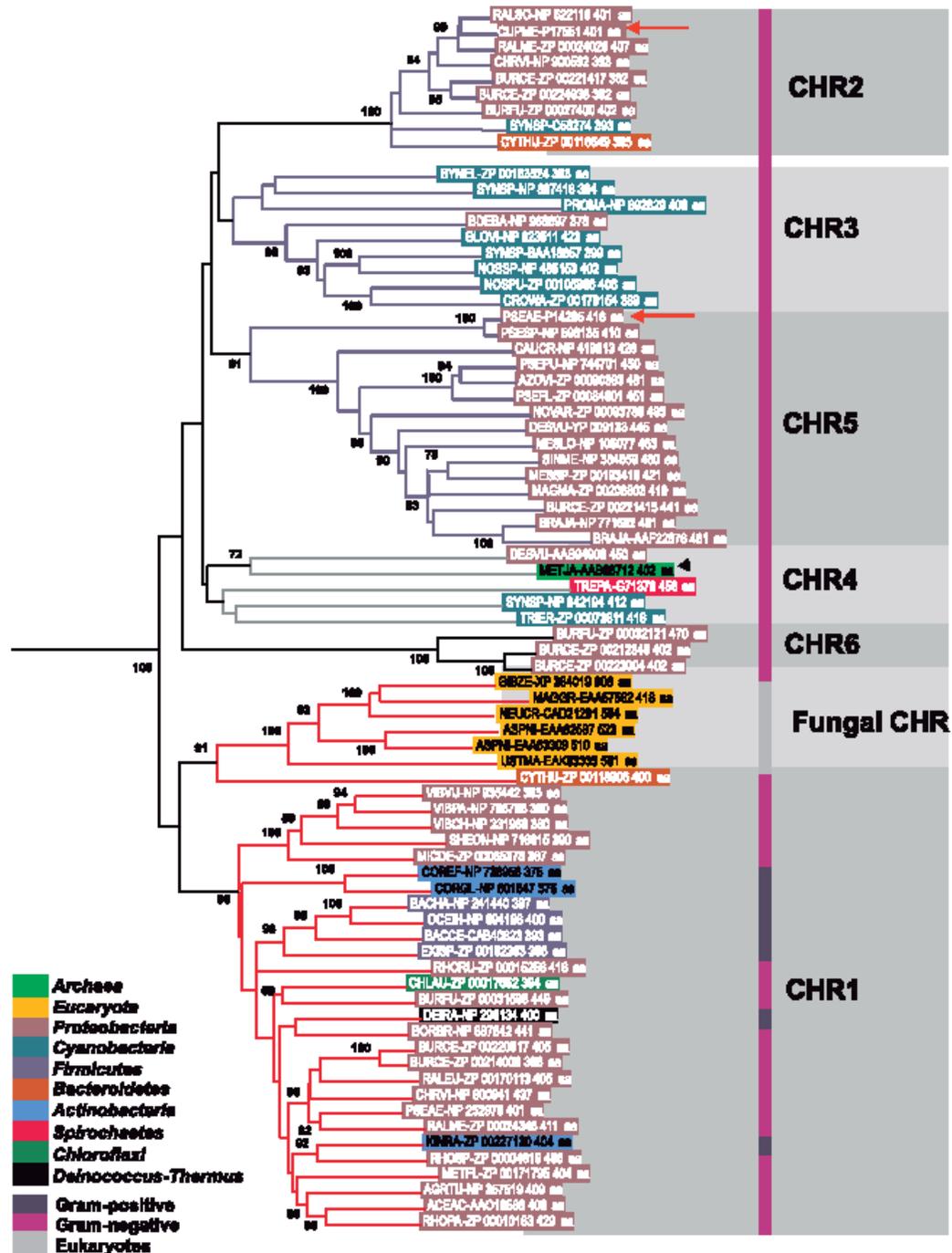


Figura 4. Árbol filogenético de proteínas mayores LCHR de la superfamilia CHR. El color en la leyenda indica la distribución taxonómica de los grupos. La barra vertical derecha muestra la clasificación Gram de las bacterias. También se indican las siete principales subfamilias descritas en el texto (CHR1-5). Las flechas indican las dos proteínas caracterizadas funcionalmente, ChrA de *P. aeruginosa* y ChrA de *C. metallidurans*. Tomada de Cervantes y Campos-García, 2007.

veinte aminoácidos naturales de acuerdo a su energía libre de transferencia (ΔG_{woct}) desde el agua a un solvente que imita el ambiente interno de la bicapa lipídica de la membrana, como es el octanol. De acuerdo a esta escala, los aminoácidos más favorecidos termodinámicamente para ser insertados en el ambiente hidrofóbico de la membrana son la Phe y el Trp con un ΔG_{woct} de -1.7 y -2.0 kcal/mol, respectivamente. Por el contrario, los aminoácidos menos favorecidos termodinámicamente para llevar a cabo este proceso de inserción son el Asp y Glu los cuales presentan un ΔG_{woct} de 3.6 kcal/mol, lo que significa que se requiere mucho más energía para que estos residuos puedan acomodarse en el interior de la membrana.

4.2 Participación de los aminoácidos ácidos en las proteínas de membrana

A pesar de los factores energéticos desfavorables involucrados en la inserción de aminoácidos ionizables (aminoácidos ácidos y básicos) en el interior del ambiente hidrofóbico de los fosfolípidos de la membrana, tales residuos aparecen en regiones membranales de las proteínas encontradas en este ambiente. Quizá el análisis de mutagénesis más notable en una proteína de membrana fue el realizado en el transportador de lactosa de *E. coli* (Lac Y), el cual permitió demostrar que sólo seis aminoácidos de los 417 presentes en la proteína son esenciales para el transporte, y todos estos son aminoácidos con carga positiva ó negativa localizados dentro de STMs. A cada uno de estos residuos se les ha asignado una función, ya sea en el transporte de lactosa o de protones (Abramson y col., 2003).

Se ha puntualizado que la inserción en la membrana de los aminoácidos ionizables puede facilitarse si su carga es neutralizada por interacciones electrostáticas, pues mientras

se requieren 10 kcal/mol para insertar un residuo cargado en el interior de una región con una baja constante dieléctrica como la membrana o el vacío, una interacción electrostática entre aminoácidos cargados puede requerir sólo 1 kcal/mol (Honig y Hubbell, 1984). Un ejemplo de la formación de una interacción electrostática en el interior de STMs, es la formada por el Glu269 (STM VIII) y la Arg144 (STM V) en la permeasa de lactosa LacY de *E. coli*. Se propone que esta interacción electrostática forma parte del sitio de unión del azúcar que transporta la proteína, debido a que esta interacción estabiliza la formación de dos enlaces de hidrógeno entre la Arg144 y el sustrato lactosa, como se observó en la estructura cristalizada de LacY (Abramson y col., 2003). Evidencia bioquímica sugiere que en cierto estado conformacional de LacY, diferente al estado de unión del azúcar, el Glu126 (STM IV) puede también formar una interacción electrostática con la Arg144 (**Fig. 5**) (Abramson y col., 2003).

Existen aminoácidos con carga negativa en regiones transmembranales que no forman una interacción electrostática, pero que justifican el gasto energético que implica su presencia en un ambiente hidrofóbico al tener una función importante en la proteína donde se encuentran. Este es el caso de los residuos ácidos Asp34, Asp109 y Glu112 presentes en STMs del simportador de H^+ / Mn^{2+} MntH de *E. coli*, los cuales se ha propuesto que están involucrados en la coordinación del Mn^{2+} para llevar a cabo su transporte (Haemig y Broker, 2004).

Otra forma de estabilizar residuos de Asp y Glu en STMs puede ser protonando o desprotonando el grupo carboxilo de su cadena lateral. Hay evidencia de que el grupo carboxilo del Asp61 de la subunidad C de la porción F_0 de la F_0F_1 ATPasa de *E. coli* puede

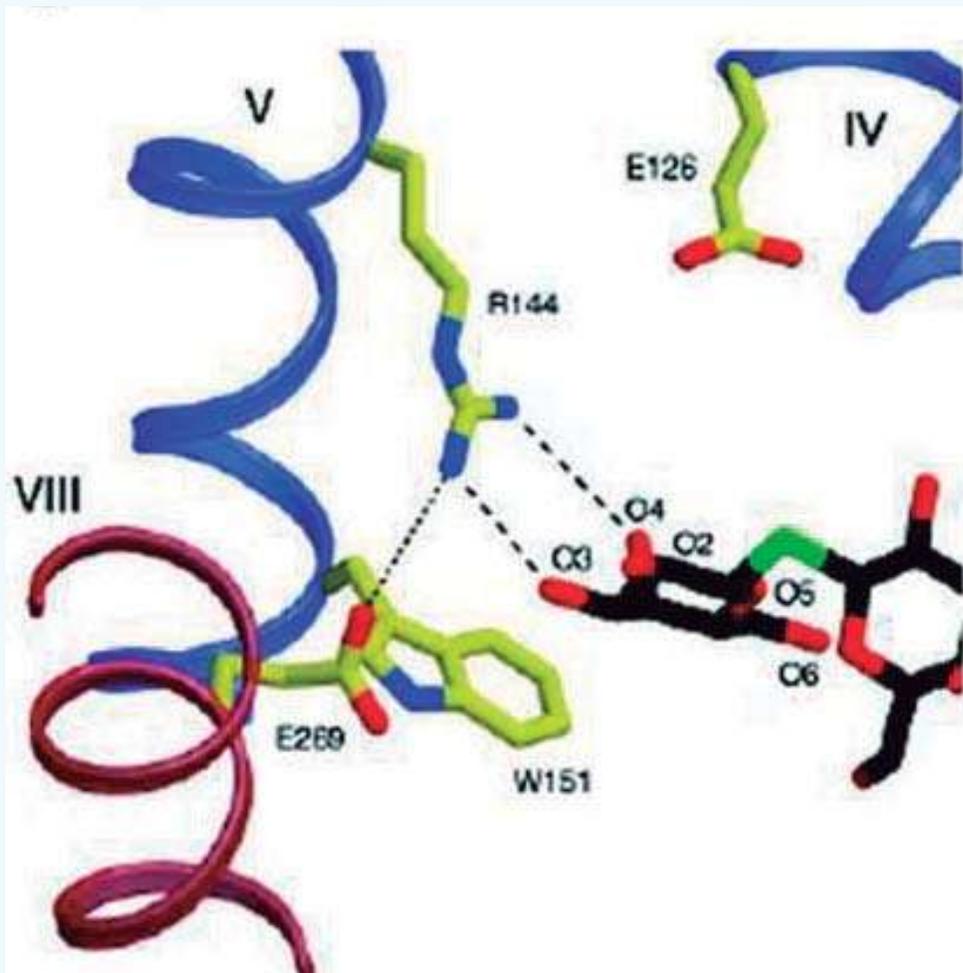


Figura 5. Interacción electrostática formada en el interior de hélices transmembranales de la permeasa LacY de *E. coli*. La Arg144 (hélice V) forma un enlace de hidrógeno bifurcado con dos átomos de oxígeno del anillo galactopiranosil, así como una interacción electrostática con el Glu269 (hélice VIII). Posiblemente el Glu126 también forma una interacción electrostática con la Arg144 en un estado conformacional diferente al de la unión del sustrato. Tomada de Abramson y col., 2003.

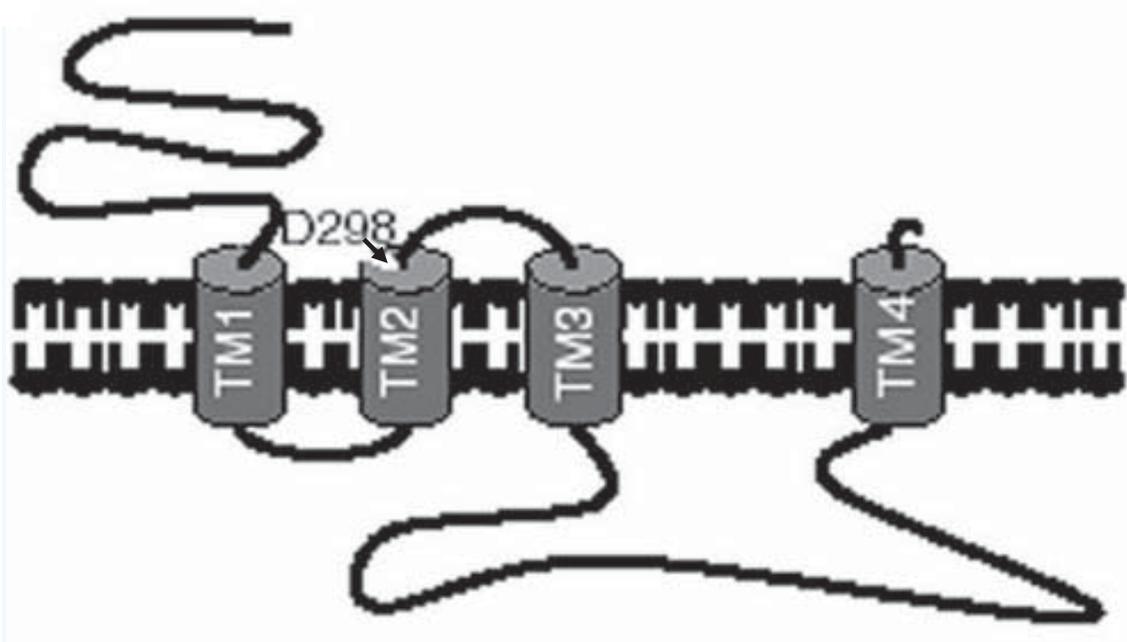
ser protonado y desprotonado como parte del mecanismo de transporte del protón (Millar y col., 1990).

Recientemente, usando un modelo de traducción in vitro de construcciones de proteínas integrales de membrana, Meindl-Beinker y col. (2006) mostraron que parejas de Asp o de su amida, la Asn, median interacciones de STMs vecinos, aumentando la eficiencia de la inserción en la membrana de un STM marginalmente hidrofóbico.

Los aminoácidos ácidos también suelen tener participaciones importantes en las regiones hidrofílicas de las proteínas de membrana, como son las asas que unen los STMs. Hay reportes que indican la participación del Asp298 presente en el asa que une los STMs 2 y 3 del receptor 5HT_{3A} de ratón, en cambios conformacionales involucrados en un estado funcional de este canal catiónico y como un determinante crítico de la acción del calcio sobre el mismo (**Fig. 6**) (Hu y Lovinger, 2005).

El retinocromo es una proteína transmembranal que forma parte de la familia de las rodopsinas. Al igual que en otras rodopsinas, un retinal cromóforo es unido al retinocromo por un residuo de lisina presente en el STM VII (**Fig.7**), formando una base de Schiff protonada (imina). La carga positiva de la base de Schiff protonada es energéticamente inestable en el interior de la proteína, por lo que un residuo cargado negativamente, llamado contraión, debe neutralizar la carga positiva para permitir que el retinocromo absorba luz visible. Un análisis de mutagenesis sitio dirigida del retinocromo bovino permitió identificar al Glu181 presente en el asa extracelular que conecta los STMs IV y V, como el residuo que actúa como el contraión de esta proteína (**Fig.7**) (Terakita y col., 2000).

Exterior celular



Citoplasma

Figura 6. Papel del residuo Asp298 en el receptor 5HT_{3A} de ratón. Se muestran los cuatro segmentos transmembranales (TM1-TM4) que constituyen a la proteína y las asas que los unen. Se señala con una flecha el Asp298 presente en el asa extracelular que une TM2 con TM3, probablemente involucrado en un estado funcional del receptor. Tomada de Hu y Lovinger, 2005.

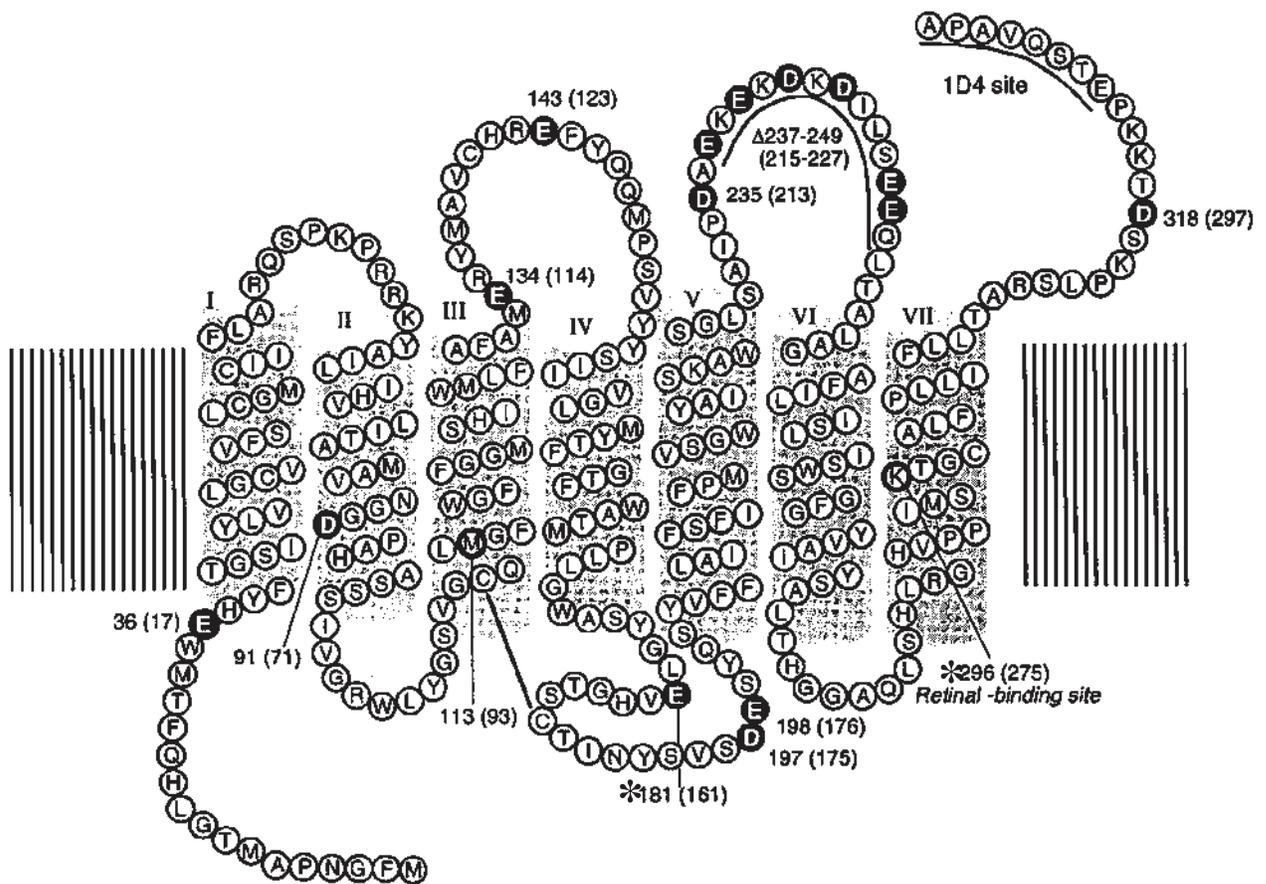


Figura 7. Localización del contraión del retinocromo bovino. El retinocromo bovino está constituido por siete STMs (I-VII). Se señala con asterisco la Lys 296 del STM VII involucrada en la unión del retinal cromóforo y en la formación de una base de Schiff protonada. Se muestran los residuos ácidos que constituyen la proteína, entre los que se encuentra el Asp 181(indicado con asterisco) presente en el asa extracelular que conecta los STMs IV y V el cual actúa como el contraión del retinocromo. Tomada de Terakita y col., 2000.

II. ANTECEDENTES

Con el propósito de identificar residuos de ChrA involucrados en la resistencia a cromato conferido por esta proteína, se generaron mutaciones al azar en el gen *chrA* usando la cepa hipermutagénica de *E. coli* XL1-Red. Algunas mutantes sensibles a cromato fueron aisladas y sometidas a experimentos de transporte, mostrando que la expulsión de cromato radiactivo fue disminuida en comparación con la cepa portadora del gen *chrA* silvestre. Esto confirmó que la mutación afectó el sistema de expulsión de cromato. Un análisis de secuenciación del DNA indicó que la mayoría de las mutaciones afectaron aminoácidos localizados en regiones citoplásmicas, o de STMs de la mitad N- terminal de la proteína, de acuerdo al modelo topológico de ChrA (**Fig. 3**). Estos resultados mostraron la importancia de la mitad N- terminal de ChrA en la resistencia a cromato (Aguilera y col., 2004).

El abordaje de mutagénesis al azar evidenció información relevante acerca de la proteína ChrA, sin embargo, debido a que los aminoácidos obtenidos presentaron cambios no conservativos, y debido a que en algunos casos se presentaron dobles mutaciones, no se pudo concluir acerca de la participación de aminoácidos específicos en el funcionamiento de la proteína (Aguilera y col., 2004).

El siguiente paso fue identificar ciertos residuos esenciales para la función de ChrA, así como dilucidar su probable participación en el proceso de expulsión del cromato, empleando para ello mutagénesis sitio-dirigida. La selección de probables aminoácidos esenciales se hizo tomando en cuenta aquellos aminoácidos altamente conservados evolutivamente, los cuales son encontrados en proteínas homólogas a ChrA (**Fig. 4**). Para

ello se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas de todos los miembros de la familia CHR.

Los primeros aminoácidos seleccionados como blanco de mutagénesis dirigida fueron la Gly81, presente en el STM II de ChrA, así como la Val269 del asa citoplásmica 4 (**Fig. 8**). La Gly81 sustituida por Ala y Ser, resultó ser esencial para mantener la resistencia a cromato conferido por ChrA, mientras que la Val269 al ser mutada por Leu y Thr no mostró un cambio significativo en el funcionamiento de la proteína. Se concluyó que la Gly81 es un residuo esencial que probablemente ayuda a la conformación correcta del STM II, sugiriendo que este STM forma parte del canal de expulsión de cromato (Aguilar, 2005).

Se continuó analizando la participación del STM II en el funcionamiento de ChrA, seleccionando como blanco de mutación dos Prolinas muy conservadas en este segmento (**Fig. 8**). La Pro80 y Pro82 mostraron su esencialidad para mantener la resistencia a cromato conferida por ChrA, y se propuso que estas dos Pro son importantes para el STM II desde un punto de vista estructural (Cortés, 2005). Esto debido a que se ha reportado que la presencia de Pro en el interior de las hélices transmembranales genera la formación de una curvatura involucrada en la protección de aminoácidos polares del ambiente desfavorable donde se encuentran (Von Heijne, 1991).

Otros aminoácidos que mostraron ser importantes, probablemente desde un punto de vista estructural en la proteína ChrA, fueron la Gly44 y Gly45 presentes en el STM I, la Gly92 del STM II, la Gly100 del STM III y el Trp 63 ubicado en el asa periplásmica 1 (**Fig 8**) (Díaz-Pérez, 2006). Se propuso que las Gly pueden participar en mantener la interacción hélice-hélice transmembranales, orientando así estas hélices de manera correcta, como ocurre en otras proteínas (Javadvpour y col., 1999). En el caso del Trp 63 de ChrA se ha

propuesto que este residuo puede participar permitiendo que haya cambios conformacionales que provocan el cierre o apertura del canal de transporte de cromato, o como estabilizador de la larga asa periplásmica donde se encuentra, como se ha observado en otras asas de características similares (Chen y col., 2001; Ridder y col., 2000).

Debido a que el cromato es un ión con carga negativa, es muy probable que algunos aminoácidos con carga positiva de ChrA interaccionen directamente con él para llevar a cabo su expulsión. Tomando en cuenta este criterio, también se seleccionaron residuos básicos (Arg y Lys) para ser analizados bajo el mismo abordaje de mutagénesis sitio-dirigida. Para su selección se tomaron en cuenta los alineamientos de secuencias proteicas con los miembros de las subfamilias CHR2 y CHR5 del árbol filogenético de la familia LCHR, donde se ubican las dos proteínas caracterizadas como transportadoras de cromato (**Fig. 4**). De este análisis se concluyó que los residuos Arg 154, ubicada en la interfase del asa citoplásmica 2 con el STM IV, la Lys 248 del STM VIII, y la Lys 394 del asa citoplásmica 6 (**Fig. 8**) probablemente unen el cromato antes de que éste sea expulsado al espacio periplásmico (Moreno, 2006).

III. JUSTIFICACION

Dada la importancia de los residuos ácidos en proteínas de membrana y con la finalidad de identificar nuevos residuos que juegen un papel importante en la resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA, decidimos analizar los aminoácidos ácidos conservados. Este análisis permitirá complementar el estudio de los aminoácidos esenciales en la proteína ChrA, iniciado con el análisis de los aminoácidos neutros y básicos conservados.

IV. HIPÓTESIS

Los residuos ácidos con un alto grado de conservación son esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar residuos ácidos esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar residuos ácidos conservados de la proteína ChrA
2. Obtener mutantes afectadas en los residuos ácidos seleccionados de ChrA.
3. Evaluar la esencialidad de los residuos ácidos.
4. Establecer la posible participación de los residuos ácidos esenciales en el funcionamiento de ChrA.

VI. MATERIALES Y METODOS

1.- REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo o sus componentes se adquirieron de los laboratorios Bioxon de México S. A., Merck-México S.A. o Sigma Chemical Corporation.

- Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- Agar Luria Bertani (AL): Al CL se le agregó 1.5% de agar bacteriológico.
- Caldo nutritivo (CN).
- K_2CrO_4 y $MgSO_4$ de los laboratorios Merck.

2.- CEPAS EMPLEADAS

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas como receptoras en la transformación fueron las siguientes:

- ▶ JM101 *supE*, *thi-1* Δ (*lac-proAB*) [F' , *traD36*, *proAB*, *laqI^qZ* Δ M15] (Yanisch-Perron y col., 1985).
- ▶ XL1-Blue *end A1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* *supE44* *recA1* *lac* [F' *proAB* *laqI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tc)] (Stratagene).

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fue empleada como receptora de transformación (Holloway y col., 1969).

3.-PLASMIDOS EMPLEADOS

El plásmido pGEMTChrAHis (**Fig. 9**) se usó para realizar la mutagénesis dirigida. Este plásmido se obtuvo a partir de la subclonación del gen *chrA* fusionado con histidinas

en el vector pGEM-T y la adición de dos sitios de restricción *Xba*I y *Sph*I que liberan el gen *chrAHis* (Aguilar, 2005). El plásmido también cuenta con un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R) y un gen que codifica para la proteína β -galactosidasa (LacZ).

Para subclonar el gen *chrAHis* con la mutación se utilizó el vector binario pUCP20, el cual cuenta con orígenes de replicación para *E. coli* y *P. aeruginosa* (West y col., 1994) (**Fig. 10**) que tiene además un gen de resistencia a ampicilina y un segmento de DNA que codifica la región amino terminal de la β -galactosidasa (LacZ'), que permite complementar la forma inactiva de LacZ de las cepas estándar de *E. coli* (sistema de α -complementación). De esta manera, las bacterias que tengan el plásmido con un inserto clonado desarrollarán colonias blancas Lac⁻, contra colonias azules Lac⁺ en presencia de un sustrato cromogénico (Xgal) cuando el vector se religa sin inserto.

4-AISLAMIENTO DE DNA PLASMIDICO

a) Por lisis alcalina:

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó empleando el método de lisis alcalina (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979; Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo:

En 4 ml de CL se creció un cultivo bacteriano durante 18-20 h a 37°C con agitación constante, posteriormente se distribuyó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugaron durante 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla se suspendió en 100 μ l de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM) y se le adicionaron 20 μ l de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min.

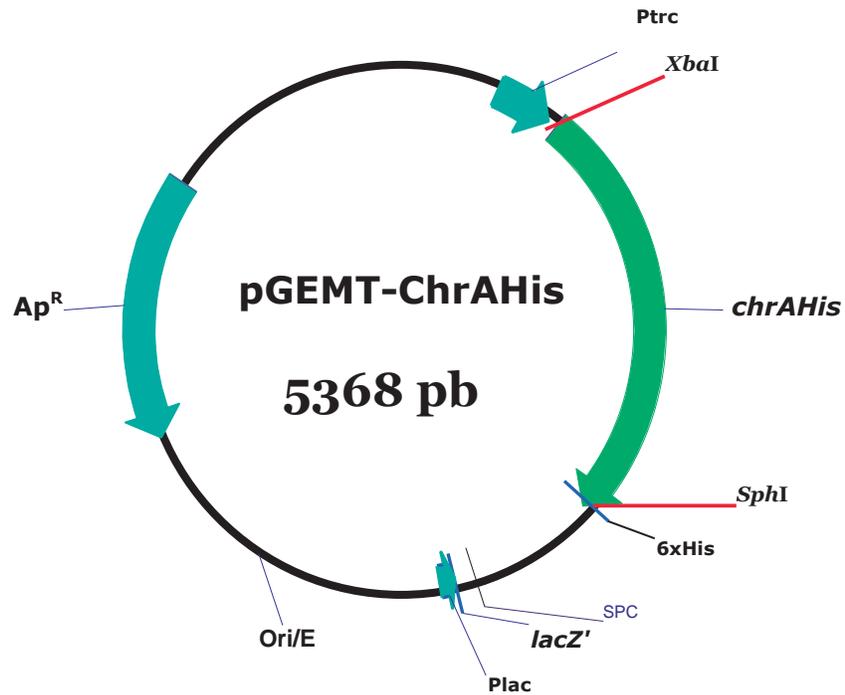


Figura 9. Plásmido pGEMT-ChrAHis. El gen *chrAHis* clonado en el vector pGEMT bajo el promotor *Ptrc*, se encuentra flanqueado con sitios de restricción para *XbaI* y *SphI*. Cuenta con origen de replicación para *E. coli* (*Ori/E*), un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R), un segmento de DNA que codifica para la región amino terminal de la β -galactosidasa (*LacZ'*) y un sitio de policlación (*SPC*). Tomada de Aguilar, 2005.

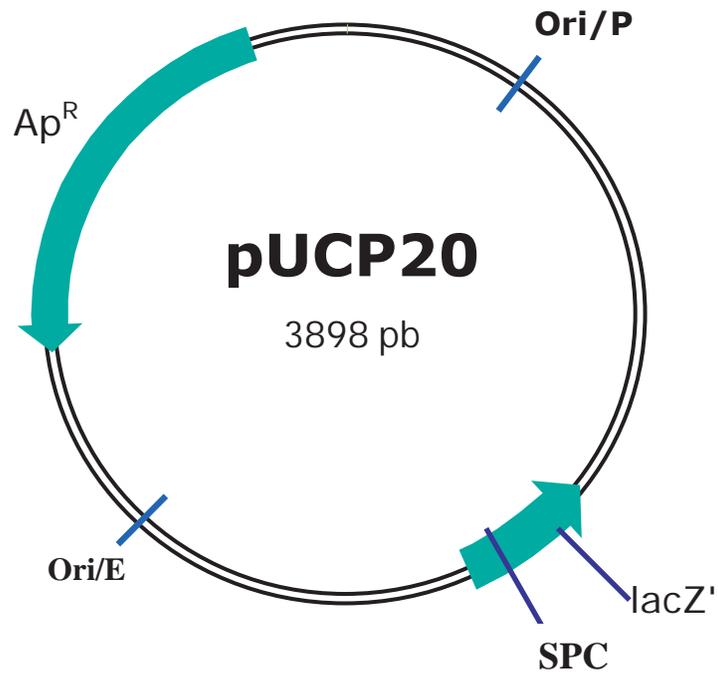


Figura 10. Plásmido pUCP20. Tiene un origen de replicación para *E. coli* (Ori/E) y uno para *Pseudomonas* (Ori/P). Cuenta además con un gen de resistencia a ampicilina/carbenicilina (Ap^R), la porción que codifica para la β -galactosidasa (LacZ) y un sitio de policlonación (SPC). Adaptado de West y col., 1994.

A la suspensión formada se le agregaron 300 μ l de la solución II recién preparada {NaOH 0.2 N y SDS (dodecilsulfato de sodio) 1%}, se agitó suavemente y se incubó durante 10 min en hielo. Transcurrido este tiempo se le adicionaron 250 μ l de una solución de acetato de potasio 5 M (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial pH 4.8), se mezcló ligeramente y se mantuvo 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a temperatura ambiente. Se le adicionaron 500 μ l de la mezcla 1:1 fenol-cloroformo y se mezcló moderadamente. Se centrifugó durante 10 min y al sobrenadante se le agregaron 500 μ l de cloroformo, se mezcló y se centrifugó durante 10 min. La fase acuosa superior se recuperó y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mantuvo durante 1 h a -20°C . Se centrifugó durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, el sedimento se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% centrifugando durante 5 min entre cada lavado. Se recuperó el sedimento y se secó a temperatura ambiente para posteriormente resuspender la pastilla de DNA obtenida en 25 μ l de agua grado HPLC estéril. Estas muestras se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a los corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

b) Por columna:

Para obtener el DNA de las clonas a secuenciar se utilizó el kit comercial “Wizard® plus Minipreps DNA purification system” de Promega siguiendo las siguientes instrucciones:

En 6 ml de CL se creció un cultivo bacteriano durante 18-20 h a 37°C con agitación constante, posteriormente se distribuyó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Se cosecharon las células centrifugando durante 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. A las células cosechadas se les adicionó 300 μ l de una solución de resuspensión, 300 μ l de

una solución de lisis y 300 μ l de una solución de neutralización. La mezcla de lisis fue centrifugada a 12,000 rpm y el sobrenadante fue aplicado a una columna con 1 ml de una solución de resina, se insertó un émbolo y se expulsó el contenido de la columna. Para lavar el DNA se repitió el paso anterior usando en lugar de resina 2 ml de solución de lavado que contiene etanol al 70%. Se secaron los tubos a 65 °C y se resuspendió la pastilla en 20 μ l de agua grado HPLC (65 °C). Estas muestras se almacenaron a -20 °C o fueron sometidas a los corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

5.-ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El DNA aislado se sometió a corrimientos electroforéticos. Para ello se preparó un gel de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M pH 8.0). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo amortiguador. Se tomaron 2 μ l de una muestra de DNA y se mezclaron con 2 μ l de amortiguador de carga [azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5%, sacarosa 40%] y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus Corporation modelo EC452) y se sometió a un voltaje constante de 120 voltios durante 1 h. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 10 min. Las bandas de DNA teñidas se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc.). Como marcador de tamaño molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y/o *HindIII*.

6.-AISLAMIENTO DEL DNA DE GELES DE AGAROSA

Para purificar el DNA empleado en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega. La banda de interés se cortó del gel de agarosa y se colocó en un tubo Eppendorf adicionando 10 µl de solución de unión a membrana por cada 100 mg de gel. Se mezcló bien en el agitador y se incubó a 50-65°C hasta disolver completamente el gel. La minicolumna SV se insertó en un tubo de colección, se transfirió la solución disuelta en la columna y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 1 min a 10 000 rpm. Se lavó primero con 700 µl de solución de lavado de membrana y centrifugando 1 min y después con 500 µl con solución de lavado centrifugando ahora 5 min. La elución del DNA se hizo adicionando agua grado HPLC y centrifugando 1 min. Una alícuota del DNA se corrió en un gel de agarosa para determinar la concentración del DNA recuperado y la muestra restante fue almacenada a – 20 °C.

7.-TRATAMIENTOS ENZIMATICOS DEL DNA

a) Restricción con endonucleasas

Los DNA plasmídicos se digirieron con endonucleasas empleando una unidad de enzima de restricción (Promega o Invitrogen) por microgramo de DNA e incubando a 37°C por un mínimo de 4 h o toda la noche. Después de este tiempo las muestras se sometieron a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

b) Ligaciones

Después de la recuperación y purificación de los fragmentos de DNA del gel de agarosa, éstos fueron ligados utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). Las

proporciones inserto-vector variaron según el experimento realizado. Las ligaciones se dejaron como mínimo 24 h a 4 °C y enseguida fueron almacenadas a –20 °C.

8.-TRANSFORMACION DE *E. coli* POR ELECTROPORACION

a) Preparación de células competentes

De un cultivo de la cepa de *E. coli* JM101 crecido durante toda la noche se tomaron 4 ml para inocular 250 ml de CL contenidos en un matraz de 1L y se incubó durante 3 h a 37°C con agitación constante hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente se mantuvo el cultivo en hielo durante 20 min y se distribuyeron alícuotas en tubos para centrifugar durante 10 min a 9, 500 rpm a 4°C. La pastilla se lavó dos veces por resuspensión con agua estéril fría y se centrifugó entre cada lavado en las condiciones antes descritas. Después del último lavado, la pastilla se resuspendió en agua estéril más glicerol al 20%. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 0.2 ml en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Estas células se utilizaron para la transformación o bien fueron almacenadas a –80°C.

b) Transformación

Se utilizaron de 3-5 µl de una mezcla de ligación de DNA, la cual se adicionó a 100 µl de células competentes. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación previamente enfriada para después ser colocada en un electroporador 2510 de Eppendorf al cual se le dio un pulso de 2.4 KV. Inmediatamente después se le adicionó 2 ml de LB precalentado y se incubó durante 2 h a 37°C con agitación constante. Se tomaron 100 µl de la mezcla previamente concentrada y se plaqueó en medio selectivo.

9.-TRANSFORMACION DE *E. coli* POR CHOQUE TERMICO

a) Preparación de células competentes

Se preparó un preinóculo de la cepa de *E. coli* XL1-Blue en 3 ml de medio LB y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Al siguiente día el preinóculo se vació a un matraz con 500 ml de medio LB y se incubó a 37°C hasta una absorbencia de 0.45-0.55 a 560 nm. El crecimiento se detuvo colocando el matraz en hielo por 5 min y se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 25 ml de TFb1 frío (acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15%, se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M y se esterilizó por filtración en un filtro de 0.22 µm), se mantuvo en hielo por 20 min y posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm por 10 min. La pastilla se resuspendió en 2 ml de TFb2 frío [MOPS (ácido 4-morfolino propano sulfónico) 75 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 100 mM y glicerol 15%], se ajustó el pH a 6.5 con KOH y se esterilizó por filtración. Posteriormente se hicieron alícuotas de 100 µl de la suspensión bacteriana y se almacenaron a -80°C.

b) Transformación

Se adicionaron 20 µl de una muestra de DNA digerida con *DpnI* a 100 µl de la suspensión de células competentes y se mantuvo en hielo 20 min. Después de este tiempo los tubos se incubaron a 42°C en un baño de agua por 45 seg y se transfirieron al hielo por otros 3 min. Se les adicionó 1 ml de caldo LB precalentado, se incubaron a 37°C por un máximo de 1 h, se concentró todo el cultivo centrifugando 1 min y resuspendiendo en 100 µl los cuales se plaquearon en medio selectivo.

10.- TRANSFORMACION DE *P. aeruginosa* POR ELECTROPORACION

Para la electroporación de *P. aeruginosa* se empleó el método de Enderle y Farwell, (1998): Se sembró en una placa de AL la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y se incubó 16 h a 37°C, posteriormente la caja se mantuvo a temperatura ambiente por 4 h. A un tubo de 1.5 ml con 500 µl de agua desionizada, estéril y fría se transfirieron aproximadamente 3 mg de células de la caja al tubo, usando un asa estéril. Los tubos se mezclaron moderadamente en el agitador hasta tener una mezcla homogénea y la suspensión celular se centrifugó 1 min a 14, 000 rpm desechando el sobrenadante. Posteriormente las células se lavaron con 500 µl de agua desionizada, estéril y fría. Las células se resuspendieron en 500 µl de agua, se mantuvieron en hielo y se usaron inmediatamente para la electroporación.

El DNA usado para la electroporación se diluyó en agua destilada estéril a una concentración final entre 5-50 ng de plásmido en 5-10 µl de volumen final. Después el DNA se adicionó a 100 µl de suspensión celular y se mezcló moderadamente. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación en hielo y se les dió un pulso de 1.8 ó 2.5 KV. Inmediatamente después se transfirió a un tubo con 1 ml de LB y se incubó de 1.5 a 4 h a 37°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo se plaquearon 100 µl del cultivo en medio selectivo.

11.-MUTAGENESIS DIRIGIDA BASADA EN PCR Y DIGESTION CON *DpnI*

a) Diseño de oligonucleótidos mutagénicos

Los oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron de un tamaño entre 25 a 45 nucleótidos, con una Tm igual o mayor a 78°C. La Tm se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$Tm = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N; \text{ donde N es igual al numero de nucleótidos.}$$

La mutación se localizó al centro de cada par de los oligonucleótidos, los cuales son complementarios entre sí. El diseño se realizó de manera que tuvieran un mínimo de GC de 40% y por lo menos una G o C en los extremos. Los oligonucleótidos, no fosforilados, fueron obtenidos de Invitrogen (**Tabla 1**).

b) Síntesis de la cadena mutada

Para este método se empleó el plásmido pGEMT-ChrAHis como DNA molde (**Fig 9**). La síntesis de la cadena mutada se hizo por medio de PCR (**Fig 11**). Se puso la siguiente reacción para la obtención de las mutantes: DNA (50-100 ng), oligonucleótido superior e inferior (150 ng), amortiguador de reacción 10X (5µl), mezcla de dNTPs 10 mM (1 µl), se ajustó la reacción para un volumen final de 50 µl con agua HPLC y se adicionó 1 µl de DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene) (2.5 U/µl).

Las condiciones del PCR usadas fueron las siguientes: 94°C/1 min (desnaturalización inicial), 94°C/1 min (desnaturalización), 64°C/1 min (alineamiento), 72°C/7.5 min (extensión) y 72°C/7.5 min (extensión final). Las muestras se sometieron a 16 ciclos de amplificación en un termociclador Perkin Elmer y al final de la amplificación se tomó una alícuota de la muestra para ser digerida con la endonucleasa *DpnI*.

c) Digestión con *DpnI*

Con la finalidad de eliminar el DNA molde carente de la mutación, el DNA amplificado por PCR fue tratado con la enzima de restricción *DpnI* (**Fig 11**) (New England Biolabs), para lo cual se puso la siguiente reacción: DNA amplificado (15 µl), amortiguador 10X (2 µl), BSA (suero bovino de albumina) 1/10 (2 µl) y 1 µl de *DpnI* (10-20 U/µl). La reacción se incubó toda la noche a 37°C y se usó para llevar a cabo la transformación.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la obtención mutaciones en residuos ácidos

Nombre del oligonucleótido ^a	Secuencia ^b
E56A 5'	GAT CGA CAT GTT GCG CCG <u>CGC</u> GCT CGT GGA CGA GGA ACG C
E56A 3'	GCG TTC CTC GTC CAC GAG <u>CGC</u> GCG GCG CAA CAT GTC GAT C
D59A 5'	GCG CCG CGA GCT CGT <u>GGC</u> CGA GGA ACG CTG GAT C
D59A 3'	GAT CCA GCG TTC CTC <u>GGC</u> CAC GAG CTC GCG GCG C
E60A 5'	CGC GAG CTCGTG GAC <u>GCG</u> GAA CGC TGG ATC TCC
E60A 3'	GGA GAT CCA GCG TTC <u>CGC</u> GTC CAC GAG CTC GCG
E83A 5'	GGT GCT GCC CGG ACC <u>CGC</u> AGC GCA TGA AAT ATG CG
E83 A 3'	CGC ATA TTT CAT GCG <u>CTG</u> CGG GTC CGG GCA GCA CC
E86A 5'	CCC GGA CCC GAA GCG CAT <u>GCA</u> ATA TGC GTT CAT TTG GGC
E86 A 3'	GCC CAA ATG AAC GCA TAT <u>TGC</u> ATG CGC TTC GGG TCC GGG
D162A 5'	GAG CAC ATC CTG CTT <u>GCT</u> CGC TGG TTG TGG GTC
D162A 3'	GAC CCA CAA CCA GCG <u>AGC</u> AAG CAG GAT GTC CTC
E230A 5'	GAC AGC GAA GCT TGT <u>GGC</u> AGC GGT CGT TCA GGG C
E230A 3'	GCC CTG AAC GAC CGC <u>TGC</u> CAC AAG CTT CGC TGT C
D281A 5'	GAT GGG CAG TTC CTG <u>GCC</u> GGC CTG GCG CTG TCC
D281A 3'	GGA CAG CGC CAG GCC <u>GGC</u> CAG GAA CTG CCC ATC
E333A 5'	GAT TTT CTA CGA CCG GCT <u>GGC</u> GGC GGT CGT GGA GAA CAA AC
E333A 3'	GTT TGT TCT CCA CGA CCG <u>CCG</u> CCA GCC GGT CGT AGA AAA TC
E369A 5'	GCG CAG GTC ACT GCT <u>GCA</u> CGT GTC CCA TCG TTG
E369A 3'	CAA CGA TGG GAC ACG <u>TGC</u> AGC AGT GAC CTG CGC

^aEl nombre indica el número de residuo ácido (D, E) en la proteína ChrA que se sustituye por Alanina (A). 5', oligonucleótido superior; 3', oligonucleótido inferior.

^bEn negritas se indica el nucleótido que genera el cambio del codón, el cual se encuentra subrayado.

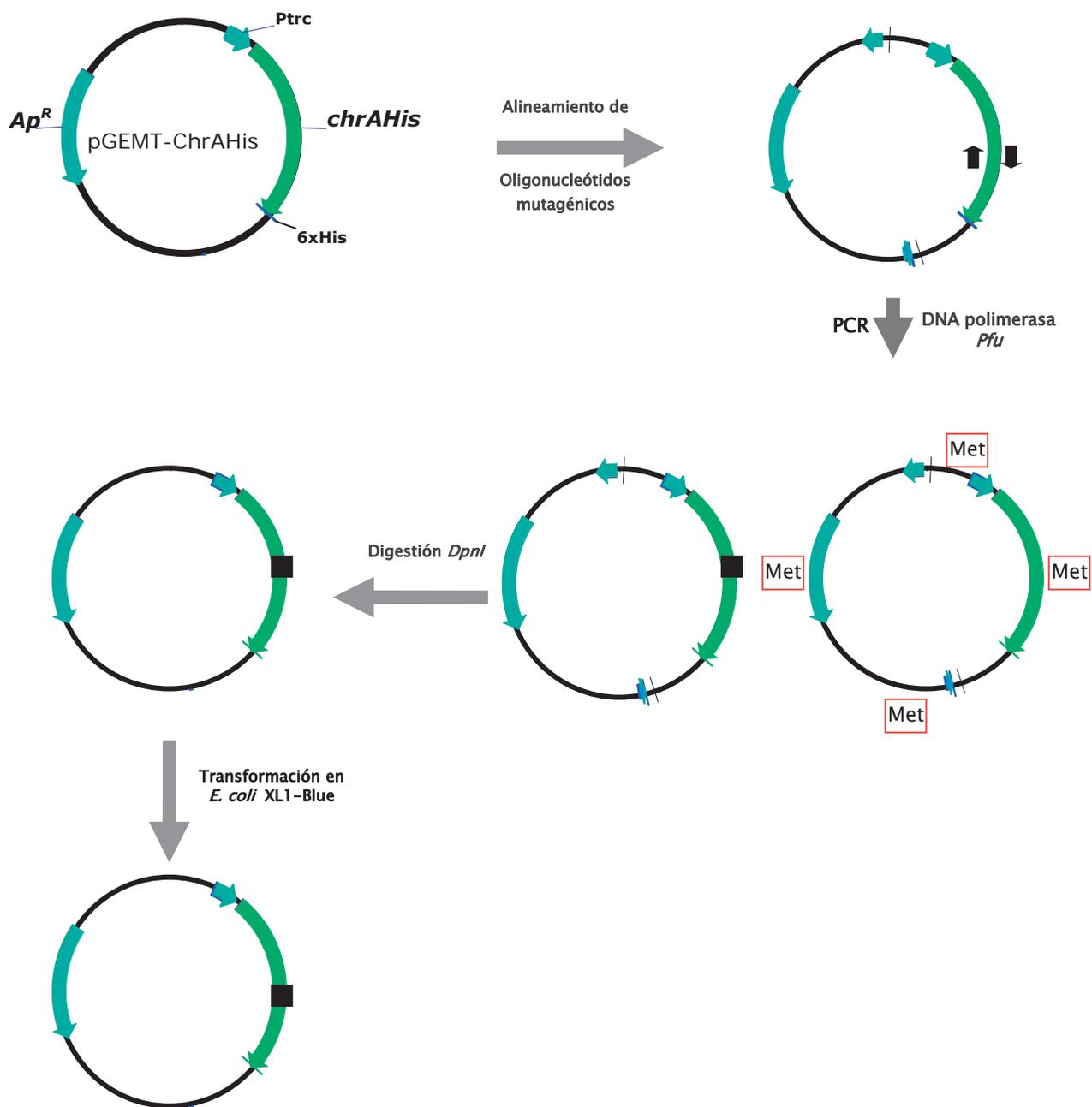


Figura 11. Esquema del método de mutagénesis dirigida basada en PCR y digestión con *DpnI*. Se muestra el plásmido pGEMT-ChrAHis. El método detallado es descrito en el texto. Las flechas negras indican los oligonucleótidos mutagénicos, el cuadro negro sobre el plásmido indica que este presenta la mutación deseada. Met indica que el plásmido silvestre presenta sitios metilados.

d) Transformación

La mezcla total de digestión con *DpnI* se empleó para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue por choque térmico (anteriormente descrito). La selección de las mutantes se hizo plaqueando en cajas de AL con 100 µg/ml de ampicilina. De las colonias obtenidas se seleccionaron tres al azar y se les realizó ampicilina. De las colonias obtenidas se seleccionaron tres al azar y se les realizó aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina para verificar la presencia del plásmido y para su posterior secuenciación.

12. SECUENCIACION

a) Oligonucleótidos empleados

Para la verificación de la mutación en la región deseada, el gen *chrA* fue enviado para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Genómica Cinvestav-Irapuato. Los oligonucleótidos empleando fueron los siguientes:

Directo ChrA+1: 5'-CAA TCT AGA ATC AAG CAG GAT GTC CTC GCC-3'

(Permite amplificar un fragmento del gen *chrA* de aproximadamente 100 pb, a partir de la región codificante)

Directo R201K: 5' –CTG GTG CTG AAT CAT AAG GCC TCA GCG CTC TG-3'

(Permite amplificar un fragmento del gen *chrA* de aproximadamente 100 pb a partir del codón que codifica para el residuo número 197 de la proteína ChrA)

Reverso G416: 5'-CAT CTA GAG CCT TGG TTC GGA AAT ACC AGC-3'

(Permite amplificar un fragmento del gen *chrA* de aproximadamente 100 pb iniciando por el codón que codifica para el aminoácido 416 de ChrA)

e) Análisis de las secuencias

El alineamiento de secuencias se realizó empleando el programa Clustal W de EMBL-EBI para confirmar el cambio ocurrido en las mutantes.

13.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO

Se prepararon tubos con 4 ml de CN y con concentraciones variables de cromato. A cada tubo se le agregaron 40 μ l de un cultivo crecido en CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante. Como control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo que no contenía cromato. Los tubos inoculados se incubaron por un periodo de 18-20 h a 37°C con agitación constante. La susceptibilidad se midió en función de la absorbencia de los cultivos a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy y en un espectrofotómetro Jenway 640.

El porcentaje del nivel de resistencia conferido por las mutantes se determinó obteniendo el promedio de absorbencia a las concentraciones usadas. A cada valor se le restó el obtenido para el control sensible PAO1 (pUCP20) y estableciendo como 100% la absorbencia del control resistente PAO1 (pUChrA).

VII. RESULTADOS

Con la finalidad de complementar el estudio de la posible participación estructural o funcional de los aminoácidos conservados en la proteína ChrA, mismo que fue iniciado con el análisis de los aminoácidos neutros y básicos conservados, se seleccionaron algunos aminoácidos ácidos como blanco para mutagénesis sitio dirigida.

1. Criterios de selección para los aminoácidos ácidos

La selección de los aminoácidos ácidos se realizó tomando en cuenta su grado de conservación de acuerdo a un alineamiento de secuencias proteicas con miembros pertenecientes a las subfamilias CHR2 y CHR5 de la familia LCHR (**Fig 12**) donde se encuentran las dos proteínas funcionalmente caracterizadas (**Fig. 4**). Para determinar el grado de conservación se tomaron en cuenta únicamente cambios entre los dos aminoácidos ácidos, Aspartato y Glutamato, sin considerar sus correspondientes amidas. Una excepción fue la selección del residuo E86, del cual se obtuvo su grado de conservación tomando en cuenta su amida la Glutamina. De acuerdo a este alineamiento, de los 25 aminoácidos ácidos presentes en la proteína ChrA diez de ellos presentan una conservación mayor al 50% (**Tabla 2**), por lo que fueron seleccionados para su estudio. Los diez aminoácidos se encuentran distribuidos, de acuerdo al modelo topológico de ChrA (**Fig. 3**), de la siguiente forma: cinco están presentes en asas periplásmicas, tres se encuentran ubicados en STMs y dos en la interfase de asas citoplásmicas con STMs (**Tabla 2**).

2. Sustitución de los aminoácidos ácidos

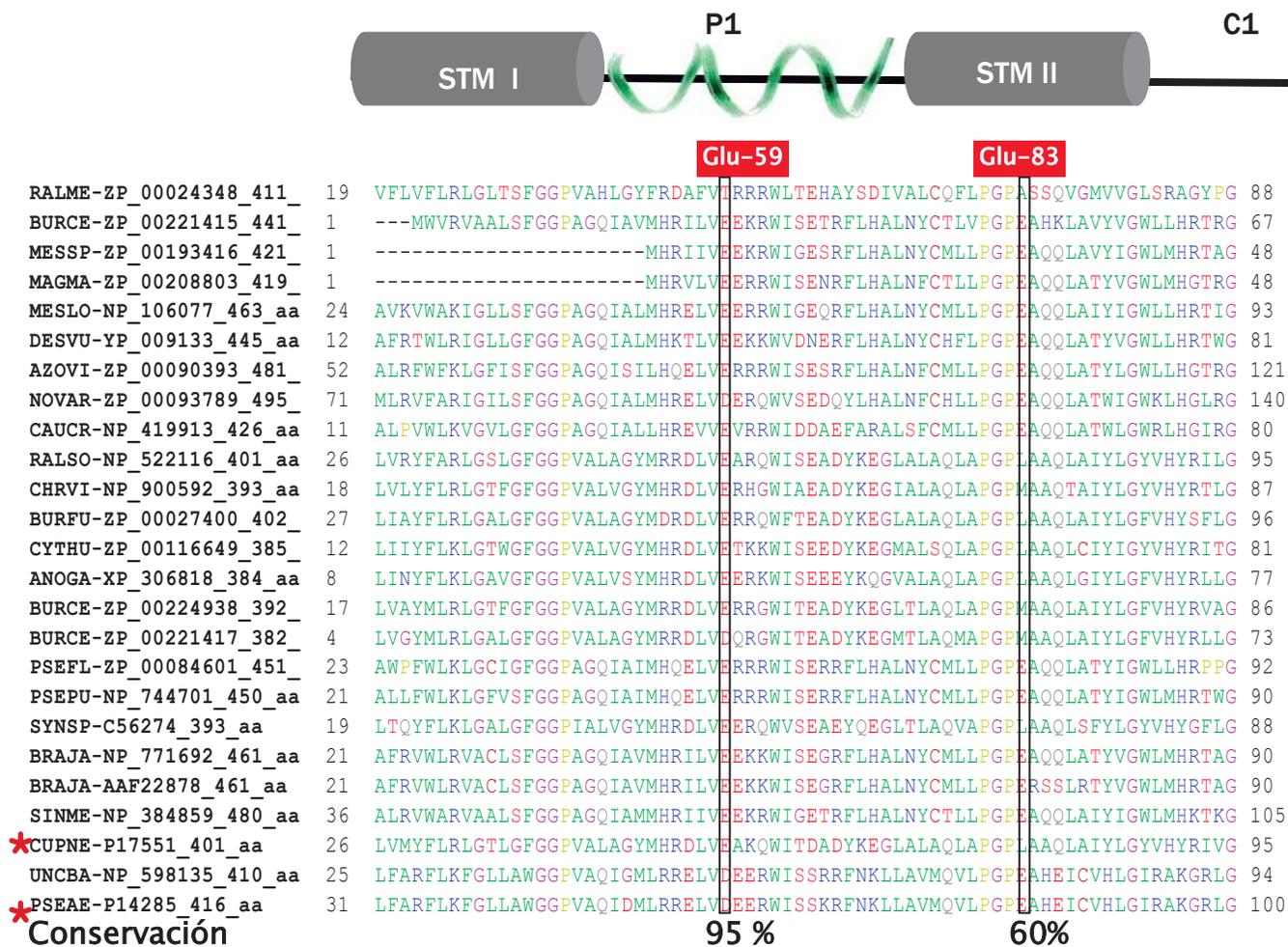


Figura 12. Conservación de los aminoácidos de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Se muestra parte de un alineamiento de secuencias proteicas de los miembros pertenecientes a las subfamilias CHR2 y CHR5 de la familia LCHR. A la izquierda se muestra en forma abreviada el nombre del organismo al que pertenecen las proteínas, el número de acceso y el número de aminoácidos. Con asteriscos se indican en la parte inferior las dos proteínas funcionalmente caracterizadas; ChrA de *C. metallidurans* y ChrA de *P. aeruginosa*. Se indica con el esquema de la parte superior, los aminoácidos de ChrA de *P. aeruginosa* que forman parte de los segmentos transmembranales I y II (STM I y II), del asa periplásmica 1 (P1) y del asa citoplásmica 1 (C1). Se indica con un recuadro el Glu 59 de P1, conservado en un 95%, y el Glu 83 del STM II conservado en un 60%.

Tabla 2. Conservación y localización de los 25 aminoácidos ácidos de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*.

AMINOÁCIDO	POSICIÓN ^a	% CONSERVACIÓN ^b
D59	P1	95
E333*	C5-STM X	95
D281	C4-STM IX	87
D162	STM V	79
E369*	P6	70
E56	P1	66
E83	STM II	62
E60	P1	54
E230	P4	50
D276	C4	40
E61	C1	41
D181	P3	41
D346	STM XI	41
E157	C2	30
E337	C5	37
E20	Ncit	16
E86	STM II	8 (95) ^c
E7	Ncit	8
D16	Ncit	8
E127	P2	8
D267	C4	8
D330	STM X	8
D362	STM XI	8
E6	Ncit	4
D51	P1	4

^a Abreviaturas: STM, segmento transmembranal; C, asa citoplásmica; P, asa periplásmica; N, amino terminal citoplásmico; C-STM, interfase asa citoplásmica-segmento transmembranal; STM-P interfase segmento transmembranal-asa periplásmica.

^b Conservación: Asp/Glu

^c Conservación: Glu/Gln

(*) Residuos de los que no se logró obtener su mutante.

Con el propósito de eliminar la carga negativa, la sustitución de cada uno de los aminoácidos ácidos fue por el aminoácido neutro Alanina (**Fig. 13**). Este cambio no conservativo elimina la posibilidad de una interacción electrostática o de un enlace de hidrógeno por parte este residuo, por lo que de esta manera se puede evaluar si el aminoácido ácido es o no esencial para el funcionamiento de la proteína.

3. Obtención y caracterización de las mutantes

La sustitución de cada uno de los residuos ácidos elegidos fue realizada por el método de mutagénesis mediante PCR y digestión con *DpnI* de Fisher y Pei (1997) descrito en Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos mutagénicos empleados (**Tabla 1**) fueron diseñados de acuerdo a las características requeridas para el método de mutagénesis, las cuales fueron descritas en Materiales y Métodos.

El plásmido utilizado para introducir las mutaciones fue pGEMT-ChrAHis, el cual cuenta con el gen *chrA* fusionado a una etiqueta de histidinas bajo el promotor Ptrc (**Fig. 9**). También cuenta con 29 sitios de restricción para la enzima *DpnI*, los cuales sirven para que la endonucleasa digiera específicamente el DNA metilado carente de la mutación.

Las condiciones de amplificación por PCR para la obtención de las mutantes fueron las implementadas por Aguilar (2005) y son mostradas en Materiales y Métodos. Posterior a las reacciones de PCR y digestión con *DpnI*, el DNA fue usado para llevar a cabo el proceso de transformación en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. De aquí se obtuvo un número de colonias transformantes variable por cada muestra de DNA, que fue desde 10 hasta 50 colonias. Se tomaron tres colonias de cada experimento de transformación y se sometieron a un aislamiento de DNA plasmídico. Los plásmidos obtenidos fueron caracterizados con las enzimas de restricción *BglII*, *XbaI* y *SphI* (**Fig. 14**). Liberando estos tratamientos lo

Aspartato	
$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $	
Glutamato	
$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $	
Alanina	
$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	

Figura 13. Sustitución de los aminoácidos ácidos. Se muestra la estructura química y tridimensional de los dos aminoácidos ácidos (Aspartato y Glutamato) y del residuo Alanina, por el cual fueron sustituidos por mutagénesis.

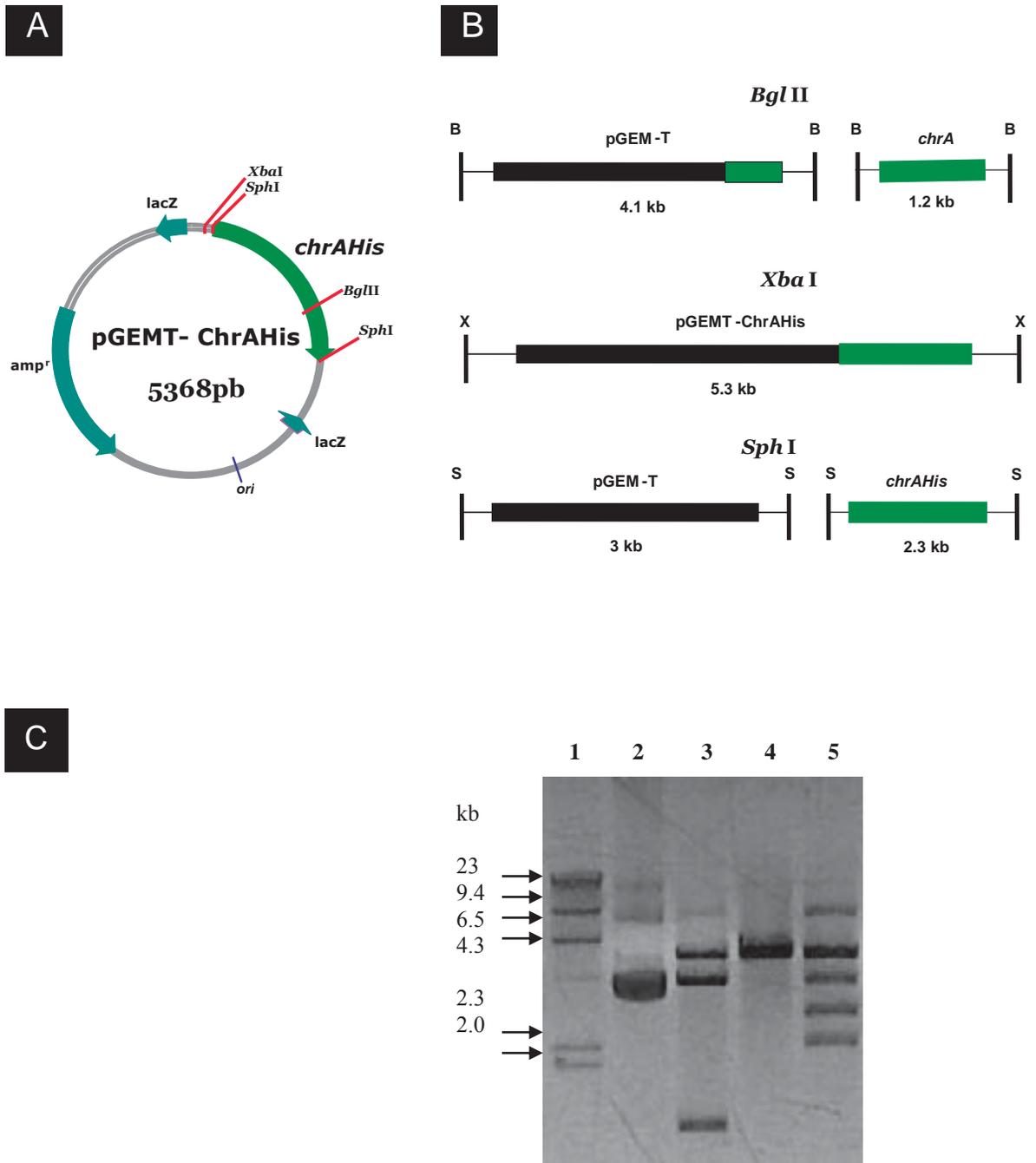


Figura 14. Caracterización del plásmido pGEMT-ChrAHis mutagenizado. A, Esquema de pGEMT-ChrAHis con algunos de los sitios de restricción. B, Fragmentos generados de la digestión con las enzimas *Bgl*II, *Xba*I y *Sph*I. B, Fotografía de un gel de agarosa que muestra la digestión de pGEMT-ChrAHis. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular; 2) pGEMT-ChrAHis sin digerir; 3) pGEMT-ChrAHis/*Bgl*II; 4) Restricción pGEMT-ChrAHis/*Xba*I; 5) pGEMT-ChrAHis/*Sph*I.

fragmentos de 4.1 kb y 1.2 kb con *Bgl*III, un fragmento linearizado de 5.3 kb con *Xba*I y los fragmentos de 3 kb y 2.3 kb con la endonucleasa *Sph*I (**Fig. 14**).

Los plásmidos fueron enviados para su análisis por secuenciación. Las secuencias obtenidas se alinearon con el gen *chrA* silvestre para corroborar la presencia de las mutaciones. En la **figura 15** se muestra como ejemplo un alineamiento mediante la cual se confirmó la presencia de la mutación Asp281Ala en el gen *chrA*.

4. Subclonación de los genes mutados en el vector pUCP20

Una vez que se confirmó la presencia de la mutación deseada en *chrA*, este gen fue aislado del plásmido pGEMT-*ChrAHis* con las endonucleasas *Sph*I y *Xba*I y subclonado en el vector con origen de replicación para *E. coli* y *P. aeruginosa* pUCP20 (West y col., 1994) digerido con las mismas enzimas (**Fig 16**). La cepa de *E. coli* JM101 fue transformada con el producto de esta subclonación, que fue denominado pUChrA más el nombre de la mutación, por ejemplo pUChrA-D281A. La caracterización del plásmido pUChrA mutante se realizó tomando al azar tres colonias transformantes para ser sometidas a un aislamiento de DNA plasmídico y a un análisis de restricción con las endonucleasas *Xba*I y *Bgl*III. Generando la digestión un fragmento de DNA linearizado de 6.2 kb con *Xba*I y los fragmentos de 1.2 kb y 5 kb con *Bgl*III (datos no mostrados).

Debido a que se ha reportado que la proteína ChrA es funcional en *P. aeruginosa* pero no en *E. coli* (Cervantes y col., 1990), la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 fue transformada con los plásmidos pUChrA mutantes. Para comprobar la presencia de pUChrA mutante en esta cepa receptora, se escogieron tres clonas para la caracterización del plásmido con las endonucleasas *Xba*I y *Bgl*III, obteniéndose un fragmento de DNA linearizado de 6.2 kb con *Xba*I y los fragmentos de 1.2 kb y 5 kb con *Bgl*III (datos no

```

ChrA                AGGGCCAGGCCTCGGTGCTGCTCATCTTCGCGTCGGGCCTGAAG
ChrA-D281A         AGGGCCAGGCCTCGGTGCTGCTCATCTTCGCGTCGGGCCTGAAG
*****

ChrA                TCGGCGGCGCCTACACAGCGATTCCGTTTCGTTTCGCAACGACGCC
ChrA-D281A         TCGGCGGCGCCTACACAGCGATTCCGTTTCGTTTCGCAACGACGCC
*****

ChrA                TGACGGATGGGCAGTTCCTGGACGGCCTGGCGCTGTCCGGTGTG
ChrA-D281A         TGACGGATGGGCAGTTCCTGGCCGGCCTGGCGCTGTCCGGTGTG
*****

ChrA                TCATCTTCGCCACGTTTCGTTCGGCTATGTGGCGGGGGGGCCGATC
ChrA-D281A         TCATCTTCGCCACGTTTCGTTCGGCTATGTGGCGGGGGGGCCGATC
*****

ChrA                CGGTGGGTGTCTTTCTTCCGGCCTTTGCGTTCTCGCTGATTTTC
ChrA-D281A         CGGTGGGTGTCTTTCTTCCGGCCTTTGCGTTCTCGCTGATTTTC
*****

ChrA                CGGTCGTGGAGAACAAACGGCTGCACGCCTTTCTGGACGGCGTC
ChrA-D281A         CGGTCGTGGAGAACAAACGGCTGCACGCCTTTCTGGACGGCGTC
*****

ChrA                GCCTGATCGGCGCAACCACCATCGACTTGGCGCAGGTCACTGCT
ChrA-D281A         GCCTGATCGGCGCAACCACCATCGACTTGGCGCAGGTCACTGCT
*****

ChrA                TGACGGTGGGCATGTCGATTTTCGCCGCAGGCTTGGCATTTCCTT
ChrA-D281A         TGACGGTGGGCATGTCGATTTTCGCCGCAGGCTTGGCATTTCCTT
*****

ChrA                AGCTCAACGTCGTCGTCGTGATCCTCGCGGGGGATTGGCGGGG
ChrA-D281A         AGCTCAACGTCGTCGTCGTGATCCTCGCGGGGGATTGGCGGGG
*****

```

Figura 15. Confirmación de la presencia de la mutación Asp281Ala en el gen *chrA*. Se muestra como ejemplo un alineamiento de secuencias de nucleótidos realizado en el programa ClustalW. En la parte superior se encuentra la secuencia del gen *chrA* silvestre y en la parte inferior la secuencia del gen *chrA-D281A*. En negritas se indica el codón que en *chrA* codifica para Aspartato y en *chrA-D281A* codifica para Alanina.

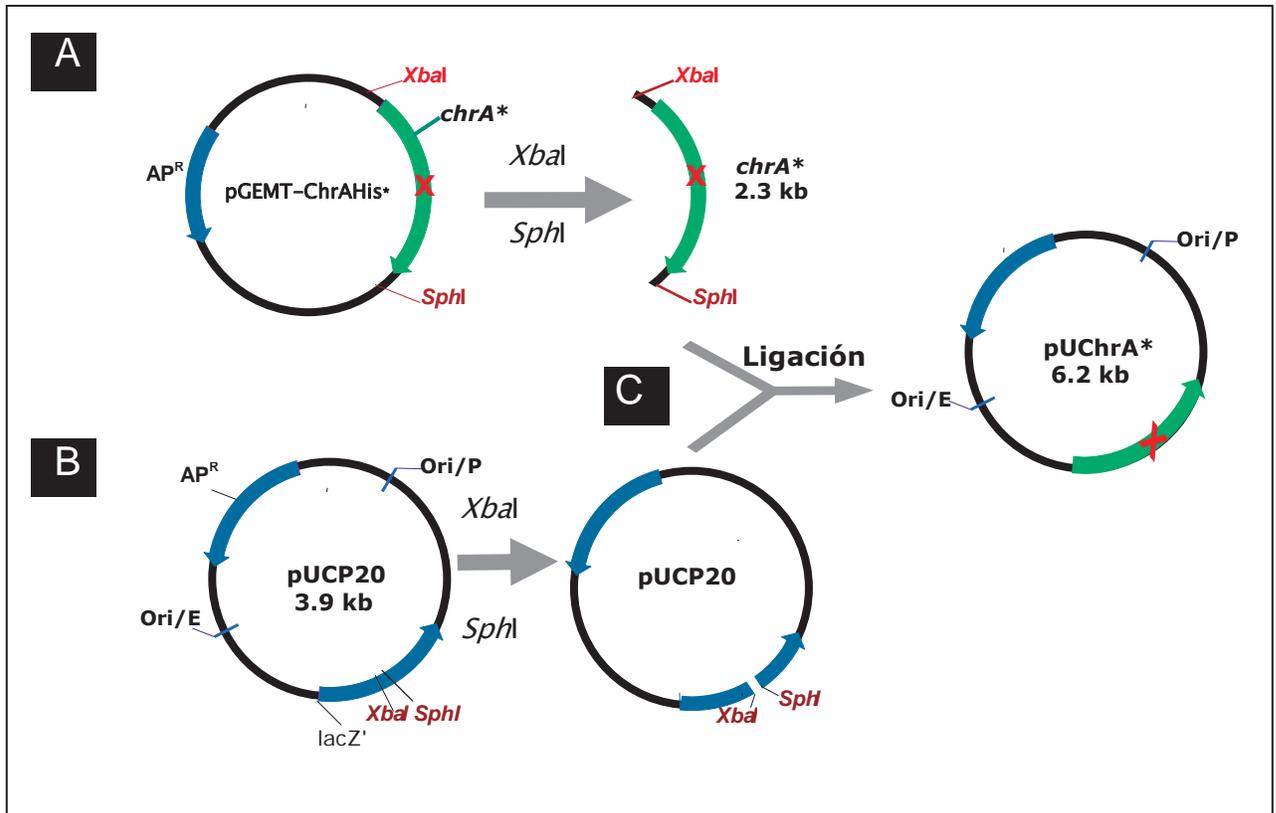


Figura 16. Subclonación del gen *chrAHis* mutante en el vector binario pUCP20. A, El gen *chrA** (mutante) es liberado del plásmido pGEMT-*chrAHis** mediante una restricción con *Xba*I y *Sph*I. B, El vector pUCP20 fue digerido con las mismas enzimas. C, El gen *chrA** es ligado con pUCP20 obteniéndose como producto el plásmido pUChrA*.

mostrados). Una de las clonas de PAO1 caracterizadas de cada una de las mutantes fue seleccionada para la realización de pruebas de susceptibilidad a cromato.

5. Pruebas de susceptibilidad a cromato

El estudio de la participación de los aminoácidos ácidos conservados en el funcionamiento de la proteína ChrA se realizó analizando pruebas de susceptibilidad a cromato efectuadas a las cepas transformadas con los plásmidos mutados. Los controles de estas pruebas fueron los siguientes: como control positivo, la cepa resistente a cromato de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pUChrA silvestre y, como control negativo, la cepa sensible a cromato PAO1 transformada con el vector pUCP20 carente del gen *chrA*. El porcentaje del nivel de resistencia conferido por las mutantes se determinó como se indica en materiales y métodos.

5.1 Glutamato 56, Aspartato 59 y Ácido glutámico 60

Los residuos ácidos Glu 56, Asp 59 y Glu 60 ubicados en el asa periplásmica 1 de la proteína ChrA (**Fig. 17**), al ser mutados por Alanina (Ala, A) generaron las mutantes E56A, D59A y E60A, respectivamente, las cuales mostraron los siguientes niveles de resistencia a cromato: la mutante con la sustitución E56A se vio drásticamente afectada, presentando un nivel de resistencia del 16% en comparación con la cepa portadora del plásmido control pUChrA (**Fig. 18**). La mutante D59A se afectó notablemente, presentando un nivel de resistencia del 63% (**Fig. 18**). La mutante con el cambio E60A prácticamente no se vio afectada, debido a que presentó un nivel de resistencia del 98% (**Fig. 18**). Estos resultados indican que la presencia del residuo Glu 56 en el asa periplásmica 1 es esencial para que la proteína ChrA confiera resistencia a cromato. También sugieren que el Asp 59 tiene una

Fig. 17. Localización en el modelo topológico de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* de los residuos ácidos mutados por Alanina. Se indican con un recuadro los diez aminoácidos ácidos conservados en un 50% o más en homólogos de la proteína ChrA, los cuales fueron seleccionados como blanco de mutagénesis sitio dirigida.

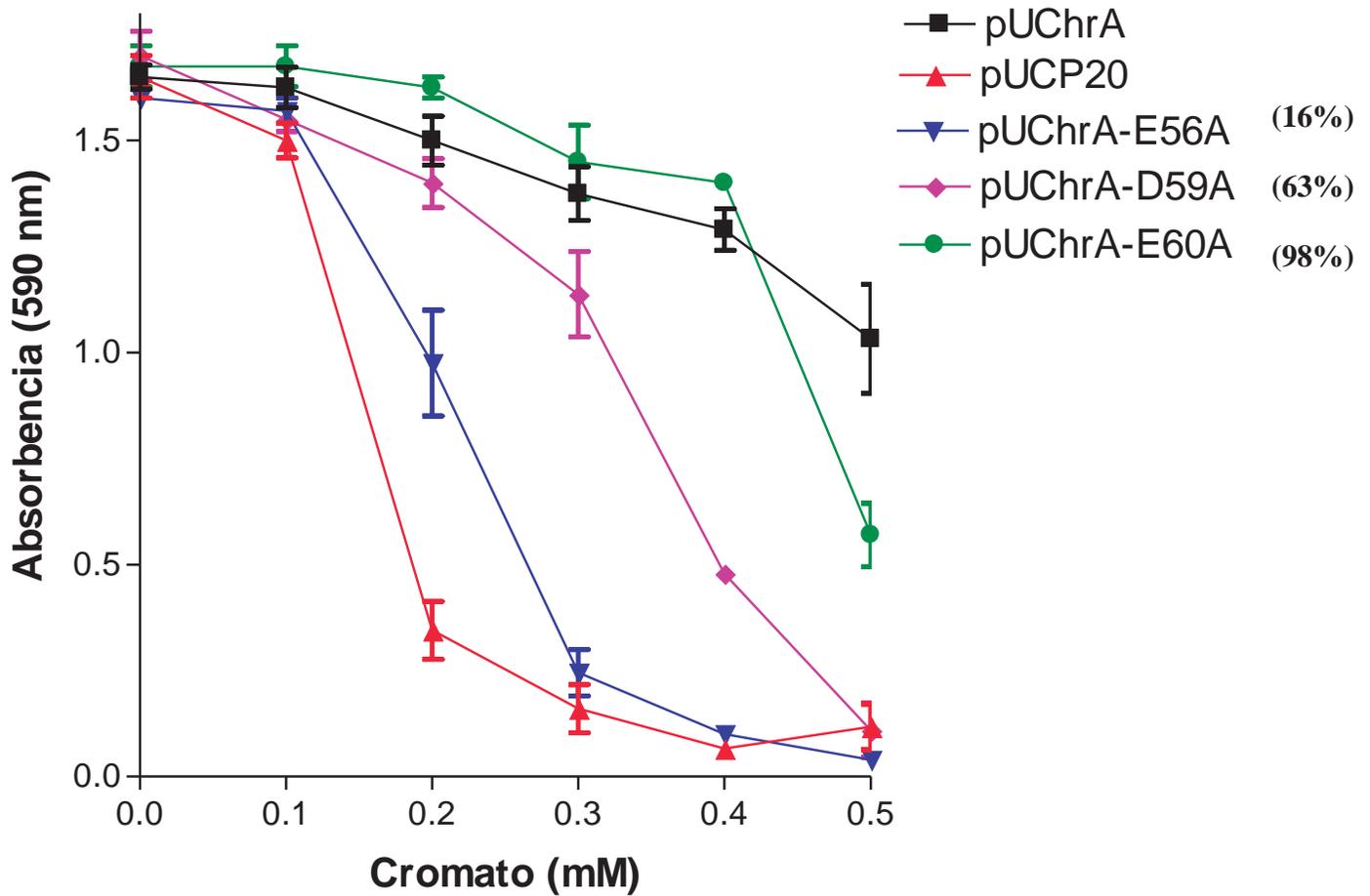


Figura 18. Efecto de las mutantes Glu56Ala, Asp59Ala y Glu60Ala en la susceptibilidad a cromato. Los cultivos se crecieron de 18-20 h a 37°C con agitación constante en medio CN con las concentraciones de cromato que se indican. Se determinó el crecimiento por la absorbancia de los cultivos a 590 nm. Se emplearon las cepas: PAO1 (pUCP20) (sensible), PAO1 (pUChrA) con el gen *chrA* silvestre (resistente) y las mutantes PAO1 (pUChrA-E56A), PAO1 (pUChrA-D59A) y PAO1 (pUChrA-E60A). Se indica el nivel de resistencia de las mutantes en porcentaje. $\bar{x} \pm S$ de cuatro ensayos.

\bar{x} = media; S = desviación estándar

participación importante en la proteína y que el Glu 60 no se requiere para que la proteína ChrA funcione adecuadamente.

5.2 Glutamato 83

La cepa de PAO1 portadora del plásmido pUChrA con la mutación Glu83Ala ubicado en el STM II (**Fig 17**), resultó drásticamente afectada en su capacidad para resistir cromato, presentando un nivel de resistencia igual al del control sensible pUCP20 (**Fig 19**). Esto refleja que el Glu 83 de ChrA es esencial para que ésta confiera resistencia a cromato.

5.3 Glutamato 86

A pesar de la baja conservación del Glu 86 en homólogos de la proteína ChrA por residuos ácidos (8%) (**Tabla 2**), se tomó en cuenta este residuo para su análisis por mutagénesis, debido a que se encuentra muy conservado por su amida la Glutamina (95%) (**Tabla 2**) Glu83 además se encuentra ubicado en el STM II (**Fig. 17**) donde se han identificado otros residuos esenciales para la proteína (**Fig. 8**). La sustitución de este residuo por Ala provocó la pérdida total de resistencia a cromato de la cepa mutante (**Fig. 19**). Esto indica que se requiere la presencia del Glu 86 en el STM para que la proteína funcione adecuadamente.

5.4 Aspartato 162

El residuo Asp 62 ubicado, de acuerdo al modelo topológico de la proteína ChrA, en el STM V (**Fig. 17**), al ser sustituido por Ala, conservó un nivel de resistencia de solo 14% comparado con el control resistente (**Fig. 19**). Esto indica la esencialidad del Asp 62 para el mantenimiento de la resistencia a cromato por ChrA.

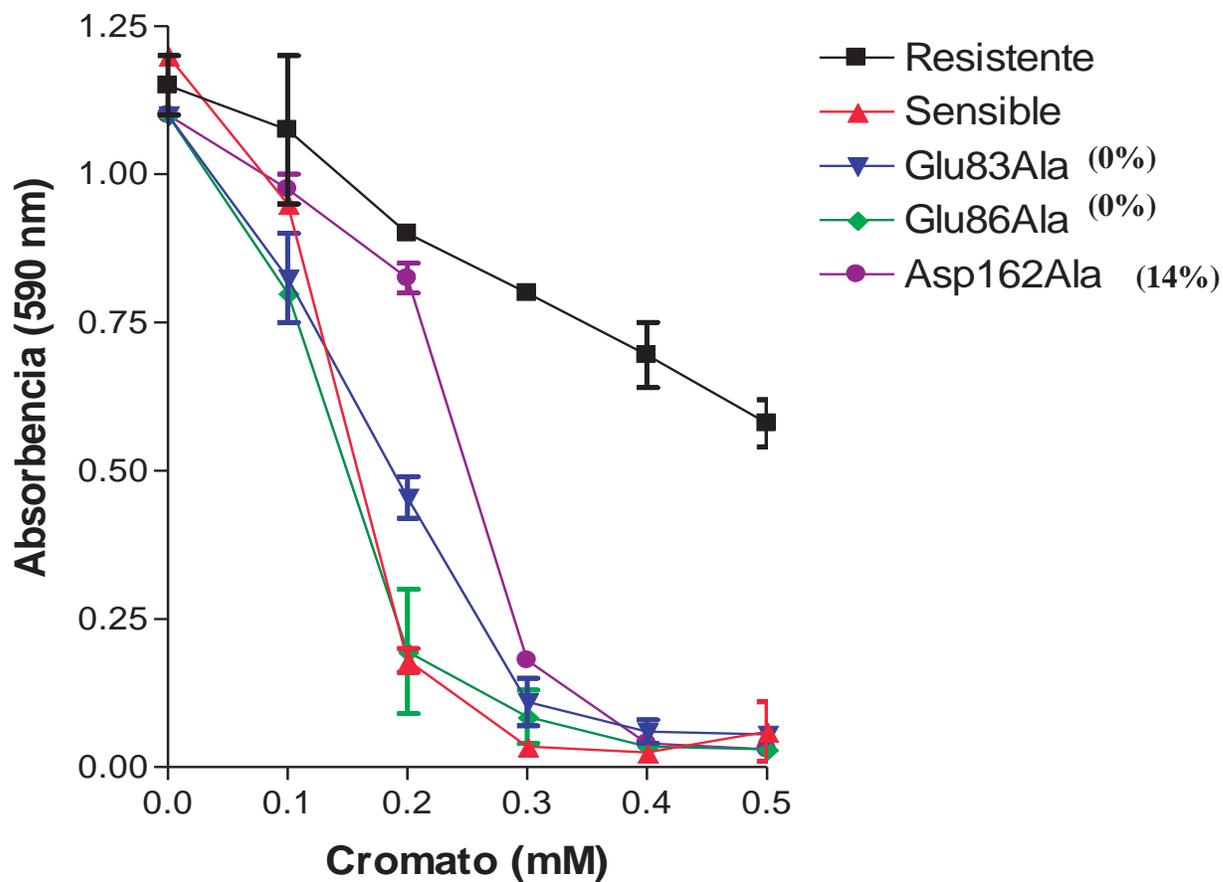


Figura 19. Efecto de la mutación Glu83Ala Glu86Ala y Asp162Ala en la susceptibilidad a ciprofloxacina. Las condiciones de crecimiento y los controles fueron los mismos indicados en la figura 19. La cepa mutante empleada en este experimento fue PAO1 (pUChrA-E83A), PAO1 (pUChrA-E86A) y PAO1 (pUChrA-D162A). $\bar{x} \pm S$ de cuatro ensayos.

5.5 Glutamato 230

La mutante Glu230Ala mostró un comportamiento muy similar al de la cepa control resistente pUChrA (**Fig. 20**), presentando un 100% de resistencia en las pruebas de susceptibilidad a cromato. Este resultado indica que el residuo Glu 230, del asa periplásmica 4 (**Fig. 17**), no se requiere para que ChrA confiera resistencia a cromato.

5.6 Aspartato 281

El residuo Asp 281 se ubica en el asa citoplásmica 4 (**Fig. 17**) y su mutación por Ala provocó un moderado decremento en la resistencia a cromato, alcanzando un nivel de resistencia del 79% comparado con el control resistente (**Fig. 20**). Este resultado indica que el Asp 281 no tiene una participación importante en el funcionamiento de la proteína ChrA.

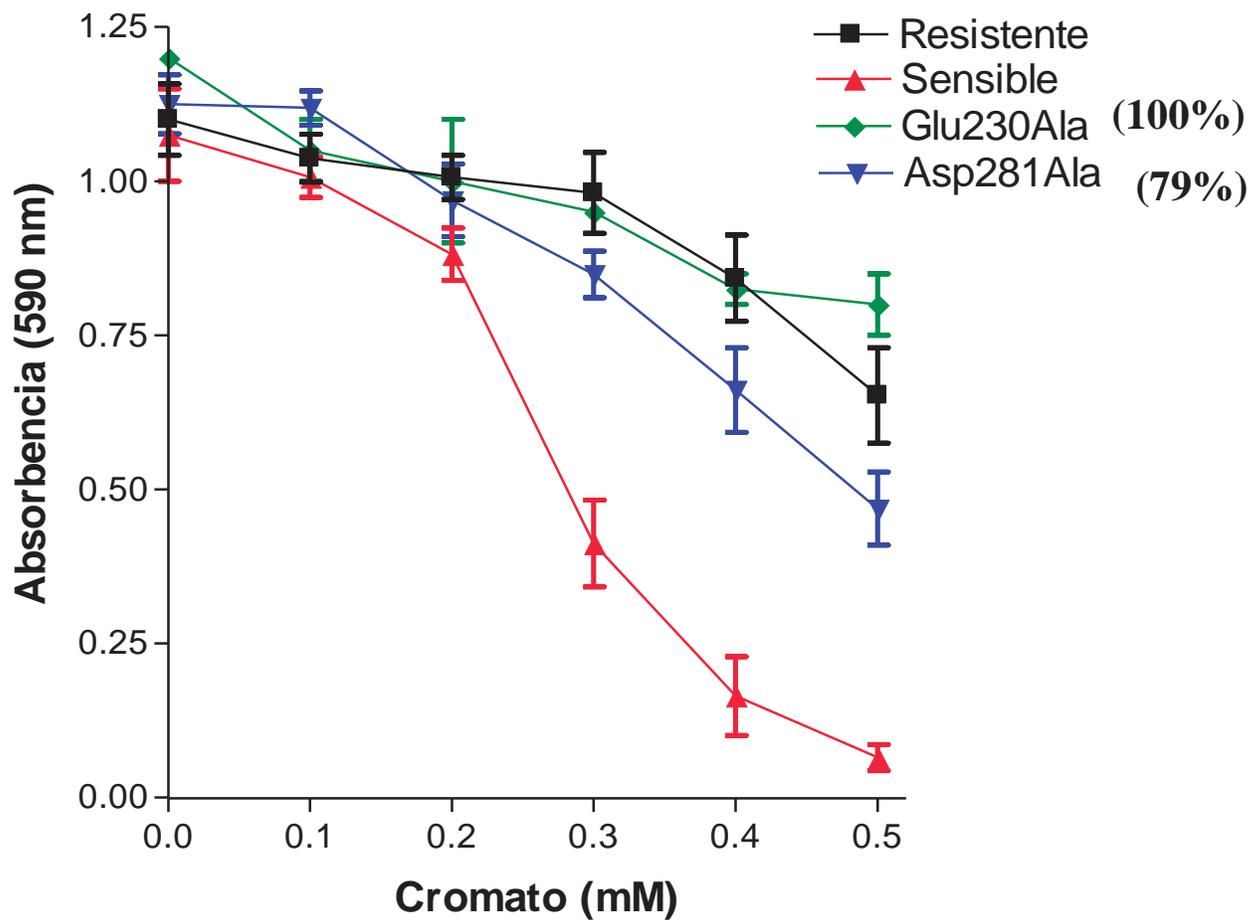


Figura 20. Efecto de la mutación Glu230Ala y Asp281Ala en la susceptibilidad a cromato. Las condiciones de crecimiento y los controles fueron los mismos indicados en

la figura 19. La cepa mutante empleada en este experimento fue PAO1 (pUChrA-E230A) y PAO1 (pUChrA-E281A). $\bar{X} \pm S$ de cuatro ensayos.

5.7 Dobles mutantes de residuos en segmentos transmembranales

Con la finalidad de obtener posibles mutantes supresoras, que recuperen la pérdida de la función de la proteína ChrA provocada por mutaciones de residuos esenciales cargados ubicados en STMs, se decidió realizar dobles mutantes afectadas en aminoácidos de carga opuesta.

Para la obtención de la cepa con la mutación E83A-K248L, se utilizó como DNA molde el gen *chrA* con la mutación K248L, la cual abatió por completo la resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA silvestre (Moreno, 2006). A este gen mutado se le introdujo el nuevo cambio E83A, que en este trabajo se encontró que provocaba de igual forma el abatimiento de la resistencia a cromato por ChrA (**Fig 21**). El nivel de resistencia alcanzado por la cepa con esta doble mutación fue muy similar al nivel de resistencia generado por las mutaciones individuales (**Fig. 21**). Estos resultados indican que estos dos residuos transmembranales de carga opuesta, Glu83 y Lys248, no interaccionan entre sí en la proteína silvestre.

Para tratar de recuperar la pérdida del funcionamiento generada por la mutación D162A en ChrA (Moreno 2006), se introdujo la mutación R154L, generando la doble mutante R154L-D162A. Las pruebas de susceptibilidad a cromato mostraron que en la doble mutante no se revirtió la pérdida de resistencia generada por las mutaciones R154L y D162A (**Fig. 22**). Este resultado permite concluir que los residuos R154L y D162A no forman una interacción electrostática en la proteína ChrA.

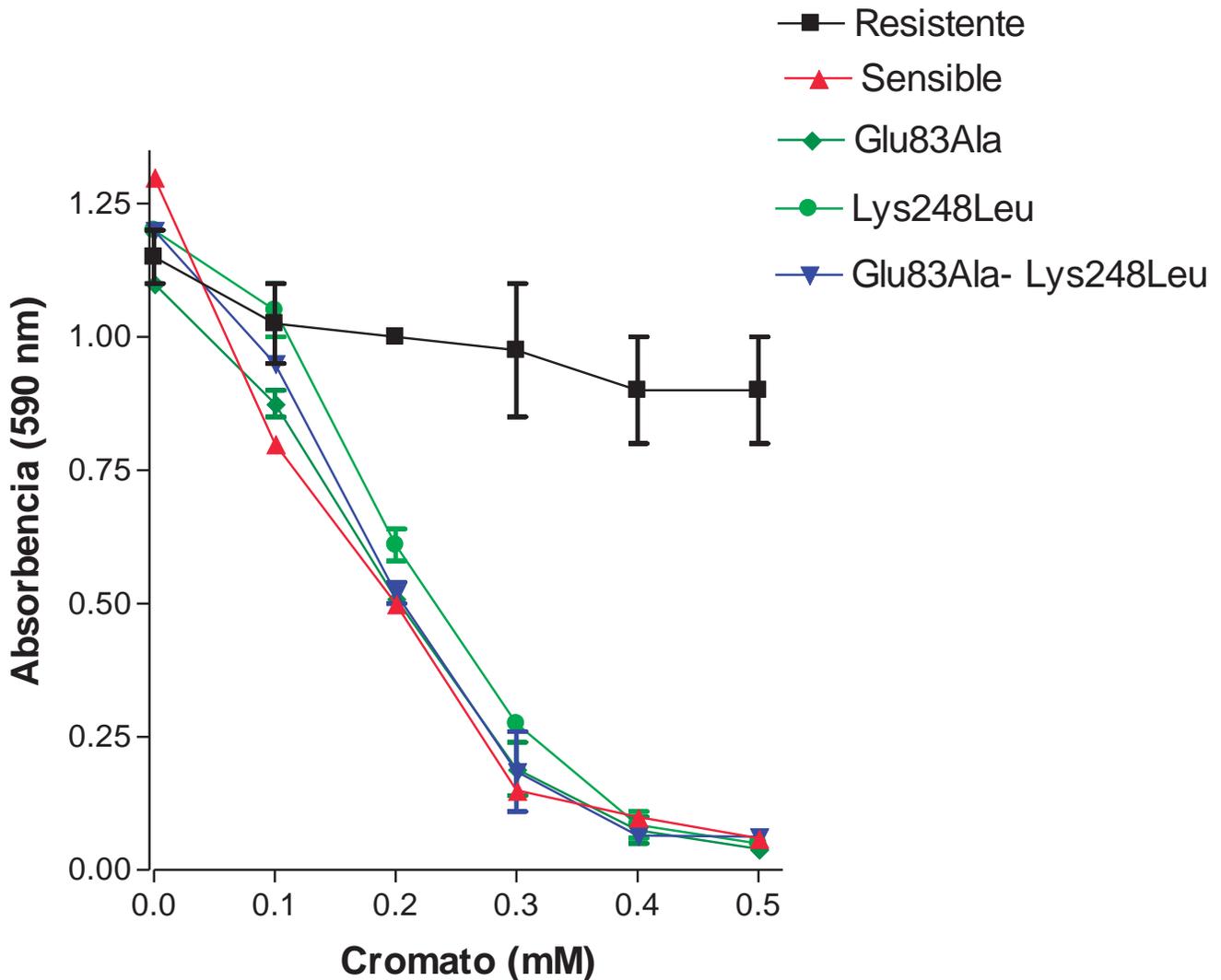


Figura 21. Efecto de la doble mutación Glu83Ala-Lys248Leu en la susceptibilidad a cromato. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas indicados en la figura 19. Además de los controles indicados en la figura 19 se incluyeron los controles PAO1 pUChrA-E83A (sensible), PAO1 pUChrA-K248L (sensible). La cepa empleada con la doble mutación fue PAO1 (pUChrA-E83A-K248L) $\bar{x} \pm S$ de cuatro ensayos.

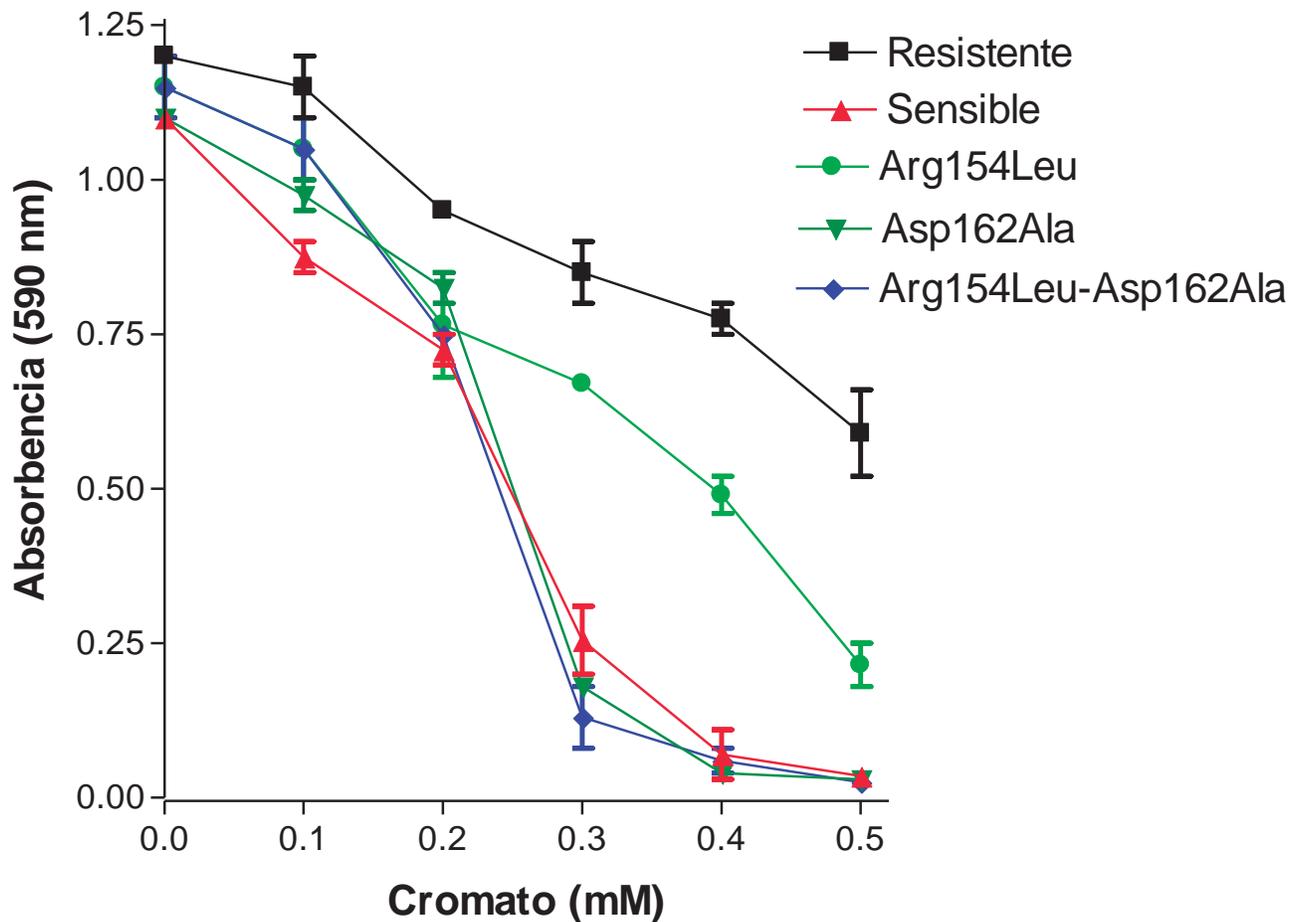


Figura 22. Efecto de la doble mutación Arg154Leu-Asp162Ala en la susceptibilidad a cromato. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas indicados en la figura 19. Además de los controles indicados en la figura 19 se incluyeron los controles PAO1 pUChrA-R154L (sensible), PAO1 pUChrA-D162A (sensible). La cepa empleada con la doble mutación fue PAO1 (pUChrA R154L-D162A) $\bar{x} \pm S$ de cuatro ensayos.

VIII. DISCUSIÓN

ChrA es una proteína de membrana que confiere resistencia a cromato en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, a través de la expulsión de este oxianión del citoplasma usando para ello la fuerza motriz de protones (Pimentel y col., en el 2002). La topología de la proteína ChrA en la membrana, consta de 416 aminoácidos distribuidos en 13 segmentos transmembranales (STMs), con el N-terminal localizado en el citoplasma y el C-terminal en el espacio periplásmico (Jiménez-Mejía y col., 2006).

La resistencia a cromato conferida por un homólogo de la proteína ChrA ha sido también demostrada en la bacteria *Cupriavidus metallidurans* (Nies y col., 1990). La familia de proteínas LCHR, que incluye homólogos no caracterizados de las proteínas ChrA de *Pseudomonas* y *Cupriavidus*, actualmente cuenta con 77 proteínas que forman parte de los tres dominios de los seres vivos (Archaea, Eubacteria y Eukaryota) (Cervantes y Campos-García, 2007).

Un análisis de mutagénesis al azar del gen *chrA* de *P. aeruginosa*, permitió aislar un grupo de mutantes sensibles a cromato; la secuenciación del DNA indicó que la mayoría de las mutaciones afectaron aminoácidos localizados en la mitad N-terminal de la proteína (Aguilera y col, 2004). Posteriormente, un análisis filogenético de homólogos de ChrA, reveló que las mitades N-terminal se encuentran más conservadas que las mitades C-terminal. Estos datos sugieren que las dos mitades de ChrA pueden tener funciones distintas para el transporte de cromato (Díaz-Pérez, 2006).

El reemplazo de algunos aminoácidos conservados por mutagénesis sitio dirigida en ChrA, ha permitido identificar un conjunto de ellos como esenciales para el funcionamiento de la proteína. De acuerdo a las características de estos aminoácidos

esenciales, y a lo reportado en otras proteínas de membrana, se ha propuesto que algunos residuos neutros tales como el Triptófano 63 y el grupo de aminoácidos Prolina 80, Glicina 81 y Prolina 82 son esenciales para mantener la correcta estructura de ChrA (Cortés, 2005; Díaz-Pérez, 2006). Por otro lado, se ha propuesto que algunos residuos básicos como la Arginina 154, Lisina 248 y Arginina 394, por su carga positiva, probablemente son esenciales para la función de la proteína ChrA, al interaccionar de manera directa con el oxianión cromato para llevar a cabo su expulsión del citoplasma (Moreno, 2006).

Con la finalidad de complementar el análisis de la participación de los residuos conservados en la proteína ChrA, iniciado con el estudio de los residuos neutros y básicos, en este trabajo se analizaron los aminoácidos ácidos conservados, para así identificar nuevos residuos que juegan un papel importante en la resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA.

Selección de residuos ácidos

Por analogía con otras proteínas de membrana, se puede anticipar que algunos aminoácidos con grupo R ácido presentes en STMs pueden ser esenciales para el transporte de cromato por ChrA, debido al costo energético que implica la presencia de un aminoácido cargado en el ambiente hidrofóbico de la membrana. Sin embargo, seguimos el mismo enfoque anteriormente utilizado para la selección de aminoácidos, que fue mutagenizar los aminoácidos más conservados, independientemente de su posición.

Al realizar un alineamiento con las 77 proteínas que forman parte de la familia LCHR, no se encontraron residuos ácidos con un alto porcentaje de conservación, como en el caso de los aminoácidos neutros antes identificados por Díaz-Pérez en el 2006. Por esta razón se realizó un alineamiento únicamente con las secuencias de las 24 proteínas que forman parte de las subfamilias LCHR donde se ubican las dos proteínas ChrA

funcionalmente caracterizadas (**Fig. 4**). Este alineamiento de las secuencias de las subfamilias LCHR2 y LCHR5, también fue realizado por Moreno en el 2006 para la identificación de residuos básicos conservados como blanco de mutagénesis, debido a la baja conservación de estos aminoácidos en todos los homólogos LCHR. La baja conservación de los residuos cargados (menos del 20%) en las siete subfamilias LCHR se puede explicar por el hecho de que es probable que no todas las proteínas de esta familia actúen como transportadores de cromato, presentando por lo tanto diferencias estructurales y funcionales que son reflejadas en diferencias en su estructura primaria. La superfamilia de transportadores mayores (MFS) incluye entre sus miembros a proteínas que transportan una amplia variedad de compuestos (azúcares, drogas, aminoácidos, nucleósidos, etc.), mostrándonos por lo tanto notables diferencias en sus secuencias, pero presentando como característica común un motivo muy conservado ubicado entre los STMs 2 y 3 de sus estructuras proteicas (Saier y col., 1999).

De los 416 aminoácidos que constituyen a la proteína ChrA, 25 son aminoácidos de carácter ácido; nueve de ellos fueron seleccionados para su análisis por mutagénesis debido a que presentan una conservación igual o mayor al 50% en homólogos de ChrA (**Tabla 2**). Como criterio de conservación se tomaron en cuenta únicamente cambios en los residuos ácidos (Asp por Glu y viceversa), sin considerar cambios por sus correspondientes amidas (Asparagina, Glutamina). También se incluyó para el análisis de mutagénesis el residuo Glu86, que aunque presenta una muy baja conservación (8%) si se toman en cuenta únicamente los residuos ácidos como criterio de conservación, cuando se incluye la Glutamina, su porcentaje de conservación se eleva hasta un 95% (**Tabla 2**). Además, este residuo se ubica en el STM II de ChrA, donde se han identificado otros residuos esenciales para el funcionamiento de la proteína (**Fig. 17**).

Las sustituciones realizadas sobre los residuos ácidos fueron por Alanina (Ala) (**Fig. 13**), con la finalidad de eliminar la posibilidad de una interacción electrostática o de enlace de hidrógeno por parte de su grupo R, y tratando de no hacer un cambio drástico del volumen del residuo con esta sustitución. Con el cambio por Ala se pretendió evaluar la importancia de los residuos ácidos conservados en el funcionamiento de ChrA.

Residuos ubicados en asas hidrofílicas de ChrA

Los aminoácidos Glu56, Asp59 y Glu60 son residuos ubicados en el asa periplásmica 1 de ChrA (P1) (**Fig. 17**). Estos residuos presentan una conservación del 66, 95 y 54%, respectivamente, en las secuencias homólogas de ChrA. En las pruebas de susceptibilidad a cromato la mutante Glu56Ala presentó un nivel de resistencia drásticamente afectado (**Fig. 18**), indicando que el Glu56 es esencial para el funcionamiento de ChrA. La mutante Asp59Ala presentó un nivel de resistencia notablemente afectado (**Fig. 18**), aunque no al grado de la mutante Glu56Ala. Esto nos permitió concluir que el residuo Asp59 es importante para que la proteína ChrA confiera resistencia a cromato. La mutante Glu60Ala fue la única mutante de esta asa periplásmica que sólo se vio ligeramente afectada en su nivel de resistencia a cromato (**Fig. 18**), indicando que el residuo Glu60 no es importante para el funcionamiento de la proteína.

El haber identificado dos residuos ácidos requeridos para el funcionamiento de ChrA en el asa P1, como son el Glu56 y el Asp59, refuerza la importancia del papel que esta asa desempeña para que ChrA funcione adecuadamente. La primera propuesta de que el asa P1 tiene una participación importante en la proteína, fue realizada por Díaz-Pérez en el 2006, al identificar al Trp63 como un residuo esencial para ChrA. Díaz-Pérez propuso que es probable que esta larga asa periplásmica participa en los cambios conformacionales que provocan el cierre y apertura del canal del transporte de cromato. Esto se ha visto que

ocurre en distintos canales iónicos en donde estructuras extramembranales intervienen en los procesos de activación e inactivación de estos transportadores (Guo y col., 1995; Benzanilla, 2000). El Trp63 es probablemente uno de los residuos responsables de estos cambios conformacionales en el asa P1 de la proteína ChrA. En los quimiorreceptores Tar de *E. coli* y *S. typhimurium*, se ha observado que el grupo R del Trp, cercano a la interfase membrana-agua, interviene en la actividad y sensibilidad del receptor, controlando la transición a los estados activo/inactivo (Miller y Falke, 2004; Draheim y col., 2005).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que probablemente otros residuos involucrados en los cambios conformacionales del asa P1 para que el canal de transporte de cromato sea funcional, son Glu56 y Asp59. Existen varios ejemplos en donde el Trp y los aminoácidos cargados, positiva o negativamente establecen interacciones, que permiten la activación de proteínas transportadoras (Chen y col., 2001; Okada y col., 2001; Blanchet y col., 2007).

Para reforzar la propuesta de que el asa P1 puede sufrir cambios conformacionales, e identificar con qué residuos es probable que interaccionen Glu56 y Asp59, se construyó un modelo de la estructura tridimensional de esta asa. El modelo se hizo por similitud en secuencia con un asa la proteína Crambina de *Crambe hispanica* (Ahn y col., 2006). La estructura del asa presenta regiones que adoptan una estructura secundaria de hélice α y regiones de estructura irregular, lo que permite que el asa tenga una cierta flexibilidad y por lo tanto que pueda presentar cambios conformacionales (**Fig. 23**). En la estructura del asa se advierten los residuos ácidos Glu56 y Asp59, con sus respectivas probables parejas de residuos básicos Arg54 y Lys 67, respectivamente. Al encontrarse a una distancia menor a 3 Å, probablemente se generan entre ellos interacciones electrostáticas, o enlaces de

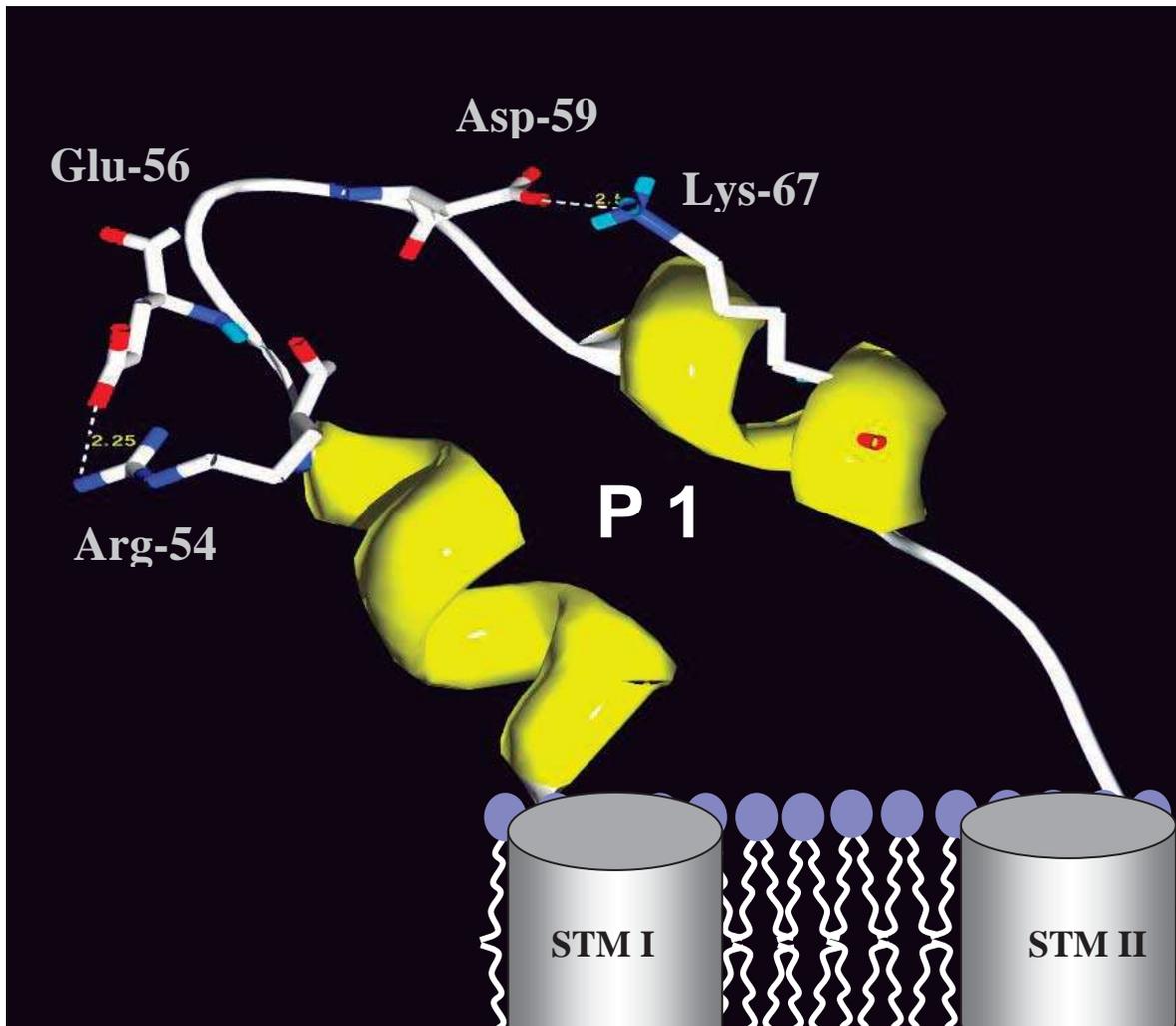


Figura 23. Modelo de la estructura tridimensional del asa periplásmica 1 (P1) de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Se muestra la probable estructura que puede adoptar el asa P1, que une los STMs I y II de ChrA. El modelaje fue realizado en el programa Swiss-PDB Viewer (<http://www.expasy.ch/spdv/>) en base a la estructura tridimensional de un asa de la proteína Crambina de *Crambe hispanica* (Ahn y col., 2006). En amarillo se encuentran las regiones del asa que adoptan una estructura de hélice α y en blanco las que adoptan una estructura irregular. Se muestran los residuos Glu56 y Arg154, así como Asp59 y Lys67, y las distancias (Å) entre sus grupos R.

hidrógeno, que permiten el reacomodo del asa que promueve el cierre o la apertura del canal de transporte de cromato.

Por otra parte, la mutante por Ala del residuo Glu230, ubicado en el asa periplásmica 4 de ChrA (**Fig. 17**) y con una conservación del 50%, presentó un nivel de resistencia a cromato similar al control resistente (**Fig. 20**), mientras que la mutante del residuo Asp281, localizado en la interfase del asa citoplásmica 4 con el STM IX de la proteína (**Fig. 17**), presentó un nivel de resistencia sólo ligeramente afectado (**Fig. 20**). Estos resultados permitieron concluir que los residuos Glu230 y Asp281, ambos presentes en regiones hidrofílicas, no son importantes para el funcionamiento de la proteína ChrA.

Residuos ubicados en segmentos transmembranales de ChrA

Los residuos Glu83 y Glu86 con una conservación del 62 y 95%, respectivamente, se ubican en el STM II de ChrA (**Fig. 17**). Las mutantes de ambos residuos presentaron un nivel de resistencia a cromato similar al control sensible (**Fig. 19**), indicando que Glu83 y Glu86 son esenciales para el funcionamiento de la proteína. De la misma manera, el residuo Asp162, localizado en la interfase del asa citoplásmica 2 con el STM V de la proteína (**Fig. 17**), al mutarlo por Ala presentó un nivel de resistencia drásticamente afectado (**Fig. 19**), indicando que este residuo ácido también es esencial para el funcionamiento de ChrA.

La posible participación de los residuos Glu83, Glu86 y Asp162 puede ser ayudando a mantener la correcta estructura terciaria de la proteína, probablemente al establecer interacciones de los grupos R con residuos de otros STMs. Es probable que el residuo Glu86 establezca un enlace de hidrógeno con otro residuo transmembranal, debido a que en homólogos de ChrA Glu86 se encuentra sustituido principalmente por Glutamina (87%), que al igual que el Glutamato puede actuar como aceptor de un enlace de hidrógeno. Por otra parte, es muy probable que los grupos R de Glu86 y Asp162

establezcan interacciones electrostáticas de largo alcance con otros residuos transmembranales cargados positivamente, como Lys y Arg, debido a que presentan una conservación de su carga negativa mayor del 50% en homólogos de ChrA.

Otra posibilidad de la importancia de las cargas negativas del Glu83 y Asp162 en la función de ChrA, puede ser uniendo protones. La proteína ChrA podría funcionar entonces como un transportador de cromato y de protones, de igual forma que funcionan otros transportadores, como por ejemplo la proteína LacY de *E. coli*, que cotransporta β -galactósidos y protones en una proporción 1:1 (West y Mitchell, 1972).

No se puede descartar que lo importante del Glu83 sea su volumen y no su carga negativa, debido a que en el 38% de los ejemplos en que no se conserva por residuos ácidos en homólogos de ChrA, se sustituye por residuos neutros como, Leucina y Metionina, que se asemejan en volumen al Glutamato. Asimismo, es posible que lo importante del Asp162 sea la presencia de una carga, negativa o positiva, debido a que se conserva un 79% por residuos ácidos y en el 29% restante se sustituye por residuos básicos (Arg y Lys).

Dobles mutantes de la proteína ChrA

Previo a la identificación de los residuos esenciales para ChrA Glu83 y Asp162, Moreno (2006) identificó los residuos esenciales Arg154 y Lys248, también ubicados en STMs (**Fig. 24**). Con la finalidad de identificar posibles interacciones electrostáticas entre estos residuos cargados, se obtuvieron dobles mutantes de residuos de carga opuesta. Los criterios que se tomaron en cuenta para la formación de las dobles mutantes fueron que los residuos transmembranales cargados estuvieran conservados en homólogos de ChrA, y que al ser mutados mostraran ser esenciales para el funcionamiento de la proteína. Un enfoque similar se hizo en el transportador vesicular de monoamina (VMAT2) de rata, donde se

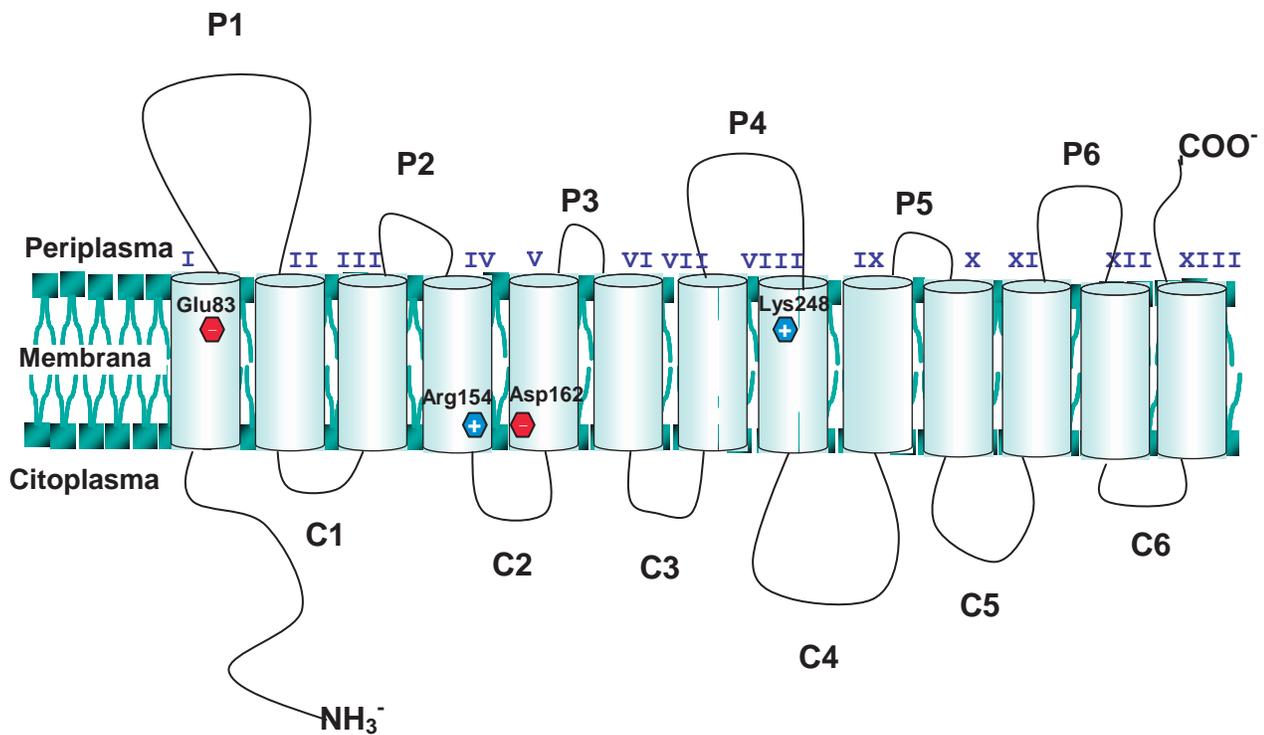


Figura 24. Residuos cargados esenciales en segmentos transmembranales de la proteína ChrA. Se indican los residuos ácidos Glu83 y Asp162, identificados como esenciales para el funcionamiento de ChrA en este trabajo, y los residuos básicos Arg154 y Lys 248 identificados por Moreno (2006).

logró identificar una interacción electrostática entre un par de residuos transmembranales cargados (Merickel y col., 1997). También se tomó como criterio adicional que los aminoácidos de carga opuesta, posibles formadores de interacciones electrostáticas, se encontraran aproximadamente a la misma altura en los STMs correspondientes, de acuerdo al modelo topológico de la proteína (**Fig. 24**), debido a que es más probable la cercanía de estos aminoácidos en la estructura terciaria de la proteína.

Las dobles mutantes obtenidas fueron Glu83Ala-Lys248Leu y Arg154Leu-Asp162Ala. En las dobles mutantes ambos residuos cargados, posibles formadores de una interacción electrostática, se encuentran mutados por los aminoácidos neutros Alanina y Leucina. Esto se hizo con el objetivo de tratar de recuperar, al menos parcialmente, la pérdida del funcionamiento de la proteína, provocada por las mutaciones individuales de los residuos cargados. Debido a que el reemplazo individual de los residuos cargados, formadores de una interacción electrostática, por residuos neutros crea una carga desapareada que causa un defecto funcional, se ha propuesto que el efecto es menos drástico con la sustitución de ambos residuos cargados por residuos neutros (Sahin-Tóth y col., 1992). Este abordaje para la identificación de interacciones electrostáticas entre residuos cargados en STMs se ha realizado exitosamente en diversas proteínas de membrana; por ejemplo, en LacY de *E. coli* donde mediante un análisis por mutagénesis se propuso la interacción de los residuos cargados Asp240-Lys319 (Sahin-Tóth y col., 1992). Más tarde esta interacción fue corroborada cuando se cristalizó la proteína (Abramson y col., 2003).

La doble mutante de ChrA Glu83Ala-Lys248Leu presentó un nivel de resistencia similar al control sensible y a las mutantes individuales de estos residuos cargados, Glu83Ala y Lys248Leu (**Fig. 20**), mostrando que no se reestableció el funcionamiento de

la proteína que se perdió por las mutaciones individuales. Este resultado indica por lo tanto que los residuos Glu83 y Lys248 no forman parte de una interacción electrostática en la estructura terciaria de la proteína ChrA. La doble mutante Asp162Ala-Arg154Leu mostró un nivel de resistencia similar al control sensible y a la mutante Asp162Ala (**Fig. 21**), lo que permitió concluir que los residuos Arg154 y Asp162 tampoco forman una interacción electrostática en la estructura terciaria de ChrA. El haber obtenido un resultado que sugiere que las parejas Glu83-Lys248 y Asp162-Arg154 no forman interacciones electrostáticas, no descarta la posibilidad de que estos residuos ácidos establezcan este tipo de interacciones con otros residuos transmembranales.

Una estrategia muy útil para la identificación de interacciones electrostáticas, y que puede ser usada en ChrA para la identificación de interacciones entre residuos cargados, es la obtención de mutantes segundo sitio supresoras. En este enfoque, un residuo cargado es sustituido por mutagénesis dirigida por un residuo neutro, resultando en una proteína con muy poca actividad. Entonces se obtienen mutantes al azar que restauran la actividad y que permiten suponer la existencia de una interacción entre el residuo sustituido por mutagénesis y el residuo mutado en un segundo sitio que restaura la actividad. Esta poderosa herramienta ha servido para la dilucidación de interacciones electrostáticas en una gran variedad de proteínas de membrana, revelando información acerca de su estructura terciaria (Arastu-Kapur y col., 2005). Un ejemplo de ello es la interacción propuesta entre Glu126 (STM IV) y Arg144 (STM V) de la permeasa LacY de *E. coli* a partir de la obtención de mutantes supresoras (Johnson y Brooker, 2003).

IX. CONCLUSIÓN

Los residuos ácidos conservados Glu56 del asa P1 y los residuos transmembranales Glu83, Glu86 y Asp162 son esenciales para el funcionamiento de ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*, probablemente participando en generar una estructura correcta de la proteína relacionada con su función como un transportador de cromato.

X. PERSPECTIVAS

La mutagénesis de los residuos ácidos esenciales Glu56, Glu83, Glu86 y Asp162 por cambios conservativos (Glu/Asp y viceversa, residuos básicos Arg/Lys, o sus correspondientes amidas Gln/Asn) pueden ayudar a dilucidar las posibles interacciones que establecen estos residuos y que son esenciales en el funcionamiento de la proteína ChrA.

Es importante detectar y cuantificar las proteínas mutantes afectadas en estos residuos ácidos, para descartar que el fenotipo observado en las pruebas de susceptibilidad a cromato se deba a que las proteínas mutantes se degradan o no se ensamblan en la membrana.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verter, H. R. Ronald y S. Iwata (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301: 610-615.

Aguilar, M. E. (2005). Análisis de la función de residuos esenciales de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría. IIQB-UMSNH.

Aguilera, S., M. E. Aguilar, M. P. Chávez, J. E. López-Meza, M. Pedraza-Reyes, J. Campos-García y C. Cervantes (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 107-112.

Ahn, H. C., N. Juranic, S. Macura y J. L. Markley. Three-dimensional structure of the water-insoluble protein crambin in dodecylphosphocholine micelles and its minimal solvent-exposed surface. [J Am. Chem. Soc.](#) 128:4398-4404.

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: 7398-7400.

Arastu-Kapur, S., C. S. Arendt, T. Purnat, N. S. Carter y B. Ullman (2004). Second-site suppression of a nonfunctional mutation within the *Leishmania donovani* inosine-guanosine transporter. *J Biol. Chem.* 280:2213-2219.

Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80:555-592.

Birnboim, H. C. y J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Blanchet, J., S. Pilote y M. Chahine (2007). Acidic residues on the voltage-sensor domain determine the activation of the NaChBac sodium channel. *Biophys. J.* 92:3513-3523.

Bridgewater, LC., F. C. Manning, E.S. Woo, y S. R. Patierno (1994). DNA polymerase arrest by aducted trivalent chromium. *Mol. Carcinog.* 9:122-133.

Cervantes, C. y J. Campos-García (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. En: *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Nies D. H. y S. Silver (Eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp. 407-419.

Cervantes, C., J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzmán y R. Moreno-Sánchez (2001). Interactions of chromium with microorganism and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 335-347.

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: 287-291.

Chen, N., R. A. Vaughan y M. E. Reith. (2001) The role of conserved tryptophan and acidic residues in the human dopamine transporter as characterized by site-directed mutagenesis. *J. Neurochem.* 77:1116-1127.

Cortés, V. R. (2005). Análisis de las prolinas del segmento transmembranal II de la proteína ChrA. Tesis de licenciatura. Facultad de QFB. UMSNH.

De Flora, S. y K. E. Wetterhahn (1989). Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* 7:169-244.

Díaz-Pérez, C. (2006). Filogenia y evaluación de aminoácidos conservados en la función de la proteína transportadora de cromato ChrA. Tesis de Maestría. IIQB-UMSNH.

Draheim, R. R., A. F. Bormans, R. Z. Lai y M. D. Manson (2005). Tryptophan residues flanking the second transmembrane helix (TM2) set the signaling state of the Tar chemoreceptor. *Biochemistry* 44:1268-1277.

Fisher, C. L. y G. K. Pei (1997). Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques* 23: 570-571, 574.

Haeming, H. A. y R. J. Brooker. Importance of conserved acidic residues in MntH, the Nramp homolog of *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* 201:97-107.

Holloway, B. W. (1969). Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol. Rev.* 33: 419-443.

Honig, B. H. y W. L. Hubbell (1984). Stability of salt bridges in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:5412-5416.

Hu, X. U. y D. M. Lovinger (2005). Role of aspartate 298 in mouse 5-HT_{3A} receptor gating and modulation by extracellular Ca²⁺. *J. Physiol.* 568: 381-396.

Ish-Horowicz, D. y J. F. Burke (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.

Javadpour, M. M., M. Eilers, M. Groesbeek y S. O. Smith (1999). Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys. J.* 77:1609-1618.

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

Johnson, J. L. y **R. J. Brooker** (2003). Role of glutamate-126 and arginine-144 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42:1095-10100.

Kadiiska, M. B., Q. H. Xiang y **R. P. Mason** (1994). In vivo free radical generation by chromium(VI): an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Chem. Res. Toxicol.* 7: 800-805.

Katz, S. A. y **H. Salem** (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation. *J. Appl. Toxicol.* 13: 217-224.

Kortenkamp, A., P. O. Brien y **D. Beyersmann**, (1991). The reduction of chromate is prerequisite of chromium binding to the cell nuclei. *Carcinogenesis* 12:1143-1144.

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

Luo, H., Y. Lu, X. Shi, Y. Mao y **N. S. Dalal**. (1996). Chromium (IV)-mediated Fenton-like reaction causes DNA damage: implication to genotoxicity of chromate. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26:185-191.

Matthews, C. K. y **K. E. Van Holde** (2002). *Bioquímica* McGrawHill/Interamericana. pp. 149-150.

Meindl-Beinker, N. M., C. Lundin, I. Nilsson, S. H. White y **G. von Heijne** (2006). Asn- and Asp-mediated interactions between transmembrane helices during translocon-mediated membrane protein assembly. *EMBO Rep.* 7:1111-1116.

Merickel, A., H. R. Kaback y **R. H. Edwards** (1997). Charged residues in transmembrane domains II and XI of a vesicular monoamine transporter form a charge pair that promotes high affinity substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 272: 5403-5408.

Miller, A. S. y **J. J. Falke** (2004). Side chains at the membrane-water interface modulate the signaling state of a transmembrane receptor. *Biochemistry* 43:1763-1770.

Miller, M. J., M. Oldenburg y **R. H. Fillingame** (1990). The essential carboxyl group in subunit c of the F1F0 ATP synthase can be moved and H(+)-translocating function retained. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990 87:4900-4904.

Moreno, M. G. (2006). Importancia de residuos básicos de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría. IIQB-UMSNH.

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: 5799-5802.

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: 5648-5653.

Okada, A., T. Miura y H. Takeuchi (2001). Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza A virus. *Biochemistry* 40:6053-6060.

Othomer, K., H. F. Mark, D. F. Othomer, C. G. Overberger y G. I. Seaborg (1998). Enciclopedia temática de química Limusa (Ed). pp 130-133

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: 249-254.

Ridder, A.N., S. Morein, J. G. Stam, A. Kuhn, B. Kruijff y J. A. Killian (2000). Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. *Biochemistry* 39:6521-6528.

Saier, M. H., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jähn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng y P. S. Virk (1999). The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:257-279.

Sahin-Tóth, M., R. L. Dunten, A. Gonzalez y H. R. Kaback (1992). Functional interactions between putative intramembrane charged residues in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 89:10547-10551.

Terakita, A., T. Yamashita y Y. Shichida (2000). Highly conserved glutamic acid in the extracellular IV-V loop in rhodopsins acts as the counterion in retinochrome, a member of the rhodopsin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14263-14267.

Von Heijne, G. (1991). Proline kinks in transmembrane alpha-helices. *J. Mol. Biol.* 218: 499-503.

West, I. C. y P. Mitchell (1972). Proton-coupled beta-galactoside translocation in non-metabolizing *Escherichia coli*. *J. Bioenerg.* 3: 445-462.

West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample y L. J. Runyen-Janecky (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148: 81-86.

White, S. H. y W. C. Wimley (1998). Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376: 339-352.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

