

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**Papel de aminoácidos con grupo R ácido
en el funcionamiento de la proteína ChrA
de *Pseudomonas aeruginosa***

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

Maurino Luna Luna

Asesor: D.C. Carlos Cervantes Vega

Morelia, Mich., Mayo 2008

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORIA DEL D.C CARLOS CERVANTES VEGA

PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA COORDINACIÓN CIENTIFICA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y DEL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COECYT)

DEDICATORIA:

A mis Padres: Maurino y Teresa por darme lo más valioso que existe; la vida.

A mis Hermanos: Luís Manuel, Tomas, Antonio, Cristóbal, Joaquín, Cristina, Teresa y Adriana por todo el apoyo que me han brindado durante mi carrera.

A mis Sobrinos: Roberto y Cruz por ser la alegría de nuestro hogar.

A Paula, por ser la persona que me alienta a seguir adelante y por toda la confianza que ha puesto en mí.

A mis compañeros: Ricarda, Esther, Amada, Yhoana por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A Rene, por la amistad que siempre me ha brindado.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Carlos Cervantes Vega, por ser ejemplo de responsabilidad, entrega y dedicación.

A la M.C. Eréndira, por la paciencia mostrada hacia mí durante el desarrollo de mi servicio social y el presente trabajo.

A Ricarda, por su aportación en la realización del presente trabajo y ser mi maestra.

A mis sinodales: Dr. Rosalio Mercado Carmargo, Dra Consuelo De Jesús Cortés Penagos y la Dra. Martha I. Ramírez Díaz, por su apoyo en la revisión de este trabajo.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Cromo	1
a). Propiedades químicas	1
b). Transporte y acumulación	1
c). Toxicidad	3
2. Resistencia bacteriana a cromato	3
a). Características del gen <i>chrA</i> del plásmido pUM505	5
b). Características de la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	5
3. Superfamilia CHR de transportadores	6
4. Mutagénesis dirigida	9
5. Aminoácidos con grupo R ácido	11
a). Propiedades de los aminoácidos con grupo R ácido	11
b). Participación de los aminoácidos en proteínas de membrana	11
II. ANTECEDENTES	13
III. HIPOTESIS	19
IV. OBJETIVO GENERAL	19
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
VI. MATERIALES Y METODOS	20
1. Reactivos y medios de cultivo	20
2. Cepas empleadas	20
3. Plásmidos empleados	20
4. Aislamiento de DNA plasmídico	21

a).	Por lisis alcalina-----	21
b).	Por columna-----	24
5.	Electroforesis en geles de agarosa-----	25
6.	Aislamiento del DNA de geles de agarosa-----	25
7.	Tratamientos enzimáticos del DNA-----	26
a).	Restricción con endonucleasas-----	26
b).	Ligaciones-----	26
8.	Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación-----	26
a).	Preparación de células competentes-----	26
b).	Transformación-----	27
9.	Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico-----	27
a).	Preparación de células competentes-----	27
b).	Transformación-----	28
10.	Electroporación de <i>P. aeruginosa</i> sembrada en placa-----	28
11.	Mutagénesis dirigida-----	29
a).	Diseño de oligonucleótidos mutagénicos-----	29
b).	Síntesis de la cadena mutada-----	30
c).	Digestión con <i>DpnI</i> -----	31
d).	Transformación-----	31
e).	Secuenciación-----	31
f).	Análisis de secuencias-----	31
12.	Pruebas de susceptibilidad a cromato-----	32
VII.	RESULTADOS-----	33

1. Identificación y selección de los residuos a mutar-----	33
2. Selección del cambio para evaluar la participación de los residuos-----	33
3. Obtención y caracterización de las mutantes-----	33
4. Subclonación de los genes mutados-----	38
5. Pruebas de susceptibilidad a cromato-----	40
VIII. DISCUSIÓN-----	44
Conclusión y Perspectivas-----	49
IX. BIBLIOGRAFÍA-----	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte y acumulación del cromo en la célula bacteriana-----	2
Figura 2. Mecanismos de toxicidad del cromo en bacterias-----	4
Figura 3. Sistema de expulsión de cromato de <i>P. aeruginosa</i> -----	7
Figura 4. Topología de la proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	8
Figura 5. Árbol filogenético de la familia LCHR-----	10
Figura 6. Puente salino formado en el interior de hélices transmembranales de la permeasa LacY de <i>E. coli</i> -----	14
Figura 7. Papel del residuo Asp-298 en el receptor 5HT _{3A} de ratón-----	15
Figura 8. Localización de residuos esenciales en el modelo topológico de la proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	17
Figura 9. Plásmido pGEMT-ChrAHis-----	22
Figura 10. Plásmido pUCP20-----	23
Figura 11. Aminoácidos seleccionados para la mutagénesis de la proteína ChrA-----	34
Figura 12. Cambio utilizado para la evaluación de los residuos ácidos transmembranales seleccionados-----	35
Figura 13. Análisis de restricción del plásmido pGEMT-ChrAHis-D346A-----	37
Figura 14. Verificación de la mutación en el gen <i>chrA</i> -----	39
Figura 15. Análisis de restricción de los plásmidos pUChrA-mutación-----	41
Figura 16. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes-----	42
Figura 17. Modelo helicoidal del segmento transmembranal XI-----	48
Figura 18. Modelo hipotético del arreglo de la proteína ChrA en la membrana--	50

RESUMEN

ChrA es una proteína de membrana que confiere resistencia al oxianión cromato en *Pseudomonas aeruginosa*, a través de la expulsión de cromato al exterior celular. ChrA consta de 13 segmentos transmembranales (STMs) unidos por seis asas citoplásmicas y seis asas periplásmicas. Esta proteína pertenece a la superfamilia de transportadores CHR la cual consta de proteínas de cadena larga (LCHR) y proteínas de cadena corta (SCHR). Utilizando mutagénesis sitio dirigida se han identificado algunos residuos neutros y básicos esenciales para el funcionamiento de ChrA, a los cuales se les asignó un papel estructural o funcional. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de los residuos ácidos transmembranales Asp346 y 362, ubicados en el STM XI, en la resistencia a cromato conferido por la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Utilizando mutagénesis sitio dirigida se cambiaron los residuos ácidos por el aminoácido neutro alanina. Se obtuvieron las mutantes Asp346Ala y Asp362Ala, a las cuales se les evaluó el nivel de resistencia con respecto a la proteína silvestre en pruebas de susceptibilidad a cromato en caldo nutritivo a 37°C. Las mutantes Asp346Ala y Asp362Ala afectaron drásticamente el nivel de resistencia a cromato, comportándose de manera similar al control sensible. Esto llevó a concluir que los residuos Asp346 y 362 son esenciales en el funcionamiento de la proteína ChrA, probablemente ayudando en mantener su correcta estructura.

I.- INTRODUCCION

1.- CROMO

a) Propiedades químicas

El cromo es un metal de transición del grupo VI-B de la tabla periódica con un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.966. Tiene varios estados de oxidación, pero las formas más estables y comunes son trivalente Cr(III) y hexavalente Cr(VI), ambas con propiedades químicas muy diferentes (Alloway, 1990).

El Cr(VI) existe como anión y se considera la forma más toxica del cromo; usualmente se encuentra combinado con el oxígeno formando iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Al contrario, el Cr(III) se encuentra formando óxidos, hidróxidos o sulfatos. Los compuestos de Cr(VI) son altamente solubles, fuertes oxidantes y en presencia de materia orgánica son reducidos a Cr(III), sin embargo, altas concentraciones de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y así persistir como un contaminante (Cervantes y col., 2001).

b) Transporte y acumulación

El transporte activo del cromato a través de las membranas biológicas, usando la vía de transporte del sulfato, ha sido demostrada en una variedad de especies bacterianas (Cervantes y col., 2001). El cromato utiliza el sistema de captación de sulfato (**Figura 1**) debido a la similitud química que tiene con este anión (SO_4^{2-}), indispensable como fuente de azufre para la síntesis de proteínas. Ambos oxianiones son moléculas tetraédricas con radios atómicos y de hidratación semejantes (Pardee y col., 1966). El cromato es transportado al interior celular con gran facilidad, y se ha demostrado que es un inhibidor competitivo del transporte de sul-

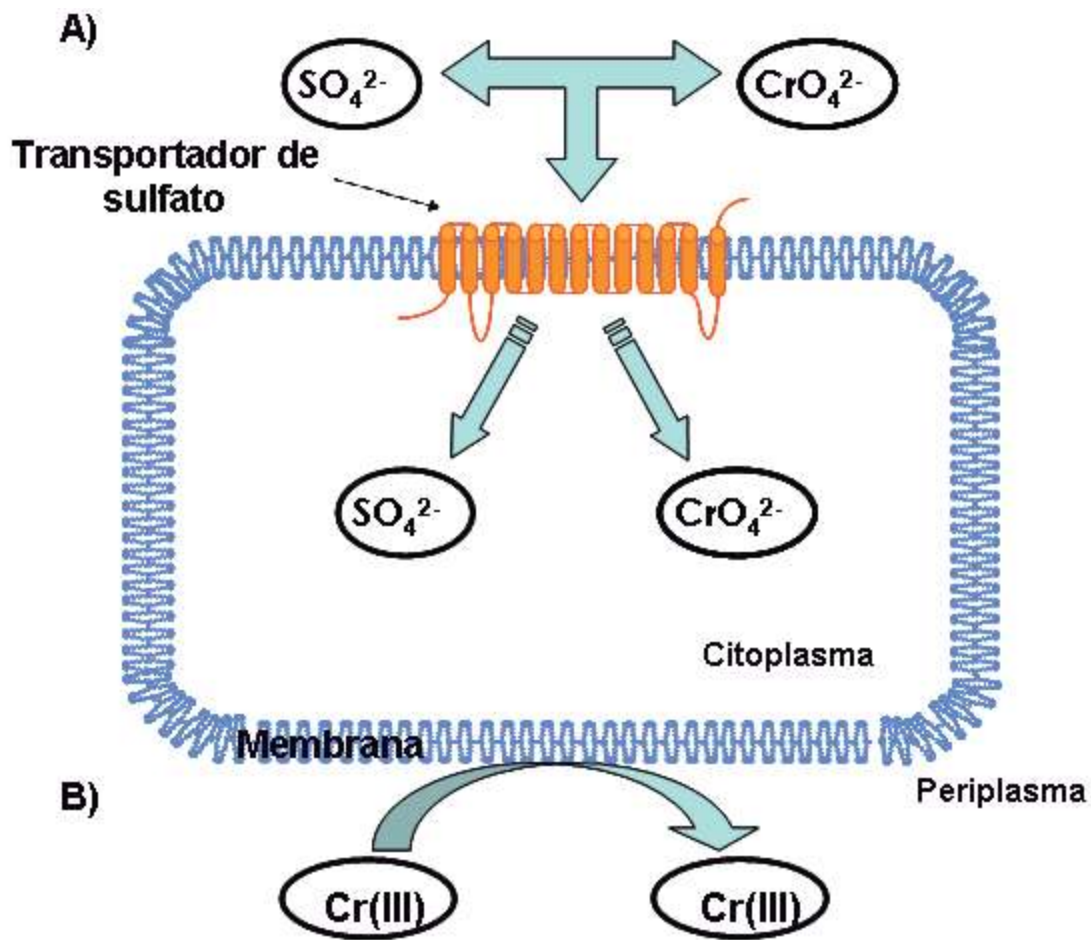


Figura 1. Transporte y acumulación del cromo en la célula bacteriana. A) El cromato (CrO_4^{2-}) puede ingresar a la célula a través de la vía de entrada de sulfato. B) El Cr(III) es incapaz de atravesar la membrana celular debido a su baja solubilidad en medios acuosos. Modificada de Pérez, 2001.

fato en bacterias (Karbanowska y col., 1977; Ohtake y col., 1987). Por otra parte, la mayoría de las células son impermeables al Cr(III) debido a que éste forma compuestos insolubles en soluciones acuosas no acídicas (**Figura 1**).

c) Toxicidad

Los efectos biológicos del Cr dependen de su estado de oxidación. El Cr(VI) es considerado la forma más tóxica del cromo (Cervantes y col., 2001). Una vez que ingresa a las células es reducido intracelularmente a especies reactivas como Cr(V) y Cr(IV) y a su forma estable Cr(III) (Snow, 1994) (**Figura 2**). La reducción de Cr(VI) a Cr(III) se ha reportado en muchos sistemas biológicos; la formación transitoria de Cr(V) es el mecanismo probablemente implicado en la toxicidad del Cr (Cervantes y col., 2001). La formación de Cr(V) es fundamental en el mecanismo implicado en el daño en el DNA (Sugden y col., 2002). La reducción de Cr(VI) a Cr(V) genera cantidades significativas de radicales libres, como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el anión superóxido O_2^- (**Figura 2**). Los radicales $\cdot\text{OH}$ pueden causar alteraciones al DNA, así como otros efectos tóxicos (Cervantes y col., 2001).

Por otra parte, el Cr(III) intracelular puede ser secuestrado por los grupos fosfato del DNA afectando la replicación, transcripción y causando mutagénesis. 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) (**Figura 2**).

2.- RESISTENCIA BACTERIANA A CROMATO

El uso excesivo de 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

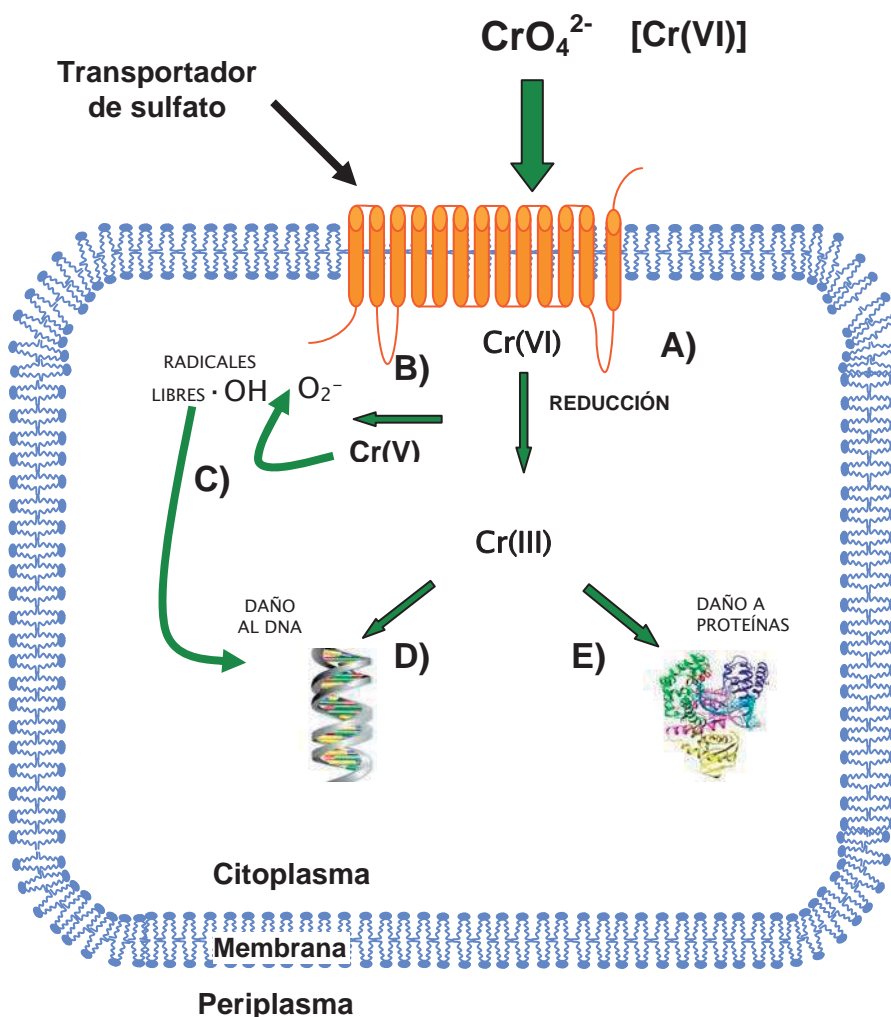


Figura 2. Mecanismos de toxicidad del cromo en bacterias. A) En el citoplasma el Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III). B) En este proceso puede ocurrir la formación de productos intermediarios como Cr(V) y radicales libres OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet -}$. C) Los radicales libres pueden oxidar el DNA. D) El Cr(III) también puede interactuar con el DNA, afectando la replicación y transcripción; E) El Cr puede además unirse con las proteínas alterando su estructura y actividad. Modificada de Aguilera, 2001.

variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato han sido reportados, incluyendo cepas de ambientes naturales y clínicos; en estos aislados la tolerancia a cromato está usualmente asociada con plásmidos (Cervantes y col., 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).

a) Características del gen *chrA* del plásmido pUM505

pUM505 es un plásmido conjugativo de 100 kilobases aislado de una cepa de *P. aeruginosa* de origen clínico; después de un análisis molecular, se encontró que la resistencia a cromato está dada por la presencia de un solo gen llamado *chrA*, el cual se expresa de manera constitutiva (Cervantes y col., 1990).

b) Características de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*

A partir de la secuencia de nucleótidos de *chrA* se determinó que codifica una proteína hidrofóbica de 416 aminoácidos llamada ChrA. En base a su composición de aminoácidos (63% de los cuales son hidrofóbicos) y a su perfil hidropático, la proteína ChrA se considera una proteína de membrana (Cervantes y col., 1992).

La tolerancia a cromato conferida por la proteína ChrA se asoció inicialmente con la acumulación reducida de cromato radioactivo, tanto en *P. aeruginosa* como en *C. metallidurans* y se hipotetizó que ChrA está involucrada en la expulsión del ión (Cervantes y col., 1990; Nies y col., 1990). 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 motriz de protones (Álvarez y col., 1999; Pimentel y col., 2002). (**Figura 3**).

Recientemente, por análisis de fusiones traduccionales con las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa, fue determinada la topología de membrana de ChrA de *P. aeruginosa*. De este trabajo se concluyó que ChrA consta de 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) (**Figura 4**).

Un alineamiento de las dos mitades de ChrA, cada una formada por seis STM, mostró significativa similitud de secuencias, aunque estas mitades 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 familia CHR de transportadores de cromato fue descrita por Nies y col. (1998) como un grupo pequeño de proteínas procariotes involucradas en el transporte de sulfato o cromato. En la actualidad, las bases de datos de las proteínas contienen varias docenas de homólogos, incluyendo proteínas de eucariotes. Además de las proteínas ChrA de *P. aeruginosa* y de *C. metallidurans* (Cervantes y Campos-García., 2007), recientemente en nuestro grupo de trabajo se caracterizó el homólogo del plásmido 1 de *Shewanella sp* ANA-3 (Aguilar, 2008). 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

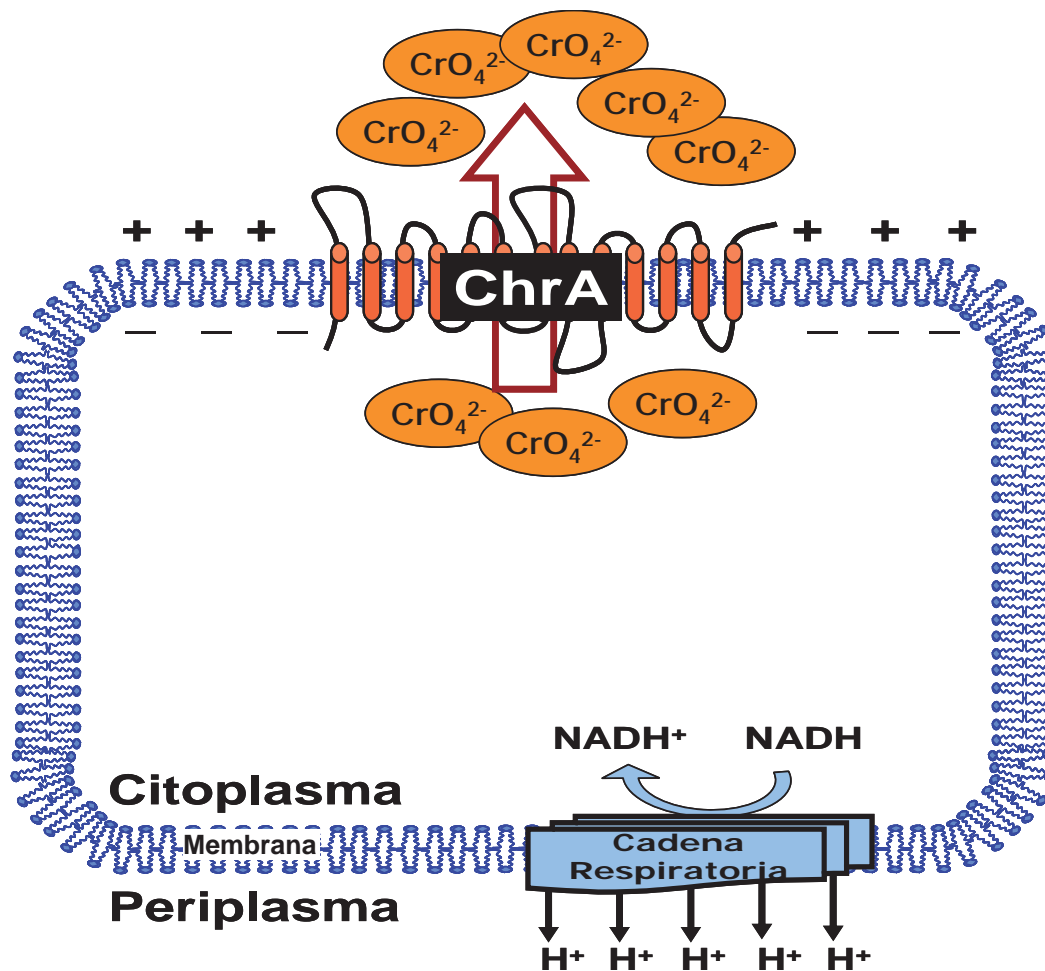


Figura 3. Sistema de expulsión de cromato de *P. aeruginosa*. La proteína membranal ChrA expulsa los iones cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma empleando el potencial de membrana generado durante el bombeo de protones de la cadena respiratoria. Adaptado de Pimentel y col., 2002

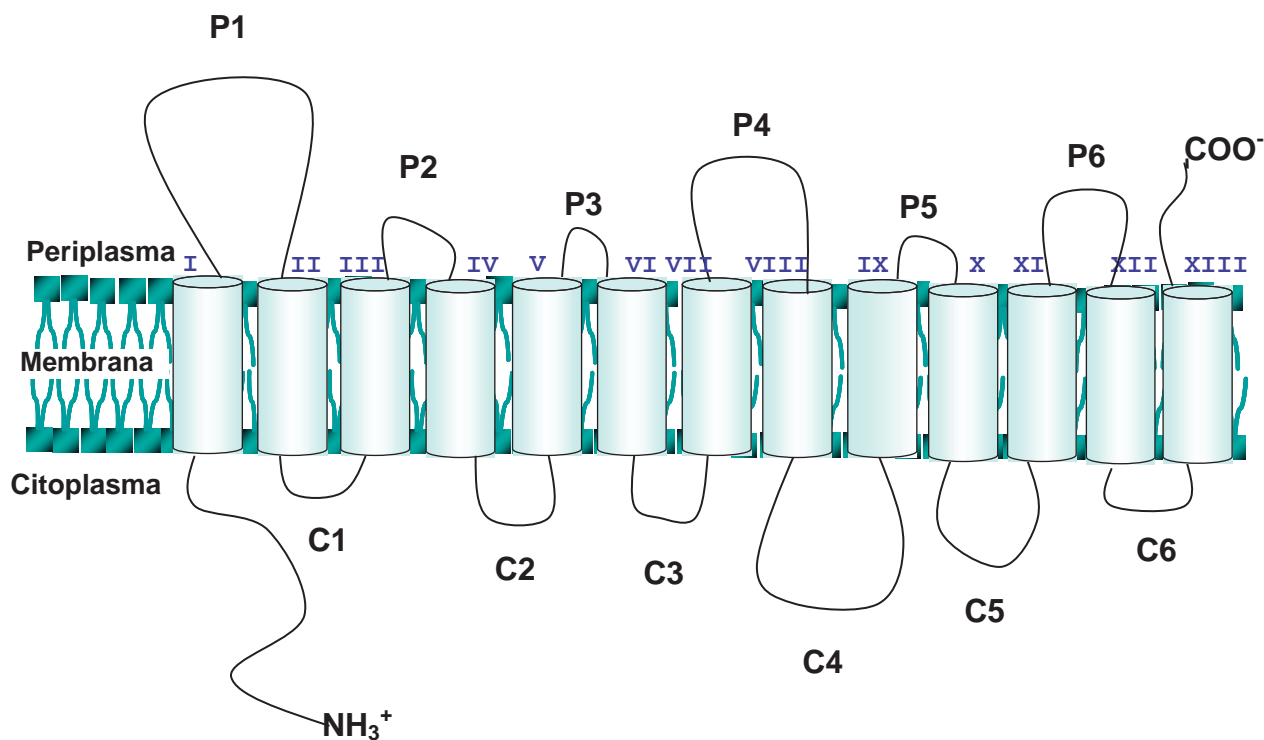


Figura 4. Representación esquemática de la topología membranar de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Se predice que los 416 residuos están distribuidos en 13 segmentos transmembranales (STM) representados por los cilindros (I-XIII), unidos por seis asas periplásmicas (P1-P6), y seis asas citoplásmicas (C1-C6). El extremo amino se encuentra en el citoplasma y el extremo carboxilo en el periplasma. Adaptada de Jiménez-Mejía y col., 2006.

otras familias de transportadores (Cervantes y Campos-García., 2007). Los homólogos CHR existen en dos tamaños: proteínas de cadena corta (SCHR, de aproximadamente 200 aminoácidos, aa) con un solo dominio, y proteínas de cadena larga (LCHR, de aproximadamente 400 aminoácidos, aa) con dos dominios homólogos.

Del total de 135 secuencias de proteínas homólogas analizadas, 77 consisten de proteínas grandes LCHR, las cuales fueron colocadas en un árbol filogenético de siete subfamilias, conteniendo proteínas principalmente de proteobacterias, entre las cuales se encuentran las dos proteínas ChrA con función demostrada de transporte de cromato. Estos dos subgrupos, y probablemente la subfamilia LCHR3, pueden contener otros transportadores de cromato funcionales. La subfamilia LCHR4 incluye la única proteína de una arquea (*Methanococcus jannaschii*). La subfamilia LCHR de hongos contiene seis proteínas de especies fúngicas, estrechamente relacionadas con la subfamilia LCHR1, que contiene todos los homólogos Gram positivos (**Figura 5**) (Cervantes y Campos-García, 2007). Recientemente en nuestro laboratorio se caracterizó el gen *chrNC* de *Neurospora crassa* que codifica una proteína que probablemente esta involucrada en la resistencia a cromato (Flores, 2008).

4.- MUTAGENESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es el método empleado para la producción de mutaciones específicas en un gen (Glick y Pasternak, 1994). Para realizar la mutagénesis dirigida se debe conocer la secuencia precisa de nucleótidos del DNA que codifica los aminoácidos que se van a cambiar y saber el cambio a realizar. Determinar cuáles aminoácidos de una proteína deben ser cambiados para tener una propiedad específica es mas fácil si se conoce la estructura tridimensional de la proteína, determinada después de un análisis cristalográfico por rayos-X. Sin embargo, para la mayoría de las proteínas no se tiene esta información detallada, por lo

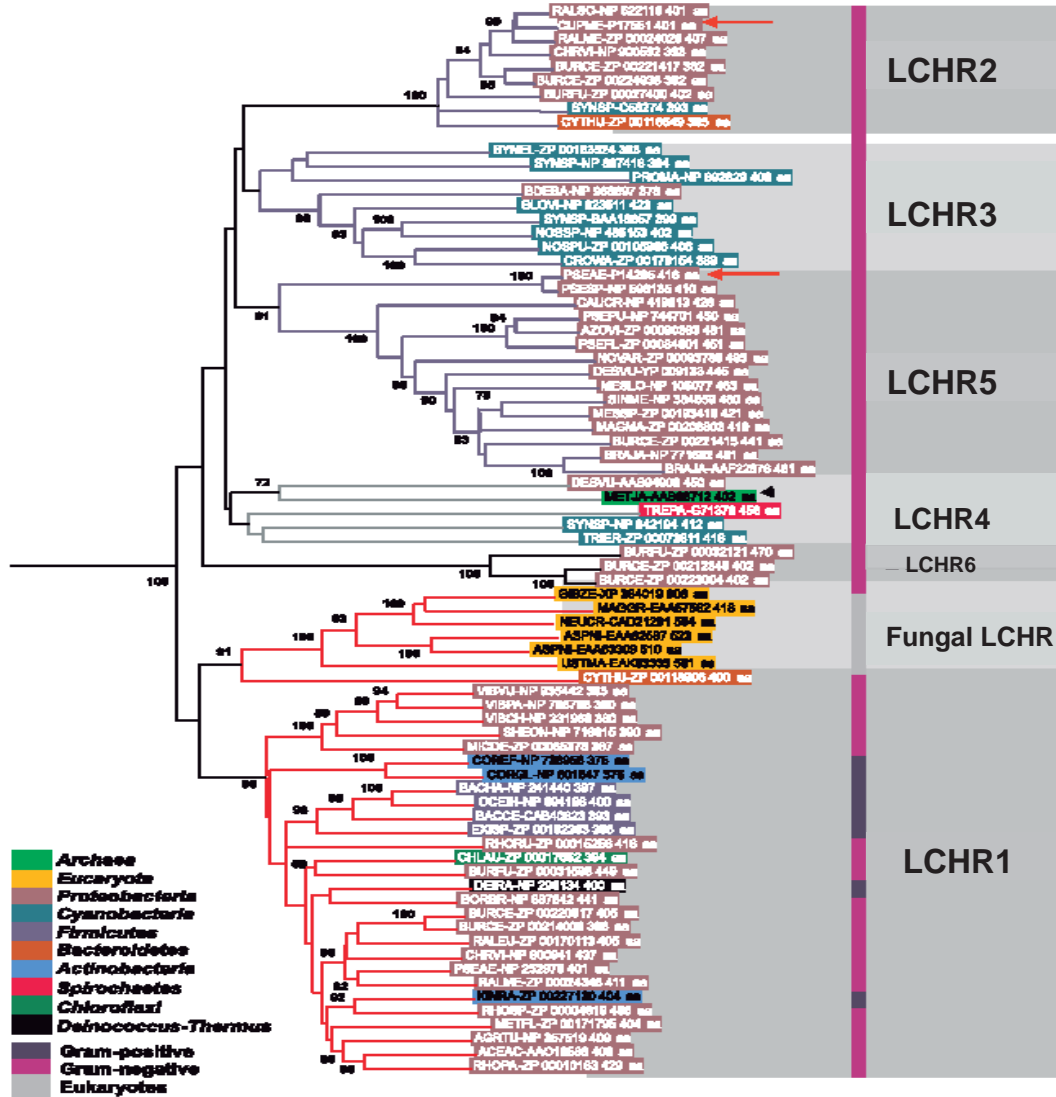


Figura 5. Árbol filogenético de la familia LCHR de la superfamilia de proteínas CHR. El color en la leyenda de la izquierda indica la distribución taxonómica de los grupos. La barra vertical derecha muestra la clasificación Gram de las bacterias. En rosa se representan las (Gram positivo) y en Gris (Gram negativo). También se indican las siete principales subfamilias mencionadas en el texto (LCHR1-6) y la subfamilia LCHR fúngica. Las flechas indican las dos proteínas caracterizadas funcionalmente, ChrA de *C. metallidurans* y ChrA de *P. aeruginosa*. Tomada de Cervantes y Campos-García, 2007.

que la mutagénesis comúnmente es una estrategia de “prueba y error” en la que se cambian aquellos aminoácidos que más probablemente causen un cambio en las propiedades de la proteína (Glick y Pasternak, 1994). La mutagénesis es una herramienta importante en el estudio de la expresión de genes así como en el estudio de la relación estructura-función de las proteínas.

5.- AMINOÁCIDOS CON GRUPO R ÁCIDO

a) 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 a pH de 7. Los valores de pKa 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 tanto, se suele denominar a estos aminoácidos Aspartato (Asp) y Glutamato (Glu) (Mathews y col., 2006). White y Wimley (1998) crearon una escala de hidrofobicidad que permite clasificar los veinte aminoácidos naturales de acuerdo a su energía 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 fenilalanina y el triptófano 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.

b) Participación de los aminoácidos ácidos en las proteínas de membrana

A pesar de los factores energéticos desfavorables involucrados en la inserción de aminoácidos ionizables (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. Se ha puntualizado que la inserción en la membrana de los aminoácidos ionizables puede facilitarse si su carga es neutralizada por interacciones iónicas, 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, un puente salino entre aminoácidos cargados puede requerir sólo aproximadamente 1 kcal/mol (Honig y Hubbell, 1984).

El análisis de mutagénesis más notable en una proteína de membrana fue el realizado en el transportador de lactosa de *Escherichia coli* LacY, el cual permitió demostrar que sólo seis aminoácidos cargados (ácidos y básicos), de los 417 presentes en la proteína, son esenciales para el transporte. Todos estos aminoácidos cargados se encuentran localizados dentro de los STMs. A cada uno de estos residuos se les ha asignado una función, ya sea en el transporte de la lactosa o de protones (Abramson y col., 2003).

Existen aminoácidos con carga negativa en regiones transmembranales que no forman un enlace iónico, 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). Un ejemplo de la formación de un puente salino en el interior de STMs, es el formado por el Glu269 (STM VIII) y la Arg144 (STM V) en la permeasa de lactosa LacY de *E. coli*. Se propone que este puente forma parte del sitio de unión del azúcar que transporta esta proteína, debido a que esta interacción estabiliza la formación de dos puentes de hidrógeno entre la Arg144 y el

sustrato lactosa, como se observó en la estructura cristalizada (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 un puente salino con la Arg144 (**Figura 6**) (Abramson y col., 2003).

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 F₀F₁ ATPasa de *E. coli* puede ser protonado o desprotonado como parte del mecanismo de transporte del protón (Miller, 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 Asparagina (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 (**Figura 7**) (Xiang-Qun y Lovinger, 2005).

II. ANTECEDENTES

Con la finalidad de identificar residuos esenciales para la función de ChrA de *P. aeruginosa*, así como para dilucidar su probable participación en el proceso de expulsión del cromato, se empleó mutagénesis sitio-dirigida. En nuestro laboratorio el primer aminoácido seleccionado como blanco de mutagénesis dirigida fue la Glicina 81, presente en el STM II de ChrA

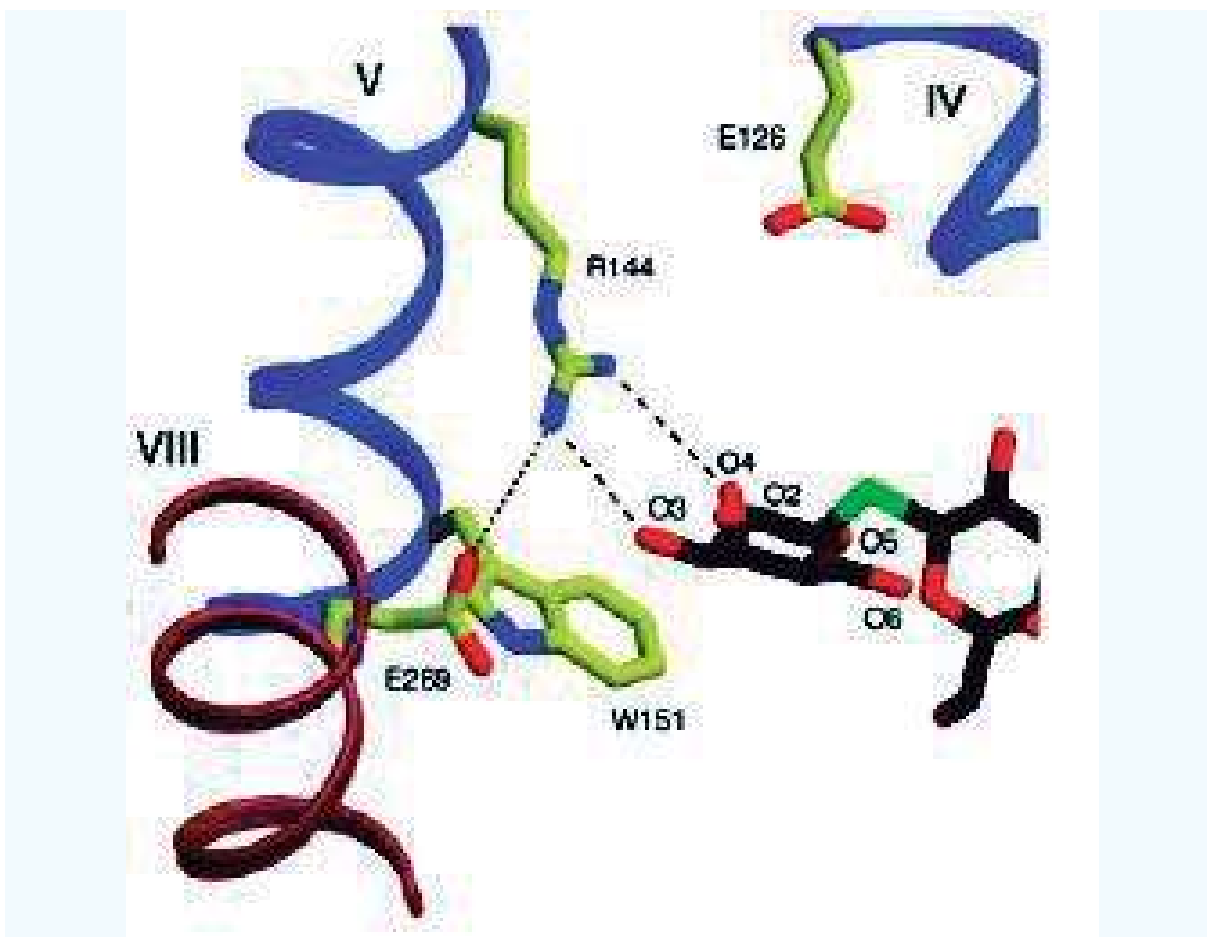
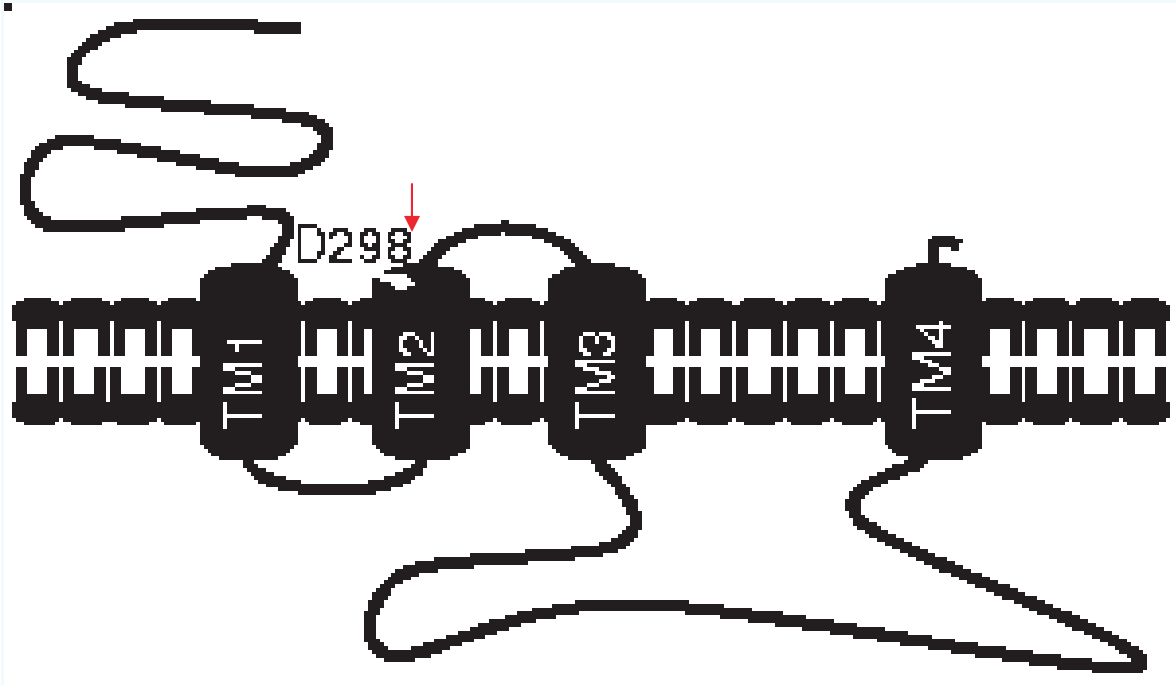


Figura 6. Puente salino formado en el interior de hélices transmembranales de la permeasa LacY de *E. coli*. La Arginina 144 (R144, hélice V) forma un puente de hidrógeno bifurcado con dos átomos de oxígeno del anillo galactopiranosil, así como un puente salino con el Glutamato 269 (E269, hélice VIII). Posiblemente el Glutamato 126 (E126, hélice IV) también forma un puente salino con la Arginina 144 en un estado conformacional diferente al de la unión del sustrato. Tomada de Abramson y col., 2003

Exterior celular



Citoplasma

Figura 7. Papel del residuo Asp-298 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 Aspartato 298 (D298) presente en el asa extracelular que une TM2 con TM3, probablemente involucrado en un estado funcional del receptor. Tomada de Xiang-Qun y Lovinger, 2005.

(Figura 8). La Glicina 81 resultó ser esencial para mantener la resistencia a cromato conferido por ChrA. Se continuó con las Prolinas 80 y 82 **(Figura 8)** las cuales también mostraron su esencialidad para mantener la resistencia a cromato conferida por ChrA. Se propuso que estas dos Prolinas son importantes para el STM II desde un punto de vista estructural (Cortés, 2005). Otros aminoácidos que mostraron ser importantes en la proteína ChrA, probablemente también desde un punto de vista estructural, fueron las Glicinas 44 y 45, presentes en el STM I, la Glicina 92 del STM II, la Glicina 100 del STM III y el triptofano 63 ubicado en el asa periplásmica 1 **(Figura 8)** (Díaz-Pérez, 2006). Se propuso que las Glicinas pueden participar en mantener la interacción hélice-hélice transmembranales, orientando así estas hélices de manera correcta, como ocurre en otras proteínas de membrana (Javadpour y cols., 1999). En el caso del Triptófano 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 **(Figura 8)**, como se ha observado en otras asas de características similares (Ridder y col., 2000; Chen y col., 2001).

También se seleccionaron residuos básicos (Arginina y Lisina) para ser analizados bajo el mismo abordaje de mutagénesis sitio-dirigida. De este análisis se concluyó que los residuos Arginina 154, ubicada en la interfase del asa citoplásmica 2 con el STM IV, la Lisina 248 del STM VIII, y la Lisina 394 del asa citoplásmica 6 son esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA y probablemente unen el cromato antes de que éste sea expulsado al espacio periplásmico (Moreno, 2006).

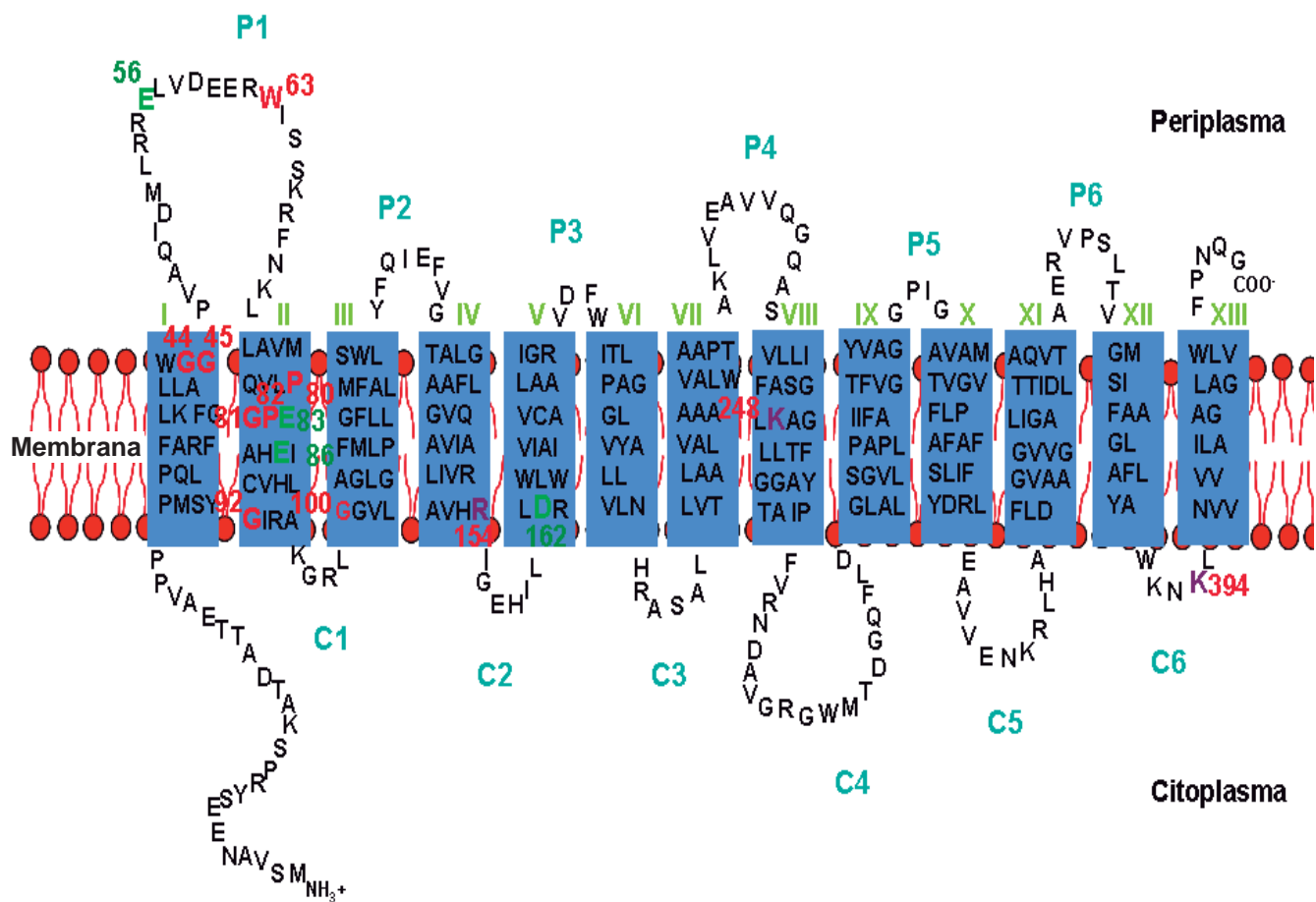


Figura 8. Localización de residuos esenciales en el modelo topológico de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. En color rojo se señalan los aminoácidos neutros, con una probable participación estructural en la proteína. En color azul se muestran los aminoácidos básicos, propuestos para interaccionar con el cromato durante el proceso de expulsión. En color verde se muestran los aminoácidos ácidos, probablemente involucrados en mantener la correcta estructura de la proteína (Aguilar, 2005; Cortés, 2005, 2007; Díaz-Pérez, 2006; Moreno, 2006).

Recientemente, con la finalidad de complementar el estudio de la participación de los aminoácidos conservados en el funcionamiento de la proteína ChrA, Cortés (2007) realizó un análisis de los residuos ácidos conservados por mutagénesis dirigida. Encontrando, que de los ocho residuos ácidos mutados, cuatro de ellos resultaron ser esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA. Estos residuos son el Glu-56 ubicado en el asa periplásmica 1 (**Figura 8**), probablemente involucrado en cambios conformacionales de esta asa, que provocan el cierre y apertura del canal del transporte de cromato, de igual forma que el Trp-63 previamente identificado por Díaz-Pérez (2006). También los aminoácidos transmembranales Glu-83, Glu-86 y Asp-162 (**Figura 8**) resultaron ser esenciales y probablemente están involucrados en mantener la correcta estructura de la proteína a través de las interacciones de puentes de hidrógeno o de puentes salinos con otros aminoácidos transmembranales (Cortés, 2007).

Se seleccionaron 10 residuos ácidos conservados (siete en asas hidrofílicas y tres ubicados en STMs) de los 25 presentes (6 ubicados en STMs y 19 en asas hidrofílicas) en ChrA. Se encontró que los tres residuos localizados en STMs seleccionados y solo un residuo de los siete seleccionados ubicados en asas hidrofílicas son esenciales para el funcionamiento de ChrA (Cortés, 2007).

Esto indica una alta probabilidad de que los tres residuos restantes ubicados en STMs tengan una participación esencial en el funcionamiento de ChrA.

III. HIPOTESIS

Los residuos ácidos Asp330, 346 y 362, ubicados en segmentos transmembranales, son esenciales en el funcionamiento de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los residuos transmembranales Asp330, 346 y 362 en la resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Realizar mutagénesis dirigida de los residuos Asp330, Asp346 y Asp362 de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.
- b) Subclonar los genes mutados en un vector para su expresión en *Pseudomonas aeruginosa*.
- c) Determinar la susceptibilidad a cromato de las mutantes.
- d) Establecer la posible función de los residuos alterados.

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 caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico.
- Caldo nutritivo (CN).
- Medio SOC: Tristona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.584%, Glucosa 1%, MgCl₂ y MgSO₄ 1%.

2.- CEPAS EMPLEADAS

Las cepas de *E. 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*^q Z Δ M15 Tn10 (Tc)] (Stratagene).

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

3.- PLASMIDOS EMPLEADOS

El plásmido pGEMTChrAHis (**Figura 9**) se usó para realizar la mutagénesis dirigida. Este plásmido se obtuvo a partir de la subclonación del gen *chrA* fusionado con histidinas y dos nuevos sitios de restricción *Xba*I y *Sph*I que liberan el gen *chrAHis*, proveniente del plásmido pChrAES y clonado en el vector pGEM-T (Aguilar, 2005). El plásmido también cuenta con un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R) y un gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ).

Para subclonar el gen *chrAHis* con la mutación en un vector con origen de replicación para *E. coli* y *P. aeruginosa* se utilizó el vector binario pUCP20 (West y col., 1994) (**Figura 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 el gen de interés clonado desarrollarán colonias blancas Lac⁻, contra colonias azules Lac⁺ en presencia de un sustrato cromogénico (Xgal) cuando el vector se religa.

4.-AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

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, enseguida se distribuyó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugaron durante 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. A continuación 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

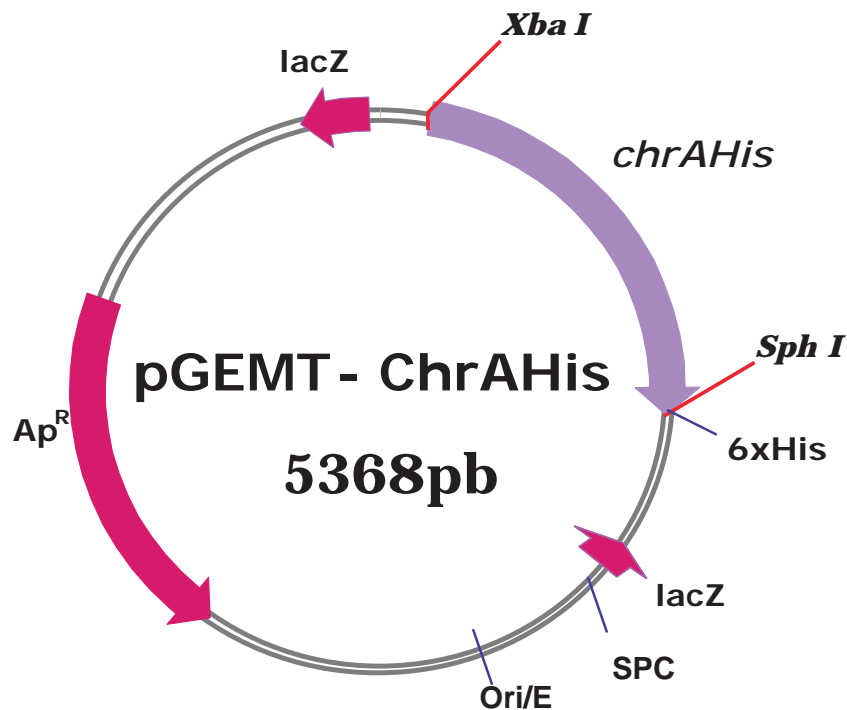


Figura 9. Plásmido pGEMT-ChrAHis. El gen *chrAHis* clonado en el vector pGEMT se encuentra flanqueado con sitios de restricción para *Xba*I y *Sph*I. Cuenta con origen de replicación para *E. coli* (*OriE*) un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R), un gen que codifica para la β -galactosidasa (*LacZ*) y un sitio de policonación (*SPC*). Aguilar, 2005

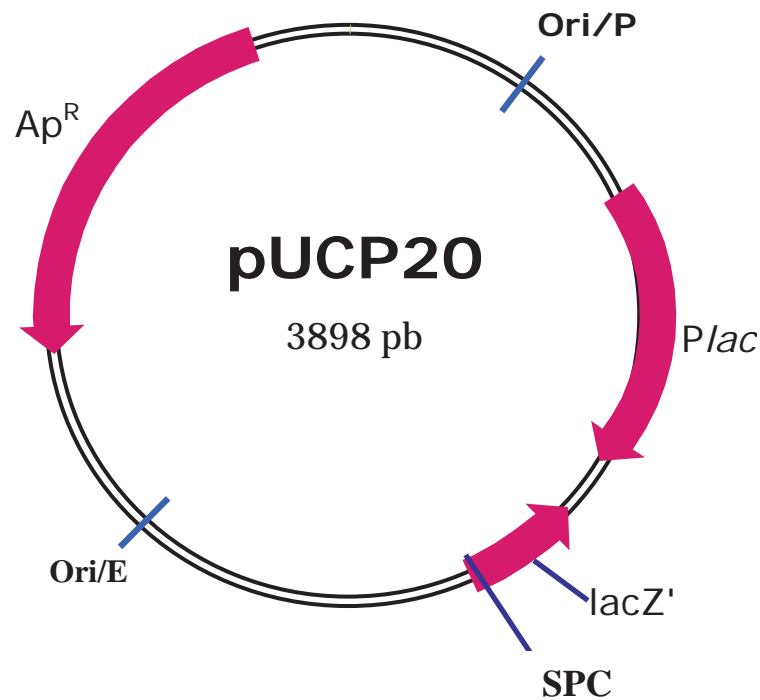


Figura 10. Plásmido pUCP20. Tiene un origen de replicación para *E. coli* (Ori/E) y uno para *Pseudomonas* (Ori/P). Cuenta además con un gen de resistencia a ampicilina/carbenicilina (Ap^R), el promotor del operón de lactosa (*Plac*), la porción que codifica para la β -galactosidasa (*LacZ*) y un sitio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

incubó a 37°C durante 5 min. A la suspensión formada se le agregaron 200 µl de la solución II recién preparada {NaOH 0.2 N y SDS (dodecilsulfato de sodio) 1%}, se agitó suavemente y se incubó durante 5 min en hielo. Transcurrido este tiempo se le adicionaron 150 µl 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 incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a temperatura ambiente. Se le adicionaron 500 µl de la mezcla 1:1 fenol-cloroformo y se mezcló moderadamente. Se centrifugó durante 5 min y al sobrenadante se le agregaron 500 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó durante 3 min. La fase acuosa superior se recuperó y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 10 min 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 50 µl de agua desionizada 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 3 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 µl de una solución de resuspensión y posteriormente fueron lisadas con 300 µl de una solución de lisis y 300 µl de una solución de neutralización. La mezcla de lisis fue centrifugada a 12,000 rpm en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y el sobrenadante obtenido fue adicionado a una columna a la que previamente se le adicionó 1 ml

de una solución de resina, se le 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 en un termoblock (65°C) y se resuspendió la pastilla en 30 µl de agua grado HPLC caliente. 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 un corrimiento electroforético, 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). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. Una muestra del DNA se mezcló con 2 µl 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 dos veces, 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 al 1% para determinar la concentración del DNA recuperado.

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 al 1% 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 fueron ligados utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). Las ligaciones se dejaron como mínimo toda la noche a 4°C y las proporciones inserto-vector variaron según el experimento realizado. Se emplearon de 3-5 µl de la mezcla de ligación en la transformación.

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 incubó 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 con 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 en hielo 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 cajas de AL con ampicilina (100 µg/ml).

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 incubando 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 incubó 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 en un filtro de 0.22 µm). Posteriormente se hicieron alícuotas de 100 µl de la suspensión bacteriana y se almacenaron a -80°C.

b) Transformación

Se mezcló el DNA con 100 µl de la suspensión de células competentes y se incubó en hielo 20 min. Después de este tiempo se incubaron a 42°C en un baño de agua por 45 seg y los tubos se transfirieron al hielo incubándose por 3 min. Se les adicionó 1 ml de caldo LB precalentado, se incubaron a 37°C con agitación constante por un máximo de 1 h, se concentró el cultivo resuspendiendo en 100 µl y se plaqueó en cajas de AL con ampicilina (100 µg/ml).

10- ELECTROPORACION DE *P. aeruginosa* SEMBRADA EN PLACA

Para la electroporación de *P. aeruginosa* se empleó el método de Enderle y Farwell, (1998): Se sembró en una placa de LB la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y se incubó 16 h a 37°C, posteriormente la caja se mantuvo a temperatura ambiente. Se llenó un tubo de 1.5 ml con 500 µl de agua desionizada, estéril y fría y después 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 resuspendieron con la

pipeta en 500 µl de agua desionizada estéril y fría y se centrifugaron nuevamente 2 min desechando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en agua estéril y fría en un volumen de aproximadamente 500 µl, 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 células 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 le adicionó 1 µl de medio SOC a la celda, se mezcló suavemente con la pipeta, 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 a 200 µl de cultivo en cajas de AL con carbenicilina (200 g/ml).

11.-MUTAGENESIS DIRIGIDA

Para este método se empleó el plásmido pGEMT-ChrAHis como DNA molde metilado. Para la extensión de los oligos mutagénicos se usó la enzima de alta fidelidad DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene). Una vez sintetizada la cadena mutada se digirió el DNA molde con la enzima *DpnI* (New England Biolabs), el cual se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue.

a) Diseño de oligonucleótidos mutagénicos

Los oligonucleótidos 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 formula:

$Tm = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N$; donde N no incluye las bases eliminadas.

La mutación se localizó al centro 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. Además, los oligonucleótidos no fueron fosforilados. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Invitrogen.

Oligonucleótidos para la mutación de Aspartato 330 por alanina (En negritas y subrayado se indica el codón que codifica para la alanina):

Superior (D330A-S) 5'-GTT CTC GCT GAT TTT CTA **CGC** CCG GCT GGA GGC GGT CGT G-3'

Inferior (D330A-I) 5'-CAC GAC CGC CTC CAG CCG **GGC** GTA GAA AAT CAG CGA GAA C-3'

Oligonucleótidos para la mutación de Aspartato 346 por alanina:

Superior (D346A-S) 5'-CGG CTG CAC GCC TTT CTG **GCC** GGC GTC GCG GCT GGG GTA G-3'

Inferior (D346A-I) 5'-CTA CCC CAG CCG CGA CGC **CGG** CCA GAA AGG CGT GCA GCC G-3'

Oligonucleótidos para la mutación de Aspartato 362 por alanina:

Superior (D362A) 5'-GAT CGG CGC AAC CAC CAT **CGC** CTT GGC GCA GGT CAC TGC-3'

Inferior (D362A) 5'-GCA GTG ACC TGC GCC AAG **GCG** ATG GTG GTT GCG CCG ATC-3'

b) Síntesis de la cadena mutada

La síntesis de la cadena mutada se hizo por medio de PCR. Se puso la siguiente reacción para la obtención de las mutantes: DNA (50-100 ng), oligonucleótido superior e inferior (125 ng), amortiguador de reacción 10X (5µl), mezcla dNTPs 10 mM (1 µl), 1 µl de DNA polimerasa

Pfu (Stratagene) (2.5 U/ μ l), se ajustó la reacción a un volumen final de 50 μ l con agua HPLC.

La enzima siempre se adicionó al final.

Las condiciones del PCR usadas fueron las siguientes: 94°C/1 min (desnaturalización inicial), 94°C/1 min (desnaturalización), 62°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.

c) Digestión con *DpnI*

Con la finalidad de eliminar el DNA molde, el DNA amplificado por PCR fue tratado con la enzima de restricción *DpnI*, para lo cual se puso la siguiente reacción: DNA amplificado (15 μ l), amortiguador 10X (2 μ l), BSA (suero bovino de albúmina) 1/10 (2 μ l) y 1 μ l de *DpnI* (10-20 U/ μ l). La reacción se incubó toda la noche a 37°C .

d) Transformación

La mezcla total de digestión se empleó para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue por choque térmico (anteriormente descrito). De las colonias obtenidas se seleccionaron algunas al azar y se les realizó aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina para verificar la presencia del plásmido y su posterior secuenciación.

e) Secuenciación

El DNA se mandó secuenciar al laboratorio de secuenciación del CINVESTAV unidad Irapuato. Para la secuenciación del gen *chrA* de las mutantes se utilizó el oligo G416 que amplifica un fragmento de 1278 pb del gen *chrA* con el oligo 1(+) e introduce un sitio de restricción para *XbaI*.

f) Análisis de secuencias

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

12.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO

Se prepararon tubos con 4 ml de CN y con concentraciones variables de cromato de potasio (Merck). A cada tubo se le agregaron 40 µl 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 directamente en función de la absorbencia de los cultivos (crecimiento celular) a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

VII. RESULTADOS

1.- Identificación y selección de los residuos a mutar

En un análisis previo de mutagénesis dirigida de residuos ácidos conservados en la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, se encontró que tres de los cuatro residuos esenciales (Glutamatos 83 y 86 y Aspartato 162) para el funcionamiento de la proteína se ubican en segmentos transmembranales (STMs) (Cortés, 2007). Debido a que sólo existen seis residuos ácidos ubicados en STMs, de los 25 presentes en la proteína ChrA, esto nos indica una alta probabilidad de que los tres residuos restantes ubicados en STMs tuvieran una participación esencial en el funcionamiento de ChrA. Por lo que el criterio de selección que se utilizó en este trabajo fue la posición de los aminoácidos elegidos para mutagenizar, todos ubicados en STMs. Se seleccionaron los tres residuos ácidos restantes ubicados en STMs (**Figura 11**): Aspartato 330, ubicado en el STM X y Aspartato 346 y 362, ambos ubicados en el STM XI.

2.- Selección del cambio para evaluar la participación de los residuos

Con el fin de evaluar la participación de los aminoácidos ácidos elegidos ubicados en STMs en el funcionamiento de la proteína ChrA, se hicieron las mutantes de Aspartato por Alanina, con el fin de eliminar la carga y además mantener el volumen del aminoácido cambiado (**Figura 12**).

3.- Obtención y caracterización de las mutantes

Para llevar a cabo el cambio de los residuos se empleó el método de mutagénesis sitio dirigida mediante PCR y digestión con la enzima de restricción *DpnI* que se describió en Materiales y Métodos (Fisher y Pei, 1997).

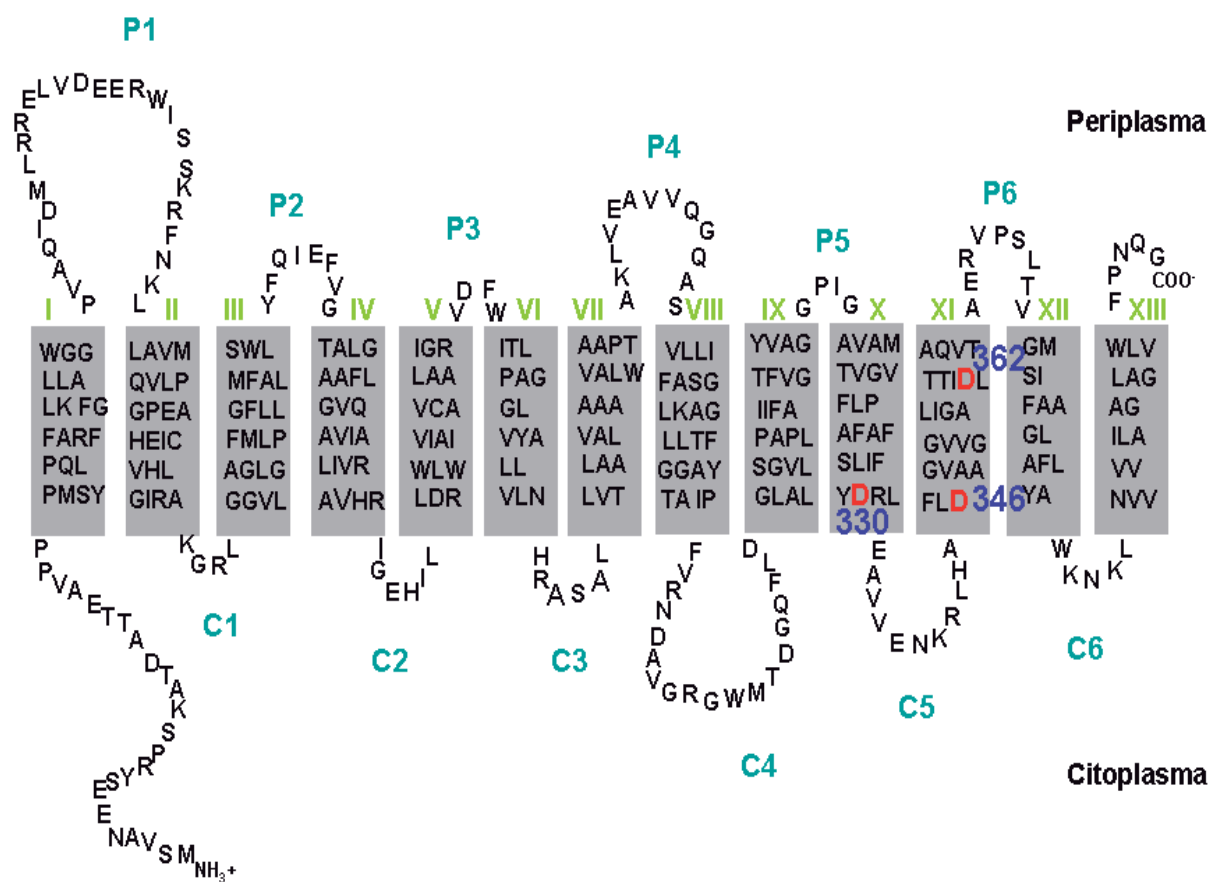


Figura 11. Aminoácidos ácidos seleccionados para la mutagénesis de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Esquema de la topología de la proteína ChrA donde se indican en color rojo los residuos ácidos seleccionados en este trabajo para mutagénesis dirigida.

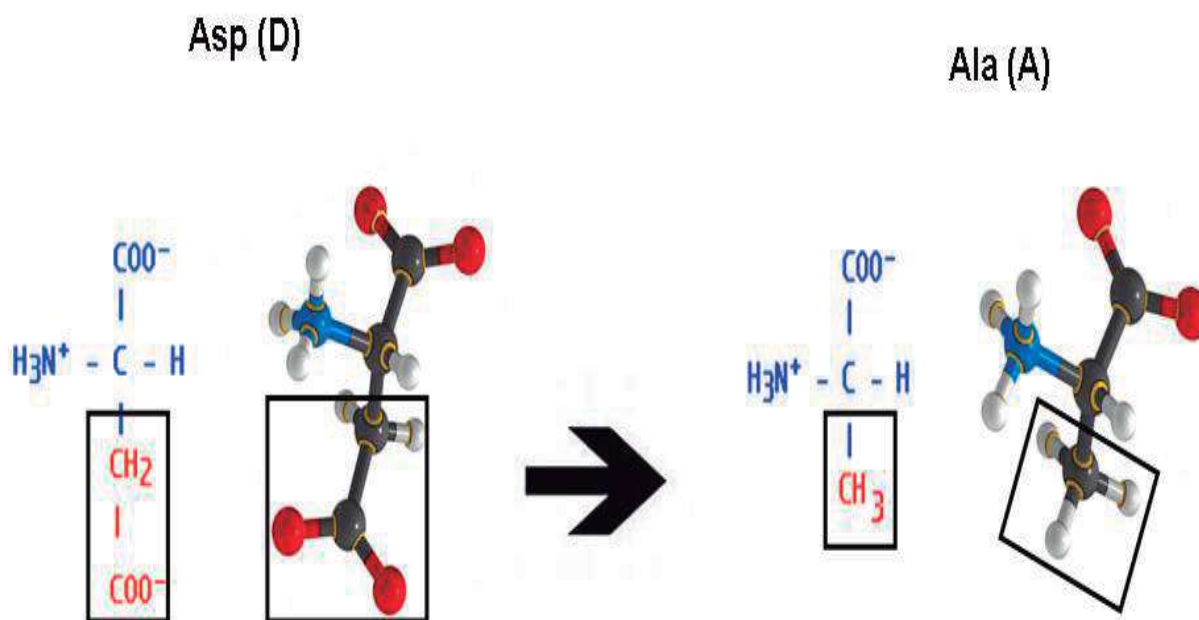


Figura 12. Cambio utilizado para la evaluación de la participación de los residuos ácidos transmembranales de la proteína ChrA seleccionados. Con rectángulos se resaltan los grupos R de Aspartato y Alanina.

Inicialmente se diseñaron los oligonucleótidos, los cuales cumplieron las características requeridas por el método como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos. Se usó como plásmido molde pGEMT-ChrAHis (Aguilar, 2005) el cual cuenta con el gen que codifica para la proteína ChrA bajo la regulación del promotor Ptrc; el gen *chrA* se encuentra fusionado a una etiqueta que codifica para seis histidinas, la cual podrá ser utilizada para el futuro análisis de las proteínas mutantes mediante inmunodetección.

Se llevó a cabo el procedimiento de PCR para las mutaciones propuestas, usando las condiciones descritas por Aguilar (2005) y que se describen en Materiales y Métodos. Estas condiciones permitieron obtener las mutantes buscadas. Después de llevar a cabo el PCR, la mezcla de reacción se sometió a digestión con *DpnI* (pGEMT-ChrAHis cuenta con 29 sitios de restricción para la enzima *DpnI*), tras lo cual se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Se obtuvo un número de colonias variable para cada prueba de mutagénesis, desde 1 hasta más de 50 colonias por caja. Se seleccionaron algunas colonias de cada ensayo en función del número obtenido, y al menos a una de ellas se les extrajo el DNA plásmidico, del cual se procedió a analizar su tamaño molecular en geles de agarosa.

Los plásmidos que presentaron el mismo patrón de corrimiento que el plásmido pGEMT-ChrAHis silvestre (5.3 kb) se digirieron con la enzima *BglII*, la cual libera un fragmento de 1.2 kb que contiene el gen *chrA*. En la **Figura 13** se observa un ejemplo del corrimiento electroforético del plásmido pGEMT-ChrAHis con la mutación D346A. En el carril 2 se muestra el plásmido pGEMT-ChrAHis-D346A de 5.3 kb. En el carril 3 se muestra la digestión con *BglII*, la cual libera fragmentos de 4.1 y 1.2 kb; éste ultimo pertenece al gen *chrA*. Esto también se realizó con el plásmido pGEMT-ChrAHis-D362A. Para cada clona analizada se seleccionaron de uno a tres plásmidos que mostraron el patrón de corrimiento y restricción esperado y se obtuvo la secuencia de la región correspondiente al gen *chrA*, para

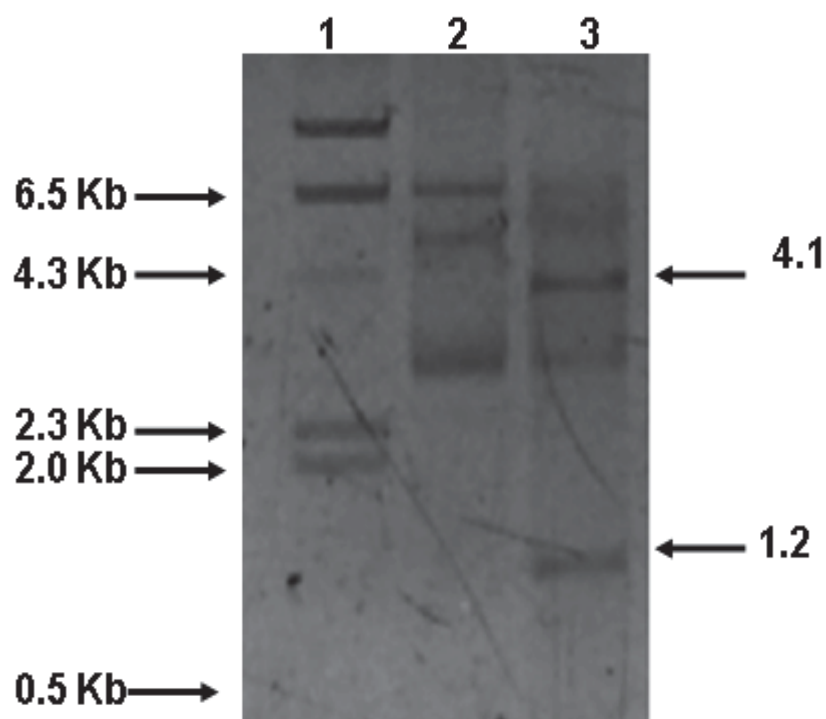


Figura 13. Análisis de restricción del plásmido pGEMT-ChrAHis-D346A. Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, marcador de tamaño molecular (λ *HindIII*). Carril 2, plásmido pGEMT-ChrAHis-D346A. Carril 3 digestión del plásmido pGEMT-ChrAHis-D346A con Bg/II.

comprobar que tuvieran la mutación en el codón establecido. En la **Figura 14** se muestra parte de las secuencias de los plásmidos con los genes mutantes, donde se observa la mutación esperada.

Es importante mencionar que en la secuencia obtenida de la mutante afectada en el Aspartato 330 además de presentar la mutación esperada se observó una inserción por lo que se descartó para los ensayos posteriores.

4.- Subclonación de los genes mutados

Debido a que el plásmido pGEMT-ChrAHis no cuenta con origen de replicación para *Pseudomonas*, una vez comprobado que el gen *chrA* de cada una de las clonas llevaba la mutación deseada, se procedió a subclonarlo en el vector de expresión binario *E. coli/Pseudomonas* pUCP20 (West y col., 1994). Esto es debido a que el procedimiento de mutagénesis dirigida está implementado en *E. coli*, pero la proteína ChrA no es funcional en esta especie bacteriana (Cervantes y col., 1990), por lo que fue necesario transferir los genes a *P. aeruginosa* para poder evaluar la actividad de la proteína.

El gen *chrA* mutante se recuperó digiriendo el plásmido pGEMT-ChrAHis con las enzimas *XbaI* y *SphI*, las cuales liberan un fragmento de 2.3 kb que contiene la región promotora P_{trc} y el gen *chrAHis*. Este fragmento se purificó y se sometió a ligación con el vector pUCP20 digerido con las mismas enzimas. La reacción de ligación se usó para transformar células de *E. coli* JM101. Se seleccionaron algunas colonias por cada subclonación a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico para determinar su tamaño molecular en geles de agarosa. A los plásmidos obtenidos se les denominó plásmido pUChrA-mutación, donde “mutación” se refiere al cambio de aminoácido en una posición; por ejemplo, pUChrA-Asp346Ala, lleva la mutación Aspartato-346 por Alanina.

A)

```

ChrA      C G G T C G T G G A G A A C A A A C G G C T G C A C G C C T T T C T G G A C G G C G T C G C G G C T G G G G T A G T C G 1440
Asp346Ala C G G T C G T G G A G A A C A A A C G G C T G C A C G C C T T T C T G G C C G G C G T C G C G G C T G G G G T A G T C G 842
*****

ChrA      G C C T G A T C G G C G C A A C C A C C A T C G A C T T G G C G C A G G T C A C T G C T G A A C G T G T C C C A T C G T 1500
Asp346Ala G C C T G A T C G G C G C A A C C A C C A T C G A C T T G G C G C A G G T C A C T G C T G A A C G T G T C C C A T C G T 902
*****

```

B)

```

ChrA      C G G T C G T G G A G A A C A A A C G G C T G C A C G C C T T T C T G G A C G G C G T C G C G G C T G G G G T A G T C G 1440
Asp362Ala C G G T C G T G G A G A A C A A A C G G C T G C A C G C C T T T C T G G A C G G C G T C G C G G C T G G G G T A G T C G 436
*****

ChrA      G C C T G A T C G G C G C A A C C A C C A T C G A C T T G G C G C A G G T C A C T G C T G A A C G T G T C C C A T C G T 1500
Asp362Ala G C C T G A T C G G C G C A A C C A C C A T C G C T T G G C G C A G G T C A C T G C T G A A C G T G T C C C A T C G T 496
*****

```

Figura 14. Verificación de la mutación en el gen *chrA*. **A)** Alineamiento de las secuencias del gen *chrA* silvestre (superior) y de la mutante Asp346Ala (inferior). **B)** alineamiento de las secuencias del gen *chrA* silvestre (superior) y de la mutante Asp362Ala (inferior). Se indica el codón correspondiente al aminoácido original y el codón para el nuevo aminoácido (subrayado y con el nucleótido que hizo el cambio de Asp por Ala en rojo).

Se empleó el DNA de una de las colonias que mostró el patrón de restricción esperado para transformar células de la cepa estándar *P. aeruginosa* PAO1. De cada transformación se eligieron dos colonias a las cuales se extrajo DNA plasmídico, el cual se digirió con la enzima *Bgl*II para confirmar la presencia del gen *chrA*. En la **Figura 15** se muestran ejemplos del análisis de restricción realizado. Se presenta el corrimiento electroforético de los plásmidos pUChrAD346A (carril 2) y pUChrAD362A (carril 3), con un peso de aproximadamente 6.1 kb. También se muestran las digestiones con *Bgl*II, las cuales liberan un fragmento de 4.9 y de 1.2, este último corresponde al gen *chrA* (Carriles 4 y 5). En el carril 1 se muestra el marcador de tamaño molecular (λ *Hind*III). Se eligió una colonia por cada plásmido para realizar las pruebas de susceptibilidad a cromato.

5.- Pruebas de susceptibilidad a cromato

Con el fin de evaluar el posible papel de los residuos ácidos mutados en el funcionamiento de la proteína ChrA, se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad a cromato a las mutantes obtenidas anteriormente. En cada prueba se usó como control resistente la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (pUChrA), la cual lleva el vector pUCP20 con el gen *chrA* silvestre, y como control sensible, la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (pUCP20), la cual lleva el vector sin inserto.

Aspartato 346

En las pruebas de susceptibilidad en CN se observó que la mutante presentó un nivel de resistencia similar al control sensible (pUCP20) (**Figura 16**), por que podemos concluir que el residuo Asp346 es esencial para en funcionamiento de la proteína ChrA.

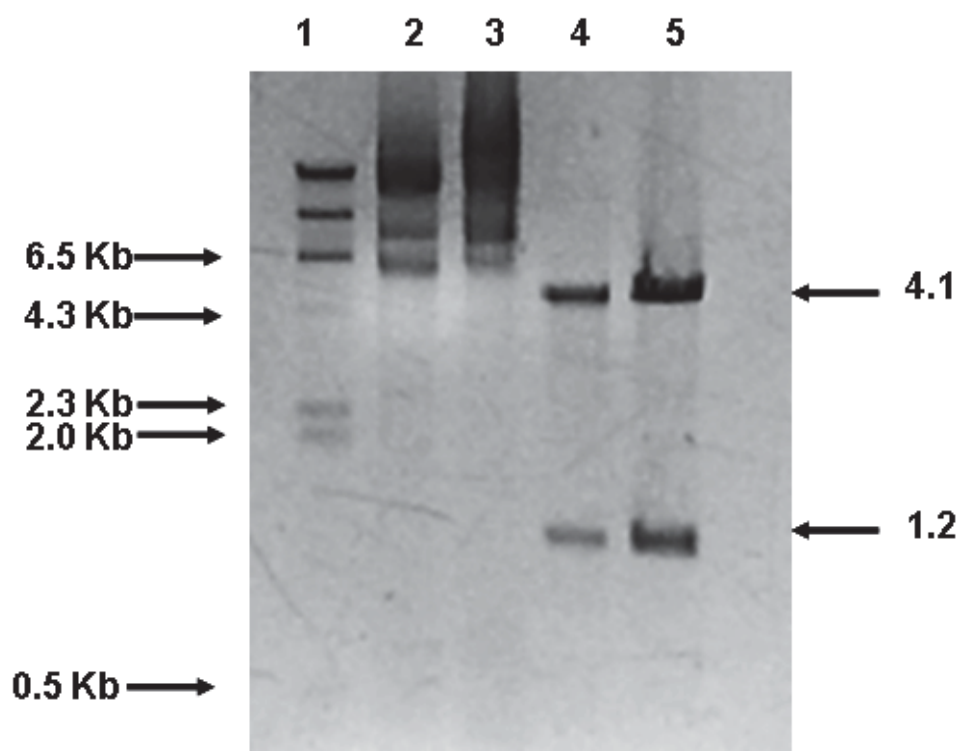


Figura 15. Análisis de restricción de los plásmidos pUChrA-mutación. Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, marcador de tamaño molecular (λ *HindIII*). Carril 2 y 3, plásmidos pUChrA-D346A y pUChrA-D362A. Carril 4, digestión del plásmido pUChrA-D346A con *Bgl/II* y en el carril 5 digestión del plásmido pUChrA-D362A con *Bgl/II*.

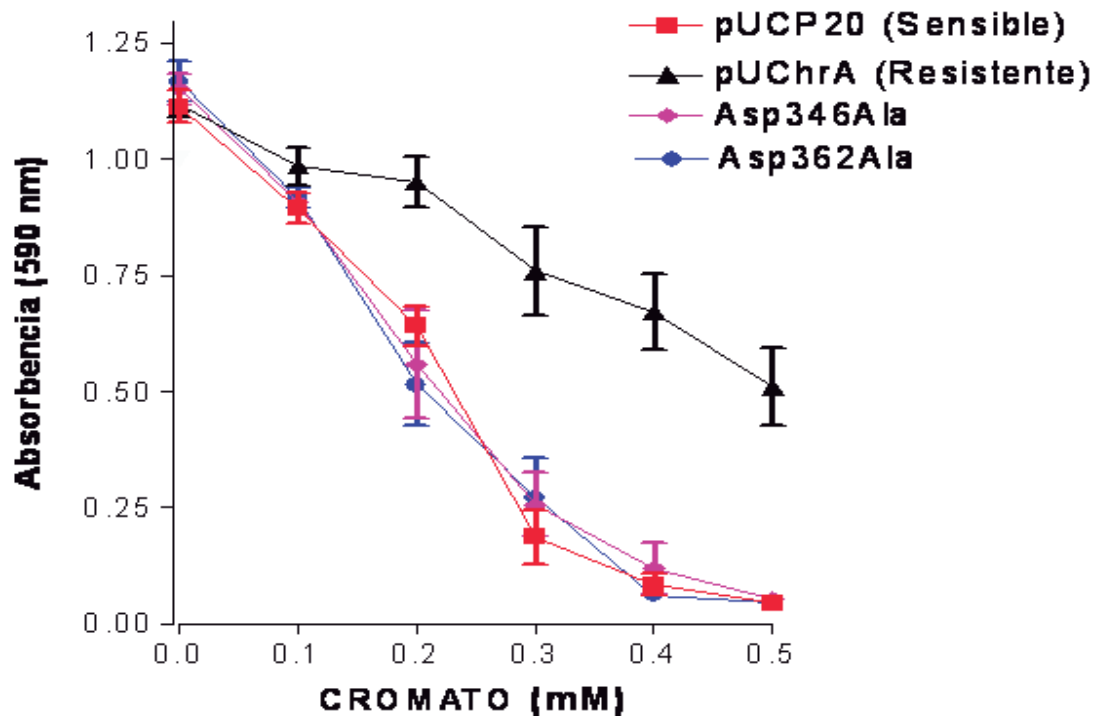


Figura 16. Susceptibilidad a cromato de las mutantes Asp346Ala y Asp362Ala de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h con agitación constante en caldo nutritivo a 37°C, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbancia de los cultivos a 590 nm. Como control sensible se utilizó PAO1 (pUCP20) y como control resistente PAO1 (pUChrA). Se muestran las barras del error estándar de la media (n=4).

Aspartato 362

Al igual que el Asp346, el Asp362 mostró un nivel de resistencia similar al control sensible (pUCP20) (**Figura16**), indicando que es esencial para el funcionamiento de la proteína ChrA.

VIII. DISCUSIÓN

El transportador de cromato ChrA de *P. aeruginosa* es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia CHR, la cual consta de proteínas de cadena larga (LCHR) y de cadena corta (SCHR) (Nies y col., 1998). Díaz-Pérez (2006) realizó una búsqueda de secuencias similares a ChrA, encontrando 135 proteínas homólogas distribuidas en los tres dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Un análisis filogenético permitió predecir que las proteínas CHR surgieron de un evento de duplicación y fusión del gen que las codifica (Díaz-Pérez y col., 2007). Alineamientos con las secuencias de las 135 proteínas permitieron (Díaz-Pérez, 2006) encontrar aminoácidos altamente conservados, los cuales fueron analizados mediante mutagénesis dirigida con el fin de conocer su probable participación en la relación estructura-función de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Se encontró que algunos de los aminoácidos conservados son esenciales para el funcionamiento de la proteína. Por ejemplo, las Glicinas 44 y 45 ubicadas en el STM I, las glicinas 81 y 92 y las Prolinas 80 y 82 ubicadas en el STM II, así como el Triptófano 63 ubicado en el asa periplásmica 1 (P1) son esenciales para el funcionamiento de ChrA. A estos residuos se les asignó un papel fundamentalmente estructural debido a su carga neutra, probablemente auxiliando en mantener la conformación que permite el funcionamiento de la proteína (Aguilar, 2005; Cortés, 2005; Díaz-Pérez, 2006).

También se analizaron mediante mutagénesis dirigida los residuos básicos (Lisina y Arginina) de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. En este análisis se encontró que la Arginina 154 ubicada en el STM IV, la Lisina 248 ubicada en el STM VIII y la Lisina 394 ubicada en el asa citoplásmica 6 (C6) abatieron la resistencia a cromato, por lo que se concluyó que son esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA. Probablemente estos residuos con carga positiva unen el cromato (un oxianión) antes de que éste sea expulsado al espacio

periplásmico (Moreno, 2006). En este trabajo también se encontraron aminoácidos importantes como la lisina 37 ubicada en el STM I, la Arginina 55 ubicada en el asa periplásmica 1 (P1) y la lisina 201 ubicada en el asa citoplásmica 3 (C3) los cuales afectaron considerablemente la resistencia a cromato conferido por ChrA. A estos aminoácidos se les asignó un papel estructural probablemente porque su carga positiva es necesaria para mantener la estructura funcional (terciaria) de ChrA (Moreno, 2006).

Recientemente se analizaron por mutagénesis dirigida los residuos ácidos conservados de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, encontrando que el Glutamato 56 ubicado en el asa periplásmica 1, los Glutamatos 83 y 86 ubicados en el STM II y el Aspartato 162 ubicado en el STM V afectaron drásticamente la resistencia a cromato, por lo que se concluyó que son esenciales para el funcionamiento de ChrA. En este trabajo se concluyó que estos residuos probablemente están involucrados en mantener la correcta estructura de la proteína (Cortés, 2007).

Para verificar si los seis residuos con grupo R ácido localizados en STMs son esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, en este trabajo nos enfocamos en el análisis de los residuos ácidos transmembranales Aspartato 330 ubicado en el STM X y los Aspartatos 346 y 362 ubicados en el STM XI, con el fin de establecer el posible papel de estos residuos en la función de la proteína ChrA.

Aunque en el trabajo previo los residuos ácidos se seleccionaron en base a su conservación, también se tomó en cuenta la ubicación de los residuos. El criterio de selección en este trabajo fue la ubicación de los residuos, los tres localizados en STMs. Un análisis similar fue realizado en el transportador de sulfato SHST1 de la planta *Stylosanthes hamata*, en el que se mutaron los residuos Aspartato 107 ubicado en el STM I y el Glutamato 175 ubicado en el STM III, el Glutamato 366 ubicado en el STM VIII y el Glutamato 497 ubicado en el STM

XII, los cuales están conservados en la familia SulP a la cual pertenece SHST1. Además, se mutaron residuos como Aspartato 122 y Glutamato 270, que se eligieron en base a su ubicación en los STMs I y VI, respectivamente. En este análisis se encontró que los Aspartatos 107 y 122, así como el glutamato 366, son esenciales para el transporte de sulfato de SHST1. Los demás residuos no afectaron el transporte de sulfato por lo que se concluyó que no son esenciales para el funcionamiento de SHST1. También se encontró que la Arginina 354 es esencial para el transporte de sulfato de SHST1 debido a que posiblemente participa en la formación de interacciones electrostáticas con residuos ácidos transmembranales (Shelden y col., 2003).

Para el residuo Aspartato 330 no se obtuvo el cambio por alanina, por lo cual no se le midió el nivel de resistencia a cromato.

Los residuos ácidos Aspartato 346 y Aspartato 362 se localizan en el segmento transmembranal XI (**Figura 11**). De estos residuos se obtuvo el cambio por alanina, el cual afectó drásticamente en ambos casos el nivel de resistencia a cromato conferido por la proteína ChrA (**Figura 16**). Este resultado era esperado, debido al alto costo energético que le implica a los residuos cargados estar en un ambiente desfavorable como es el ambiente hidrofóbico de los fosfolípidos de la membrana. Además, hay reportes que apoyan el posible papel de los residuos ácidos ubicados en STMs en la estructura o función de proteínas de membrana. Por ejemplo, en el transportador de galactósidos y protones LacY de *E. coli*, el Aspartato 240 del STM VII interacciona formando un puente salino con la Lisina 319 del STM X (Abramson y col., 2003). El Aspartato 107 del STM I del mencionado transportador de sulfato SHST1 de *S. hamata* se propone que forma una interacción electrostática con la Arginina 154 del STM II; también se ha reportado la posible interacción electrostática entre el Glutamato 157 ubicado en el STM III con la Arginina 354 ubicada en el STM VIII ó el

Glutamato 270 ubicado en el STM VI con la Arginina 354 del mismo transportador (Shelden y col., 2003). Estos residuos son esenciales para los transportadores, probablemente porque participan formando interacciones electrostáticas que permiten que haya interacciones entre los STMs donde se encuentran. De esta manera, estos residuos contribuyen en mantener la estructura terciaria de la proteína, que es la conformación en la cual llevan a cabo de manera adecuada su función.

Las pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes Asp346Ala y Asp362Ala (**Figura 16**) mostraron que se afectó drásticamente la resistencia a cromato. Lo primero que indican estos resultados es que el STM XI, donde se localizan, es importante en el transporte de cromato por la proteína ChrA. Por esta razón, construimos un modelo de este STM con el fin de inferir el posible papel de los Aspartatos 346 y 362 (**Figura 17**). Se observa que estos residuos se localizan en caras opuestas de la hélice. En este modelo helicoidal se observan también las Treoninas 359 y 360, que se hallan cerca de los residuos Asp362 y Asp346, respectivamente, y que pudieran formar puentes de hidrógeno con alguno de los residuos ácidos y de esta manera mantener la correcta estructura del STM XI. El Aspartato 346 se encuentra muy cerca del asa citoplásmica 5 (C5) (**Figuras 11 y 17**), la cual contiene residuos básicos como la Lisina 339 y la Arginina 340; este último residuo se encontró ser esencial para el funcionamiento de ChrA (Aguilar, 2007). El asa C5 también tiene al residuo polar Asparagina 338 con la cual pudiera formar puentes de hidrógeno y con ello ayudar a mantener la correcta estructura de la proteína. Esto debido a que al mutar el Aspartato 346 se afectó drásticamente la resistencia a cromato conferido por ChrA. El hecho de que el Aspartato 362 se encuentra inmerso en el STM XI (**Figura 11**), nos lleva a pensar que este residuo pudiera interaccionar con un residuo de carga opuesta de otro STM. Para determinar si el STM XI se encuentra cerca de otro STM que tenga residuos con los que pudiera interaccionar, recurrimos

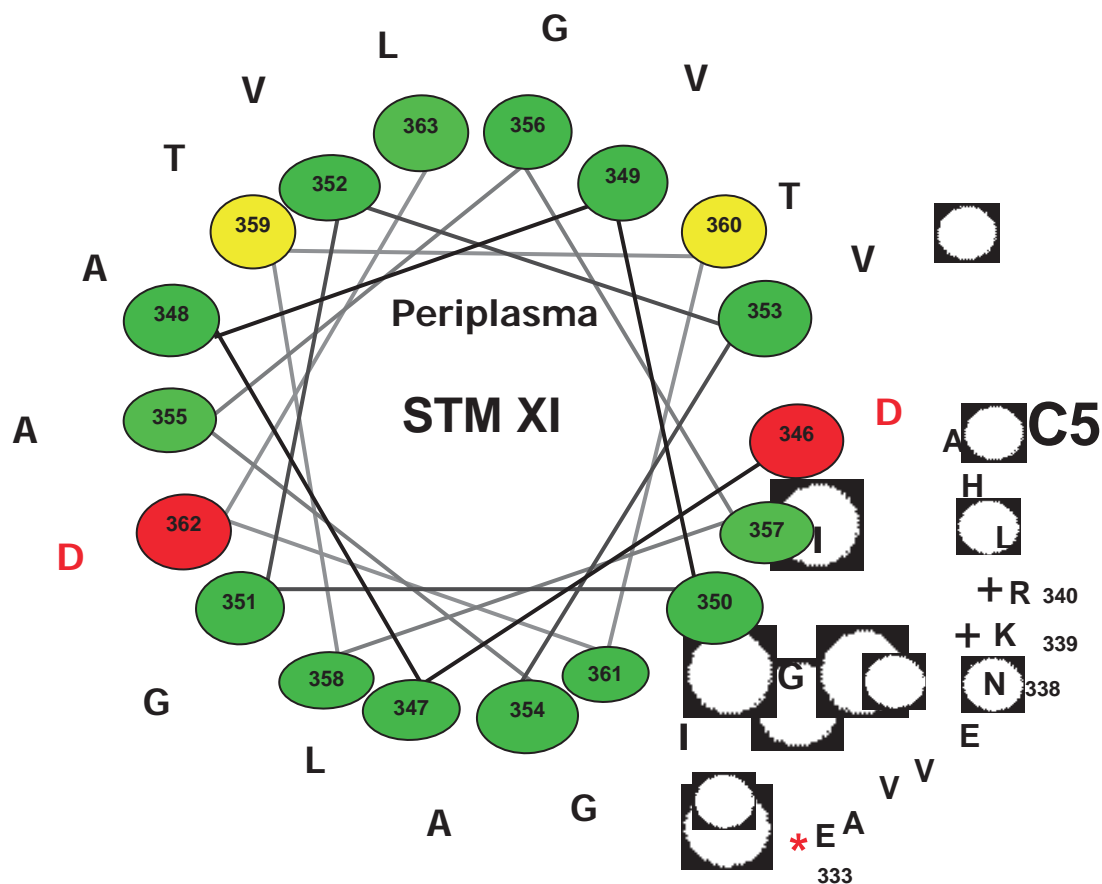


Figura 17. Modelo helicoidal de una parte del segmento transmembranal XI de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* visto desde el citoplasma. Los círculos numerados representan los residuos de la proteína. En rojo se representan las posiciones del Asp346 y Asp362. También se muestra a la derecha el asa citoplásmica 5. Con un asterisco se resalta el Glutamato 333, detectado como importante para la función de ChrA en el análisis previo (Cortés, 2007). Adaptado del diagrama generado por el programa *helicawheel* del servidor Swiss-prot.

al modelo hipotético de la estructura terciaria de la proteína ChrA propuesto por Moreno (2006) (**Figura 18**). Se puede observar en este modelo que el STM XI se encuentra cerca del STM VIII donde está presente el residuo básico Lisina 248, que también es esencial para la función de la proteína ChrA (Moreno, 2006). Esto nos lleva a pensar que el Aspartato 362 y la Lisina 248 pueden estar formando una interacción electrostática y con ello ayudar a mantener la correcta estructura de la proteína.

Es importante mencionar que falta medir la expresión de ChrA en las mutantes para descartar que la mutación la afecta.

Conclusión

Los residuos ácidos transmembranales Asp346 y Asp362 son esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*, probablemente porque participan en la formación de interacciones electrostáticas con residuos polares o de carga opuesta ayudando a mantener la correcta conformación de la proteína en la membrana.

Perspectivas

Para verificar si los seis residuos ácidos transmembranales son esenciales para el funcionamiento de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, es importante obtener la mutante Asp330Ala, que es la única faltante. Además, sería conveniente obtener otras mutantes de residuos como la Lisina 339 y la Asparagina 338, que se encuentran cercanos al Aspartato 346, que permitan establecer si son esenciales en el funcionamiento de ChrA. Se podrían también crear dobles mutantes que permitan predecir si alguno de estos residuos forma interacciones electrostáticas con el Aspartato 346. Finalmente, se podrían crear las dobles mutantes de los residuos ya detectados como esenciales en el funcionamiento de ChrA, por

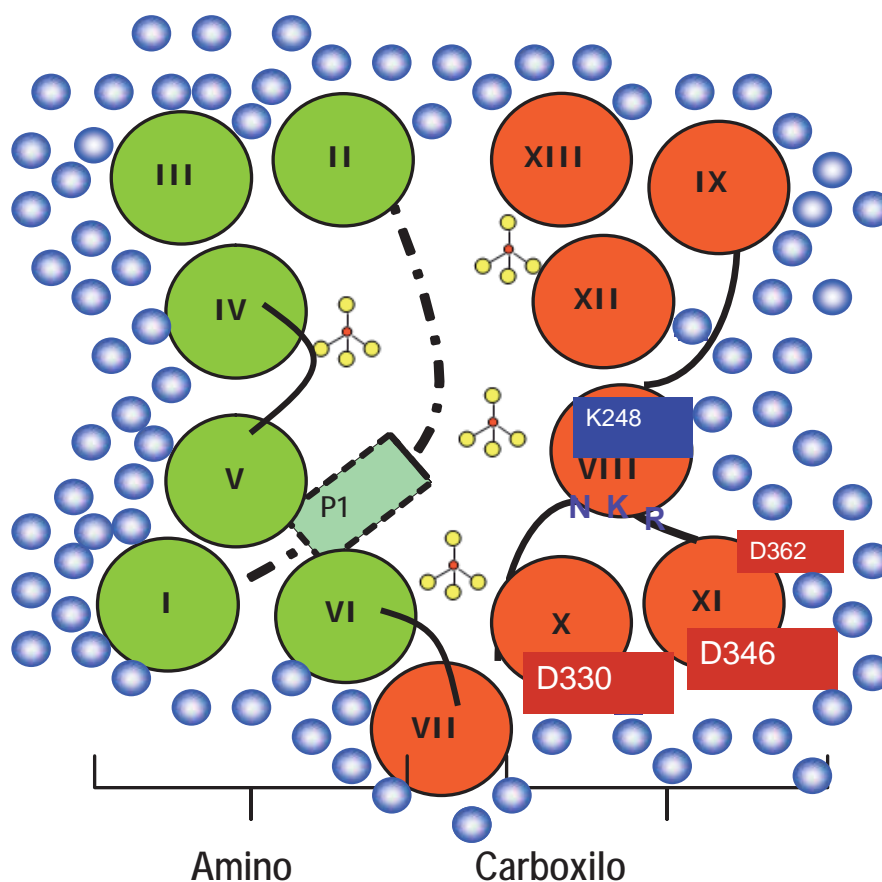


Figura 18. Modelo hipotético del arreglo de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* en la membrana. Los círculos grandes representan los 13 segmentos transmembranales numerados (I-XIII) en arreglo simétrico, visto en un corte transversal desde el citoplasma. Las líneas continuas representan las asas citoplásmicas y las discontinuas las periplásmicas. Los círculos pequeños esquematizan los lípidos de la membrana. El dominio amino de la proteína se localiza a la izquierda y el dominio carboxilo a la derecha. Se muestra el asa P1 como un rectángulo representando la estructura de hélice y una línea discontinua. Se muestra también la estructura tetraédrica de las moléculas de cromato a través del canal. Los rectángulos rojos representan los residuos ácidos mutados y el rectángulo azul representa el residuo esencial lisina 248. En azul se muestran los residuos básicos presentes en el asa C5 (Moreno 2006).

ejemplo Asp362Ala-Lys248Ala y Asp346Ala-Arg340Ala, que permitan predecir si estos residuos forman interacciones electrostáticas entre ellos.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, J.**, I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback 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 los residuos esenciales de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
- Aguilar, M. E.**, E. Paluscio, C. Cervantes y C. Rensing (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella sp.* strain ANA-3 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* (En revisión).
- Aguilera, S.** (2001) Identificación de aminoácidos esenciales para la función de la proteína ChrA. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
- Alloway, B. J.** (1990). Heavy metals in soils. Ed. Wiley Nueva York.
- 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.
- Birnboim, H. C.** y J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Cervantes, C.**, J. Campos-Garcia, S. Devars, F. Gutierrez-Corona, H. Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzman y R. Moreno-Sanchez (2001). Interactions of chromium with microorganisms 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.
- Cervantes, C.** y S. Silver (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27: 65-71.
- 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.
- 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.

Cortés, V. R. (2007). Participación de residuos ácidos en el funcionamiento de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.

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.

Díaz-Pérez, C., C. Cervantes, J. Campos-García, A. Julián-Sánchez y H. Riveros-Rosas (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. FEBS J. 274: 6215-6227.

Enderle, P. J. and M. A. Farwell (1998). "Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. " Biotechniques 25: 954-6, 958

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

Flores, L. J. (2008). Análisis funcional del Gen *chrNC* de *Neurospora crassa* en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. Facultad de QFB-UMSNH.

Glick, B. R. y Partenak, J. J. (1994). Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. Washington D. C., ASM Press.

Haeming, H. A. y R. J. Brooker (2004). 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. Q. 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.

Ishibashi, Y., C. Cervantes y S. Silver (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2268-2270.

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

Karbonowska, H., A. Wiater y D. Hulanicka (1977) Sulphate permease of *Escherichia coli* K12. Acta Biochim. Pol. 24:329-334

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.

Mathews, C. K. y. K. E. Van Holde (2006). 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.

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

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

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.

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.

Ohtake, H., C. Cervantes y S. Silver (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. J. Bacteriol. 169: 3853-3856.

Pardee, A. B., L. S. Prestidge, M. B. Whipple y J. Dreyfuss (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 241: 3962-3969.

Pérez, E. S. (2001) Expresión de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH

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, y col. (2000). “ Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. “ Biochemistry 39: 6521-8

Shelden, M. C., P. Loughlin, M. L. Tierney y S. M. Howitt (2003). Interactions between charged amino acid residues within transmembrane helices in the sulfate transporter SHST1. *Biochemistry*, 42: 12941-12949.

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

Sugden, K. D. y B. D. Martin (2002). Guanine and 7, 8-dihydro-8-oxo-guanine-specific oxidation in DNA by chromium (V). *Environ. Health Perspect.* 110: 725-728.

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*, 128: 51-56.

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 col. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. " *Gene* 33: 103-19