



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“Determinación de la topología membranal de la proteína
ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
QFB. RAFAEL JIMÉNEZ MEJÍA**

**ASESOR:
DR. CARLOS CERVANTES VEGA**

MORELIA, MICH.

DICIEMBRE 2005

INDICE

RESUMEN	4
I.- INTRODUCCION	5
1. Resistencia bacteriana a cromato	5
2.- Características de la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	6
3.- Mecanismo de resistencia a cromato por ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	6
4.- Proteínas de membrana	8
a) Características generales	8
b) Inserción de proteínas en la membrana	13
c) Plegamiento y estabilidad de proteínas de membrana	16
5.- Transportadores de membrana	19
6.- Análisis topológico de las proteínas de membrana	20
7.- Fusiones traduccionales con proteínas reporteras	21
8.- Topología de los transportadores bacterianos	25
II.- ANTECEDENTES	28
III.- HIPOTESIS	31
IV.- OBJETIVOS	31
a) General	31
b) Específicos	31
V.- MATERIALES Y METODOS	32
1.- Medios de cultivo	32
2.- Cepas	32
3.- Plásmidos	32
4.- Aislamiento de plásmidos	37
5.- Electroforesis en geles de agarosa	39
6.- Aislamiento de DNA de geles de agarosa	39

7.- Tratamientos enzimáticos de moléculas de DNA	40
a) Restricción con endonucleasas	40
b) Ligación	41
8.- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	41
9.- Preparación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	42
10.- Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	42
11.- Mutagénesis dirigida	43
a) Diseño de oligonucleótidos mutagénicos	43
b) Desnaturalización alcalina	44
c) Reacción de alineamiento y síntesis de la cadena mutada	44
d) Transformación	45
12.- Obtención de los fragmentos de <i>chrA</i> para las fusiones traduccionales	46
a) Oligonucleótidos empleados	46
b) Amplificación	46
13.- Construcción de las fusiones traduccionales	46
14.- Determinación de la secuencia de nucleótidos	48
15.- Análisis de las secuencias	48
16.- Análisis de la expresión de las fusiones traduccionales	49
17.- Ensayos enzimáticos	49
a) Determinación de la actividad de β -galactosidasa	50
b) Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina	51
VI.- RESULTADOS	52
1.- Mutagénesis del sitio interno <i>KpnI</i>	52
2.- Amplificación de los fragmentos de <i>chrA</i> por PCR	54
3.- Clonación de los productos de PCR	54
4.- Construcción de fusiones traduccionales en los vectores de expresión pECD636 y pECD637	58
5.- Construcción de los vectores de expresión pUCPphoA y pCUPlacZ	61
6.- Construcción y caracterización de las fusiones en los vectores pUCPphoA y pUCPlacZ	64

7.- Secuenciación de las fusiones traduccionales	69
8.- Cuantificación de la actividad enzimática de las fusiones	74
a) Cuantificación de la actividad enzimática en <i>E. coli</i> CC118	74
b) Actividad enzimática de las fusiones traduccionales en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	75
9.- Localización de las fusiones en el modelo topológico propuesto para ChrA	75
 VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	 83
 VIII.- BIBLIOGRAFIA	 97

RESUMEN

La proteína ChrA de *P. aeruginosa* de 416 aminoácidos ha sido caracterizada a nivel funcional y se determinó que funciona como un transportador que expulsa el cromato del citoplasma; sin embargo, sólo se cuenta con información estructural de la región amino terminal de la proteína, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la topología membranaral de este transportador utilizando fusiones traduccionales con los genes reporteros *phoA* (fosfatasa alcalina) y *lacZ* (β -galactosidasa). Para ello se construyeron los vectores de expresión binarios *E. coli*-*Pseudomonas* pUCPphoA y pUCPlacZ y se hicieron 16 fusiones en cada uno de estos vectores. Las fusiones con cada una de las proteínas reporteras se localizaron en diferentes regiones hidrofílicas de la proteína. La determinación de la actividad enzimática de los reporteros se hizo en *E. coli* y en *P. aeruginosa*, con resultados muy similares. Las fusiones localizadas en los aminoácidos Ala188, Val233, Ala310, y Pro413 sólo mostraron actividad de PhoA lo cual indica que las regiones donde se encuentran estos residuos se localizan en el periplasma, mientras que las fusiones en los aminoácidos Ile159, Phe263, Asp276, Ala334 y Asn393 sólo produjeron actividad de LacZ, indicando que las asas hidrofílicas donde se encuentran estos aminoácidos se localizan el citoplasma. Las fusiones en los aminoácidos Glu369 y Gly416 produjeron actividad enzimática de las dos proteínas reporteras y estas regiones fueron localizadas en el peripasma. Con las fusiones en los aminoácidos Leu99, Val152, Asp162, Gly305 y Met313 no se obtuvo actividad de ninguna de las enzimas, lo que sugiere que estos aminoácidos están en un segmento transmembranaral (STM). Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con el modelo topológico previo propuesto para ChrA de 12 STM y son consistentes con un modelo topológico de 13 STM. Se concluye que la proteína ChrA consta de 13 STM conectados por seis asas periplásmicas y seis asas citoplásmicas con el amino terminal en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma.

I.- INTRODUCCION

1. Resistencia bacteriana a cromato

La exposición de las bacterias a los iones tóxicos de los metales y metaloides presentes en el ambiente ha seleccionado variantes resistentes con genes que codifican mecanismos específicos de resistencia (Cervantes y Silver, 1996). Los determinantes genéticos de resistencia a iones tóxicos generalmente se encuentran en plásmidos y en algunos casos en el cromosoma (Cervantes y col., 1990). Una gran variedad de bacterias resistentes al cromato (CrO_4^{2-}) han sido reportadas hasta la fecha, incluyendo cepas ambientales y de origen clínico. La resistencia cromosómica a cromato se debe generalmente a la alteración de los sistemas de transporte de sulfato, disminuyendo su entrada y consecuentemente la entrada del ión tóxico (Ohta y col., 1971). Otro mecanismo de resistencia cromosómica es la reducción del Cr(VI) a la forma menos tóxica del Cr(III) (Cervantes y Silver, 1992). Los mecanismos de resistencia a cromato localizados en plásmidos son diferentes a los generados por la resistencia cromosómica. Se sabe que la resistencia conferida por plásmidos radica en la disminución en la acumulación del ión tóxico (Ohtake y col., 1987). De las cepas bacterianas resistentes a cromato aisladas, sólo los determinantes de resistencia codificados por los plásmidos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de *Alcaligenes eutrophus* (Nies y col., 1990) se han caracterizado a nivel molecular. El determinante de pUM505 fue clonado y secuenciado y del análisis de la secuencia se detectó un gen que codifica una proteína denominada ChrA

(Cervantes y col., 1990). ChrA es un polipéptido altamente hidrofóbico de 416 aminoácidos.

2.- Características de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*

La proteína ChrA pertenece a la familia de antiportadores de iones cromato/sulfato CHR (Nies y col., 1998). De los 416 aminoácidos de ChrA 258 (62%) tienen cadenas laterales hidrofóbicas (Gly, Ala, Leu, Val, Ile, Pro, Met, Trp y Phe), 100 (24%) son residuos polares sin carga (Tyr, Thr, Ser, Gln, Asn y Cys), 33 (8%) son básicos con carga positiva (Arg, Lys y His) y 25 (6%) son aminoácidos ácidos con cadenas laterales cargadas negativamente (Glu y Asp). Por su alto nivel de aminoácidos hidrofóbicos y por su perfil hidropático, se sugirió que ChrA de *P. aeruginosa* es una proteína de membrana (Cervantes y Silver, 1992). Posteriormente se propuso que ChrA contiene 12 dominios transmembranales conectados por 6 asas periplásmicas y 5 citoplásmicas, con sus extremos amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma, donde 252 aminoácidos se encuentran inmersos en la membrana constituyendo los 12 STM y 164 fuera de ésta formando las asas a ambos lados de la membrana (**Figura 1**) (Aguilera y col., 2004).

3.- Mecanismo de resistencia a cromato por ChrA en *P. aeruginosa*

La tolerancia a cromato conferida por la proteína ChrA fue asociada con la disminución en la acumulación del cromato en el citoplasma y se propuso que estaba involucrada en la expulsión de los iones cromato (Cervantes y col., 1990). Para determinar el mecanismo de resistencia a cromato por la proteína

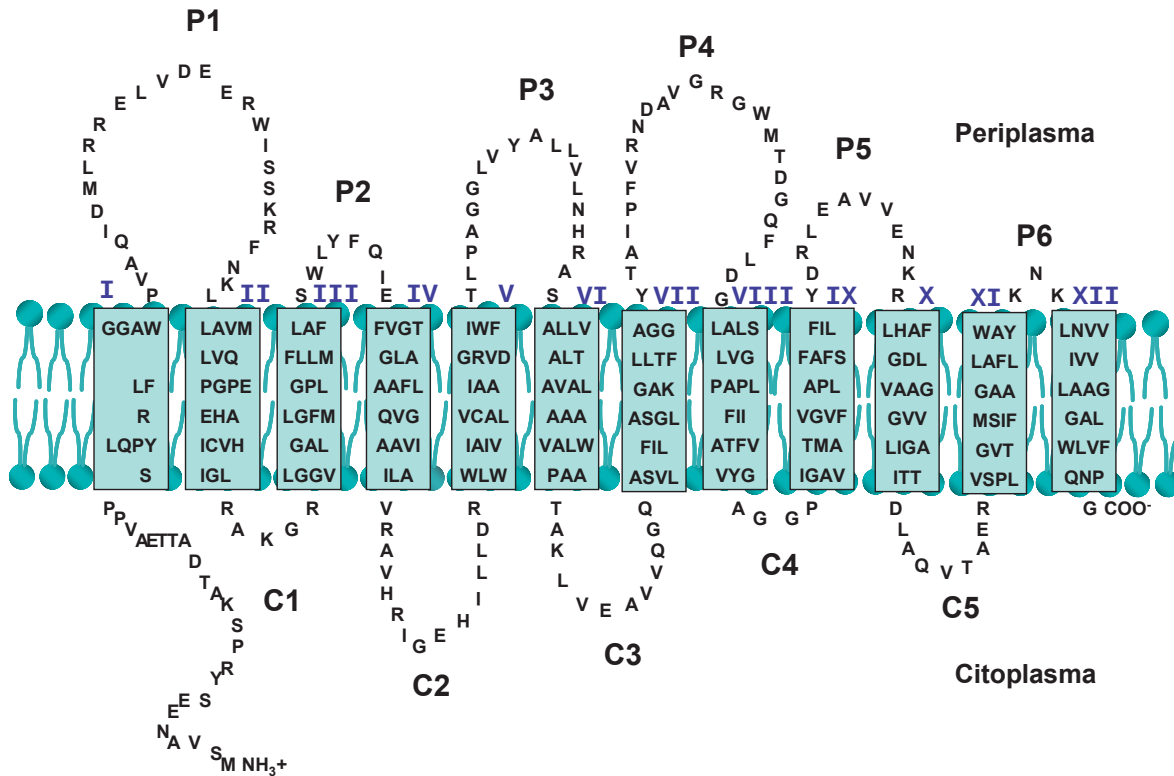


Figura 1.- Modelo topológico propuesto para la proteína ChrA. Los aminoácidos se representan en código de una letra, ChrA consta de 416 residuos que están distribuidos en 12 dominios transmembranales (representados por los rectángulos), unidos por seis asas periplásmicas (P1-P6), y cinco asas citoplásmicas (C1-C5), con sus extremos amino y carboxilo en el citoplasma. Tomada de Aguilera y col., 2004.

ChrA de *P. aeruginosa*, en 1999 Alvarez y col. usando vesículas de membrana invertidas, demostraron que esta proteína participa en la expulsión de cromato. Las vesículas de las células de *P. aeruginosa* resistentes a cromato que expresaban ChrA acumularon más cromato que las vesículas preparadas a partir de células sensibles sin plásmido. Por otro lado, el mecanismo de expulsión que confiere resistencia a cromato por la proteína ChrA de *P. aeruginosa* se comprobó *in vivo* (Pimentel y col., 2002). En estos experimentos se demostró que las suspensiones celulares de la cepa resistente “cargadas” con cromato radiactivo expulsan más cromato que las suspensiones de las bacterias sensibles cargadas con el ión. La expulsión activa de cromato promovida por ChrA utiliza el potencial electroquímico de membrana como fuente de energía (**Figura 2**).

4.- Proteínas de membrana

a) Características generales

Las proteínas de membrana son polipéptidos que tienen regiones con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos las cuales cruzan la bicapa lipídica una o varias veces. Debido a que las proteínas de membrana participan en los diferentes procesos que tienen lugar en la bicapa lipídica como son: transporte, producción de energía, fotosíntesis, recepción y transducción de señales e interacción célula-célula, entre otras (Reithmeier, 2001). Se ha establecido que el conocimiento de la estructura proteica es esencial para el entendimiento de su función pues permite conocer la localización precisa de regiones o aminoácidos importantes. Debido a la dificultad de generar cristales de proteínas de membrana, sólo se conoce la estructura tridimensional detallada de un pequeño grupo de

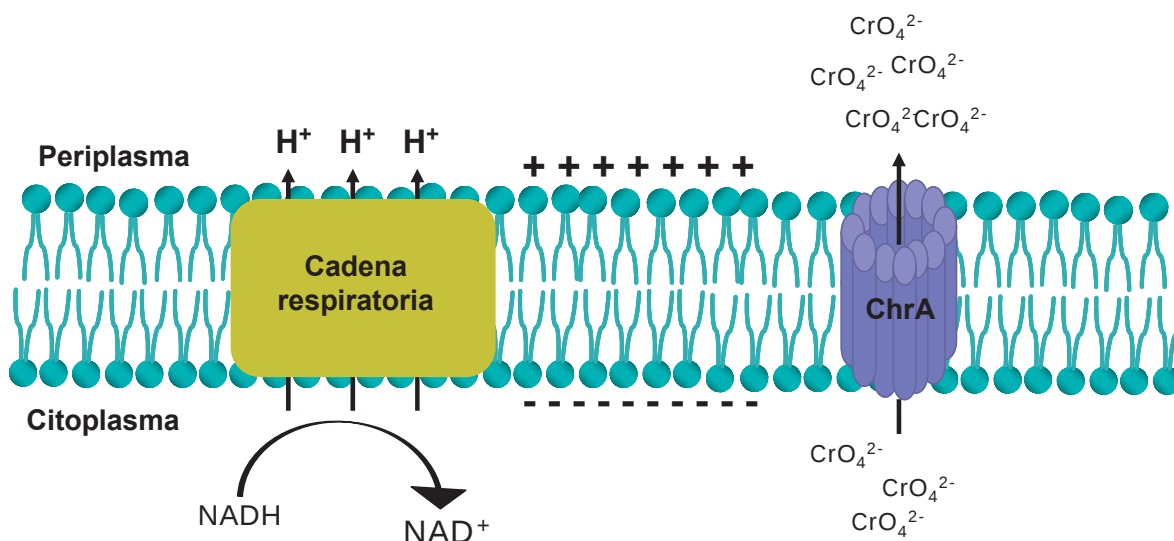


Figura 2. Sistema de expulsión de cromato por la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. La proteína membranal ChrA expulsa los iones cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma hacia el espacio periplásmico empleando el potencial de membrana generado durante el bombeo de protones de la cadena respiratoria. Adaptado de Alvarez, 1999.

estas moléculas, la cual ha sido dilucidada empleando métodos cristalográficos (Tusnády y col., 2004). Un aspecto importante de la estructura de las proteínas de membrana es su topología membranal, esto es, el número y la orientación de los segmentos de la proteína que atraviesan la bicapa lipídica. De acuerdo a su topología, las proteínas de membrana se clasifican en bitópicas o politópicas. Las proteínas bitópicas poseen un sólo segmento transmembranal (STM) que conecta dos dominios de la proteína localizados en ambos lados de la membrana. Estas a su vez se pueden agrupar en dos clases: las proteínas que tienen el extremo amino terminal en el exterior de la membrana y las que tienen el amino en el interior (**Figura 3A**) (Reithmeier, 2001). En el caso de las proteínas politópicas, varios STM atraviesan la membrana unidos por asas hidrofílicas en ambos lados de la bicapa (**Figura 3B**) (van Geest y Lolkema, 2000). Las proteínas de membrana también se pueden clasificar, de acuerdo al tipo de plegamiento que presentan, en las proteínas α cuyo plegamiento mayoritario son hélices α y proteínas β , de plegamiento en forma de láminas β . Las proteínas de plegamiento α son la forma predominante en la membrana citoplásmica, mientras que las proteínas β se encuentran principalmente en la membrana externa de bacterias (**Figura 4**) (White y Wimley, 1999).

Aunque las proteínas de membrana muestran una estructura y tamaño muy variados, se han identificado ciertos rasgos comunes entre ellas, sobre todo los relacionados con sus interacciones con el ambiente hidrofóbico en que habitan. Entre las características comunes de las proteínas de membrana de hélices α resaltan que los STM son, por lo general, tramos de 20 aminoácidos, en su

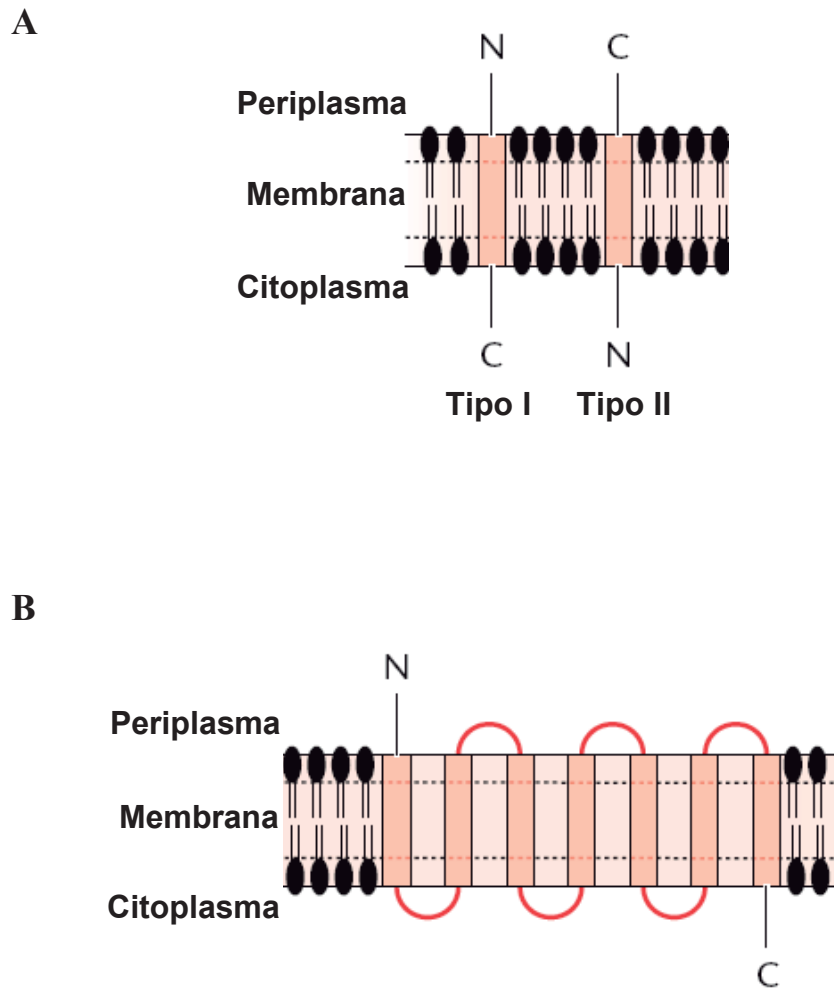


Figura 3.- Clases de proteínas integrales de membrana. **A)** Proteínas bitópicas que tienen un sólo segmento transmembranaral (representado por el rectángulo sombreado) tipo I y II, con los extremos amino (N) y carboxilo (C) en lados opuestos de la membrana. **B)** Proteínas politópicas que poseen varios segmentos transmembranarales conectados por asas hidrofílicas (líneas curvas) en ambos lados de la membrana; se muestra un ejemplo con el N y C terminales en lados opuestos de la membrana. Modificado de Reithmeier 2001.

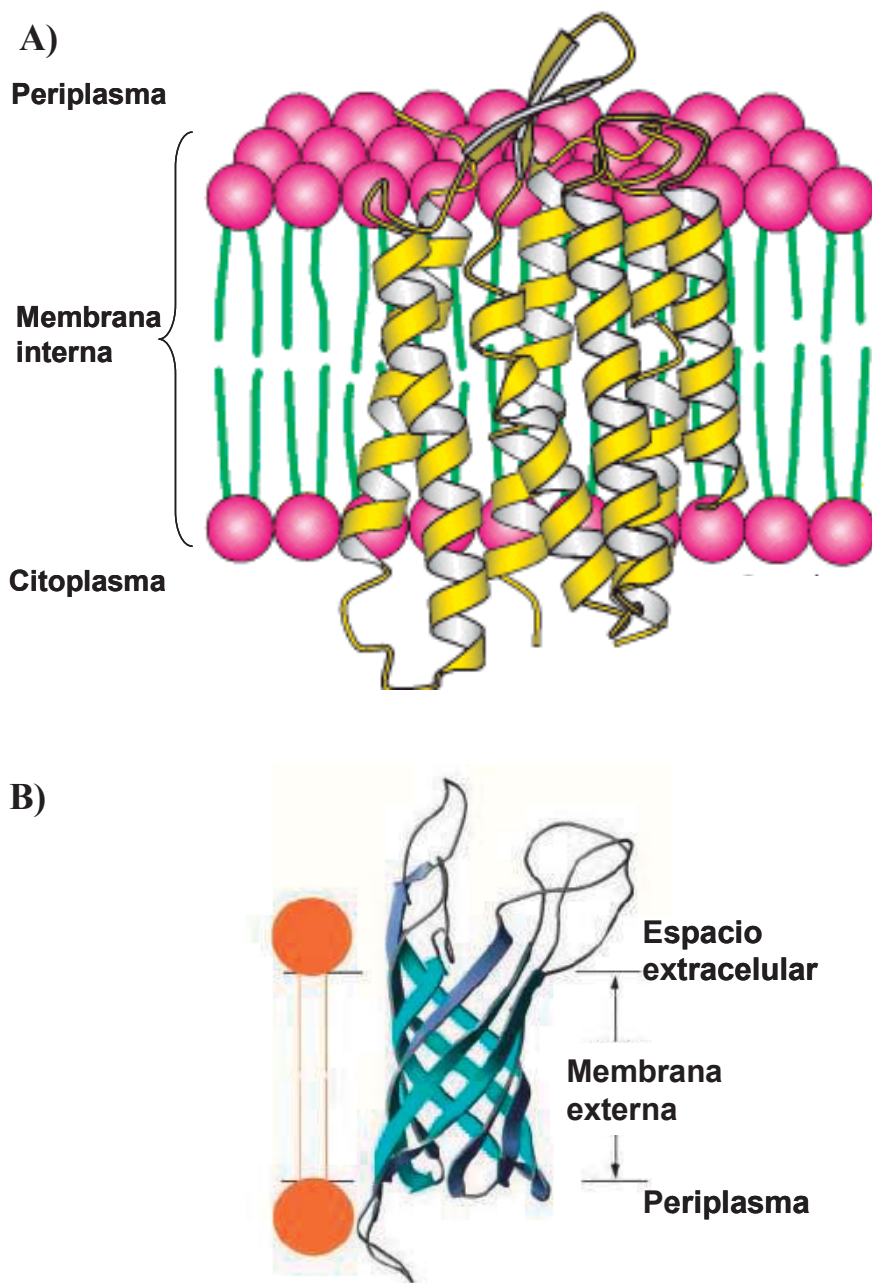


Figura 4.- Estructura de las proteínas de membrana. Se muestra la estructura de dos proteínas de membrana que cruzan la bicapa varias veces mediante hélices α (A) o láminas β (B), conectadas por asas hidrofílicas en ambos lados de la membrana. Modificada de Berg y col., 2002 y Tamm y col., 2001.

mayoría de naturaleza hidrofóbica, que se encuentran inmersos en la membrana manteniendo una orientación perpendicular con respecto al plano de la bicapa. Los STM están unidos por asas extramembranales de tamaño variable y compuestas por aminoácidos mayormente hidrofílicos (von Heijne, 1998).

Como ocurre con todas las membranas biológicas, las membranas bacterianas son estructuras asimétricas, esto es, las caras interna y externa presentan una composición diferente de lípidos y de proteínas y están expuestas a ambientes acuosos distintos. Se ha postulado que la distribución de las asas hidrofílicas de las proteínas de membrana obedece la llamada regla de “positivos adentro” (von Heijne, 1992), que señala que las asas no translocadas, o citoplásmicas, muestran una mayor proporción de aminoácidos con carga positiva (principalmente arginina y lisina), en comparación con las asas que son translocadas al periplasma.

b) Inserción de proteínas en la membrana

Una gran cantidad de proteínas deben ser transportadas o insertadas en la membrana; la mayoría de éstas lo hace de manera cotraduccional, por acción concertada de la traducción por el ribosoma y el complejo proteico denominado translocón, localizado en la membrana plasmática de procariotas o en la membrana del retículo endoplásmico (RE) de eucariotas. (White y von Heijne, 2004). Los translocones de las bacterias y del RE tienen una composición muy similar. El “core” del translocón de procariotas está formado por las proteínas SecY, SecE y SecG que son homólogos a Sec61 α , Sec61 β y Sec61 γ de eucariotas, respectivamente. Cuatro heterotrímeros de SecYEG se oligomerizan

para formar un canal de translocación funcional. Las proteínas de membrana SecDF y YajC son factores adicionales que participan de forma indirecta en la translocación; además, la proteína de membrana periférica SecA que es una ATPasa proporciona la energía requerida para la translocación y el componente citoplásmico SecB, que funciona como chaperona (von Heijne, 1999).

Las proteínas de membrana son reconocidas de forma muy similar en procariotas y en eucariotas por la vía de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP; compuesta por la proteína Ffh y una molécula de RNA 4.5S), donde SRP se une al péptido señal (secuencia en el extremo amino terminal de la proteína que funciona como marcaje en proteínas que van a ser secretadas o insertadas en la membrana) o al primer STM de la cadena nasiente que se está traduciendo en el ribosoma. La unión de SRP pausa la traducción y SRP unido al ribosoma es dirigido a su receptor en la membrana (SR) donde se acopla el ribosoma y la cadena nasiente al translocón. La cadena nasiente, liberada de SRP, entra al translocón que está sellado por el ribosoma para formar un canal continuo que permite la traducción y la translocación o la inserción en la membrana (**Figura 5**) (de Gier y Luirink, 2001; Turner, 2003). En el caso de proteínas de membrana, los STM hidrofóbicos son atrapados en el translocón y en alguna etapa se mueven hacia la bicapa lipídica; el mecanismo no es claro pero parece diferir dependiendo de la naturaleza, número y orientación de los STM. La química básica de la integración de las proteínas en la membrana está comenzando a ser comprendida. De acuerdo a un modelo para la vía de integración de proteínas de membrana, este proceso puede ser dividido en dos etapas: (1) Las hélices transmembranales salen lateralmente del translocón por el particionamiento

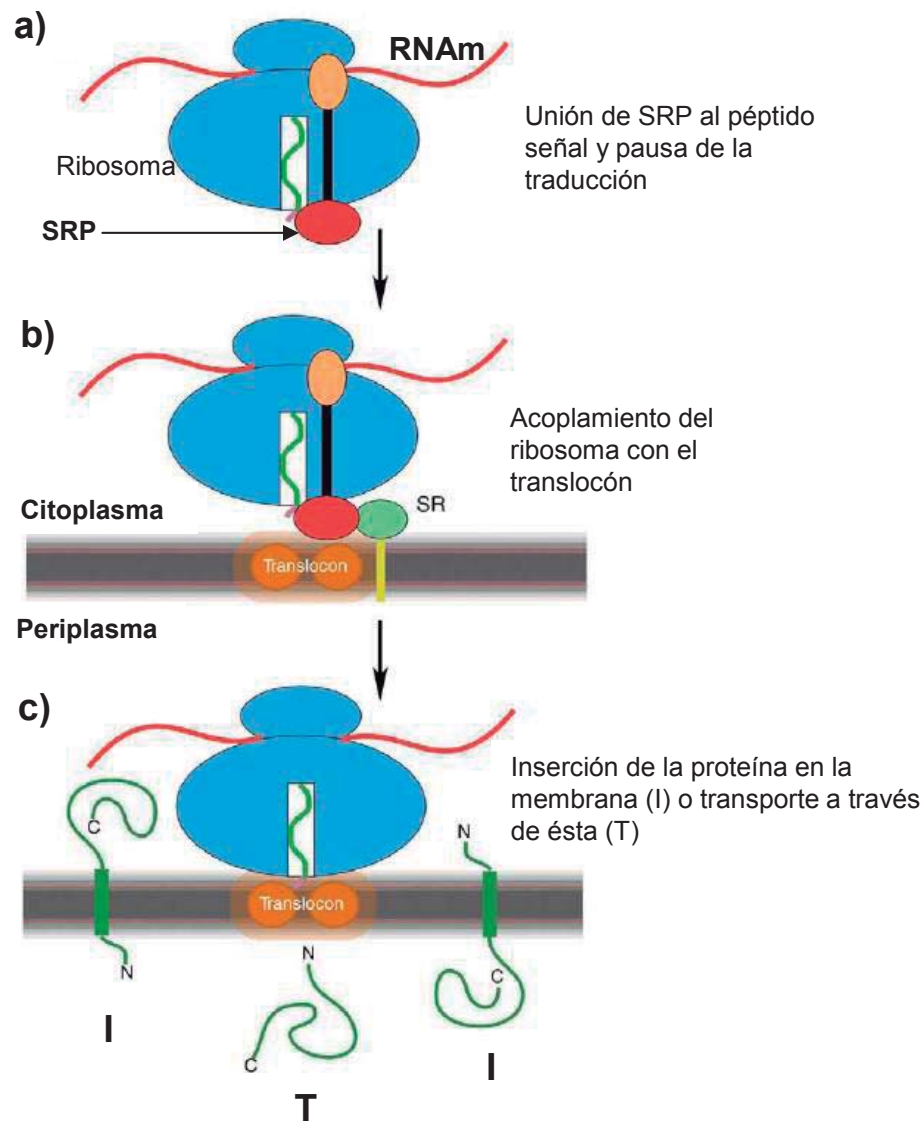


Figura 5- Inserción de proteínas de membrana. Se muestran las diferentes etapas que ocurren durante el transporte de proteínas a través de la membrana o durante su inserción en la bicapa. a) Unión de SRP (partícula de reconocimiento de la señal) al péptido señal y pausa temporal de la traducción; b) Acoplamiento del ribosoma con el translocón; y c) Transporte o inserción de la proteína en la membrana. RNAm = RNA mensajero. Modificada de White y von Heijne, 2004.

termodinámico de los lípidos; y (2) Las hélices se asocian dentro del canal del translocón formando una estructura tridimensional definida y posteriormente se mueven en grupo hacia la membrana (Chin y col., 2002).

c) Plegamiento y estabilidad de proteínas de membrana

Las proteínas de membrana son insertadas en la bicapa por un proceso de traducción/inserción, después de su salida del translocón, éstas residen en la membrana en un estado termodinámico de energía libre mínimo (White y Wimley, 1999). La bicapa lipídica, en la cual las proteínas se pliegan y funcionan, tiene dos regiones con propiedades diferentes: el centro hidrofóbico de la bicapa, formado por las cadenas hidrofóbicas, y la interfase, formada por las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos. Una vez que una proteína es integrada en la membrana, el siguiente paso es el plegamiento, en donde las hélices transmembranales interaccionan unas con otras para formar una estructura tridimensional específica (Dalbey y Kuhn, 2000). Para el plegamiento de proteínas de hélices α se ha propuesto un modelo de dos etapas en el cual la inserción en la membrana de cada hélice es independiente y estable (etapa I); esto es seguido por la interacción entre las hélices en la membrana para dar una estructura de plegamiento más ordenado y, en algunos casos, la oligomerización (etapa II) (**Figura 6**) (Engelman y col., 2003).

El plegamiento de las proteínas de membrana es energéticamente diferente del proceso llevado a cabo en proteínas solubles debido a que en las proteínas de membrana la hidrofobicidad no es la principal fuerza conductora, sino las interacciones físicas de las cadenas polipeptídicas con el agua, la interacción

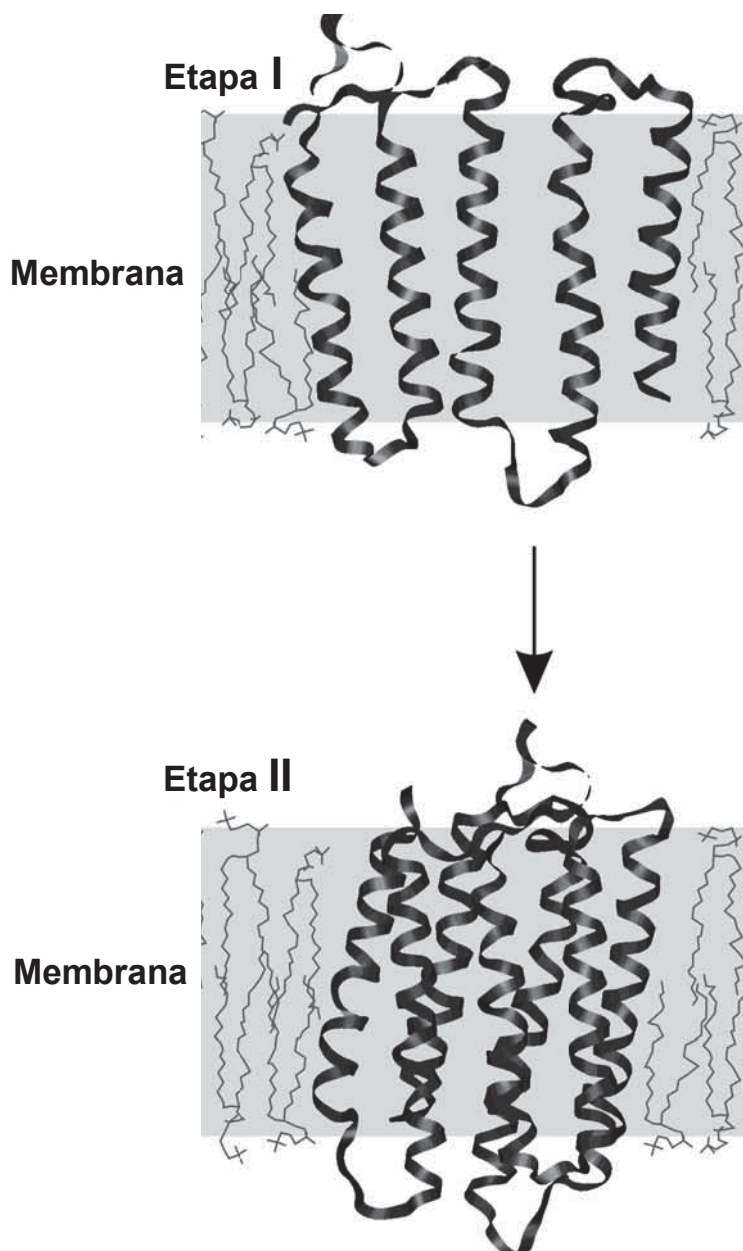


Figura 6.- Modelo de dos etapas para el plegamiento de proteínas de membrana. Se muestra una proteína de membrana cuyas hélices han sido integradas en la membrana de forma independiente (etapa I). Posteriormente, éstas interaccionan unas con otras para formar una estructura tridimensional más ordenada y funcional (etapa II). Modificada de Engelman y col., 2003.

de una hélice con otra, con el centro hidrofóbico de la bicapa, con las interfases de la bicapa y con cofactores para aquellas proteínas que los contienen (Helms, 2002).

La estabilidad de las hélices transmembranales depende de la hidrofobicidad del STM, de los enlaces de hidrógeno intrahelicales entre átomos de la cadena, así como de la interacción con otras hélices. La vasta información recabada de la estabilidad de hélices α se ha obtenido a partir de proteínas solubles debido a que la gran mayoría de las estructuras tridimensionales que se conocen son de este tipo de proteínas. Sin embargo, esta información tiene una aplicación limitada a hélices de proteínas de membrana debido a que la bicapa es un ambiente completamente diferente. Por ejemplo, en las proteínas solubles los aminoácidos leucina (Leu) y alanina (Ala) son los principales residuos formadores de hélices, mientras que isoleucina (Ile) y valina (Val) son desestabilizadores y son frecuentemente encontrados en láminas β . La glicina (Gly) desestabiliza fuertemente las hélices y prolina (Pro) es conocido como un residuo rompedor de hélices. En contraste, en las proteínas de membrana los aminoácidos Val, Leu e Ile son efectivos formadores de hélices (Li y Deber, 1994), mientras que Gly se encuentra muy frecuentemente (8.9% del total de aminoácidos) en medio de STM, participando en la asociación de hélices transmembranales (Russ y Engelman, 2000). A pesar de los efectos desestabilizadores, la prolina es bien tolerada en hélices TM y se encuentra en el interior de STM con una frecuencia de 2.2%, donde a menudo causa doblamientos locales o distorsiones de estructuras helicoidales que pueden ser relevantes para la función proteica (von Heijne, 1991).

La mayoría de las proteínas de membrana cuya estructura ha sido determinada tienen una distribución de aminoácidos aromáticos en la interfase membrana-agua; la función de estos residuos en la interfase no es clara pero probablemente está relacionada a la fuerte afinidad de Trp y Tyr con esta región, por lo que se ha propuesto que pueden contribuir a la estabilidad de las hélices (Killian y von Heijne, 2000).

5.- Transportadores de membrana

Las proteínas integrales de membrana representan una clase importante de proteínas que están involucradas en una gran cantidad de funciones celulares dentro de las que se encuentra la de transporte a través de la bicapa lipídica, transducción de señales y generación de energía, entre otras. Los sistemas de transporte permiten la entrada de nutrientes, la excreción de productos del metabolismo, la expulsión de sustancias tóxicas, la captura y expulsión de iones, la secreción de proteínas y carbohidratos y el transporte de ácidos nucleicos, entre otras funciones (Saier, 2000). Los transportadores requieren de energía para su función y de acuerdo al tipo de energía que usan se pueden clasificar en transportadores primarios o secundarios. Los transportadores primarios requieren una fuente de energía primaria para su función, como pueden ser: la hidrólisis de adenosintrifosfato (ATP), la absorción de fotones, el flujo electrónico, la descarboxilación de sustratos o la transferencia de grupos metilo. Los transportadores secundarios, por otro lado, requieren para su función potenciales electroquímicos generados por los transportadores primarios (Pao y col., 1998).

6.- Análisis topológico de las proteínas de membrana

La determinación de la topología de las proteínas membranales es importante para entender su función puesto que ayuda a conocer la localización de residuos o regiones esenciales para la función o para la correcta estructura de la proteína en estudio. Sin embargo, la dificultad de la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas de membrana ha impulsado el desarrollo de métodos para obtener información estructural basados principalmente en técnicas moleculares y ayudados por técnicas biofísicas. Un primer paso para este fin es la localización de regiones hidrofóbicas en la secuencia de aminoácidos. Esto se logra mediante la obtención de un “perfil hidropático”, empleando programas de cómputo (Moller y col., 2001). El perfil hidropático es un análisis del grado de hidrofobicidad que presenta una proteína a lo largo de su secuencia de aminoácidos. Este perfil permite identificar regiones o dominios hidrofóbicos que representen STM potenciales, así como localizar las posibles asas hidrofílicas que los conectan. Sin embargo, para determinar la orientación precisa de los probables STM se debe realizar un análisis topológico profundo ya que los métodos de predicción más precisos, aunque son de mucha ayuda, tienen aproximadamente un 75% de certeza de sus resultados (Nilsson y col., 2000), por lo que pueden predecir un número mayor o menor de STM en una proteína. Con este propósito se han diseñado y aplicado diversos métodos bioquímicos que se basan en la modificación de la proteína en estudio, generalmente mediante la manipulación molecular del gen correspondiente. Dentro de estos métodos se encuentran las fusiones traduccionales con genes reporteros, el monitoreo de cisteínas, accesibilidad a proteasas y la inserción de epítomos (van Geest y Lolkema, 2000).

7.- Fusiones traduccionales con proteínas reporteras

Una estrategia para obtener la información topológica de una proteína de membrana es mediante el uso de fusiones génicas, en las cuales el gen que codifica una proteína “reportera” (molécula cuyas propiedades, por ejemplo su actividad enzimática, depende de su localización celular) se fusiona con el gen de la proteína en estudio en sitios que se supone, de acuerdo al perfil hidropático, codifican asas o dominios hidrofílicos. La proteína híbrida generada por la fusión es el resultado de la traducción de los dos genes, unidos de tal forma que conservan sus marcos de lectura “en fase”, por lo que se producirá un sólo polipéptido. Las propiedades de la proteína fusionada resultante indicarán en qué parte de la membrana se localiza el sitio donde ocurrió la fusión (van Geest y Lolkema, 2000).

La proteína reportera más utilizada para estudios de fusiones génicas en bacterias es la enzima fosfatasa alcalina, codificada por el gen *phoA* de *Escherichia coli*. La fosfatasa (PhoA), cuya forma activa se localiza en el espacio periplásmico, se sintetiza como un precursor con una secuencia señal N-terminal que es eliminada durante su transporte a través de la membrana (Derman y Beckwith, 1991). PhoA es activa en el periplasma debido a que el plegamiento correcto y ensamble de PhoA ocurre sólo después de su exportación a este compartimiento, donde se forman dos enlaces disulfuro que le confieren una conformación parcialmente resistente a proteasas. De tal manera que cuando es fusionada a un dominio periplásmico de una proteína de membrana, PhoA es transportada hacia el periplasma donde es activa (**Figura 7**), mientras que si se

fusiona a un dominio citoplásmico, PhoA se queda en este compartimiento donde es inactiva.

Las fusiones a la enzima β -galactosidasa (LacZ) de *E. coli* con frecuencia son usadas de manera complementaria a las fusiones con PhoA. A diferencia de PhoA, LacZ sólo tiene actividad enzimática en el citoplasma, debido a que los grupos sulfhidrilo esenciales de sus residuos de cisteína permanecen reducidos por el pH más ácido de este compartimiento (Snyder y Silhavy, 1995). Así, cuando se fusiona a un dominio citoplásmico de una proteína de membrana, LacZ es activa (**Figura 8**), mientras que si se une a una señal de exportación, la enzima queda atrapada en la membrana, lo cual evita su plegamiento apropiado y la enzima es inactiva (van Geest y Lolkema, 2000). De esta manera, la determinación de la actividad de estas dos enzimas, en fusiones construidas de distintas regiones de la proteína de membrana en estudio, puede permitir conocer su localización celular.

Otra proteína reportera que se ha empleado como alternativa a PhoA es la enzima β -lactamasa. Cuando la enzima se expresa en el periplasma es activa y confiere resistencia a antibióticos lactámicos. Existen otras proteínas reporteras útiles para el análisis topológico de proteínas de membrana como son la proteína verde fluorescente, la β -glucuronidasa y la cloranfenicol acetiltransferasa; sin embargo, estas proteínas no se han utilizado mucho aún.

8.- Topología de los transportadores bacterianos

En muchos de los casos reportados, el análisis topológico de las

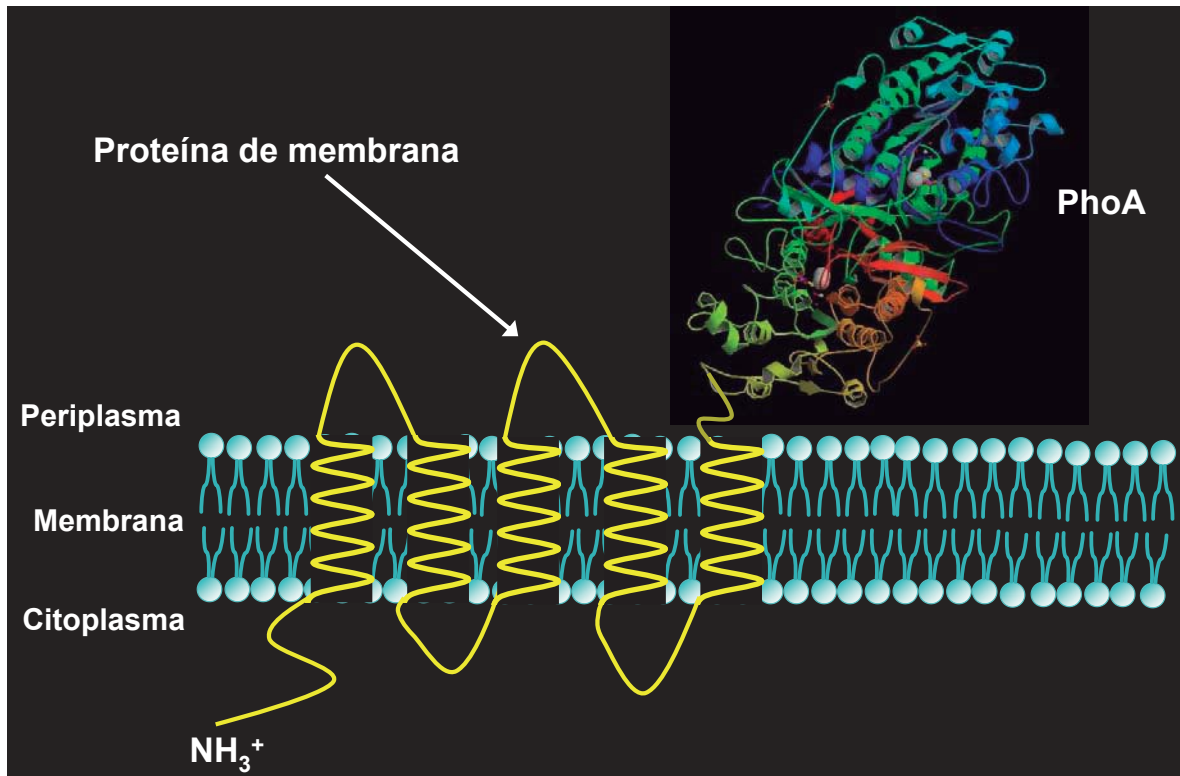


Figura 7. Fusiones traduccionales con fosfatasa alcalina. Se muestra el esquema de una proteína hipotética que cruza varias veces la membrana. Una fusión traduccional con PhoA en un dominio periplásmico da como resultado que la enzima se transporte hacia ese compartimiento, donde es activa.

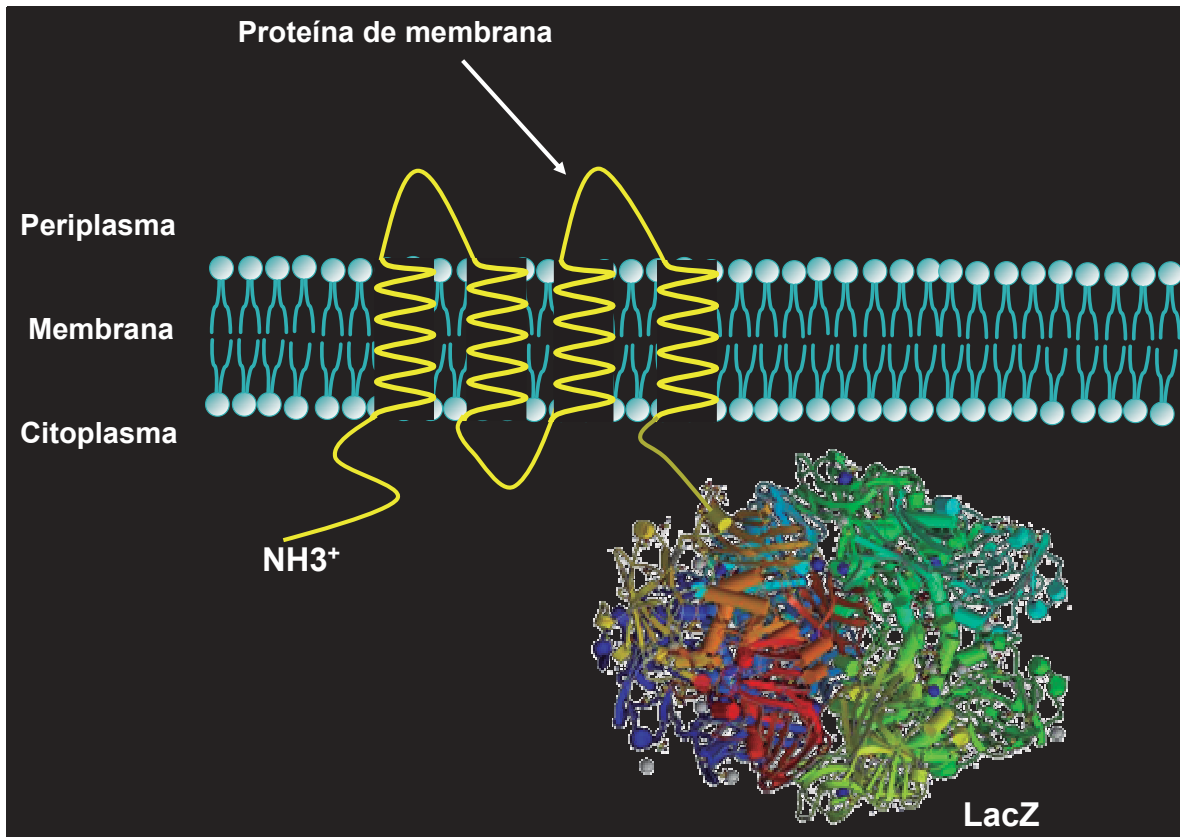


Figura 8. Fusiones traduccionales con β -galactosidasa. Se muestra el esquema de una proteína hipotética que cruza varias veces la membrana. Una fusión traduccional con LacZ en un dominio citoplásmico resulta en la localización de la enzima en ese compartimiento, donde es activa.

proteínas de membrana bacterianas ha permitido confirmar la información preliminar obtenida a partir del perfil hidropático, pero se han reportado también ejemplos en los que la información obtenida por este perfil no concuerda con la topología determinada experimentalmente, esto es, se predice un número menor o mayor de STM. En una búsqueda bibliográfica de transportadores bacterianos con topología conocida, principalmente transportadores de la membrana interna, se identificaron 111 proteínas transportadoras (Jiménez y Cervantes, 2005). La mayoría de los transportadores encontrados (62 proteínas o 55%) correspondió a proteínas de *E. coli* y le siguieron, aunque en menor grado, otras bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (nueve proteínas) y *Salmonella typhimurium* (siete proteínas). Sólo nueve transportadores (8%) fueron de especies de bacterias Gram positivas. Para el análisis de la topología membranaral sobresalió el uso de fusiones traduccionales con fosfatasa alcalina (77 casos o 69%) ya sea sola, en combinación con β -galactosidasa, o con otras reporteras. También se han empleado fusiones con la β -lactamasa y el monitoreo de cisteínas para la determinación de la topología de transportadores.

Con respecto al número de STM que poseen los transportadores reportados se dividieron en dos grupos (Jiménez y Cervantes, 2005): en el primero se encuentran las proteínas que tienen la función de transportadores por sí solas y en el segundo las proteínas que son auxiliares en los sistemas de transporte o que forman un canal. El primer grupo está formado por 74 proteínas, en donde los transportadores con 4, 6, 8, 10 y 12 STM comprenden el 73% de las proteínas; los transportadores de 6 y 12 STM representan casi la mitad del total (34 proteínas o 46%) (**Figura 9A**). Para el segundo grupo se advierte que, excepto un grupo de

proteínas que atraviesan la membrana una sola vez (13 casos), las cuales son proteínas auxiliares de sistemas de transporte, la mayoría de las proteínas contienen 2, 3 y 4 STM (**Figura 9B**).

Respecto a su función, se encontró que el 70% de las proteínas analizadas transportan compuestos orgánicos, entre ellos los que participan en la secreción de proteínas o en el transporte de intermediarios metabólicos. El 30% restante se relaciona con transportadores de iones inorgánicos. De éstos últimos, el 79% son proteínas con funciones homeostáticas que captan o expulsan cationes fisiológicos (incluyendo protones), mientras que siete transportadores participan en el transporte (expulsión) de iones tóxicos; cinco de estos transportadores se encuentran codificados en plásmidos y constituyen sistemas de resistencia bacteriana. La cantidad de transportadores de iones inorgánicos tóxicos encontrados fue baja quizá debido a que muchos de los sistemas de resistencia aún no se han estudiado con detalle, por lo que no se conoce la topología del transportador (Jiménez y Cervantes, 2005).

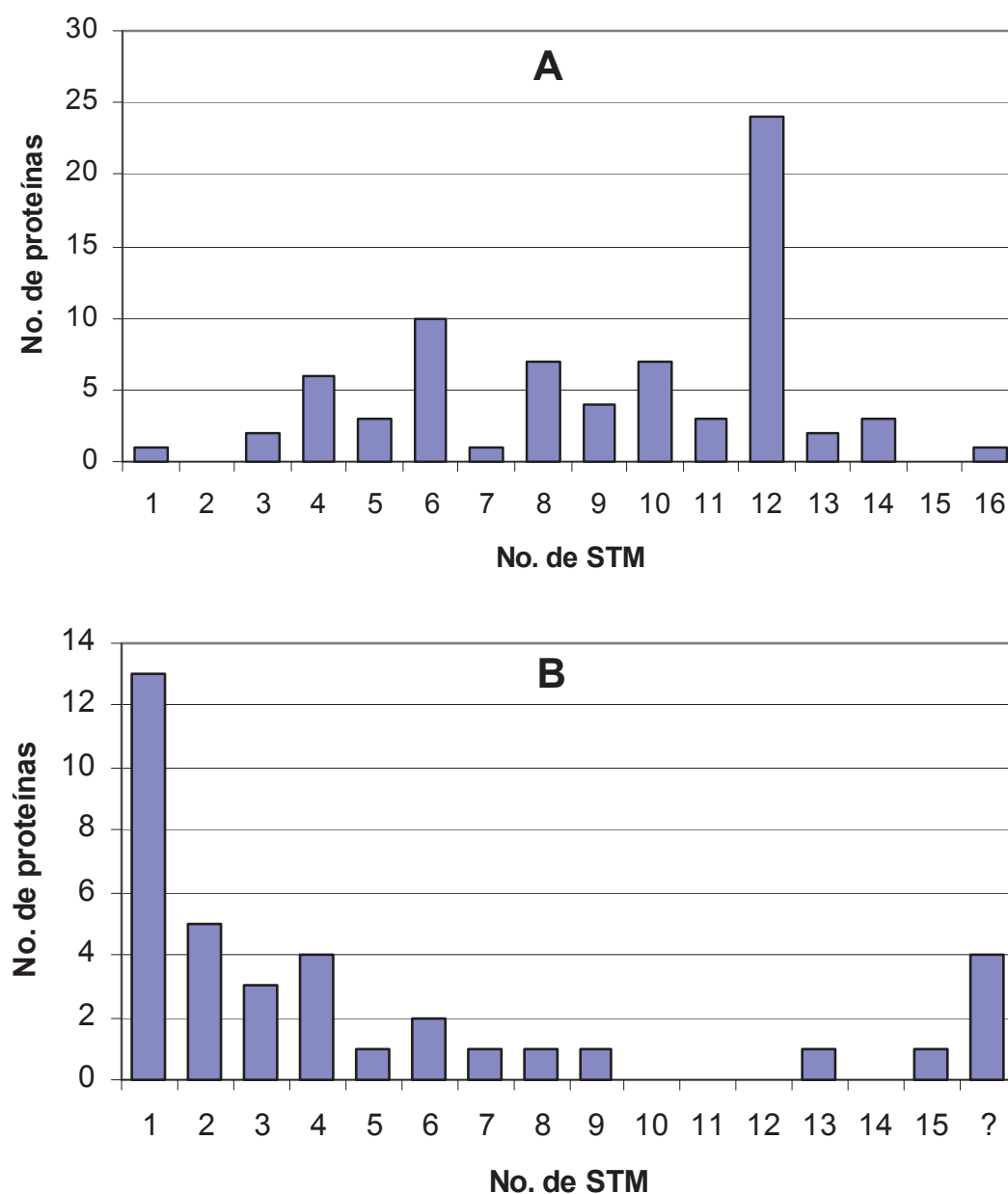


Figura 9. Topología de proteínas bacterianas de membrana. Se muestra la distribución de las proteínas de membrana con base en el número de segmentos transmembrana (STM). (A) transportadores (74) o (B) proteínas auxiliares de transportadores y canales (37). ?, Información no disponible. (Jiménez y Cervantes, 2005).

II.- ANTECEDENTES

Tomando como base los datos de predicción del perfil hidropático, Chávez (2003) y Jiménez (2003) construyeron fusiones traduccionales con las enzimas reporteras PhoA y LacZ en regiones hidrofílicas de la región amino terminal de la proteína ChrA. Los resultados fueron los siguientes: La fusión en la fenilalanina 35 produjo alta actividad de LacZ y actividad basal de PhoA, lo que permitió localizar esta región en la interfase membrana-citoplasma (**Figura 10**). En la fusión en el ácido aspártico 51, se obtuvo alta actividad de PhoA y una considerable actividad de LacZ por lo que al asa hidrofílica donde se encuentra este aminoácido se le asignó una localización periplásmica (**Figura 10**). Las fusiones en los aminoácidos fenilalanina 69 y glutamina 125 sólo mostraron actividad de PhoA, por lo que las asas hidrofílicas donde se encuentran estos residuos fueron localizadas en el periplasma (**Figura 10**). La fusión en el aminoácido lisina 96 no produjo actividad significativa de ninguna de las dos enzimas, sin embargo, esta región se ubicó en el citoplasma. De acuerdo a los resultados obtenidos con estas fusiones traduccionales se concluyó que ChrA consta de 12 STM (**Figura 10**) (Aguilera y col., 2004).

Aunque la fusión en la alanina 202 produjo alta actividad de LacZ, esa región fue asignada al periplasma (**Figura 10**) por el comportamiento anómalo que se ha observado para algunas fusiones con LacZ en sitios periplásmicos, debido a que LacZ no puede ser transportada al periplasma eficientemente y al quedar en el citoplasma muestra actividad enzimática (**Figura 10**). Sin embargo, este resultado también sugiere que la topología membranal de ChrA puede ser

diferente a la señalada de 12 STM. Aunque se han propuesto modelos topológicos para ChrA de 12 STM (Alvarez, 1999), de 11 STM (Aguilera, 2001) y de 13 STM (Chávez, 2003), estos modelos están sustentados principalmente en información teórica y con poca información experimental (Aguilera y col., 2004).

Como en nuestro laboratorio se trabaja en el estudio de la relación estructura-función del transportador de cromato ChrA de *P. aeruginosa*, fue de interés hacer un análisis completo de la topología de ChrA para establecer un modelo topológico más exacto de acuerdo a resultados experimentales que permita conocer la localización más precisa de residuos o motivos importantes para la función de este transportador.

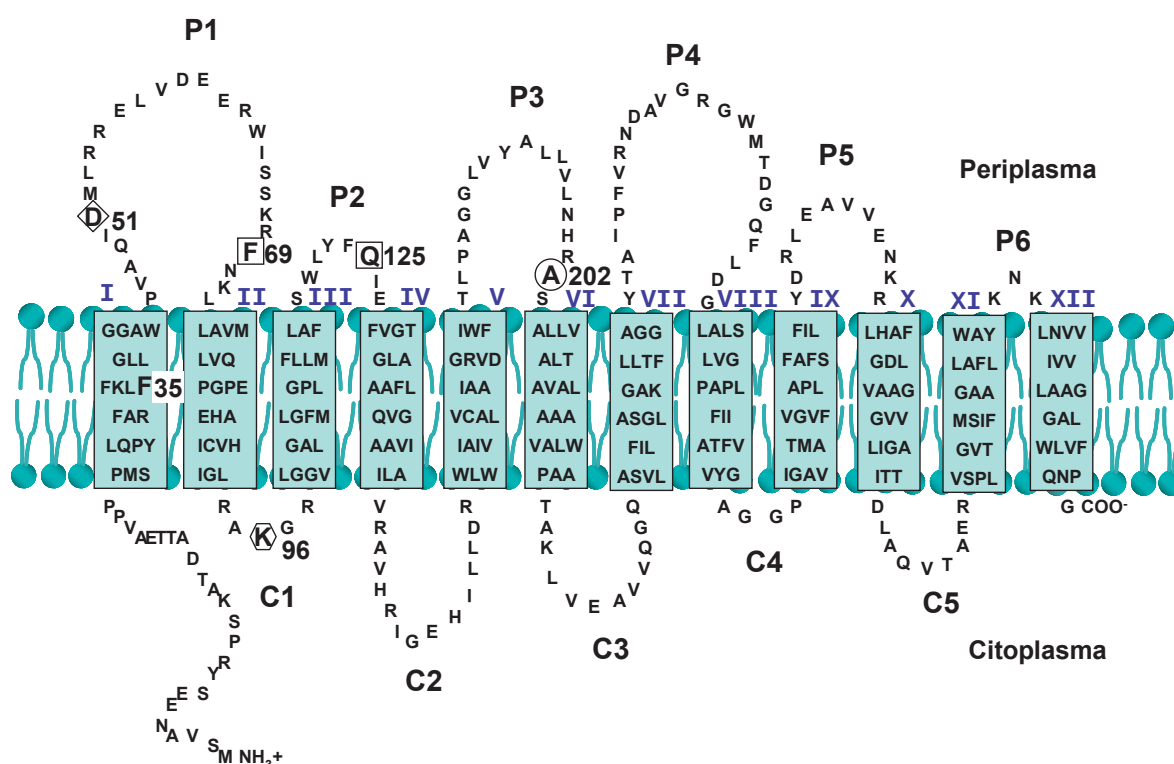


Figura 10. Localización de las fusiones traduccionales en el modelo propuesto para ChrA. Se muestran los sitios en los cuales fueron construidas las fusiones con PhoA y LacZ y los resultados obtenidos: (□), se obtuvo sólo actividad de PhoA; (◇), actividad PhoA y LacZ; (○), actividad sólo de LacZ; (◊), no se obtuvo actividad con ninguna de las enzimas. Aguilera y col., 2004.

III.- HIPOTESIS

ChrA es una proteína de membrana que contiene 12 segmentos transmembranales.

IV.- OBJETIVOS

a) Objetivo general:

Determinar la topología membranal de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

b) Objetivos específicos:

- 1.- Diseñar, construir y caracterizar fusiones traduccionales en *Escherichia coli* con las enzimas reporteras PhoA y LacZ en posibles dominios hidrofílicos de ChrA.
- 2.- Transferir las fusiones a *P. aeruginosa* y expresar en ambas especies.
- 3.- Cuantificar la actividad de PhoA y LacZ de cada una de las fusiones en *E. coli* y *P. aeruginosa*.
- 4.- Establecer un modelo topológico para ChrA con base en los datos obtenidos de las fusiones.

V.- MATERIALES Y METODOS

1.- Medios de cultivo

A) Agar Luria-Bertani (ALB). Composición: NaCl 1%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y agar bacteriológico 1.5%.

B) Caldo Luria-Bertani (CLB). Composición: la misma que agar Luria, excepto que no contiene agar bacteriológico.

C) Medio SOC. Composición: 2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.05% de cloruro de sodio, 2.5 mM de cloruro de potasio y 20 mM de glucosa (Sambrook y col., 1989).

2.- Cepas

Se utilizaron como cepas receptoras de los plásmidos usados las cepas de *Escherichia coli* ES1301 *mutS* (*lacZ53*, *mutS201::Tn5*, *thyA36*, *rha-5*, *metB1*, *deoC*, IN(*rrnD-rrnE*) (Siegel, 1982), JM101 *supE thi-1Δ(lac-proAB)* F' [*traD36proAB lacI^q ZΔM15*] (Yanisch-Perron y col., 1985), y CC118 *araD139 Δ(ara leu)7697 ΔlacX74 phoAΔ20 galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recA1* (Manoil y Beckwith, 1986) y de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Holloway y col., 1979).

3.- Plásmidos

Para la amplificación de los fragmentos por PCR se utilizó como molde el plásmido pMUK4 (**Figura 11**). Para la recuperación de productos de PCR, se utilizó el vector pGEM-T (Promega®) (**Figura 12**). Este vector tiene una timidina en cada uno de sus extremos 3', las cuales aumentan la eficiencia de ligación de

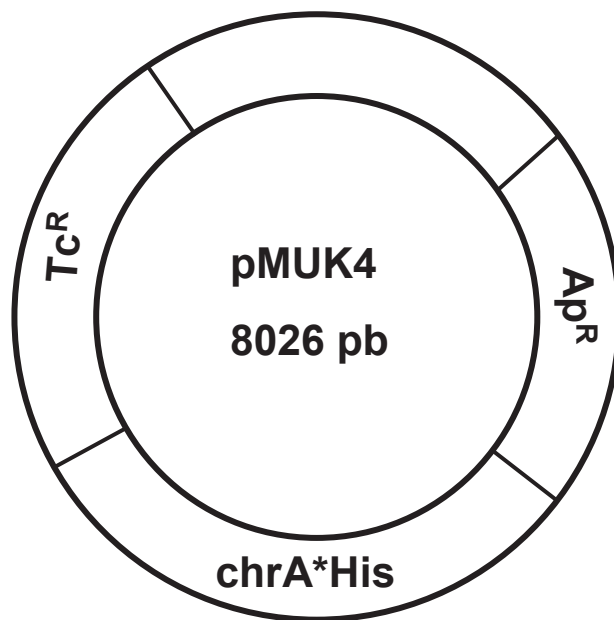


Figura 11. Esquema del plásmido pMUK4. Se muestra la posición del gen *chrA** que se encuentra fusionado a una etiqueta de 6 histidinas (*chrA*His*) el cual se encuentra clonado en el vector pALTER-1 (Promega[®]) que contiene una mutación puntual conservativa que eliminó un sitio *KpnI*. Se muestran también los genes que confieren resistencia a tetraciclina (Tc^R) y ampicilina (Ap^R).

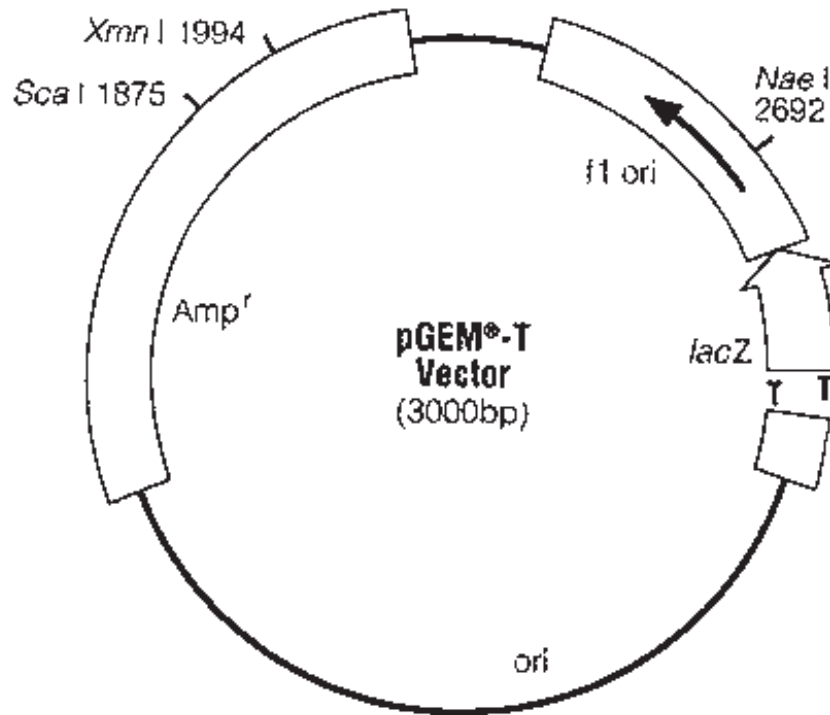


Figura 12. Mapa del vector pGEM-T. T, Timinas en los extremos 3' del vector. *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina. *lacZ*, gen de la β -galactosidasa. Se indican algunos sitios de restricción. Tomada de Promega®.

productos de PCR ya que son compatibles con las adenosinas en los extremos 5' de los fragmentos amplificados, producto de la actividad de algunas DNA polimerasas termoestables. pGEM-T confiere además resistencia a ampicilina y porta un segmento de DNA que codifica la región amino terminal de la β -galactosidasa, que puede complementar la forma defectuosa de LacZ de las cepas estándar de *E. coli* (alfa complementación). Las bacterias Lac⁺ forman colonias azules en presencia de un sustrato cromogénico (X-Gal). Un inserto dentro de *lacZ* impide la actividad enzimática y se originan colonias blancas Lac⁻.

Para la construcción de las fusiones traduccionales con ChrA se emplearon los vectores de expresión para *E. coli* pECD637 y pECD636 (Nies y col., 1998). Ambos contienen un gen que confiere resistencia a kanamicina entre sitios de restricción *KpnI* y *XbaI*; hacia el extremo 3' de este gen se localizan, entre sitios de restricción *XbaI* y *PstI* los genes reporteros *lacZ* y *phoA* que codifican para la proteínas reporteras β -galactosidasa (LacZ) y fosfatasa alcalina (PhoA), respectivamente (**Figura 13**). Una doble restricción con *KpnI* y *XbaI* permite la fusión de fragmentos de DNA con los genes reporteros por intercambio con los genes reporteros. Para la construcción de vectores binarios de expresión se utilizó el vector binario *E. coli-Pseudomonas* pUCP20 (West y col., 1994). Este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina, orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas*, así como, un sitio múltiple de clonación para el cual se indican sólo algunos de los sitios de restricción (**Figura 14**).

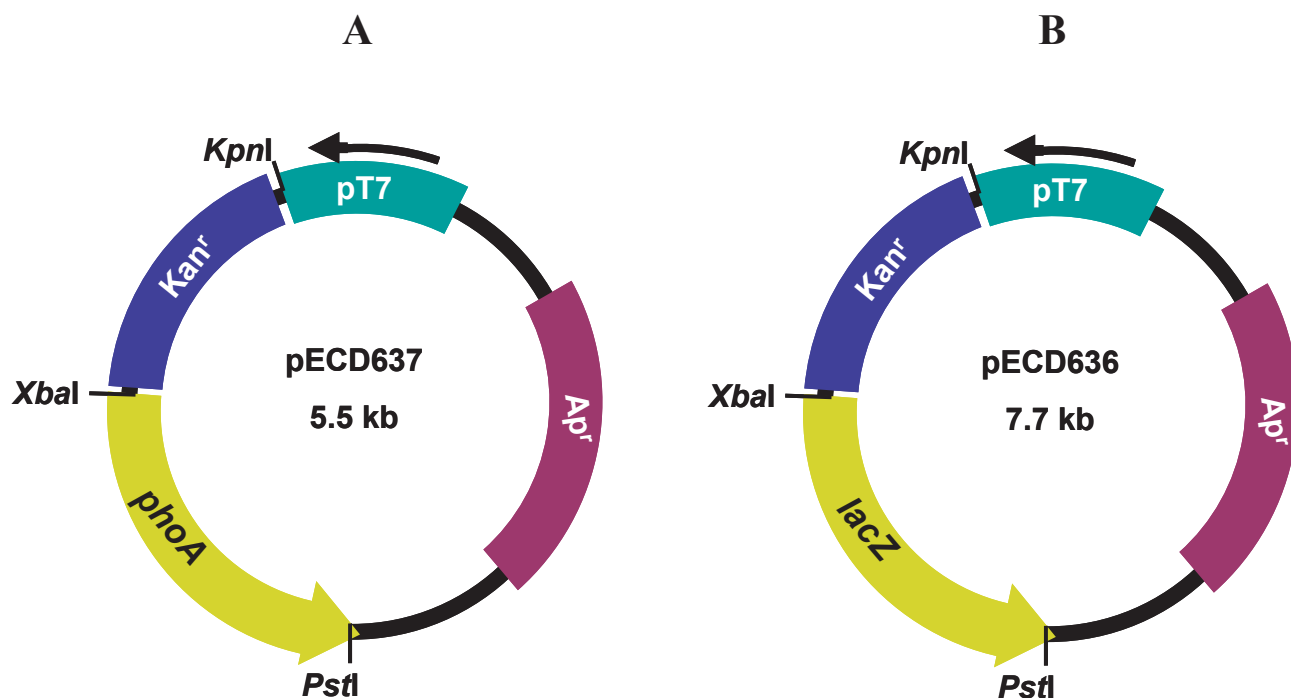


Figura 13. Mapa de los vectores de expresión pECD637 y pECD636. Se muestra la posición y orientación del promotor del fago T7 (pT7), Kan^r, gen que confiere resistencia a kanamicina y de los genes *phoA* (A) y *lacZ* (B) que codifican para la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa, respectivamente. Ap^r, gen de resistencia a ampicilina. Se muestran también algunos de los sitios de restricción presentes en los vectores (Nies y col., 1998)

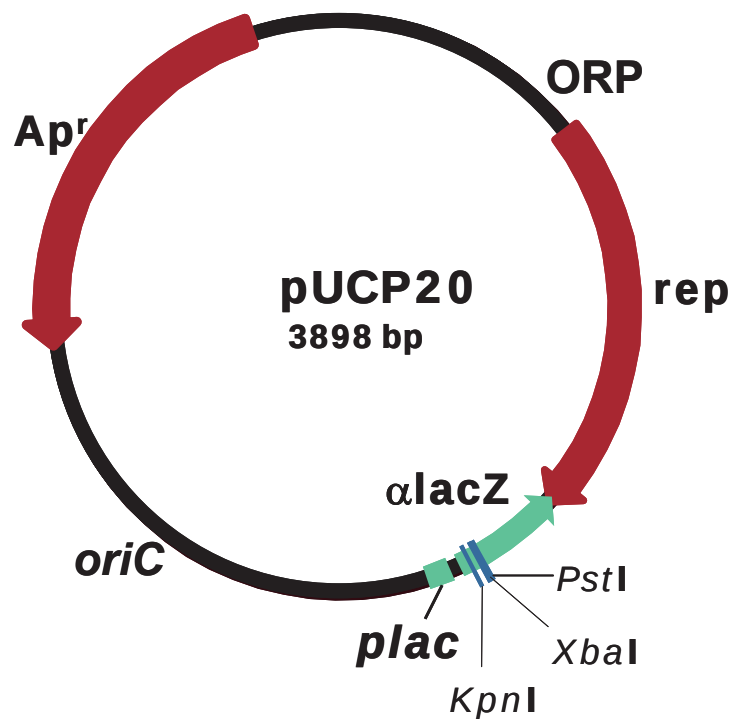


Figura 14. Mapa del vector pUCP20. Contiene un gen que confiere resistencia a ampicilina (Ap^r), orígenes de replicación para *E. coli* (*oriC*) y *Pseudomonas* (ORP), un gen que codifica para una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas* (*rep*), el promotor *lac* (*plac*), contiene una parte del gen *lacZ* ($\alpha lacZ$) y se indican algunos de los sitios de restricción (West y col., 1994)

4.- Aislamiento de plásmidos

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó mediante columnas utilizando el kit Wizard[®] plus miniprep DNA purifications system (Promega[®]) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El DNA de plásmidos recombinantes, proveniente de las colonias transformantes se obtuvo por el método de lisis alcalina (adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo:

Un cultivo bacteriano crecido en CL durante 18-20 h a 37°C con agitación constante se distribuyó en tubos de 1.5 ml y se centrifugaron durante 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución STE [Sacarosa 50 mM, Tris (tris [hidroximetil] aminometano)-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 10 mM] y se le adicionaron 15 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregaron 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1%, se agitó suavemente y se incubó durante 5 min en hielo. Se le adicionaron 150 µl de una solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8 (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial), se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 µl de una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo, se mezcló moderadamente, se recuperó la fase acuosa superior y se transfirió a tubos nuevos; se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 1h a

–20°C. Se centrifugó durante 10 min a temperatura ambiente y el sedimento se lavó 2 veces con 1 ml de etanol al 70% centrifugando durante 5 min entre cada lavado. Se secó la pastilla a 65°C y se resuspendió en 50 µl de H₂O grado HPLC estéril. Las muestras se almacenaron a –20°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

5.- Electroforesis en geles de agarosa

La separación del DNA de plásmidos se realizó en geles de agarosa (Sigma®) a una concentración de 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal conteniendo amortiguador TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con azul de bromofenol en solución de glicerol al 30% y se colocaron en los orificios del gel. Se realizó el corrimiento electroforético a un voltaje constante de 100 voltios durante 30-60 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas teñidas se observaron por medio de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc.) y posteriormente se fotografió. Como marcador de tamaño molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *Hind*III o el marcador de 1 kb plus (Invitrogen®).

6.- Aislamiento de DNA de geles de agarosa

Para purificar el DNA que se utilizó en reacciones de ligación se empleó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), como se

describe a continuación: el DNA a purificar se digirió y posteriormente se separó en un gel de agarosa al 1% que se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% y, por comparación con el marcador de tamaño molecular, se determinó el tamaño y la concentración del fragmento de DNA de interés. Se cortó la banda de DNA del gel de agarosa, se colocó en un tubo Eppendorf, se agregaron 10 μ l de solución que contiene la resina de unión por cada 10 μ g de agarosa y se disolvió la agarosa calentando a 60°C. La mezcla se transfirió a una columna de purificación, ésta se incubó 1 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min y se desechó el filtrado. El contenido de la columna se lavó con 700 μ l de solución de lavado centrifugando nuevamente 1 min y se repitió el lavado con 500 μ l de solución de lavado, centrifugando 5 min. La columna se colocó en un tubo Eppendorf nuevo y se adicionó 50 μ l de agua grado HPLC estéril, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 2 min. La presencia y concentración de DNA recuperado se verificó en un gel de agarosa al 1% por comparación con DNA de tamaño y concentración conocida y con el marcador de tamaño molecular.

7.- Tratamientos enzimáticos de moléculas de DNA

a) Restricción con endonucleasas

Los DNAs purificados se digirieron utilizando una unidad de cada una de las endonucleasas de restricción (Promega[®]) por μ g de DNA e incubando a 37°C por un mínimo de 3 h o durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento

electroforético de las mezclas de restricción en un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

b) Ligación

Los fragmentos de DNA fueron ligados manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega®). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche y después se hizo la transformación como se describe más adelante. En el caso de ligación de fragmentos de PCR, 100 ng del producto de PCR se mezclaron con 50 ng del vector pGEM-T, incubando toda la noche a 4°C. La ligación se llevó a cabo con la enzima incluida con los reactivos provistos con el vector.

8.- Preparación de células competentes de *E. coli*

Se inocularon 250 ml de CLB con 4 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa JM101 de *E. coli*. Las células se dejaron crecer a 37°C con agitación a 250 rpm hasta que alcanzaron una absorbencia de 0.5-0.6 a 600 nm (2.5 h aproximadamente). Posteriormente las células se incubaron en hielo por 20 min y para todos los pasos subsecuentes, tanto las células como el material que se utilizó, se mantuvieron a temperatura cercana a 4°C. Las células se colectaron centrifugando a 8000 rpm a 4°C en el rotor 8850 en una centrífuga Thermo IEC por 10 min. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y las células obtenidas se lavaron en dos ocasiones con agua desionizada, estéril y fría, centrifugando a 8000 rpm por 10 min a 4°C en cada lavado. Al final las células se resuspendieron

en 500 μ l de glicerol al 10%, estéril frío y la suspensión se guardó en alícuotas de 200 μ l a -80°C.

9.- Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa* y *E. coli*

Las células se prepararon siguiendo el protocolo de Enderle y Farwell, (1998), como se describe a continuación: se crecieron los cultivos en una caja petri por 16 h o hasta que las colonias alcanzaron ~1 mm de diámetro y se guardó a temperatura ambiente hasta que se usó. En 500 μ l de agua destilada o desionizada estéril se transfirió aproximadamente 3 mg de células con un asa de cultivo estéril, se resuspendieron las células suavemente en vortex hasta que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 13,000 rpm en una microcentrífuga por 1 min y se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 500 μ l de agua y se centrifugó como en el paso anterior. Se repitió éste paso y la mezcla se usó para la transformación por electroporación como se describe mas adelante, con la siguiente modificación: posterior al pulso eléctrico se le adicionó 1 μ l de medio SOC a la mezcla de transformación.

10.- Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación con DNA de plásmidos recombinantes se realizó mediante el método de electroporación, que se describe a continuación:

Se descongelaron en hielo las células competentes preparadas como se describió en el párrafo anterior. Para cada muestra a electroporar se colocó un tubo de microcentrífuga de 500 μ l y una celda de electroporación en hielo. En el

tubo frío se mezclaron 100 μ l de células competentes con 1 ó 2 μ l de DNA plasmídico (50 a 100 ng). Se ajustó el micropulso a 1,800 V y se transfirió la mezcla a una celda de electroporación fría colocando la suspensión en la base. La celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador Eppendorf 2510, ésta se colocó entre los electrodos y se dió un pulso de 4-5 milisegundos. Se sacó la celda de la cámara e inmediatamente se transfirió la mezcla de transformación a un tubo con 2 ml de CLB. Se incubó a 37°C por 1 h con agitación constante. Posteriormente se concentraron las células centrifugando a 12,000 rpm durante 1 min, resuspendiendo en el caldo que quedó en el tubo después de decantar. Se distribuyeron 100 μ l en cajas de ALB adicionado de 100 μ g/ml de ampicilina, 40 μ g/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranósido) (Promega®) y 50 μ g/ml de IPTG (Isopropiltio- β -galactósido) (Promega®) para seleccionar clonas con los plásmidos recombinantes. Las colonias blancas obtenidas se crecieron en 4 ml de CLB para realizar aislamiento y purificación de DNA.

11.- Mutagénesis dirigida

Para realizar la mutagénesis dirigida del sitio de restricción *KpnI* que se encuentra en la secuencia del gen *chrA* se empleó el kit comercial “*Altered Sites II*” (Promega®). Para realizar la mutagénesis se usó el plásmido pALC-His (Aguilar, 2005) que contiene el gen *chrA* fusionado a una secuencia que codifica seis histidinas (*chrAHis*) proveniente del plásmido pGEMT-*chrAHis* en el vector mutagénico pALTER-1 contenido en el kit.

a) Diseño de oligonucleótidos mutagénicos

Se diseñó un oligonucleótido de manera que el nucleótido cambiado se localizara al centro de éste. Además se diseñó de forma que produjera un cambio conservativo, esto es que no cambiara la secuencia de aminoácidos del producto del gen. La secuencia del oligonucleótido empleado fue: 5'-ATT GAA TTC GTG GGC ACC GCG CTG-3'.

b) Desnaturalización alcalina

El plásmido pALC-His se sometió a desnaturalización alcalina para obtener DNA de cadena sencilla. La reacción de desnaturalización se hizo como sigue: 2 µg de DNA molde doble cadena, 2 µl de solución NaOH 2 M-EDTA 2 mM a una concentración final de 100 mM y 0.1 mM, respectivamente y agua para un volumen final de 20 µl. Se mezcló e incubó 5 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se les adicionaron 2 µl de acetato de amonio 2 M (pH 4.6) y 75 µl de etanol absoluto frío y se incubó 30 min a -70°C. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad por 30 min. Se lavó la pastilla con 200 µl de etanol al 70% y se centrifugó 15 min. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en buffer TE [Tris-HCl (pH 8) (10 mM) y EDTA 1 mM]. Posteriormente se corrió una alícuota de las muestras en un gel de agarosa al 1% para corroborar su recuperación y determinar su concentración.

c) Reacción de alineamiento y síntesis de la cadena mutada

El oligonucleótido mutagénico se usó en una proporción 25:1 (oligonucleótido:DNA molde). El oligonucleótido para reparar la resistencia a ampicilina se usó en una proporción 5:1 (oligonucleótido:DNA molde). La reacción de mutagénesis contenía: DNA de cadena sencilla obtenido por desnaturalización

alcalina (200 ng en 10 µl), el oligonucleótido reparador de la resistencia a ampicilina (0.25 pmol), el oligonucleótido mutagénico fosforilado (1.25 pmol), buffer de alineamiento 10X (10%) y agua. Para el alineamiento de los oligonucleótidos la mezcla se incubó 5 min a 75°C y después se enfrió lentamente bajando la temperatura 1°C por min hasta alcanzar 45°C y después más rápido hasta 22°C. El alineamiento se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo gene Amp PCR System 2400. Para la síntesis de la cadena mutada las muestras se colocaron en hielo y se les adicionaron los componentes con el siguiente orden: 5 µl de agua HPLC, 3 µl de buffer de síntesis, 1 µl de DNA polimerasa de T4 (5-10 U) y 1 µl de DNA ligasa de T4 (1-3 U). Esta mezcla se incubó 90 min a 37°C, posteriormente con ésta se transformaron células competentes de *E. coli* ES1301 *mutS* como se describe a continuación.

d) Transformación

La mezcla de las reacciones anteriores se usó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* ES1301 *mutS*, que tiene mutado el sistema de reparación de errores de apareamiento. Para la transformación se electroporaron de 1.5-3.0 µl de la mezcla anterior en 100 µl de células competentes de ES1301. La electroporación se hizo a 2500 V en un electroporador Eppendorf 2510. Después de electroporar las células se transfirieron a 2 ml de CLB y se incubaron 2 h a 37°C con agitación constante. Después de este tiempo las células se concentraron centrifugando 2 min a 12000 rpm, se resuspendieron en 100 µl de CLB y se distribuyeron en cajas de ALB con 100 µg/ml de ampicilina. Se incubó a 37°C un mínimo de 24 h. A algunas de las colonias obtenidas se les realizó aislamiento de DNA plasmídico para su posterior secuenciación.

12.- Obtención de los fragmentos de *chrA* para las fusiones traduccionales

Para la obtención de las fusiones traduccionales se amplificaron por PCR diferentes fragmentos del gen *chrA* en base a los sitios seleccionados (**Figura 17**).

a) Oligonucleótidos empleados

Para las ampliaciones por PCR se diseñaron parejas de oligonucleótidos en base a la secuencia de *chrA*. Las parejas fueron formadas por el oligo RJ1(+), localizado hacia el extremo 5' del gen, que adiciona un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *KpnI*, con cada uno de los diferentes oligos localizados en los sitios elegidos hacia el extremo 3' de *chrA*. Estos oligos adicionan un sitio para la enzima *XbaI* (**Tabla 1**). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en forma comercial (Invitrogen®).

b) Amplificación

El DNA del plásmido pMUK4 purificado por columna se utilizó como molde para la amplificación de los fragmentos de *chrA* por PCR. Esta se llevó a cabo empleando un termociclador Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR System 2400. La mezcla que constaba de DNA (10 ng/μl), oligonucleótidos (10 pmoles/μl), 12.5 μl de PCRMaster Mix (Promega®) en un volumen final de 25 μl, se sometió a 30 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 92°C/30 s (desnaturalización), 56°C/40 s (alineamiento), 72°C/tiempo requerido por cada fragmento a amplificar (polimerización), con un ciclo final de polimerización a 72°C/5 min.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos de *chrA* por PCR.

Nombre	Fragmento amplificado (pb)	Posición en la proteína	Dirección 5' → 3'	Orientación
RJ 1(+)			CGAGGTACCAAGGAGGAATAAACCATGG ^a	Directo
L99	332	Leu99	CACTCTAGACAGCCGCCCTTTGCTCGGAT	Inverso
V152	496	Val152	ATTCTAGACACGGCGCGCACGATCAGGG	Inverso
I159	517	Leu159	TCTCTAGAGATGTGCTCGCCGATACGGTG	Inverso
D162	526	Asp162	CAATCTAGAATCAAGCAGGATGTGCTCGCC	Inverso
A188	604	Ala188	AGTCTAGACGCCGGCAGGGTGATCCAGAA	Inverso
V233	739	Val233	CCTGTCTAGAAACGACCGCTTCCACAA	Inverso
F263	829	Phe263	GTTTCTAGAGAACGGAATCGCTGTGTAGGC	Inverso
D276	868	Asp276	GGAATCTAGAATCCGTCTATCCATCCGC	Inverso
G305	955	Gly305	ATTCTAGACCCCGCCACATAGCCGACGA	Inverso
A310	970	Ala310	ATTCTAGACGCCCGATCGGCCCCCCC	Inverso
M313	979	Met313	CCTCTAGAATGGCCACCGCCCGATCG	Inverso
A334	1042	Ala334	TCTCTAGACGCCTCCAGCCGGTCGTAGAA	Inverso
E369	1147	Glu369	ATGGTCTAGATTTCAGCAGTGACCTGCG	Inverso
N393	1219	Asn393	CGTTTCTAGAGTTCTTCCAGGCATAAAGG	Inverso
P413	1279	Pro413	CCTCTAGACGGAAATACCAGCCACCCCG	Inverso
G416	1288	Gly416	CATCTAGAGCCTTGGTTCGGAAATACCAGC	Inverso

^aSe subraya el sitio de restricción introducido en cada uno de los oligos para las enzimas de restricción *KpnI* (oligo directo) y *XbaI* (oligos inversos).

13.- Construcción de las fusiones traduccionales

Los fragmentos de DNA del gen *chrA* amplificados por PCR se clonaron inicialmente en el vector pGEM-T. Para su recuperación se digirieron con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*, se purificaron como se describió anteriormente y se utilizaron para la reacción de ligación con los vectores pUCPphoA o pUCPlacZ digeridos con las mismas enzimas y purificados de la misma manera. Las células de *E. coli* JM101 fueron transformadas con las mezclas de ligación y se seleccionaron las transformantes en ALB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y XP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) (20 µg/ml) para las fusiones ChrA::PhoA o ampicilina (100 µl/ml) y X-Gal (20 µg/ml) para las fusiones ChrA::LacZ.

14.- Determinación de la secuencia de nucleótidos

La secuenciación de las fusiones traduccionales se realizó en el laboratorio de secuenciación del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Para esto el DNA a secuenciar fue purificado como se describió anteriormente y con oligonucleótidos directos diseñados para la secuenciación de las fusiones, los cuales se localizan 200 pb aproximadamente hacia el extremo 5' del sitio de unión de *chrA* con los dos genes.

15.- Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias de nucleótidos de las fusiones se realizó empleando el programa de cómputo Clustal W. Se compararon las secuencias obtenidas de las fusiones con la secuencia del gen *chrA* para localizar los

nucleótidos correspondientes a los fragmentos de fusión de *chrA*. Para identificar el sitio de unión de los genes *chrA::phoA* y *chrA::lacZ* se utilizaron las secuencias de los genes reporteros *phoA* y *lacZ* que fueron obtenidas del banco de datos NCBI. El siguiente análisis se realizó mediante la traducción de las secuencias de nucleótidos a los aminoácidos correspondientes y por comparación con las secuencias reportadas de las proteínas ChrA, fosfatasa alcalina y β -galactosidasa en el banco de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/protein>).

16.- Análisis de la expresión de las fusiones traduccionales

La expresión de las enzimas reporteras de las fusiones se midió en la cepa CC118 de *E. coli* y en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*. De estas cepas se prepararon células competentes como se describió anteriormente y se transformaron mezclando 100 μ l de células competentes con 2 μ l (50 a 100 ng) de DNA de los vectores pUCPphoA y pUCPlacZ o de cada una de las fusiones *pchrA::phoA* y *pchrA::lacZ*. Para seleccionar las colonias transformantes se distribuyeron 100 μ l de la mezcla de transformación en cajas de ALB con 100 μ g/ml de ampicilina para la cepa CC118 o con 200 μ g/ml de carbenicilina para la cepa PAO1. La presencia de los plásmidos se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

17.-Ensayos enzimáticos

Para la determinación de las actividades enzimáticas, un cultivo de 2 ml de la cepa con la fusión traduccional (PhoA o LacZ) se creció toda la noche a 37°C

con agitación en CLB con ampicilina (100 µg/ml) para CC118 o 200 µg/ml de carbenicilina para PAO1. Se subcultivó en 10 ml de CLB con los mismos antibióticos adicionando entre 150 y 250 µl del cultivo de toda la noche e incubando por 2.5 h más a 37°C para tener las células en la fase exponencial de crecimiento.

a) Determinación de la actividad de β-galactosidasa

La actividad de β-galactosidasa de las fusiones ChrA::LacZ se determinó por el método de Miller (1972) de acuerdo con el siguiente protocolo: Se registró la densidad celular de los cultivos midiendo la absorbancia a 600 nm e inmediatamente se añadieron 0.5 ml del cultivo a 0.5 ml de buffer Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM). Las células se permeabilizaron con 20 µl de cloroformo y 15 µl de SDS al 0.1%, se agitaron en vórtex por 10 s y los tubos se incubaron a 37°C durante 5 min. La reacción comenzó con la adición de 0.2 ml de ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido; Sigma®) [(4 mg/ml en buffer de fosfatos (Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ 0.1 M pH 7.0)] a cada tubo, agitando unos segundos. Se permitió que la reacción se desarrollara por 15 min a 37°C y se detuvo añadiendo 0.25 ml de una solución de Na₂CO₃ 2 M. Se centrifugó la mezcla de reacción 1 min a 13000 rpm, se registró la densidad óptica a 420 y 550 nm del sobrenadante y se efectuaron los cálculos de actividad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{1000 \times DO_{420} - 1.75 \times DO_{550}}{t \times V \times DO_{600}}$$

DO₄₂₀ y DO₅₅₀ = Densidades ópticas de la mezcla de reacción

DO_{600} = Densidad óptica antes del ensayo

t = Tiempo de reacción

V = Volumen de cultivo usado en el ensayo

b) Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de fosfatasa alcalina de las fusiones ChrA::PhoA se midió por el método de Brickman y Beckwith (1975) de la manera siguiente: Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 600 nm, se centrifugó 1 ml de estos cultivos 1 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de Tris 1M pH 8. La velocidad de hidrólisis del pNPP (p-nitrofenil fosfato; Sigma®) se midió mezclando 0.5 ml de amortiguador de ensayo (Tris-HCl 1M pH 8.0 y $ZnCl_2$ 1 mM) con 0.5 ml de las células resuspendidas que fueron permeabilizadas con 20 μ l de cloroformo y 15 μ l de SDS al 0.1% antes del ensayo. Los tubos se incubaron a 37°C durante 5 min. El ensayo se realizó a 37°C hasta que se observó la aparición de un color amarillo (aproximadamente 4h) y la reacción se detuvo adicionando 120 μ l de EDTA 80 mM (pH 8.0) y K_2HPO_4 2M. La mezcla de reacción se centrifugó 1 min, se midió la densidad óptica a 420 y a 550 nm del sobrenadante y se llevaron a cabo los cálculos de actividad usando la misma fórmula que para la β -galactosidasa.

VI.- RESULTADOS

1.- Mutagénesis del sitio interno *KpnI*

Para el análisis de la topología membranal de ChrA se construyeron fusiones traduccionales con PhoA y LacZ en vectores de expresión (**Figura 13**). Para ello se intercambi6 el fragmento que contiene el gen de resistencia a kanamicina que est6 flanqueado por sitios de restricci6n para las enzimas *KpnI* y *XbaI* por cada uno de los fragmentos amplificados de *chrA*; sin embargo, debido a que el gen *chrA* contiene un sitio para el reconocimiento de la enzima de restricci6n *KpnI* (**Figura 15**) este dificulta la construcci6n de las fusiones. El sitio interno *KpnI* se elimin6 por mutagénesis sitio dirigida usando el procedimiento que se describi6 en Materiales y M6todos. Los pl6smidos posiblemente mutados se transfirieron a c6lulas competentes de *E. coli* ES1301 por electroporaci6n, se seleccionaron las transformantes en ALB adicionado ampicilina lográndose una eficiencia de transformaci6n de 1×10^3 colonias/ μ g de DNA. Se hizo aislamiento de DNA plasmídico de algunas de las transformantes obtenidas.

La identificaci6n de los pl6smidos mutados en el gen *chrA* se hizo primero en base a su patr6n de restricci6n con *KpnI*. En la **Figura 15A** se muestra el patr6n de digesti6n del pl6smido pALC-His con *KpnI*, donde se liberan tres fragmentos de 6.3, 0.9 y 0.8 kb, las dos últimas son producto del corte en el sitio interno *KpnI*. En la **Figura 15B** se muestra el patr6n de restricci6n de pALC-His mutado en el sitio *KpnI*, al cual se denomin6 pMUK4; la digesti6n liber6 dos fragmentos uno de 6.3 kb, correspondiente a pALC-His, y uno de 1.7 kb que

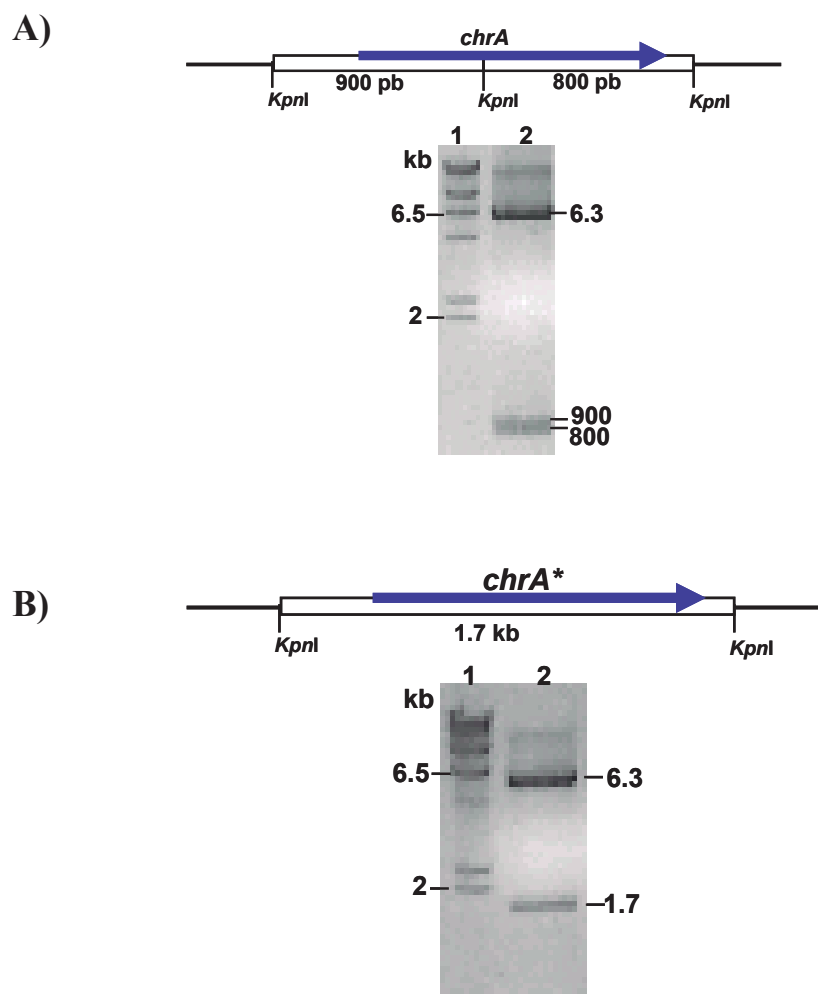


Figura 15.- Mutagénesis del sitio de restricción *KpnI* del gen *chrA*. **A)** Esquema que muestra la localización de los tres sitios *KpnI* flanqueando y dentro de la secuencia del gen *chrA* (indicado por la flecha), abajo se muestra la fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, λ *HindIII*; carril 2, digestión de pALC-His con *KpnI*. **B)** Esquema de la mutante *chrA** donde el sitio *KpnI* interno ha sido eliminado; se muestra la fotografía del gel de agarosa. Carril 1, λ *HindIII*; carril 2, digestión de pMUK4 con *KpnI*. Los números indican el tamaño (en kb) de algunos fragmentos.

contiene el gen *chrA* y que indica que la enzima no reconoció el sitio mutado y por lo tanto sólo cortó en los sitios que flanquean a *chrA*. La verificación del cambio realizado fue mediante secuenciación de la región mutada del gen *chrA* y su comparación con la secuencia del gen *chrA* silvestre. El alineamiento (**Figura 16**) muestra el cambio conservativo introducido en el codón GGT por GGC, los dos codifican para la glicina; este cambio impide a la enzima *KpnI* cortar en este sitio pero no modifica la secuencia de aminoácidos de la proteína ChrA.

2.- Amplificación de los fragmentos de *chrA* por PCR

De acuerdo a los sitios seleccionados para la construcción de las fusiones traduccionales en el modelo topológico propuesto para la proteína ChrA (**Figura 17**) se amplificaron fragmentos del gen *chrA** por PCR, empleando para ello los oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 1**. Las parejas de oligonucleótidos se formaron por el oligo directo RJ1(+), que fue común para todas las amplificaciones, y cada uno de los oligos reversos de acuerdo al sitio seleccionado. Se amplificaron un total de 16 fragmentos de *chrA**, los cuales fueron sometidos a corrimientos electroforéticos para verificar su tamaño. En la **Figura 18** se presentan algunos de los fragmentos de *chrA** amplificados. El tamaño de los 16 fragmentos de *chrA** obtenidos se indican en la **Tabla 1**.

3.- Clonación de los productos de PCR

Una vez que se tuvieron los productos de PCR y su tamaño fue verificado, éstos fueron purificados como se describió en Materiales y Métodos y se ligaron en el vector de clonación pGEM-T. Con las mezclas de ligación se transformaron

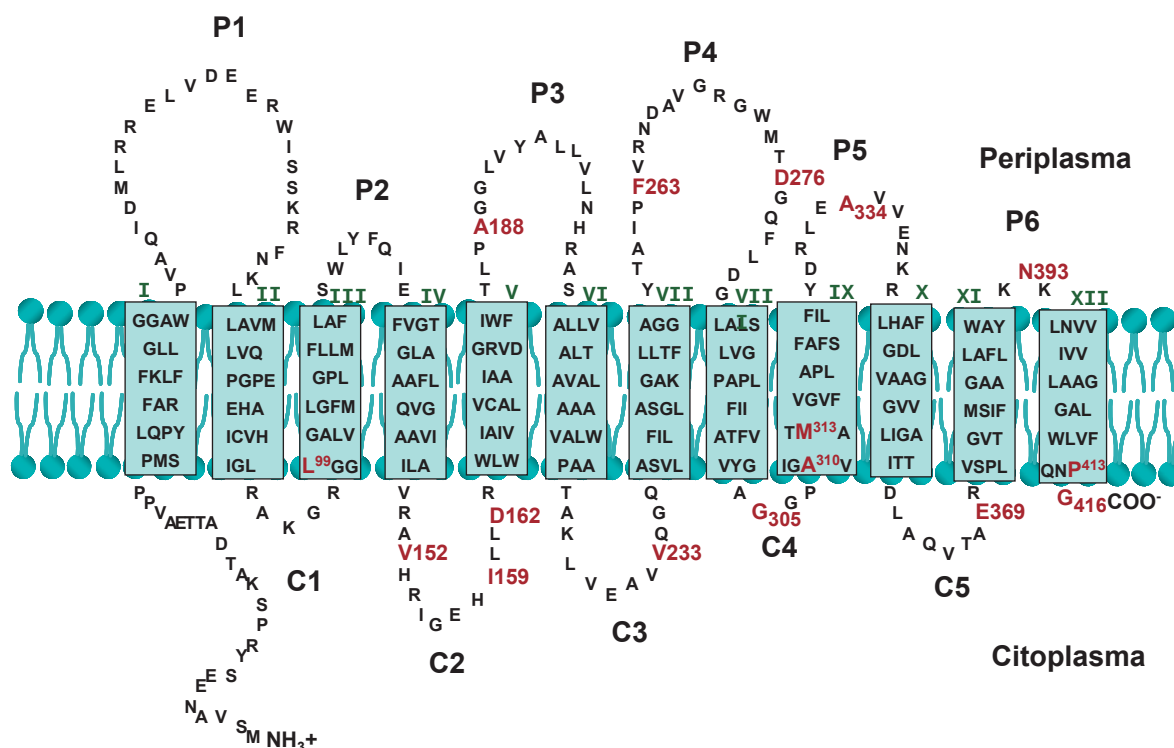


Figura 17.- Localización de los sitios seleccionados para las fusiones traduccionales en el modelo topológico de ChrA de *P. aeruginosa*. Se muestra el modelo topológico propuesto para ChrA (**Figura 1**), y en negritas los aminoácidos seleccionados para la construcción de las fusiones en dominios hidrofílicos de asas citoplásmicas o periplásmicas.

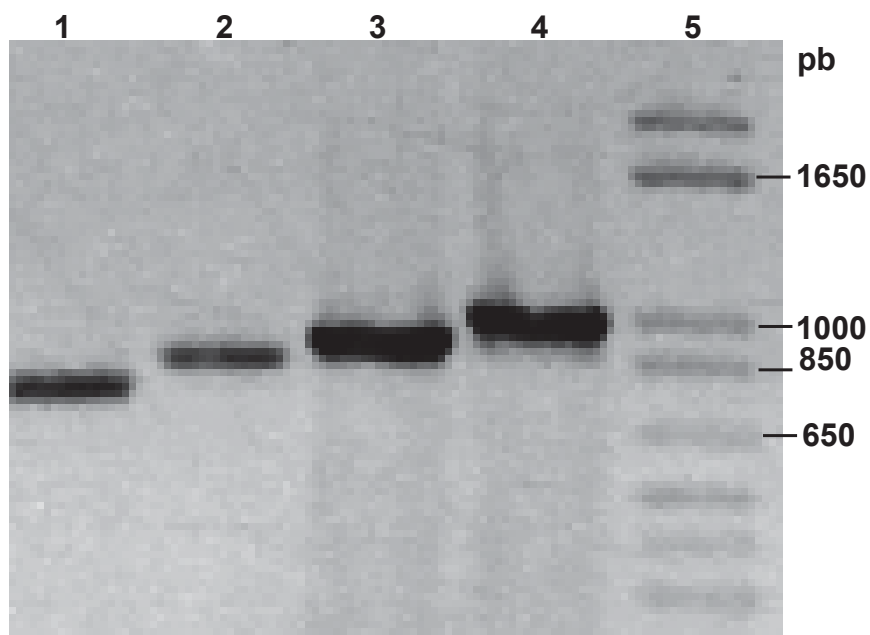


Figura 18.- Fragmentos de *chrA* obtenidos por PCR. Se muestra la fotografía de un gel de agarosa de cuatro de los fragmentos representativos amplificados. Carriles 1, 2, 3 y 4 fragmentos de *chrA* de 739, 829, 868 y 955 pb, respectivamente; carril 5, marcador de 1 kb plus para el cual se indica el tamaño de algunas bandas (en pares de bases).

células competentes de *E. coli* JM101 y de las transformantes se seleccionaron algunas para la caracterización e identificación de los fragmentos ligados en el vector. A estos plásmidos recombinantes se les denominó pJIM con un número adicional que hace alusión al tamaño del fragmento de *chrA** ligado (**Figura 19A**). La presencia y el tamaño de los insertos en pGEM-T fue verificada por digestión con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, la cual libera el vector pGEM-T de 3 kb y los insertos de *chrA**; su posterior corrimiento electroforético permitió identificar a cada uno de los productos de PCR ligados. En la **Figura 19B** se muestra la fotografía de un gel de agarosa del análisis de restricción de cuatro pJIM's representativos.

4.- Construcción de fusiones traduccionales en los vectores de expresión pECD636 y pECD637

Inicialmente se construyeron fusiones traduccionales en los vectores pECD636, que tiene el gen *lacZ*, y pECD637, que tiene el gen *phoA* (**Figura 13**). Estos vectores tienen en común hacia el extremo 5' del gen reportero, entre sitios de restricción *KpnI* y *XbaI*, un fragmento que contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina (**Figura 13**). Para la construcción de las fusiones traduccionales los vectores pECD636 y pECD637 fueron digeridos con las enzimas *KpnI* y *XbaI* y el vector fue purificado. Por otro lado, los fragmentos de *chrA* amplificados por PCR fueron recuperados por digestión con las mismas enzimas a partir de los plásmidos pJIM. Con los vectores y los fragmentos de *chrA* purificados se hicieron ligaciones para dar origen a las fusiones traduccionales (**Figura 20**); con las mezclas de ligación se transformaron células competentes de JM101 y se seleccionaron algunas colonias para su caracterización. En la **Figura**

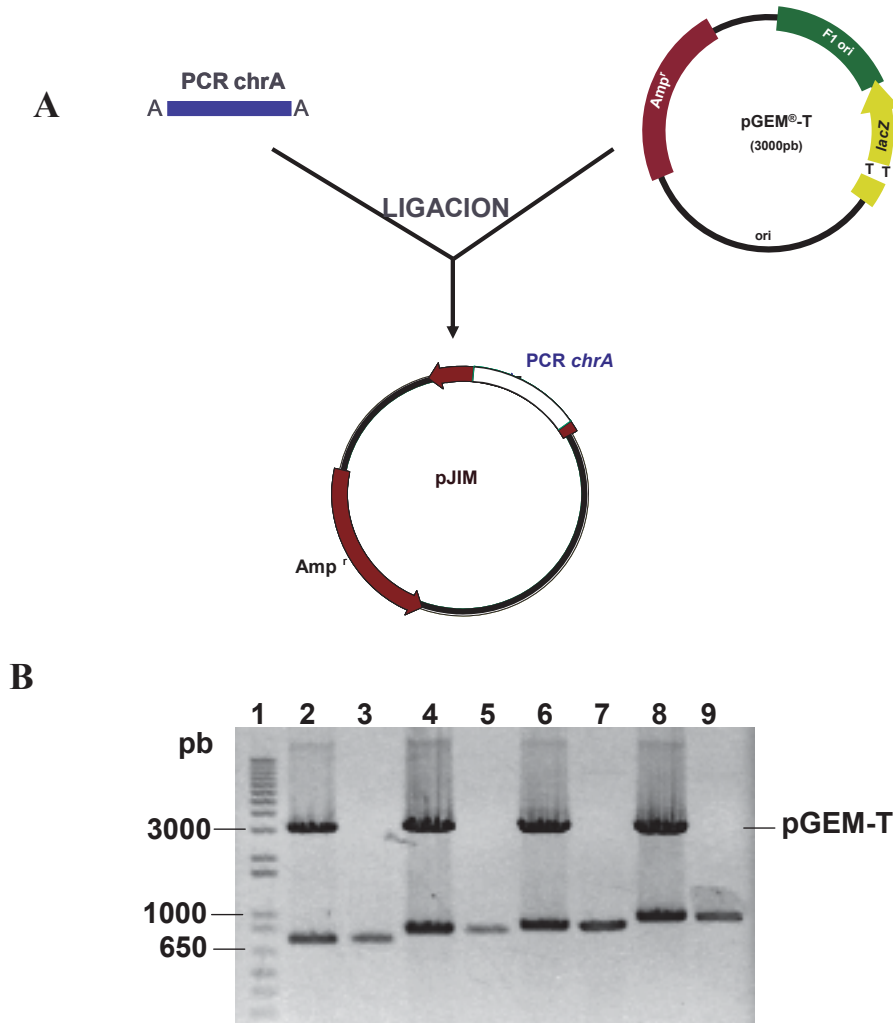


Figura 19.- Construcción y caracterización de los plásmidos pJIM. **A)** Esquema de ligación de los fragmentos de PCR del gen *chrA* en pGEM-T para dar origen a los plásmidos de la serie pJIM. **B)** Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, marcador 1 kb plus; carriles 2, 4, 6 y 8 digestión con *KpnI* y *XbaI* de los plásmidos pJIM739, 829, 868 y 955, respectivamente, carriles 3, 5, 7 y 9 productos de PCR de 739, 829, 868 y 955 pb, respectivamente. A la derecha se indica la posición del vector linearizado.

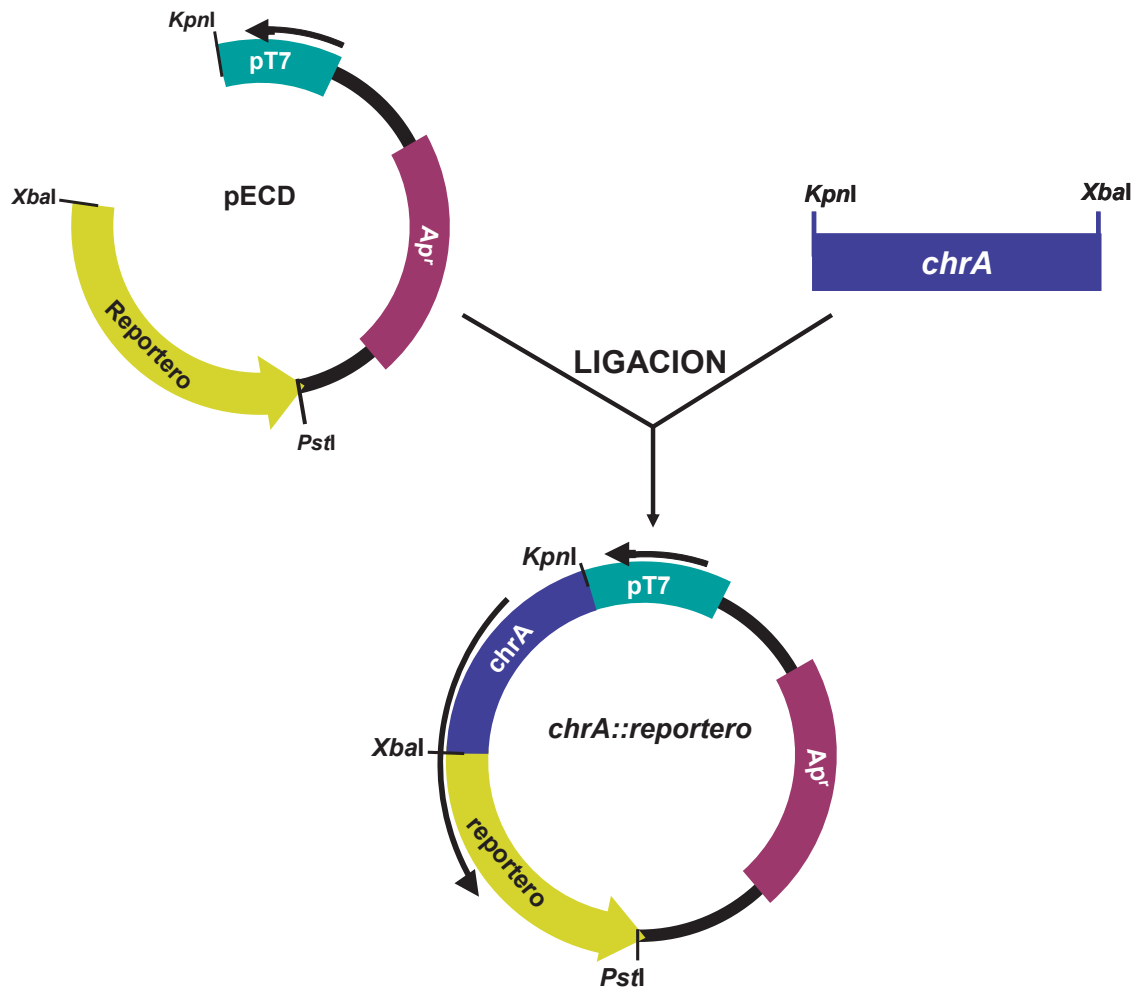


Figura 20.- Estrategia de construcción de las fusiones traduccionales. Los vectores pECD636 y pECD637 digeridos con las enzimas *KpnI* y *XbaI* se ligaron con los fragmentos de *chrA* digeridos de la misma forma. De esta forma se construyeron las fusiones traduccionales en donde *chrA* queda fusionado al gen reportero *lacZ* o *phoA*.

21 se muestra que la digestión con *KpnI* y *XbaI* liberó un fragmento de 4.3 kb, correspondiente al vector pECD637, y otro correspondiente a *chrA*, mientras que para el caso de las fusiones el pECD636 se liberó un fragmento de 6.5 kb y el de *chrA* (**Figura 21**).

Para la expresión y la cuantificación de la actividad enzimática de las fusiones traduccionales, los plásmidos con las fusiones traduccionales fueron transferidos a la cepa de *E. coli* CC118(pGP1-2). El plásmido pGP1-2 contiene el gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7 que reconoce el promotor pT7 presente en los vectores de expresión (Tabor y Richardson, 1985). Sólo las fusiones en los aminoácidos Val233 y Glu369 produjeron actividad enzimática de PhoA y no mostraron actividad de LacZ, mientras que las fusiones Phe263, Asp276, Gly305 y Ala334 no mostraron actividad significativa con ninguna de las dos enzimas (**Figura 22**).

5.- Construcción de los vectores de expresión pUCPphoA y pCUPlacZ

Debido a que con las fusiones construidas en los vectores de expresión pECD636 y pECD637 no se obtuvieron resultados que permitieran determinar la localización de las regiones donde se construyeron las fusiones, se procedió a la construcción de vectores binarios de expresión *E. coli-Pseudomonas*. Para ello se usó el vector pUCP20 (**Figura 14**), el cual fue digerido con las enzimas *KpnI* y *PstI* que liberan un fragmento de 30 pb y el resto del vector de 3.9 kb, el cual fue purificado. Después los vectores de expresión de la serie pECD fueron digeridos también con las enzimas *KpnI* y *PstI* que liberan el fragmento Kan^r-*phoA*, para el caso del vector pECD637, o Kan^r-*lacZ*, para el vector pECD636, y el resto del

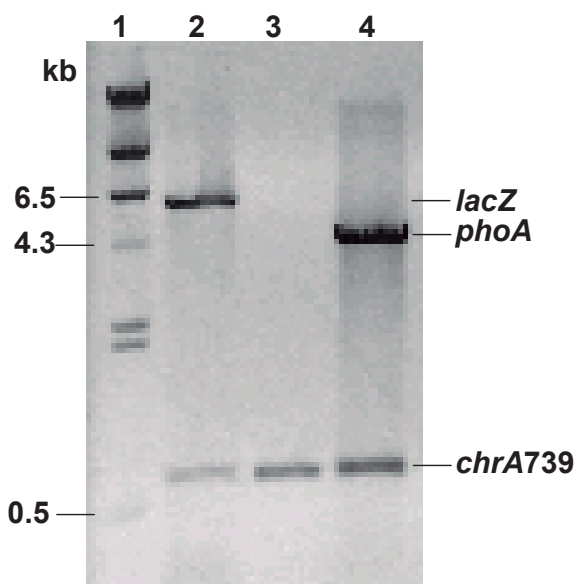


Figura 21.- Caracterización de fusiones traduccionales en los vectores pECD636 y pECD637. Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, λ *Hind*III; carril 2 digestión de la fusión *chrA739::lacZ* con *Kpn*I y *Xba*I que libera los fragmentos correspondiente al vector pECD636 (*lacZ*) y al fragmento de *chrA*; carril 3, producto de PCR de *chrA739*; carril 4, digestión de la fusión *chrA739::phoA* que libera los fragmentos de pECD637 (*phoA*) y el fragmento de *chrA739*.

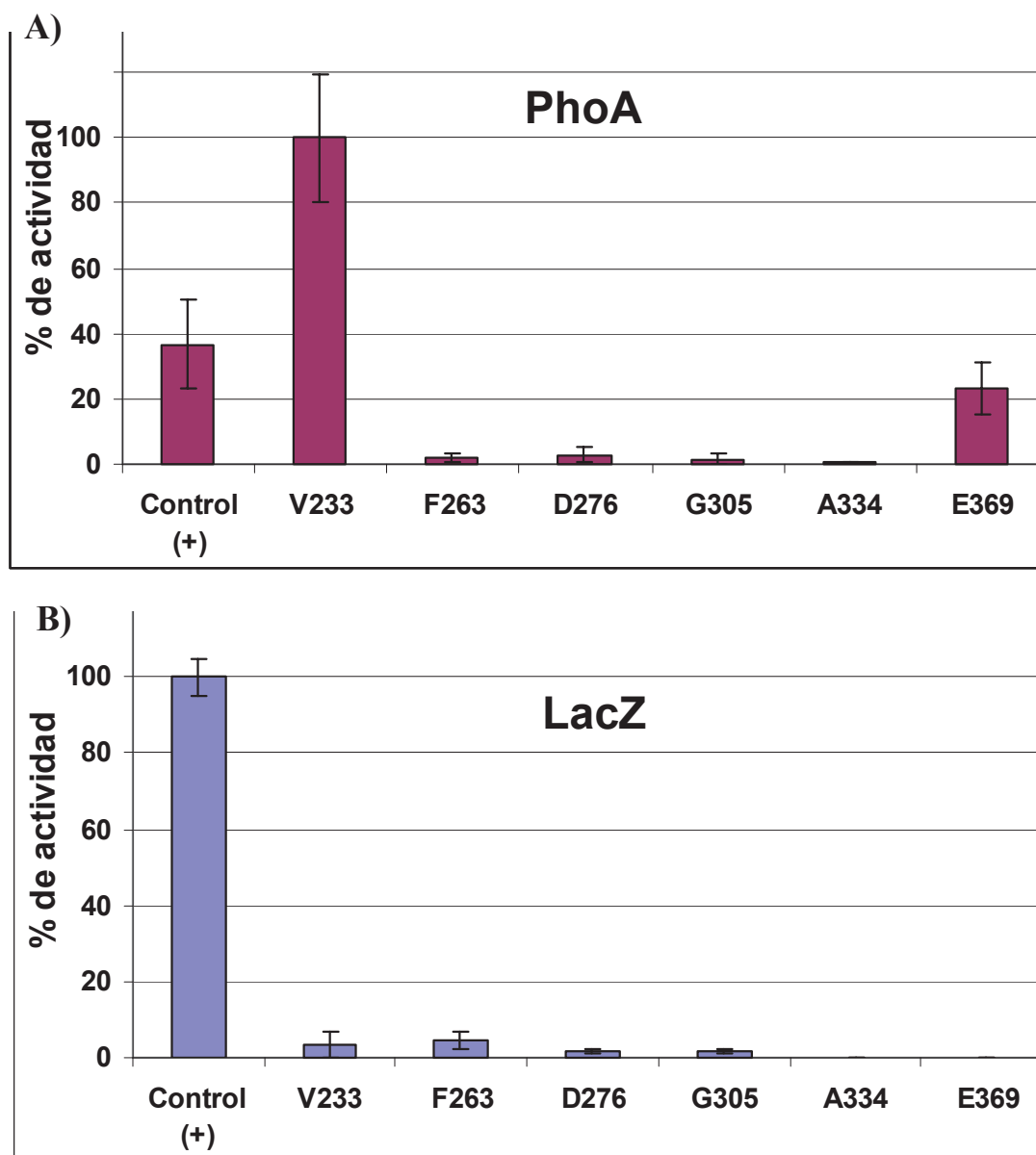


Figura 22.- Actividad enzimática de las fusiones traduccionales construidas en los vectores de expresión pECD. La actividad de PhoA y LacZ se midió en cultivos de *E. coli* CC118(pGP1-2) crecidos hasta la fase exponencial. **A)** Actividad de PhoA, y **B)** Actividad de LacZ de las fusiones construidas en los aminoácidos señalados abajo. Se muestran los valores obtenidos con los controles positivos del ensayo. La actividad se estandarizó a porcentaje. Los experimentos fueron repetidos tres veces por duplicado y se indican las barras de desviación estándar.

vector. El fragmento que contiene el gen reportero fue purificado y con los dos fragmentos de DNA deseados se procedió a su ligación para dar origen a los vectores de expresión binarios *E. coli-Pseudomonas* pUCPphoA (**Figura 23**) y pUCPlacZ (**Figura 24**). Las mezclas de ligación fueron transferidas por electroporación a células competentes de *E. coli* seleccionando las transformantes en ALB con ampicilina, y de las transformante se escogieron algunas colonias al azar para su posterior análisis.

Para la caracterización del vector pUCPphoA, la digestión con *Xba*I lineariza el vector de 6.3 kb, mientras que la digestión con *Kpn*I y *Pst*I produce dos fragmentos: el correspondiente al vector pUCP20, de 3.9 kb, y el de Kan^r-*phoA*, de 2.4 kb (**Figura 25**). Para el caso del vector pUCPlacZ se hizo un análisis similar, la linearización del vector produce un fragmento de 8.1 kb y la digestión con *Kpn*I y *Pst*I fragmentos de 3.9 kb y de 4.2 kb correspondientes a pUCP20 y a Kan^r-*lacZ*, respectivamente (**Figura 26**).

6.- Construcción y caracterización de las fusiones en los vectores pUCPphoA y pUCPlacZ

Para la construcción de las fusiones traduccionales en los vectores binarios de expresión pUCPphoA y pUCPlacZ (**Figuras 25 y 26**), el fragmento que contiene el gen de resistencia a kanamicina fue intercambiado por cada uno de los fragmentos de *chrA* de la siguiente manera. Los vectores fueron digeridos con las enzimas *Kpn*I y *Xba*I, lo cual liberó Kan^r y el resto del vector; este último fue purificado y usado para las reacciones de ligación. Por otro lado, cada uno de los fragmentos de *chrA* fue recuperado por digestión con las mismas enzimas a partir

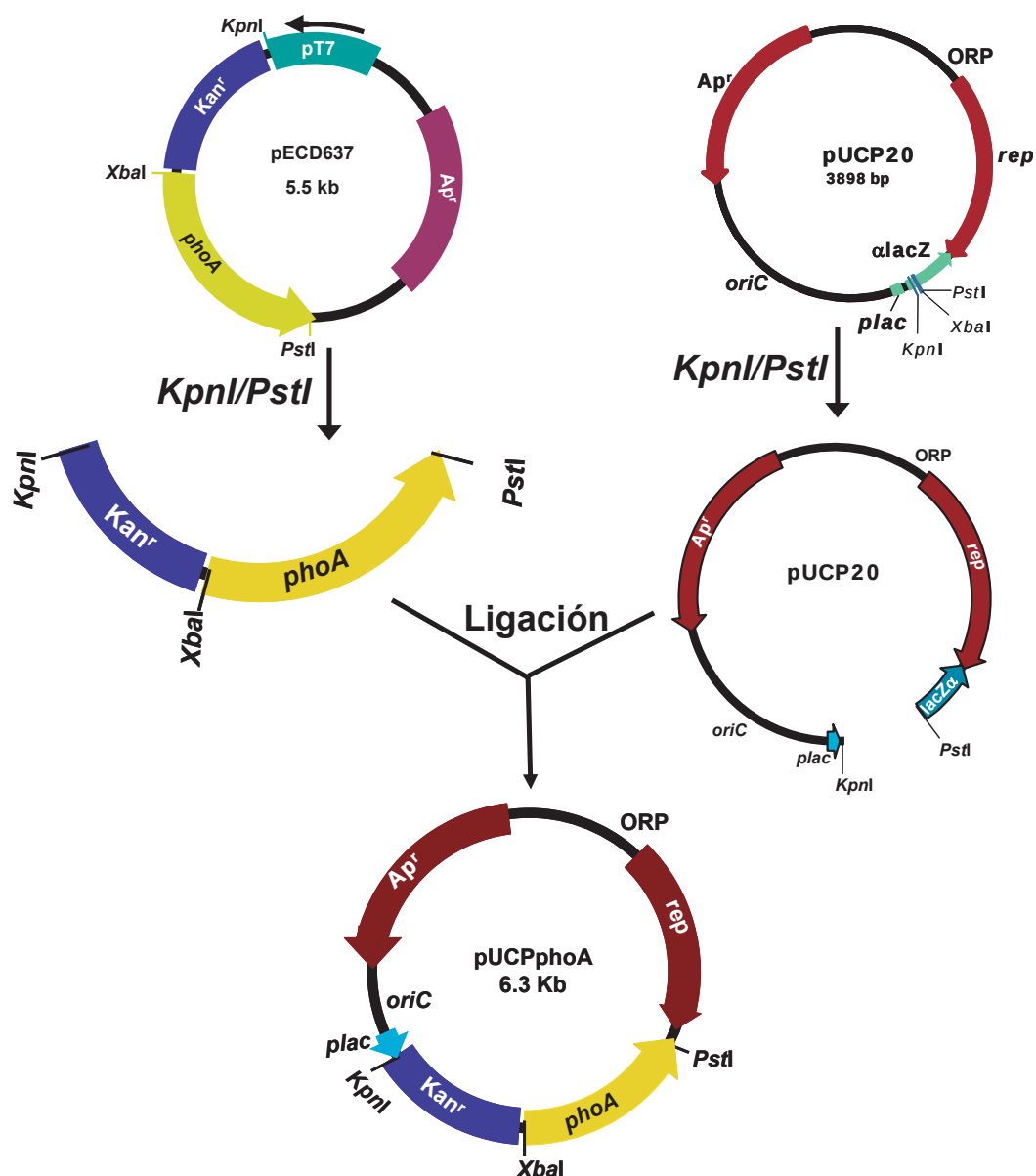


Figura 23.- Construcción del vector binario de expresión pUCPphoA. La digestión del vector pECD637 con *KpnI* y *PstI* libera el fragmento Kan^r-*phoA* el cual fue ligado en el vector pUCP20, digerido con las mismas enzimas, originando al vector pUCPphoA.

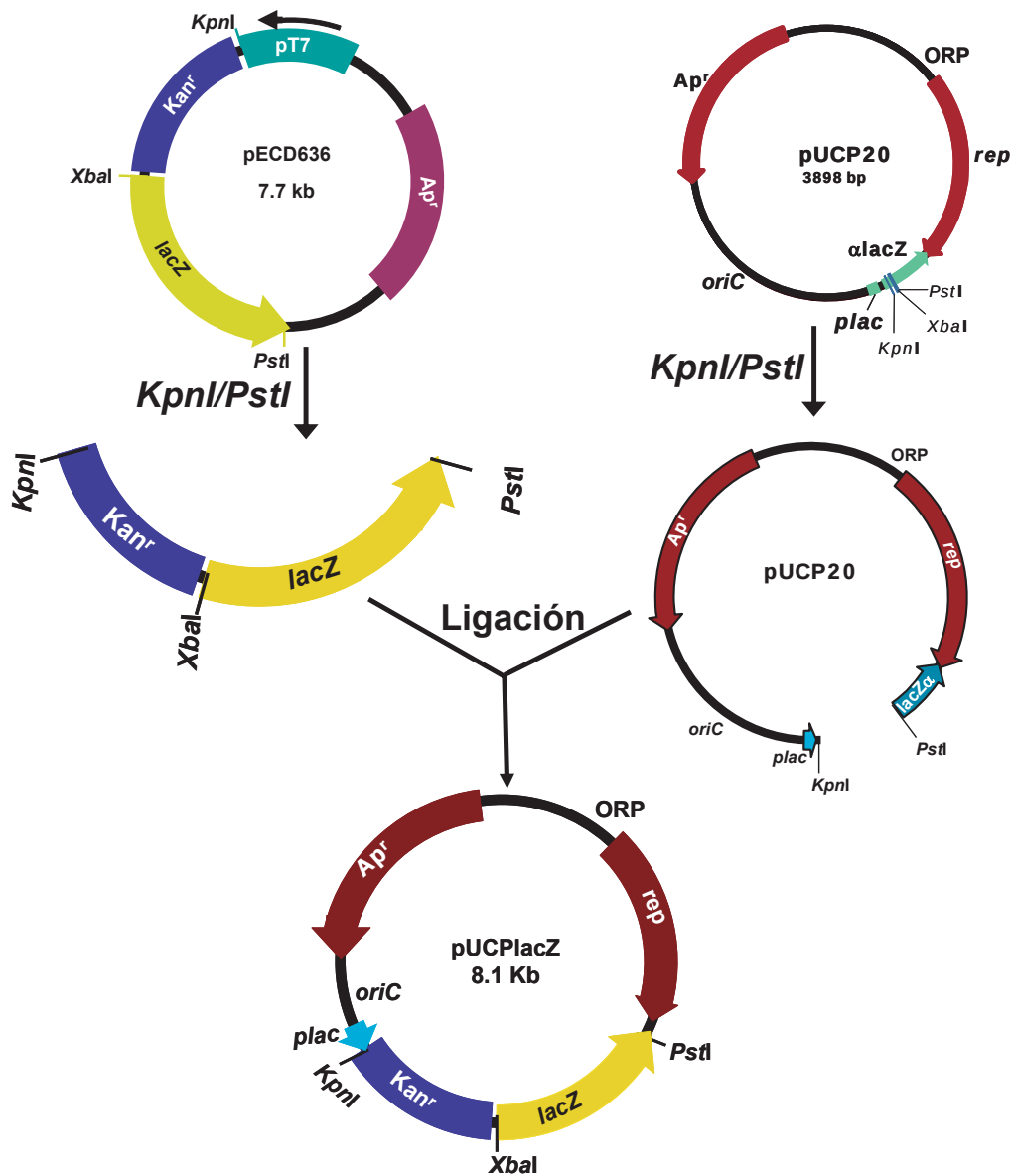


Figura 24.- Construcción del vector binario de expresión pUCPlacZ. La digestión del vector pECD636 con *KpnI* y *PstI* libera el fragmento Kan^r-*lacZ* el cual fue ligado en el vector pUCP20, digerido con las mismas enzimas, originando al vector pUCPlacZ.

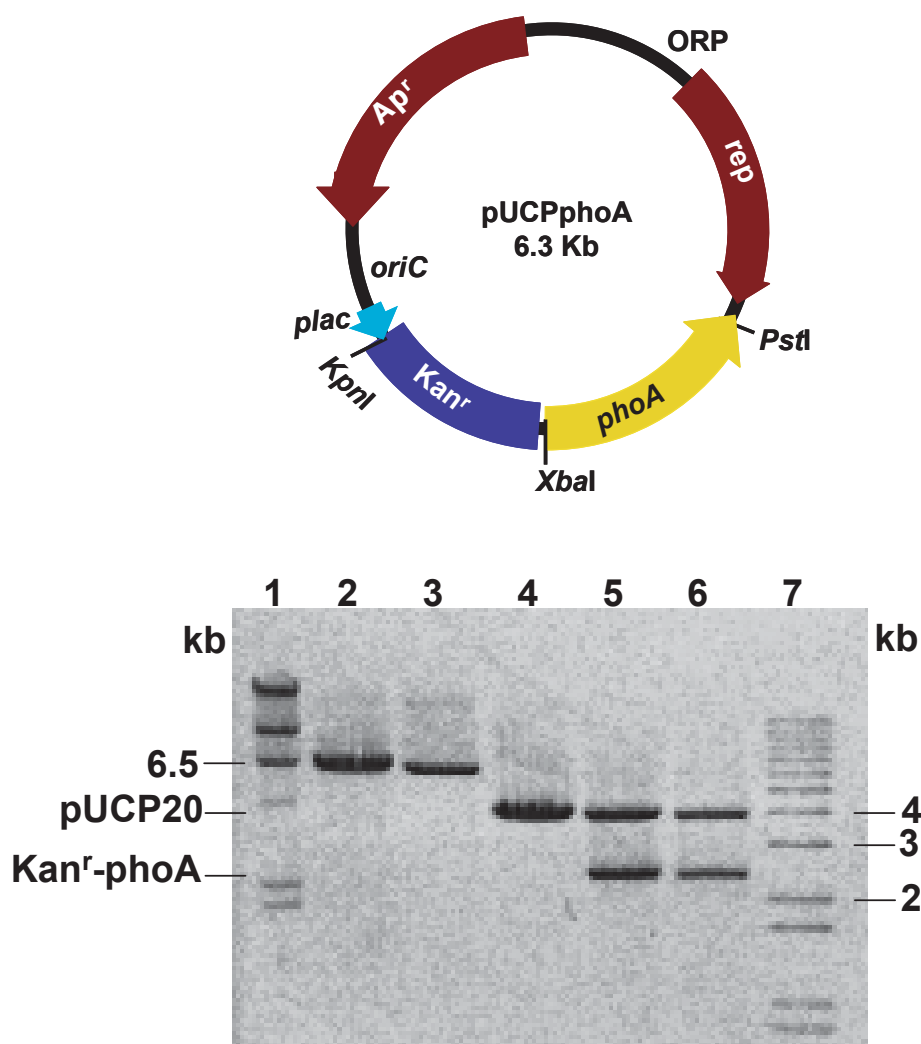


Figura 25.- Caracterización del vector binario de expresión pUCPphoA. **A)** Mapa de restricción del vector pUCPphoA. **B)** Fotografía del gel de agarosa. Carril 1, marcador λ HindIII; carriles 2 y 3, pUCphoA digerido con *XbaI*; carril 4, pUCP20 digerido con *XbaI*; carriles 5 y 6, pUCPphoA digerido con *KpnI* y *PstI*; y carril 7, marcador 1 kb plus. Se indica el tamaño de algunas de la bandas con los números o pUCP20 y Kan^r-phoA.

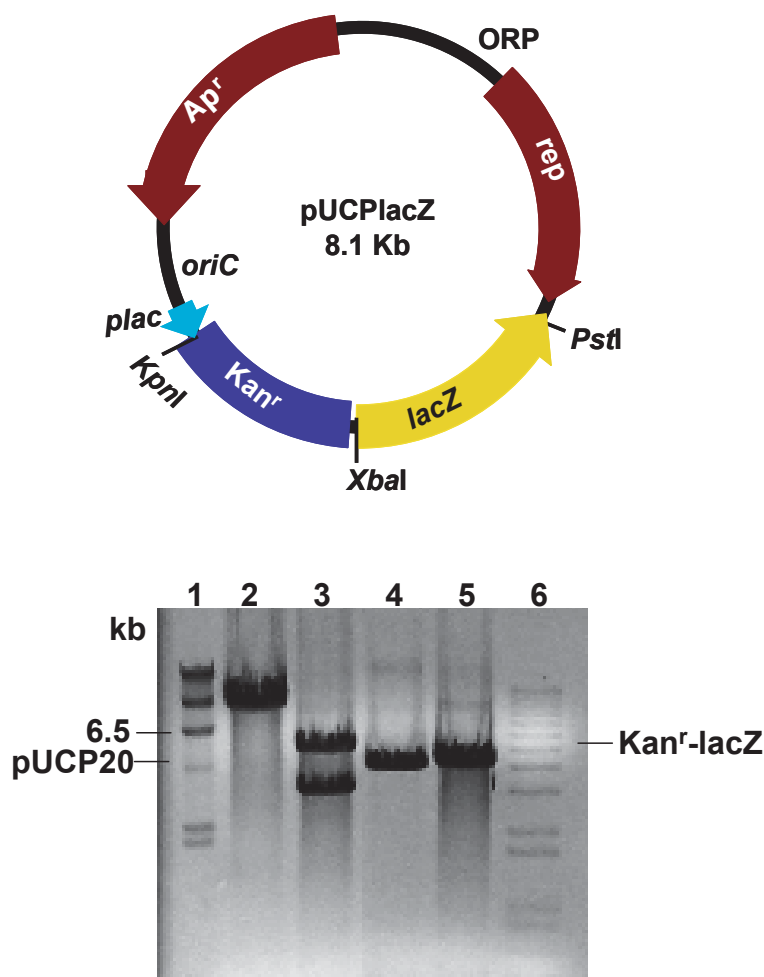


Figura 26.- Caracterización del vector binario de expresión pUCPlacZ. **A)** Mapa de restricción del vector pUCPlacZ. **B)** Fotografía del gel de agarosa. Carril 1, marcador λ *Hind*III; carril 2, pUCPlacZ digerido con *Xba*I; carril 3, pUCPlacZ digerido con *Xba*I y *Pst*I; carril 4, pUCP20 digerido con *Xba*I; carril 5, digerido con *Kpn*I y *Pst*I; y carril 6, marcador 1 kb plus. Se indican algunas de las bandas con número o pUCP20 y Kan^r-lacZ.

de los plásmidos pJIM. Se hicieron reacciones de ligación para la obtención de las fusiones traduccionales pUCP*chrA::phoA* (**Figura 27**) y pUCP*chrA::lacZ* (**Figura 28**), las cuales fueron caracterizadas en base a su patrón de restricción. Para el caso de las fusiones pUCP*chrA::phoA* la digestión con *KpnI* y *XbaI* libera un fragmento de 5.1 kb, correspondiente al vector, y otro correspondiente al fragmento de *chrA* ligado (**Figura 29**). Para las fusiones pUCP*chrA::lacZ* se liberan los fragmentos de 6.9 kb del vector y el de *chrA* (**Figura 29**).

7.- Secuenciación de las fusiones traduccionales

Una vez que se obtuvieron las fusiones traduccionales en los dos vectores binarios se verificó que la secuencia de nucleótidos conservara un solo marco de lectura desde *chrA* hasta los genes reporteros de los vectores. Para la secuenciación se diseñaron oligonucleótidos directos que se localizan aproximadamente 200 pb hacia el extremo 5' de los diferentes sitios de fusión. Una vez que se obtuvieron las secuencias se procedió a su análisis mediante su alineamiento usando el programa clustal W, primero a nivel de nucleótidos con los genes *chrA*, *phoA* y *lacZ* localizando en la secuencia la región correspondiente a cada gen e identificando los sitios de fusión. Después, las secuencias de nucleótidos se tradujeron y se analizaron las secuencias a nivel de aminoácidos. De esta forma se confirmó que las fusiones conservaron el marco de lectura en fase de las cuales sólo se presentan 8 fusiones representativas con cada una de las proteínas reporteras (**Tabla 2**), donde se observa en la columna de la izquierda el sitio de fusión y en la columna del centro la secuencia de las fusiones ChrA::PhoA, la secuencia a la derecha corresponde a la secuencia de ChrA y

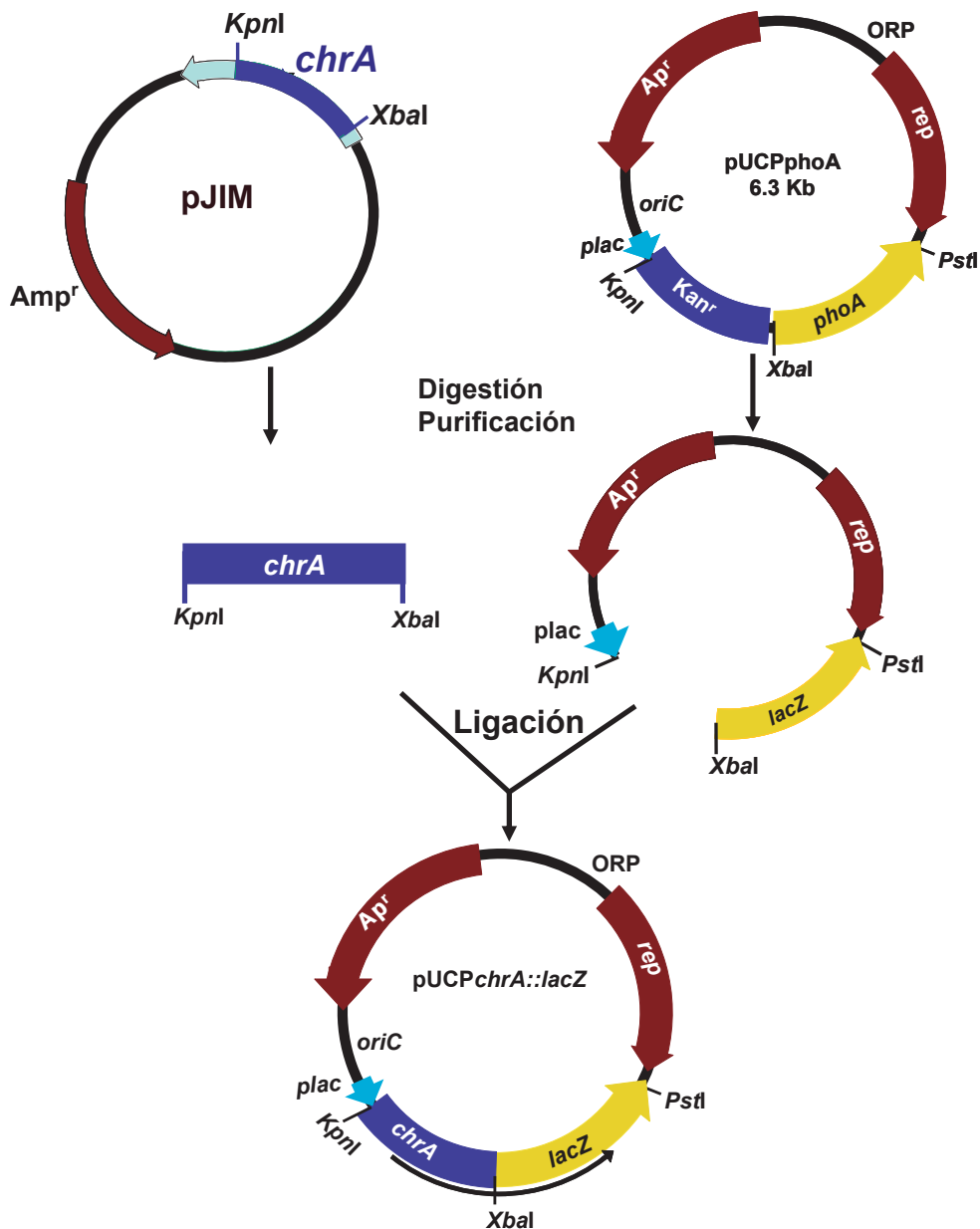


Figura 27.- Estrategia de construcción de las fusiones traduccionales pUCPchrA::phoA. Los fragmentos de *chrA* fueron recuperados por digestión con *KpnI* y *XbaI* a partir de los pJIM y el vector pUCPphoA fue digerido de la misma forma con *KpnI* y *XbaI*. Con estos fragmentos se construyeron las fusiones traduccionales pUCPchrA::phoA en donde *chrA* quedó fusionado al gen reportero *phoA*.

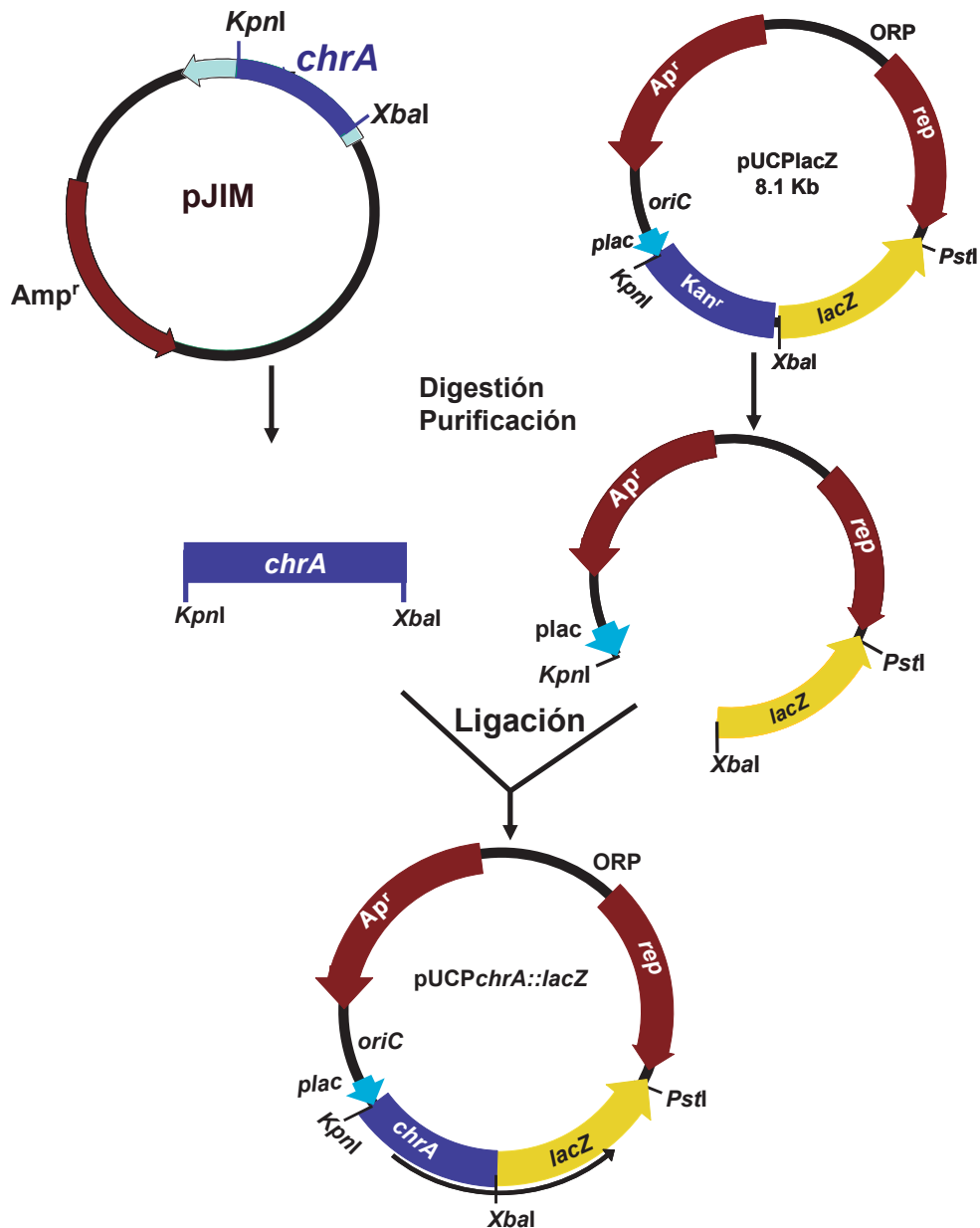


Figura 28.- Estrategia de construcción de las fusiones traduccionales pUCPchrA::lacZ. Los fragmentos de *chrA* fueron recuperados por digestión con *KpnI* y *XbaI* a partir de los pJIM y el vector pUCPlacZ fue digerido de la misma forma con *KpnI* y *XbaI*. Con estos fragmentos se construyeron las fusiones traduccionales pUCPchrA::lacZ en donde *chrA* queda fusionado al gen reportero *lacZ*.

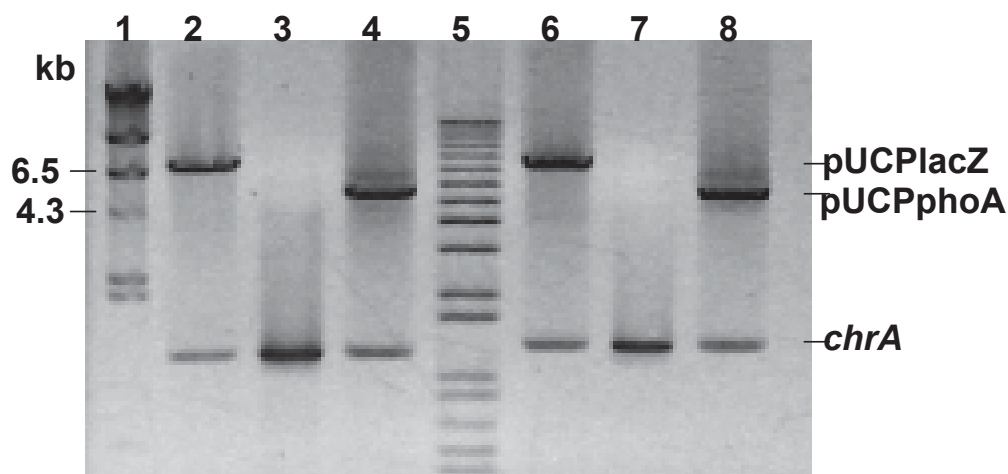


Figura 29.- Caracterización de las fusiones traduccionales en los vectores binarios. Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, marcador λ HindIII; carriles 2 y 6, fusiones pUCPchrA1279::lacZ y pUCPchrA1288::lacZ digeridas con KpnI y XbaI; carriles 4 y 8, fusiones pUCPchrA1279::phoA y pUCPchrA1288::phoA digeridas con KpnI y XbaI; carriles 3 y 7, productos de PCR de 1279 y 1288 pb, respectivamente; carril 5, marcador 1 kb plus. Se indican algunas bandas con los números o con pUCPlacZ, pUCPphoA y chrA.

Tabla 2.- Análisis de las secuencias de ocho fusiones traduccionales representativas

Localización ^a	Fusiones ChrA::PhoA ^b	Fusiones ChrA::LacZ ^b
A188	FWITLPA <u>SRGPP</u> VLENRAA	FWITLPA <u>SRGPP</u> VVLQRRD
V233	KLVEAVV <u>SRGPP</u> VLENRAA	KLVEAVV <u>SRGPP</u> VVLQRRD
F263	AYTAIPF <u>SRGPP</u> VLENRAA	AYTAIPF <u>SRGPP</u> VVLQRRD
D276	GRGWMTD <u>SRGPP</u> VLENRAA	GRGWMTD <u>SRGPP</u> VVLQRRD
G305	FVGYVAG <u>SRGPP</u> VLENRAA	FVGYVAG <u>SRGPP</u> VVLQRRD
A334	FYDRLEA <u>SRGPP</u> VLENRAA	FYDRLEA <u>SRGPP</u> VVLQRRD
E369	LAQVTAE <u>SRGPP</u> VLENRAA	LAQVTAE <u>SRGPP</u> VVLQRRD
G416	LVFPNQG <u>SRGPP</u> VLENRAA	LVFPNQG <u>SRGPP</u> VVLQRRD

^aSitios donde se realizaron las fusiones.

^bSe subraya el sitio de fusión.

subrayado el sitio de fusión y enseguida la secuencia correspondiente a PhoA, en la columna de la derecha en el mismo orden se muestran las fusiones ChrA::LacZ.

8.- Cuantificación de la actividad enzimática de las fusiones

Una vez que se obtuvieron las fusiones se procedió a cuantificar su actividad enzimática, como se describió en Materiales y Métodos. La cuantificación de la actividad se hizo tanto en la cepa de *E. coli* CC118 como en *P. aeruginosa* PAO1.

a) Cuantificación de la actividad enzimática en *E. coli* CC118

Se midió la actividad de las 16 fusiones traduccionales construidas con cada reportero (**Figura 30**). Para facilitar la comparación entre la actividad de PhoA y LacZ de cada fusión se normalizaron las actividades enzimáticas, tomando como 100% la actividad de la fusión con mayor actividad y derivando de ahí los demás porcentajes y se tomó como resultado positivo sólo las fusiones que presentaron actividad igual o mayor a 15%. Se obtuvieron los siguientes resultados. Las fusiones que sólo mostraron actividad significativa de PhoA fueron: Ala188 (29%), Val233 (51%), Ala310 (23%) y Pro413 (30%) y no produjeron actividad significativa de LacZ, lo cual indica que las regiones donde se localizan estos aminoácidos se encuentran en el periplasma. Por otro lado, las fusiones que produjeron actividad significativa sólo de LacZ fueron: Ile159 (99%), Phe263 (20%), Asp276 (100%), Ala334 (41%) y Asn393 (33%) y no mostraron actividad de PhoA, lo cual indica que estas regiones se localizan en el citoplasma. Las fusiones en los aminoácidos Glu369 y Gly416 sin embargo produjeron actividad de ambas enzimas (100 y 64% de PhoA, y 42 y 30% de LacZ, respectivamente), mientras

que con las fusiones en los aminoácidos Val152, Asp162, Gly305 y Met313 no se obtuvo actividad significativa de ninguna de las dos enzimas (**Figura 30**); estos resultados sugieren que las regiones donde se encuentran estos aminoácidos pueden estar localizadas en un segmento transmembranal (STM) o interaccionando con la interfase de la membrana.

b) Actividad enzimática de las fusiones traduccionales en *P. aeruginosa* PAO1

Para la determinación de la actividad enzimática de las fusiones en *P. aeruginosa* PAO1 se transformaron células competentes con cada una de las fusiones. Los resultados de actividad en *P. aeruginosa* fueron muy similares a los resultados obtenidos para *E. coli*. Las fusiones que sólo presentaron actividad de PhoA fueron Ala188 (30%), Val233 (90%), Ala310 (15%) y Pro413 (79%) y no se obtuvo actividad significativa de LacZ. Mientras que las fusiones que sólo presentaron actividad de LacZ fueron Ile159 (100%), Phe263 (32%), Asp276 (48%), Ala334 (42%) y Asn393 (15%) y no se detectó actividad significativa de PhoA. Por otro lado, las fusiones en los aminoácidos Glu369 y Gly416 produjeron actividad con ambas enzimas (42 y 100% de PhoA, y 19 y 31% de LacZ, respectivamente). Las fusiones localizadas en los aminoácidos Val152, Asp162, Gly305 y Met313 no mostraron actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras (**Figura 31**).

9.- Localización de las fusiones en el modelo topológico propuesto para ChrA

Una vez que se obtuvieron los resultados de actividad enzimática se

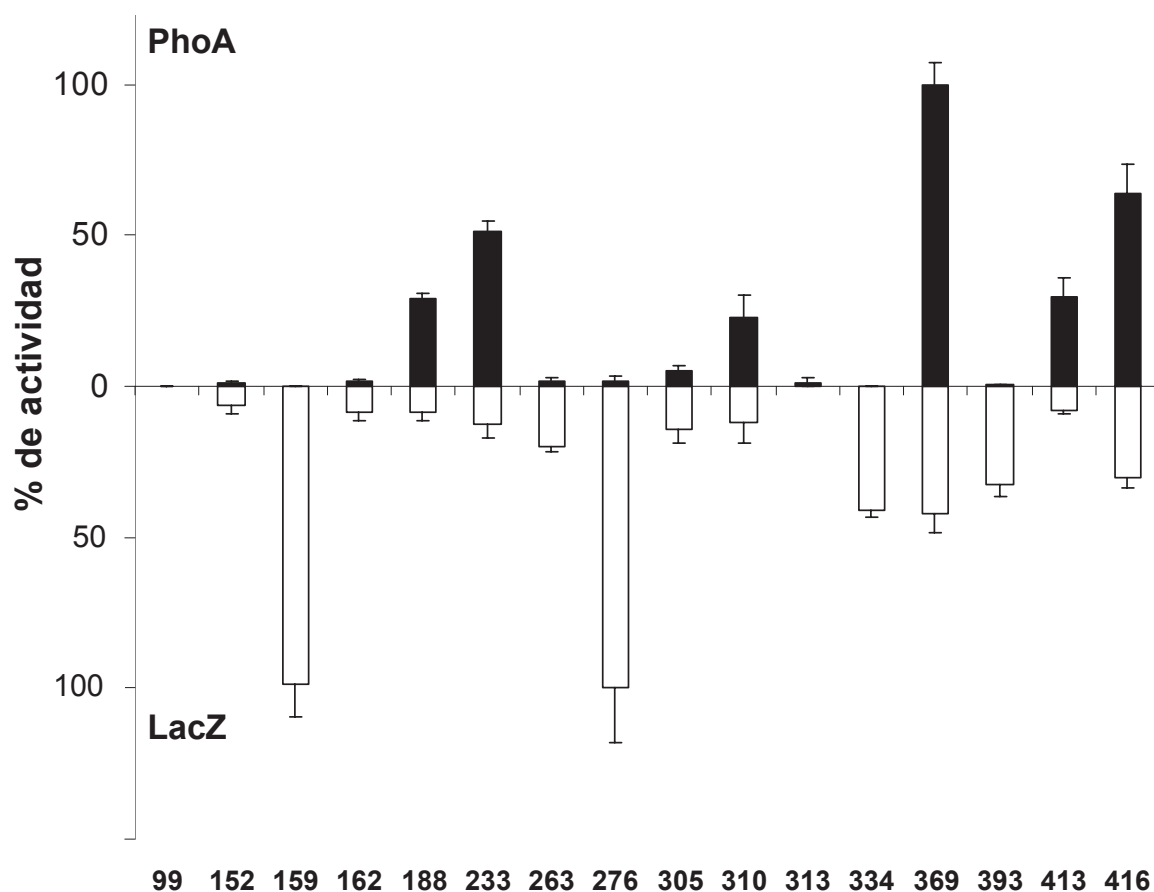


Figura 30. Actividad de las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa de las fusiones de ChrA en *E. coli* CC118. Se indica el número de los aminoácidos donde fueron construidas las fusiones. En la parte superior se muestra la actividad normalizada de PhoA de las fusiones traduccionales hechas en ChrA (barras negras) y en la parte inferior la actividad normalizada de LacZ (barras vacías). Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces por duplicado y con las barras se indica la desviación estándar.

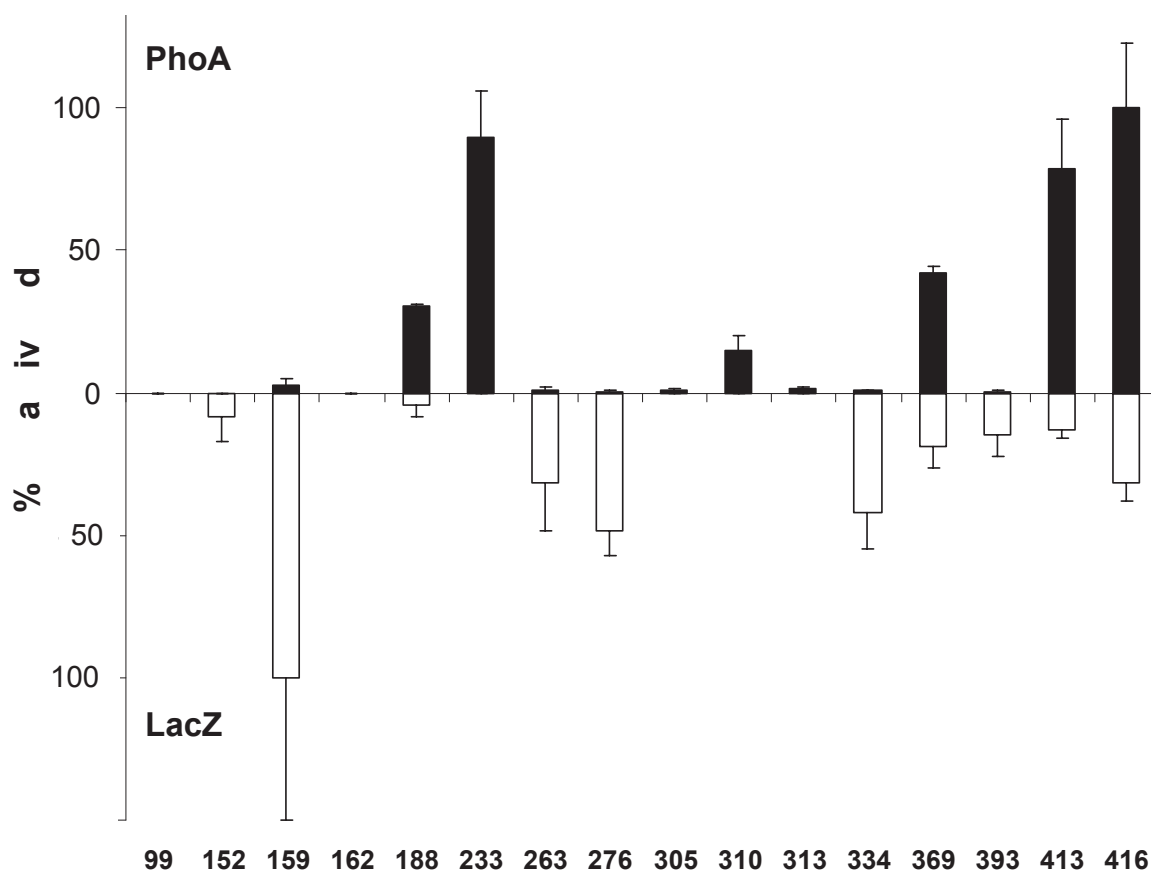


Figura 31. Actividad de las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa de las fusiones de ChrA en *P. aeruginosa* PAO1. Se indica el número de los aminoácidos donde fueron construidas las fusiones. En la parte superior se muestra la actividad normalizada de PhoA de las fusiones traduccionales hechas en ChrA (barras negras) y en la parte inferior la actividad normalizada de LacZ (barras vacías). Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces por duplicado y con las barras se indica la desviación estándar.

localizaron los sitios de fusión en el modelo topológico de 12 STM propuesto para ChrA (**Figura 1**). Los resultados obtenidos de las fusiones del extremo amino terminal hasta Ala188, localizada en el asa periplásmica tres (P3), concuerdan con el modelo topológico de 12 STM (**Figura 32**). Sin embargo, la fusión en el aminoácido Val233, que está localizada en el asa citoplásmica tres (C3), sólo produjo actividad de PhoA, lo cual indica que esta región debería estar en el periplasma y no en el citoplasma. De igual forma, la fusión en Phe263, localizada en el asa periplásmica cuatro (P4), sólo produjo actividad de LacZ, por lo que debería de tener una localización citoplásmica. El resto de las fusiones en la mitad carboxilo terminal de la proteína mostraron una localización opuesta de acuerdo a la actividad enzimática que produjeron, esto es, las que produjeron actividad de PhoA se localizan en el citoplasma o en la interfase citoplásmica de la membrana en el modelo de 12 STM y las que produjeron actividad de LacZ se localizaron en el periplasma. Los resultados obtenidos indican que la topología de la mitad carboxilo tiene una orientación opuesta de acuerdo con el modelo de 12 STM. Por esto se realizó un nuevo perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos de ChrA (**Figura 33**) el cual mostró que ChrA puede contener 13 picos de hidrofobicidad que pueden representar ese número de segmentos transmembranales. Derivado de este perfil hidropático se propuso un nuevo modelo topológico para ChrA el cual consta de 13 STM conectados por seis asas periplásmicas y seis asas citoplásmicas, con el extremo amino en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma (**Figura 34**). En este modelo se localizaron los sitios donde se construyeron las fusiones traduccionales y la localización concuerda con la actividad enzimática obtenida; esto es, las fusiones en las que se obtuvo

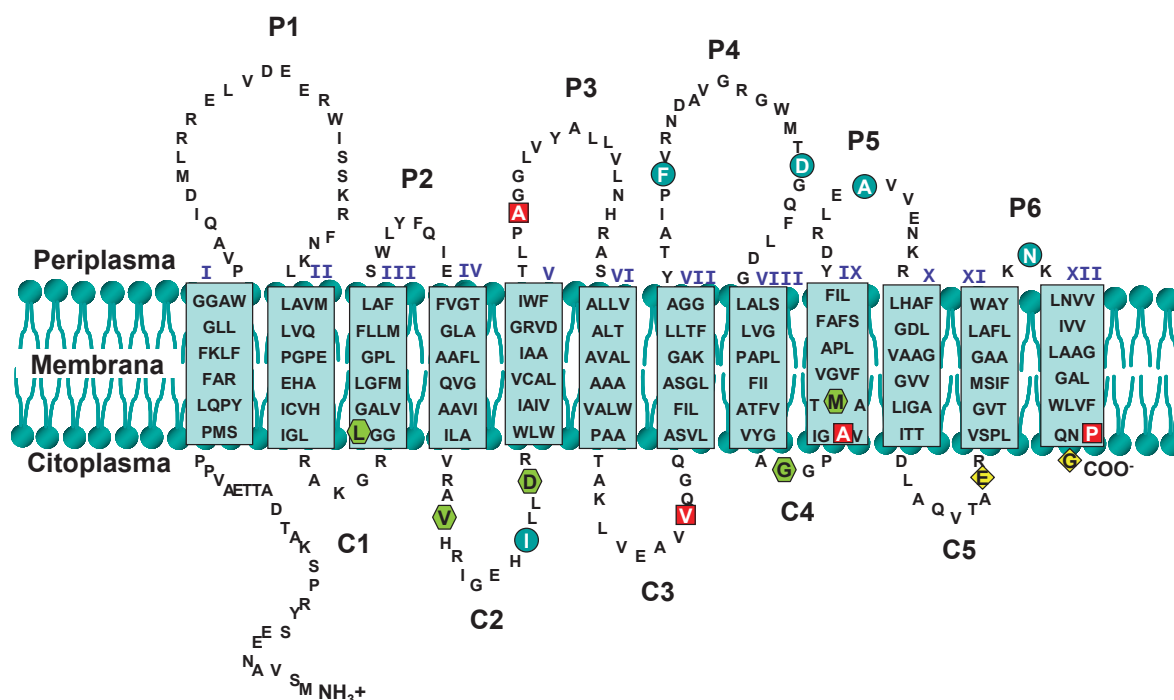


Figura 32.- Localización de las fusiones de ChrA en el modelo de 12 STM. Se indica la localización de las fusiones y los resultados obtenidos en los ensayos de PhoA y LacZ. (□), sitios de fusión en los cuales sólo se obtuvo actividad de PhoA; (○), sitios donde sólo se obtuvo actividad de LacZ; (◊), sitios donde se obtuvo actividad de PhoA y de LacZ; (◊), no se obtuvo actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras.

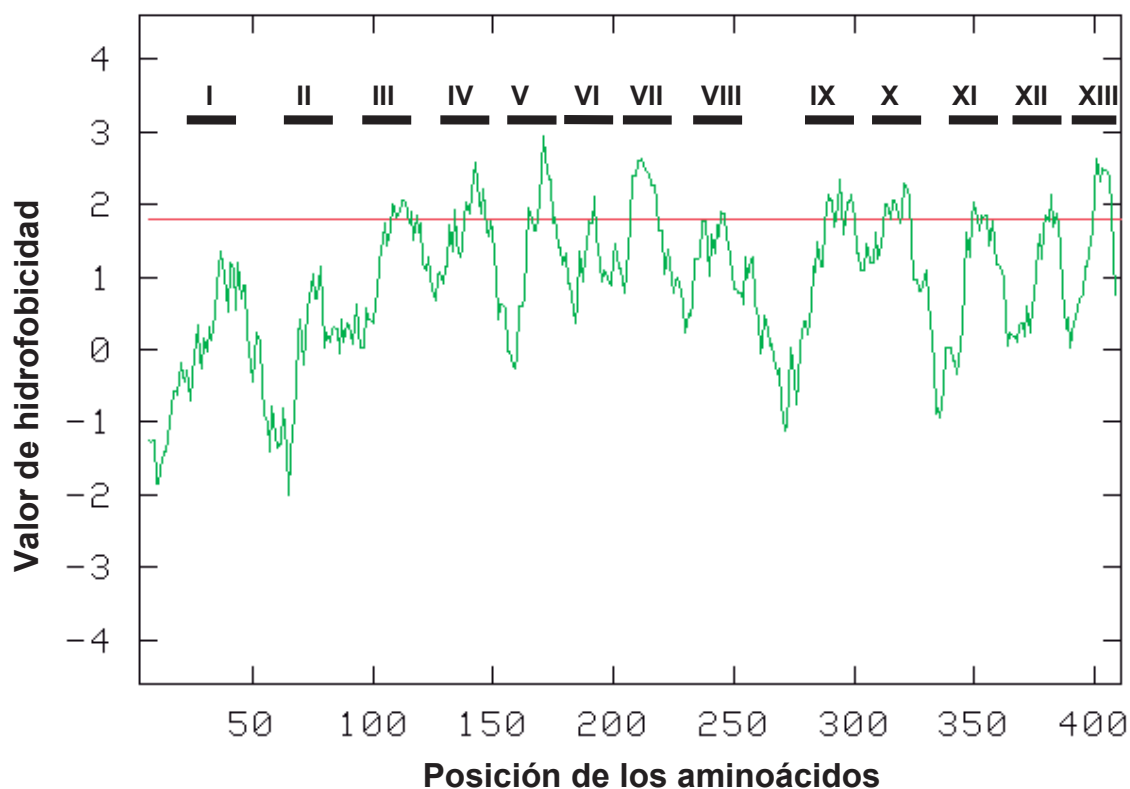


Figura 33.- Perfil hidropático de ChrA. Se grafica el valor de hidrofobicidad contra la secuencia de aminoácidos. Las barras superiores indican las 13 regiones hidrofóbicas que representan probables segmentos transmembranales. Algoritmo de Kyte y Doolittle, 1982.

actividad de PhoA se encuentran en el periplasma, o cerca de este compartimiento, y las fusiones que mostraron actividad de LacZ se localizan en el citoplasma. Por otra parte, las fusiones que produjeron actividad de ambas enzimas se localizaron en el periplasma y las que no mostraron actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras se encontraron cerca de la membrana o dentro de un STM (**Figura 34**).

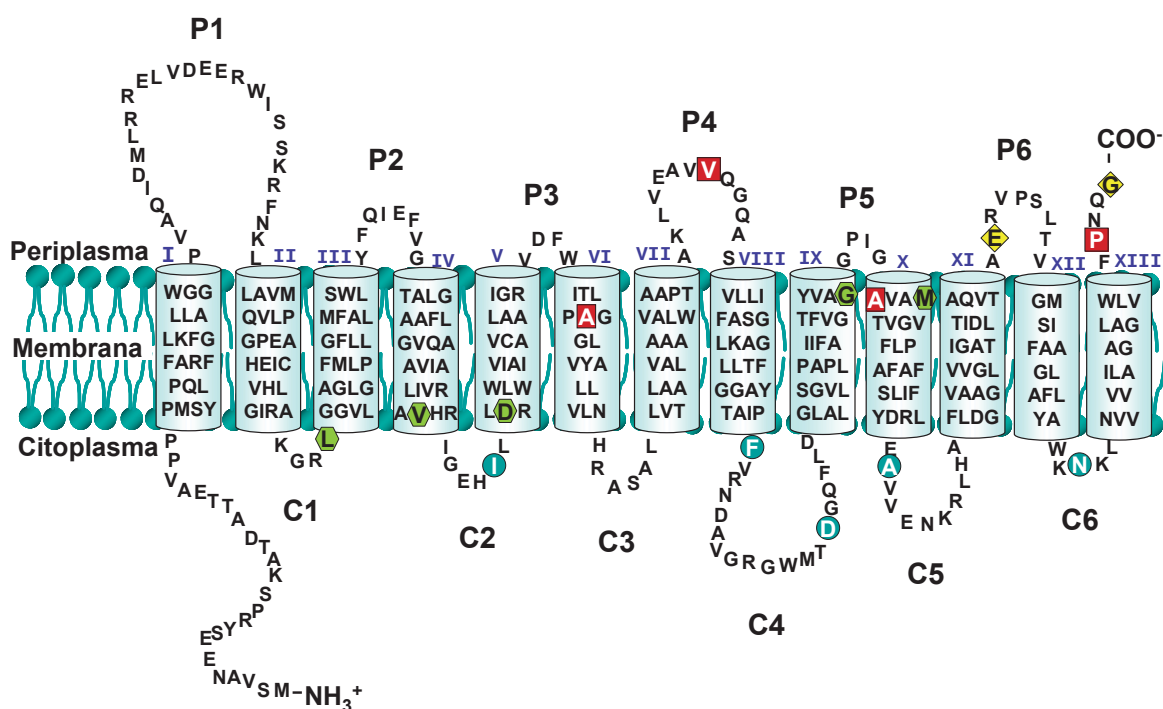


Figura 34.- Modelo topológico de ChrA de 13 STM. Se muestra el modelo de 13 STM representados por los rectángulos conectados por seis asas periplásmicas (P1-P6) y seis asas citoplásmicas (C1-C6), con el extremo amino en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma. Con los símbolos se indica la localización de los sitios de fusión y los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos como sigue: (□), sólo se obtuvo actividad de PhoA; (○), sólo se obtuvo actividad de LacZ; (◇), se obtuvo actividad de PhoA y LacZ; (∅), no se obtuvo actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras.

VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

El gen *chrA* que confiere resistencia a cromato fue identificado en el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* y del análisis de la secuencia de este gen se determinó que codifica la proteína hidrofóbica ChrA (Cervantes y col., 1990). La proteína ChrA se ha caracterizado funcionalmente y se determinó que participa como un transportador que expulsa el cromato del citoplasma hacia el espacio periplásmico en un proceso dependiente del gradiente de protones como fuente de energía (Pimentel y col., 2002).

Un aspecto fundamental de la estructura de las proteínas de membrana es su topología, es decir, el número de STM y su orientación en la membrana. Las técnicas bioquímicas usadas para analizar la topología de las proteínas están basadas en la modificación de los genes estructurales que codifican para esas proteínas (van Geest y Lolkema, 2000). La estrategia más ampliamente usada para obtener información topológica de proteínas de membrana es mediante el uso de fusiones traduccionales, donde el gen que codifica una proteína reportera se fusiona a diferentes sitios del gen que codifica la proteína de membrana en estudio y la actividad de las proteínas de fusión resultantes indican en qué lado de la membrana (hacia el citoplasma o hacia el periplasma) se localiza la fusión (Manoil, 1990). La determinación de la topología membranal de un transportador es importante para conocer la localización de residuos o regiones esenciales para la función o para la correcta estructura de la proteína.

Con datos obtenidos de fusiones traduccionales en la región amino terminal de ChrA, se propuso que esta proteína tiene 12 STM con sus extremos amino y carboxilo en el citoplasma (Aguilera y col., 2004); sin embargo, en ese trabajo sólo se analizó una pequeña porción de la proteína y se obtuvieron algunos resultados inconsistentes con la topología propuesta. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue analizar más detalladamente la topología de la proteína ChrA mediante la construcción de una mayor cantidad de fusiones traduccionales con las proteínas reporteras PhoA y LacZ, que cubrieron la mayor parte de la proteína (**Figura 17**).

Para la construcción de las fusiones en los vectores de expresión pECD636 y pECD637 (**Figura 13**) son esenciales los sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *XbaI*; sin embargo, dentro de la secuencia de *chrA* (**Figura 15A**) se localiza un sitio de reconocimiento para la enzima *KpnI* que dificulta construir las fusiones más allá de esa región. Este sitio fue removido por mutagénesis sitio dirigida (**Figura 15B**).

Los sitios para la construcción de las fusiones traduccionales con las proteínas reporteras se seleccionaron en el modelo topológico de 12 STM propuesto para ChrA (Aguilera y col., 2004). El criterio para la selección de estos sitios fue que al menos cada una de las probables asas hidrofílicas, en las que no se habían construido fusiones traduccionales o cuyos resultados anteriores no fueron concluyentes, tuviera al menos una fusión. En total se seleccionaron 16 sitios, la distribución de éstos se eligió partiendo de la probable asa citoplásmica uno (C1) y hacia el extremo carboxilo terminal, de tal manera que en la mayoría de las probables asas hidrofílicas se seleccionó al menos un sitio (**Figura 17**).

Primero se amplificaron por PCR los 16 fragmentos de *chrA* a partir del plásmido pMUK4, utilizando los oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 1** y se ligaron en los vectores de expresión pECD636 y pECD637.

Los resultados obtenidos de las fusiones construidas en estos vectores no revelaron información concluyente de la topología de ChrA puesto que de seis fusiones sólo dos produjeron actividad enzimática de PhoA, mientras que el resto no produjeron actividad con ninguna de las dos proteínas reporteras (**Figura 22**). La razón de la falta de actividad en estas fusiones no está clara, pero se considera que puedan ser problemas de expresión o que la proteína de fusión no se estuviera integrando en la membrana correctamente.

La mayoría de las proteínas bacterianas de membrana cuya topología se conoce son de *E. coli*, mientras que las de otras bacterias han sido analizadas de forma heteróloga en *E. coli* debido a que los vectores de expresión para la construcción de fusiones traduccionales están diseñados para ésta bacteria. Además, se ha encontrado que algunas de las proteínas heterólogas no son funcionales en *E. coli*, como es el caso de los transportadores de cromato caracterizados hasta la fecha (Cervantes y col., 1990; Nies y col., 1990). Para estos casos se ha sugerido que la falta de funcionalidad puede ser debida a que la proteína no se integra de forma correcta en la membrana de *E. coli*. Sin embargo, también se han reportado proteínas heterólogas que son activas en *E. coli*, como es el caso de el transportador de citrato CitS de *Klebsiella pneumoniae* (van Geest y Lolkema, 1996).

Para las proteínas que no son funcionales en *E. coli*, y cuyo análisis se ha hecho en este organismo, puede quedar duda de que la topología determinada

para esas proteínas heterólogas sea semejante a la que presenta en el organismo del cual provienen. Esto debido a que la no funcionalidad podría sugerir que la topología membranaral no sea exactamente igual en el huésped heterólogo.

Debido a que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* no es funcional en *E. coli* (Cervantes y col., 1990), y por los resultados ambiguos de las fusiones traduccionales hechas en los vectores de expresión de *E. coli* (Aguilera y col., 2004), se decidió construir vectores binarios de expresión que permitieran obtener información topológica de ChrA de forma comparativa tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*. De esta forma además se podría evaluar si la falta de función de la proteína en *E. coli* es debida a diferencias topológicas. El análisis de la topología de las proteínas de membrana en el organismo del cual provienen no es muy frecuente debido a la falta de vectores de expresión para fusiones traduccionales ya que, como se mencionó, casi todos los vectores de esta clase son para *E. coli*. El análisis topológico comparativo en *E. coli* y en el organismo del cual proviene la proteína en estudio se ha llevado a cabo para muy pocas proteínas de membrana, como son los casos de las proteínas de la subunidad L del centro de reacción fotosintético de *Rhodobacter sphaeroides* (Yun y col., 1991), las proteínas sensor cinasa RegB y PrrB de *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*, respectivamente (Chen y col., 2000; Ouchane y Kaplan, 1999). Para estas proteínas se ha encontrado que la topología determinada en *E. coli* es muy similar a la determinada en la bacteria de la cual provienen; sin embargo, se han identificado alteraciones menores y se ha propuesto que éstas pueden ser por diferencias en la composición de las membranas de las dos bacterias.

Para la construcción de los vectores de expresión binarios se partió del vector binario *E. coli*-*Pseudomonas* pUCP20 (West y col., 1994) (**Figura 14**) y de los fragmentos que contienen el gen de resistencia a kanamicina unido al gen reportero (Kan^r-Reportero) de los vectores de expresión pECD636 y pECD637 (**Figura 13**). De esta manera se construyeron los vectores de expresión binarios pUCPphoA (**Figura 23**) y pUCPlacZ (**Figura 24**).

Una vez que se caracterizaron los vectores binarios de expresión, se construyeron las 16 fusiones traduccionales diseñadas en cada uno de los vectores (**Figuras 27 y 28**). Para comprobar que se conservó un sólo marco de lectura entre *chrA* y los genes reporteros, las fusiones traduccionales fueron secuenciadas. Posteriormente, para la medición de la actividad enzimática de cada una de la 16 fusiones traduccionales, éstas fueron transferidas a las cepas de *E. coli* CC118 y de *P. aeruginosa* PAO1.

Debido a las diferencias que existen entre los ensayos de PhoA y LacZ y a la variabilidad que existe en las condiciones de los ensayos con las dos enzimas reporteras se obtuvieron valores numéricos de actividad diferentes en ambas bacterias. Esto se debe a factores que no se pueden controlar como, por ejemplo, la permeabilización celular, cuya eficiencia puede ser distinta en las dos especies. Puesto que nos interesaba establecer la relación entre la actividad de PhoA y LacZ en el mismo sitio de fusión, los datos de actividad enzimática fueron normalizados tomando como 100% la fusión que presentó la mayor actividad para cada una de las enzimas, como se ha reportado en otros trabajos (Nies y col., 1998; Young y Beatty, 1998). En los resultados de las fusiones que fueron positivas para cada reportero se encontraron diferencias entre los valores de

actividad, por lo que se estableció el criterio arbitrario de tomar como resultado positivo sólo aquellas fusiones que presentaran actividad igual o mayor a 15% de cualquiera de las enzimas reporteras en las dos bacterias.

De acuerdo a los resultados de actividad de las proteínas reporteras obtenidos en *E. coli*, las fusiones se clasificaron en cuatro grupos. El primer grupo se refiere a las fusiones que sólo presentaron actividad significativa de PhoA (Ala188, Val233, Ala310 y Pro413), por lo que a estos sitios se les asignó una localización periplásmica (**Figura 30**). En el segundo grupo se encuentran las fusiones que sólo mostraron actividad de LacZ (Ile159, Phe263, Asp276, Ala334 y Asn393), por lo que a las regiones donde se localizan estas fusiones se les asignó una localización citoplásmica (**Figura 30**). El tercer grupo lo conforman las fusiones que produjeron actividad enzimática con ambas proteínas reporteras (Glu369 y Gly416) (**Figura 30**), resultado que sugiere una localización periplásmica ya que se considera que en las fusiones que presentan actividad con las dos enzimas reporteras es más confiable la actividad de PhoA (Bartsevich y Pakrasi, 1999; Fulkerson y Mobley, 2000; van Geest y Lolkema, 2000), porque para que PhoA sea activa tiene que ser transportada hacia el periplasma (MacGovern y Beckwith, 1991). La actividad de LacZ, por otra parte, es menos confiable en estos casos debido a que cuando LacZ es fusionada a una región periplásmica no es transportada eficientemente y la enzima puede quedar localizada en el citoplasma y ser activa (Hennessey y Broome-Smith, 1993). Las fusiones del cuarto grupo son aquellas que no mostraron actividad con ninguna de las proteínas reporteras (Val152, Asp162, Gly305 y Met313) (**Figura 30**). Este resultado sugiere que las regiones donde se localizan estos aminoácidos se

encuentran formando parte de un segmento transmembranal o en la interfase de la membrana, de tal forma que las enzimas reporteras no son activas debido a que probablemente la interacción con la bicapa lipídica no les permite una conformación correcta. Casos como estos en los que no se ha obtenido actividad con ninguna de las enzimas reporteras se han reportado para otros transportadores, en donde no se logró determinar la localización precisa de esos sitios y se hipotetizó también que se encuentran cerca o dentro de la membrana (Georgiou y col., 1988; Rensing y col., 1997).

Los resultados de actividad enzimática obtenidos en *P. aeruginosa* mostraron un patrón muy similar a los obtenidos en *E. coli*; esto es, las fusiones que produjeron actividad de PhoA en *E. coli* también lo hicieron en *P. aeruginosa* y las que sólo mostraron actividad significativa de LacZ se comportaron de igual forma (**Figura 31**). Así ocurrió también con las fusiones que mostraron actividad de las dos enzimas reporteras y con las que no produjeron actividad con ninguna de ellas (**Figura 31**). Estos resultados indican que la topología membranal de ChrA es muy similar en *E. coli* y en *P. aeruginosa*. Esto además sugiere que la no funcionalidad de ChrA en *E. coli* probablemente no es debida a que esta proteína tenga una topología diferente. Posiblemente este comportamiento se deba más bien a una distorsión estructural a nivel tridimensional de la proteína en *E. coli*, en la cual puede haber cambios menores en la distribución de los aminoácidos en la membrana, o fuera de ella que, sin alterar drásticamente la topología, si altera la interacción con la bicapa o con el cromato.

Una vez que se tuvieron los resultados de la actividad enzimática de PhoA y LacZ se procedió a localizar los sitios en los cuales fueron construidas las fusiones

traduccionales en el modelo topológico de 12 STM propuesto para la proteína ChrA (**Figura 32**). La fusión en la Ala188 que dió actividad de PhoA, por lo que se debe localizar en el periplasma, concuerda muy bien con este modelo ya que se ubica en el asa periplásmica tres (P3). Sin embargo, la fusión en el aminoácido Val233 que también dió actividad de PhoA, contrasta con la localización en el modelo topológico de ChrA, donde se asignó al asa citoplásmica tres (C3) (**Figura 32**). De igual forma, el resto de las fusiones de la mitad carboxilo terminal de la proteína mostraron una localización opuesta de acuerdo a los resultados de actividad enzimática obtenidos; esto es, las fusiones que produjeron actividad de PhoA (Ala188, Val233, Ala310 y Pro413) se localizaron en el citoplasma y las que produjeron actividad de LacZ (Ile159, Phe263, Asp276, Ala334 y Asn393) se localizaron en el periplasma (**Figura 32**). Estos resultados claramente indican que ChrA tiene una topología membranal distinta a la propuesta por Aguilera y col. (2004). Para tratar de resolver esta discrepancia se analizó con mayor detalle el perfil hidropático de ChrA, utilizando el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982). Se tomaron otros parámetros para la generación del perfil hidropático, como son una ventana de 18 en lugar de 20 aminoácidos para el tamaño del STM, y disminuyendo el valor promedio de la hidrofobicidad para los probables STM. Se encontró que ChrA contiene 13 regiones hidrofóbicas, que podrían estar formando 13 STM (**Figura 33**), en lugar de los 12 STM reportados previamente.

Cuando se analizaron los resultados de las fusiones en la mitad carboxilo se observó que entre las fusiones Ala188 y Val233, que dieron actividad de PhoA, se encuentra la fusión en la Ala202, que produjo actividad de LacZ (Aguilera y col., 2004); esto sugiere que entre estas dos últimas regiones existe un STM y que la

fusión en la Ala202 en realidad se encuentra en el citoplasma y la fusión en la Val233 se localiza en el periplasma (**Figura 34**).

La localización del resto de las fusiones (Phe263, Asp276, Gly305, Ala310, Met313, Ala334, Glu369, Asn393, Pro413 y Gly416) concuerda muy bien con el modelo de 13 STM, donde las fusiones que sólo produjeron actividad significativa de PhoA se encuentran en el periplasma, o en la interfase membrana-periplasma, y las fusiones que sólo produjeron actividad significativa de LacZ se localizan todas en el citoplasma (**Figura 34**). Por otra parte, las fusiones en las que se obtuvo actividad con las dos proteínas reporteras (Glu369, Gly416) se localizaron en el periplasma en este modelo de 13 STM (**Figura 34**); como se mencionó anteriormente, esto es debido a que la actividad de LacZ es menos confiable que la de PhoA puesto que LacZ puede dar resultados falsos positivos ya que no puede ser transportada al periplasma (McGovern y Beckwith, 1991). Por otra parte, las fusiones que no produjeron actividad enzimática (Leu99, Val152, Asp162, Gly305 y Ala310) se encuentran formando parte de un STM o interaccionando con la membrana en el nuevo modelo (**Figura 34**); como se mencionó, quizá la interacción de las proteínas con la membrana no permite el correcto plegamiento de éstas y por lo tanto no muestran actividad (Georgiou y col., 1988). En este modelo también fueron localizadas las fusiones que se habían construido en la parte amino terminal de ChrA (Aguilera y col., 2004) y los resultados reportados para esas fusiones concuerdan con el modelo topológico de 13 STM (**Figura 35**).

La proteína ChrA pertenece a la familia CHR de antiportadores cromato/sulfato, para la cual se propuso un origen a partir de un evento de

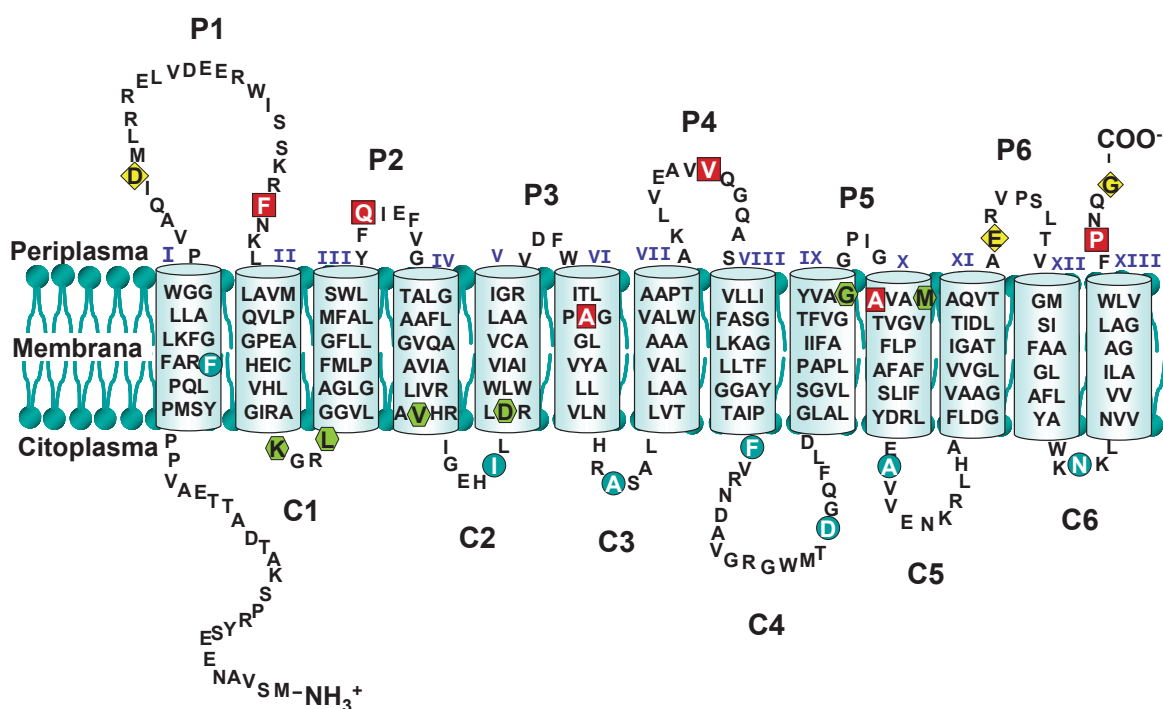


Figura 35.- Modelo topológico de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* de 13 STM. Se indica la localización de los sitios donde fueron construidas las fusiones traducionales (indicados por los símbolos) y los resultados obtenidos como sigue: (□), sólo se obtuvo actividad de PhxA; (○), sólo se obtuvo actividad de LacZ; (◻), se obtuvo actividad de PhxA y LacZ; (◊), no se obtuvo actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras. Resultados de Chávez, 2003; Jiménez, 2003; y de este trabajo.

duplicación y posterior fusión génica de un ancestro de 6 STM para dar origen a los transportadores de 12 STM (Nies y col., 1998). Se ha reportado que las regiones que formaban a los STM I y II del extremo amino incrementaron su hidrofiliidad durante la evolución y éstos ahora se localizan en el citoplasma, lo que originó proteínas con sólo 10 STM (Nies y col., 1998). Sin embargo, la evidencia experimental sólo se ha obtenido de los resultados del análisis topológico para la proteína ChrA de *Alcaligenes eutrophus* (Nies y col., 1998). La pérdida de STM en diferentes transportadores ha sido reportada (Saier, 2003); así, durante el curso de la evolución las proteínas pudieron haber perdido uno o más STMs por eliminación de un fragmento del gen, como en el caso de transportadores de la familia SGP (Spore Germination Protein) (Jack y col., 2000).

También se ha reportado que algunos transportadores han adquirido nuevos segmentos transmembranales, como es el caso de la familia DHA2 (Drug:H⁺ Antiporter-2) de la MFS (Major Facilitator Superfamily) la cual ha adquirido dos nuevos STM que se originaron por inserción del asa citoplásmica central en la membrana a partir de un transportador de 12 STM (Pao y col., 1998). Otro ejemplo es la familia Amt/MEP/Rh de transportadores de amonio en la cual se ha adicionado un nuevo segmento en el extremo carboxilo terminal (Khademi y col., 2004); se ha postulado que esas porciones se han convertido en regiones hidrofóbicas y se han insertado en la membrana.

En el caso de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, contrario a lo que se ha propuesto para la familia CHR, nuestros resultados indican que contiene 13 STM. Un análisis filogenético reciente de 77 posibles homólogos (Díaz-Pérez, 2005) ha demostrado que ésta proteína tiene un origen evolutivo a partir de un ancestro que

contenía seis STM y un posterior evento de duplicación génica y fusión dió origen a la proteína ChrA. Debido a que la mitad amino terminal de la proteína se encuentra más conservada que la mitad carboxilo terminal (Díaz-Pérez, 2005), esto puede sugerir que las dos mitades de seis STM pudieron tener una topología diferente antes del evento de fusión.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las mitades amino y carboxilo de ChrA revela que los primeros seis STM (I - VI) son muy similares a los últimos seis (VIII - XIII) solo que la orientación de los grupos de STM se encuentra en dirección opuesta respecto a la membrana (**Figura 36**). En la parte intermedia de ChrA se encontró una región que pudo haberse convertido en un STM por la sustitución de los aminoácidos hidrofílicos por residuos hidrofóbicos. Esta región corresponde con la secuencia que forma el STM VII (**Figura 36**); la inserción de este STM puede ser el responsable del aumento de 12 a 13 STM en ChrA de *P. aeruginosa*. La inserción de nuevos STMs puede ocurrir en el N-terminal o, más frecuentemente, en el C-terminal de una proteína (Saier, 2003). La inserción del STM VII pudo haber ocurrido previo al evento de fusión, en el extremo carboxilo de la primera mitad de ChrA o en el extremo amino de la segunda mitad de ésta.

Se han reportado proteínas de membrana que tienen una topología membranal invertida en sus mitades amino y carboxilo, como la familia Amt/MEP/Rh de transportadores de amonio, que contienen 11 STM donde los STM 1-5 son similares a los STM 6-10 y el 11 es un STM adicional (Khademi y col., 2004). La familia mayor de proteínas intrínsecas están formadas de dos mitades de tres STM cada una con orientación invertida debido a la duplicación de un ancestro con número impar (Park y Saier, 1996). Otras proteínas con topología

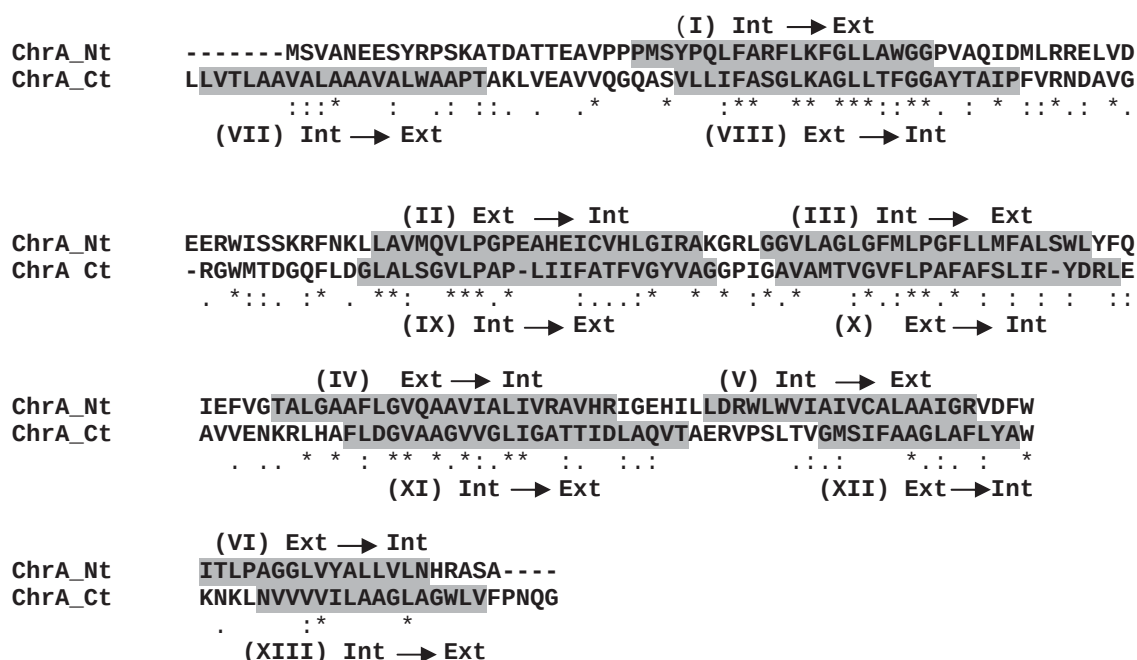


Figura 36.- Alineamiento de las mitades amino y carboxilo de ChrA de *P. aeruginosa*. Se muestra un alineamiento de las mitades amino (ChrA_Nt) y carboxilo (ChrA_Ct) de ChrA. Sombreados se indican los 13 STM señalados con números romanos entre paréntesis (I – XIII). Las flechas indican la dirección respecto a la membrana de los STM (Int → Ext) indica que va del citoplasma al periplasma y (Ext → Int) en dirección opuesta. (*), aminoácidos idénticos y (:), aminoácidos similares.

membranaral invertida son los homólogos RnfA y RnfE, que pertenecen a la familia de óxido-reductasas de NADH, las cuales son proteínas de 6 STM cada una con topología invertida (Saaf y col., 1999).

Por todo lo anterior, y en base a nuestros resultados, se concluye que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* consta de 13 segmentos transmembranarales conectados por 6 asas periplásmicas y 6 asas citoplásmicas con su extremo amino en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma. Esta es una estructura topológica novedosa ya que la mayoría de los transportadores formados por un solo polipéptido, para los cuales se conoce su topología, tienen entre 10 y 14 STM, predominando los de 12 STM (**Figura 9**) (Saier, 2003; Jiménez y Cervantes, 2005). Hasta la fecha sólo se han reportado dos transportadores que contienen 13 STM: el intercambiador de arginina:ornitina ArcD de *P. aeruginosa* (Bourdineaud y col., 1993) y el transportador Na⁺/prolina PutP de *E. coli* (Jung y col., 1998). Es probable que los transportadores de 13 STM sean más comunes de lo que se ha reportado y que debido a la poca información estructural de las proteínas de membrana no se hayan identificado muchos casos como éstos.

Como una aportación adicional, el conocimiento de la topología membranaral de la proteína ChrA nos permitió conocer la localización más precisa de residuos que en nuestro laboratorio se ha demostrado son importantes para su función como transportador de cromato (Aguilera y col., 2004; Aguilar, 2005; Cortéz, 2005; y Díaz-Pérez, 2005).

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, M. E. (2005). Análisis de la función de residuos esenciales de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría en Biología Experimental. IIQB-UMSNH.
- Aguilera, S. (2001). Identificación de aminoácidos esenciales para la función de la proteína ChrA. Tesis de Maestría en Biología Experimental. IIQB-UMSNH.
- Aguilera, S., Aguilar, M.E., Chávez, M.P., López-Meza, J.E., Pedraza-Reyes, M., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 232:107-112.
- Alvarez, A.H. (1999). Determinación del mecanismo plasmídico de resistencia a cromato en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría en Biología experimental. IIQB-UMSNH.
- Alvarez, A.H., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181:7398-7400.
- Bartsevich, V.V. y Pakrasi, H.B. (1999). Membrane topology of MntB, the transmembrane protein component of an ABC transporter system for manganese in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. J. Bacteriol. 181:3591-3593.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. y Stryer, L. (2002). Biochemistry. 5ª Edición Reverté (Ed). pp. 330.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
- Bourdineaud, J.P., Heierli, D., Gamper, M., Verhoogt, H.J., Driessen, A.J., Konings, W.N., Lazdunski, C. y Haas, D. (1993). Characterization of the arcD arginine:ornithine exchanger of *Pseudomonas aeruginosa*. Localization in the cytoplasmic membrane and a topological model. J. Biol. Chem. 268:5417-5424.

- Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T.K. y Silver, S. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172:287-291.
- Cervantes, C. y Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27:65-71.
- Cervantes, C. y Silver, S. (1996). Metal resistance systems in *Pseudomonas*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 38:45-64.
- Chávez, M.P. (2003). Topología membranal de la región N-terminal de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría en Biología Experimental. IIQB-UMSNH.
- Chen, W., Jager, A. y Klug, G. (2000). Correction of the DNA sequence of the *regB* gene of *Rhodobacter capsulatus* with implications for the membrane topology of the sensor kinase *regB*. *J. Bacteriol.* 182:818-820.
- Chin, C.N., von Heijne, G. y de Gier, J.W. (2002). Membrane proteins: shaping up. *Trends Biochem. Sci.* 27:231-234.
- Dalbey, R.E. y Kuhn, A. (2000). Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:51-87.
- de Gier, J.W. y Luirink, J. (2001). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40:314-322.
- Derman, A.I. y Beckwith, J. (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* 173:7719-7722.
- Díaz-Pérez, C. (2005). Filogenia y evaluación de aminoácidos conservados en la función de la proteína transportadora de cromato ChrA. Tesis de Maestría en Biología Experimental. IIQB-UMSNH.
- Enderle, P.J. y Farwell, M.A. (1998). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25:954-956.
- Engelman, D.M., Chen, Y., Chin, C.N., Curran, A.R., Dixon, A.M., Dupuy, A.D., Lee, A.S., Lehnert, U., Matthews, E.E., Reshetnyak, Y.K., Senes, A. Y. y

- Popot, J.L. (2003). Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.* 555:122-125.
- Fulkerson, J.F. y Jr., Mobley, H.L. (2000). Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. *J. Bacteriol.* 182:1722-1730.
- Georgiou, C.D., Dueweke, T.J., y Gennis, R.B. (1988). Beta-galactosidase gene fusions as probes for the cytoplasmic regions of subunits I and II of the membrane-bound cytochrome d terminal oxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263:13130-13137.
- Helms, V. (2002). Attraction within the membrane. Forces behind transmembrane protein folding and supramolecular complex assembly. *EMBO Rep.* 3:1133-1138.
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V. y Morgan, A.F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43:73-102.
- Hennessey, S. E. y Broome-Smith, K.J. (1993). Gene-fusion techniques for determining membrane-protein topology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:524-531.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998.
- Jack, D.L., Paulsen, I.T. y Saier, M.H. (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146:1797-1814.
- Jiménez, R. (2003). Determinación de β -galactosidasa y fosfatasa alcalina en fusiones traduccionales del gen *chrA* de *P. aeruginosa*. Escuela de QFB-UMSNH.
- Jiménez, R. y Cervantes, C. (2005). Determinación de la topología de transportadores bacterianos. REB (en prensa).
- Jung, H., Rubenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M. y Schmid, R. (1998). Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273:26400-26407.

- Khademi, S., O'Connell, J., 3rd, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J. y Stroud, R.M. (2004). Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305:1587-1594.
- Killian, J.A. y von Heijne, G. (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25:429-434.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Li, S.C. y Deber, C.M. (1994). A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments. *Nat. Struct. Biol.* 1:368-373.
- McGovern, K. y Beckwith, J. (1991). Membrane insertion of the *Escherichia coli* MalF protein in cells with impaired secretion machinery. *J. Biol. Chem.* 266:20870-20876.
- Manoil, C. y Beckwith, J. (1986). A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 233:1403-1408.
- Manoil, C. (1990). Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.* 172:1035-42.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. pp. 352-355
- Moller, S., Croning, M.D. y Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 17:646-53.
- Nies, A., Nies, D.H. y Silver, S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
- Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. y Saier, M.H., Jr. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.
- Nilsson, J., Persson, B. y von Heijne, G. (2000). Consensus predictions of membrane protein topology. *FEBS Lett.* 486:267-269.
- Ohta, N., Galsworthy, P.R. y Pardee, A.B. (1971). Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 105:1053-1062.

- Ohtake, H., Cervantes, C. y Silver, S. (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. J. Bacteriol. 169:3853-3856.
- Ouchane, S. y Kaplan, S. 1999. Topological analysis of the membrane-localized redox-responsive sensor kinase PrrB from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Biol. Chem. 274:17290-17296.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. y Saier, M.H., Jr. (1998). Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1-34.
- Park, J.H. y Saier, M.H., Jr. (1996). Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. J. Membr. Biol. 153:171-180.
- Pimentel, B.E., Moreno-Sanchez, R. y Cervantes, C. (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. FEMS Microbiol. Lett. 212:249-254.
- Reithmeier, A.F. (2001). Membrane Proteins. Encyclopedia of Life Sciences 1:1-6.
- Rensing, C., Pribyl, T., y Nies, D.H. (1997). New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. J. Bacteriol. 179:6871-6879.
- Russ, W.P. y Engelman, D.M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. J. Mol. Biol. 296:911-919.
- Saaf, A., Johansson, M., Wallin, E. y von Heijne, G. (1999). Divergent evolution of membrane protein topology: the *Escherichia coli* RnfA and RnfE homologues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:8540-8544.
- Saier, M.H., Jr. (2000). Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. J. Bacteriol. 182:5029-5035.
- Saier, M.H., Jr. (2003). Tracing pathways of transport protein evolution. Mol. Microbiol. 48:1145-1156.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Siegel, E.C., Wain, S.L., Meltzer, S.F., Binion, M.L. y Steinberg, J.L. (1982). Mutator mutations in *Escherichia coli* induced by the insertion of phage mu and the transposable resistance elements Tn5 and Tn10. Mutat. Res. 93:25-33.

- Snyder, W.B. y Silhavy, T.J. (1995). Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177:953-963.
- Tamm, L.K., Arora, A. y Kleinschmidt, J.H. (2001). Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins. J. Biol. Chem. 276:32399-32402.
- Turner, R.J. (2003). Understanding the biogenesis of polytopic integral membrane proteins. J. Membr. Biol. 192:149-157.
- Tusnady, G.E., Dosztanyi, Z. y Simon, I. (2004). Transmembrane proteins in the Protein Data Bank: identification and classification. Bioinformatics 20:2964-2972.
- van Geest, M. y Lolkema, J.S. (1996). Membrane topology of the sodium ion-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*. Evidence for a new structural class of secondary transporters. J. Biol. Chem. 271:25582-25589.
- van Geest, M. y Lolkema, J.S. (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:13-33.
- von Heijne, G. (1991). Proline kinks in transmembrane alpha-helices. J. Mol. Biol. 218:499-503.
- von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. J. Mol. Biol. 225:487-494.
- von Heijne, G. (1998). Structural aspects of transmembrane alpha-helices. Acta Physiol. Scand Suppl. 643:17-19.
- von Heijne, G. (1999). Recent advances in the understanding of membrane protein assembly and structure. Q. Rev. Biophys. 32:285-307.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K. y Runyen-Janecky, L.J. (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 Wimley, W.C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28:319-365.

- White, S.H. y von Heijne, G. (2004). The machinery of membrane protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:397-404.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Young, C.S. y Beatty, J.T. (1998). Topological model of the *Rhodobacter capsulatus* light-harvesting complex I assembly protein LhaA (previously known as ORF1696). *J. Bacteriol.* 180:4742-5.
- Yun, C.H., Van Doren, S.R., Crofts, A.R. y Gennis, R.B. (1991). The use of gene fusions to examine the membrane topology of the L-subunit of the photosynthetic reaction center and of the cytochrome b subunit of the bc1 complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* 266:10967-10973.