



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN
DEL GEN *chrA* DE *Neurospora crassa* 74-A”**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
Q.F.B. LUIS JOSÉ FLORES ALVAREZ**

**ASESOR:
D.C. CARLOS CERVANTES VEGA**

**CO ASESOR:
D.C. J. FELIX GUTIERREZ CORONA**

MORELIA , MICHOACÁN, DICIEMBRE DEL 2010.

RESUMEN

Las proteínas transmembranales ChrA bacterianas expulsan el ión cromato del citoplasma hacia el periplasma como un mecanismo de detoxificación. Las proteínas ChrA forman parte de la superfamilia de transportadores CHR, la cual se divide en las familias LCHR y SCHR, que agrupa proteínas con un tamaño de alrededor de 400 y de 200 aminoácidos respectivamente. La familia LCHR incluye cientos de proteínas bacterianas, así como de los hongos; *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis* y *Gibberella zeae*. Sin embargo, la función de homólogos ChrA en hongos no ha sido reportada aún. El objetivo de este trabajo es analizar la expresión del gen *chrA* en *N. crassa* así como estudiar la función de la proteína ChrA de *N. crassa* en un sistema heterólogo (*Saccharomyces cerevisiae*). Para analizar la expresión de *chrA*, se creció *N. crassa* en caldo papa dextrosa con cromato, tomando alícuotas de micelio a intervalos y se realizó una extracción de RNA total. Mediante RT-PCR se determinó que la expresión del gen *chrA* se induce por este ión. Para determinar la función de ChrA de *N. crassa*, el gen *chrA* proveniente de cDNA se subclonó en el vector binario pYES2 y el plásmido recombinante se transfirió a *S. cerevisiae*. Las transformantes analizadas mostraron que ChrA confiere hipersensibilidad a cromato, contrario a lo que se esperaba debido a los antecedentes de ChrA de bacterias. Esto sugirió que ChrA transporta cromato en *S. cerevisiae*. Mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo se encontró que estas transformantes hipersensibles de *S. cerevisiae* acumulan más cromo en la biomasa, apoyando que la proteína ChrA transporta cromato. Las transformantes de *S. cerevisiae* con *chrA* de *N. crassa*, en presencia de cromato y de un exceso de sulfato (análogo del cromato) fueron hipersensibles al cromato, en comparación de la cepa solo con el vector pYES2, lo cual sugiere que ChrA transporta cromato de forma independiente de sulfato. Con estos datos, se concluyó que el cromato induce la expresión del gen *chrA* en *N. crassa* y que la proteína ChrA de *N. crassa* funciona como un transportador que favorece la acumulación de cromato en un sistema de expresión heterólogo.

INDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | I |
| INDICE | II |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1. Cromo: generalidades..... | 2 |
| 2. Mecanismos de resistencia a cromato en microorganismos..... | 4 |
| 3. Proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| 4. Análisis filogenético de las proteínas ChrA..... | 6 |
| 5. <i>Neurospora crassa</i> como modelo biológico..... | 10 |
| II. ANTECEDENTES | 12 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| IV. HIPÓTESIS | 13 |
| V. OBJETIVOS | 13 |
| A) General..... | 13 |
| B) Específicos..... | 13 |
| VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 14 |
| VII. MATERIALES Y METODOS | 15 |
| 1. Análisis bioinformático del gen <i>chrA</i> y la proteína ChrA de <i>N. crassa</i> ...15 | |
| A) Análisis de secuencia y diseño de árboles filogenéticos..... | 15 |
| B) Análisis de la región 5´ del gen <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 16 |
| C) Análisis de la estructura secundaria de ChrA de <i>N. crassa</i> | 16 |
| D) Secuenciación y análisis de datos..... | 17 |
| 2. Cepas empleadas..... | 17 |
| 3. Medios de cultivo..... | 17 |
| 4. Plásmidos..... | 19 |
| 5. Reactivos..... | 19 |
| 6. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos..... | 19 |
| A) Aislamiento de DNA genómico de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 19 |
| B) Aislamiento de DNA plasmídicos..... | 20 |
| C) Aislamiento de DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCY100..... | 20 |
| D) Restricción con endonucleasas..... | 20 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| E) Ligaciones..... | 21 |
| 7. Electroforesis en geles de agarosa..... | 21 |
| 8. Aislamiento del DNA de geles de agarosa..... | 21 |
| 9. Diseño de oligonucleótidos..... | 22 |
| 10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 26 |
| 11. Reacción en cadena de la polimerasa en colonia (PCR-colonia)..... | 26 |
| 12. Aislamiento de RNA total..... | 27 |
| A) Aislamiento de RNA total de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 27 |
| B) Extracción de RNA de transformantes de <i>S. cerevisiae</i> | 28 |
| C) Tratamiento con DNasa..... | 29 |
| 13. Cinética de crecimiento de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 29 |
| 14. Reacción de la cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR)..... | 30 |
| 15. Aislamiento de <i>chrA</i> proveniente de cDNA..... | 30 |
| 16. Clonación del cDNA de <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 30 |
| 17. Subclonación del cDNA de <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 31 |
| 18. Transformación de <i>Escherichia coli</i> | 31 |
| A) Preparación de las células electrocompetentes..... | 31 |
| B) Electroporación..... | 32 |
| 19. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| 20. Pruebas de susceptibilidad a cromato en transformantes de <i>S. cerevisiae</i> | 33 |
| A) En medio sólido..... | 33 |
| B) En medio líquido..... | 33 |
| 21. Determinación de la acumulación de cromo total en transformantes de <i>S. cerevisiae</i> | 34 |
| 22. Evaluación del efecto del sulfato sobre la toxicidad del cromato..... | 35 |
| VIII. RESULTADOS | 36 |
| 1. Actualización del árbol filogenético de la subfamilia LCHR de hongos..... | 36 |
| 2. Análisis de la estructura secundaria de la proteína ChrA de <i>Neurospora crassa</i> | 39 |
| 3. Amplificación del gen <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 39 |
| 4. Análisis de la región 5´ del gen <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> | 42 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. Análisis de la expresión del gen <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A mediante RT-PCR..... | 42 |
| 6. cDNA de <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 48 |
| A) Amplificación del cDNA de <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 48 |
| B) Clonación de <i>chrA</i> de cDNA en el vector pJET 1.2/blunt..... | 51 |
| C) Subclonación del gen <i>chrA</i> en el vector pYES2..... | 51 |
| D) Selección de transformantes de <i>S. cerevisiae</i> | 54 |
| 7. Análisis transcripcional de <i>chrA</i> en las transformantes de <i>S. cerevisiae</i> | 58 |
| 8. Prueba de susceptibilidad a cromato..... | 58 |
| A) Prueba de susceptibilidad a cromato en medio sólido..... | 58 |
| B) Prueba de susceptibilidad a cromato en medio líquido..... | 60 |
| 9. Determinación de cromo total en biomasa de <i>S. cerevisiae</i> | 62 |
| 10. Análisis del efecto del sulfato en las transformantes de <i>S. cerevisiae</i> | 63 |
| IX. DISCUSIÓN | 68 |
| X. CONCLUSIONES | 83 |
| XI. BIBLIOGRAFIA | 84 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| • Figura 1. Toxicidad del cromato en bacterias. | 3 |
| • Figura 2. Sistema ChrA bacteriano..... | 7 |
| • Figura 3. Árbol filogenético de la familia LCHR..... | 8 |
| • Figura 4. Subfamilia LCHR de hongos..... | 9 |
| • Figura 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de regiones del gen <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 23 |
| • Figura 6. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de actina de <i>N. crassa</i> 74-A | 24 |
| • Figura 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de <i>chrA</i> para el PCR en colonia | 25 |
| • Figura 8. Dendrograma de la subfamilia LCHRF de hongos | 37 |
| • Figura 9. Modelo topológico de la proteína ChrA de <i>N. crassa</i> 74-A..... | 40 |
| • Figura 10. Amplificación del gen <i>chrA</i> de <i>N. crassa</i> mediante PCR | 41 |
| • Figura 11. Localización de los intrones de las secuencias de <i>chrA</i> copia genómica. | 43 |

- Figura 12. Análisis de la región 5' del gen *chrA* de *N. crassa*.....44
- Figura 13. Cinética de crecimiento de *N. crassa* 74-A.....46
- Figura 14. Amplificación de fragmentos internos de los genes *chrA* y actina de *N. crassa* mediante PCR.....47
- Figura 15. Análisis de la expresión del gen *chrA* en *N. crassa* 74-A.....49
- Figura 16. Amplificación de *chrA* de *N. crassa* a partir de cDNA.....50
- Figura 17. Clonación del cDNA del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A52
- Figura 18. Subclonación del cDNA del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A en pYES2.....53
- Figura 19. Análisis de la secuencia de *chrA* de cDNA de *N. crassa* 74-A...56
- Figura 20. Verificación de la presencia del plásmido pSCNC2 en transformantes de *S. cerevisiae*57
- Figura 21. Análisis transcripcional mediante RT-PCR del cDNA *chrA* de *N. crassa* en las transformantes de *S. cerevisiae*.59
- Figura 22. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *S. cerevisiae* en medio sólido.....61
- Figura 23. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *S. cerevisiae* en medio líquido.....64
- Figura 24. Acumulación de cromo total en transformantes de *S. cerevisiae*.....65
- Figura 25. Efecto del sulfato en las transformantes *chrA* de *S. cerevisiae*.....67

INDICE DE TABLA

Tabla1. Hongos con homólogos ChrA.....38

I. INTRODUCCIÓN

1. Cromo: generalidades

El cromo es el séptimo elemento más abundante en la Tierra (McGrath y Smith, 1990) con número atómico de 24, peso atómico de 51.996 g/mol y una densidad de 7.2 g/cm³, dándole la característica de metal pesado por sobrepasar el valor de 6 g/cm³ (Nieboer y Richardson, 1980). En la naturaleza el cromo se encuentra en diferentes estados de oxidación que van desde -2 hasta +6 (Mertz, 1969), siendo los más comunes Cr(III) y Cr(VI) (ATSDR, 2000); el Cr(VI) es alrededor de 100 veces más tóxico que el Cr(III) (Venier et al., 1982). Esta toxicidad del Cr(VI) en forma de cromato (CrO₄²⁻) radica en que su estructura molecular tetraédrica es similar a la del ión esencial sulfato (SO₄²⁻) (Pardee et al., 1966). Debido a la similitud estructural, el cromato ingresa al interior de la célula activamente tanto en las células procariontes como en eucariotes por los sistemas de transportadores específicos de sulfato (Dreyfuss, 1964, Arslan et al., 1987; Cervantes et al., 2001) (**Figura 1**). Se ha reportado que en *Saccharomyces cerevisiae* el cromato ingresa por una vía acarreadora aniónica no específica, el sistema de permeasa, el cual transporta diferentes oxianiones como sulfatos y fosfatos (Sims y Reynolds, 1990). El Cr(III) no puede ingresar a la célula ya que el sistema de transporte del sulfato no lo reconoce y la membrana plasmática es impermeable al Cr(III) (Alcedo y Wetterhahn, 1990).

Una vez dentro de la célula, el cromato puede ser reducido a Cr(III) por efecto de agentes como el FADH₂, NADPH, ciertas pentosas o glutatión, dando como

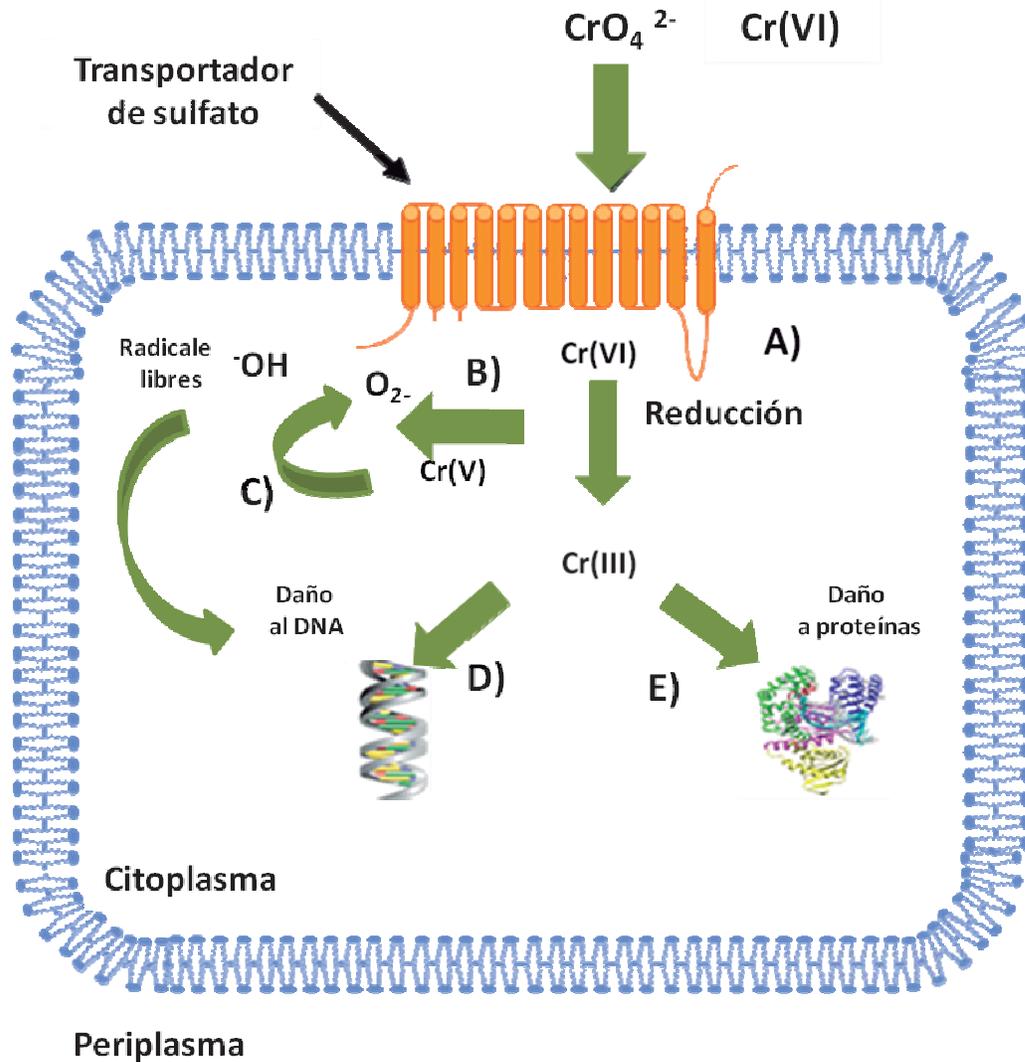


Figura 1. Toxicidad del cromato en bacterias. El cromato (CrO_4^{2-}) entra a la célula por la vía de sulfato. **A)** El cromato puede reducirse a Cr(III) en el citoplasma. **B)** En el proceso se pueden formar especies reactivas de oxígeno (OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$) y productos intermedios como el Cr(V) . **C)** Los radicales libres pueden interactuar con el DNA y dañarlo. **D)** El Cr(III) también puede interactuar con el DNA ó con las proteínas **E)**, provocando alteraciones en sus estructuras y funciones. Adaptado de Miranda, 2003.

resultado la formación de complejos de Cr(V) (Shi y Dalal, 1990). En presencia de peróxido de hidrógeno, estos complejos reaccionan y producen radicales libres hidroxilo (OH⁻), los cuales pueden dañar el DNA de forma irreversible (Shi y Dalal, 1990). Los efectos tóxicos del cromo se resumen en la **Figura 1**. En *S. cerevisiae* el Cr(VI) es muy tóxico a concentraciones de 0.1 mM (Pepi y Baldi, 1992) y con efectos adversos en el crecimiento (Dar y Shakoori, 1999). Un blanco importante del Cr(VI) en *S. cerevisiae* son las mitocondrias (Henderson, 1989), dando como resultado la inhibición de la absorción de oxígeno (Kharab y Singh, 1985) y la inducción de mutaciones tipo “petite” (Henderson, 1989). Los efectos adicionales del cromo en *S. cerevisiae* incluyen la conversión génica y mutaciones (Galli et al., 1985; Kharab y Singh, 1985; Cheng et al., 1998), así como oxidación de proteínas (Summer y col., 2005).

2. Mecanismos de resistencia a cromato en microorganismos

Las bacterias han generado mecanismos de resistencia a cromato que pueden ser codificados por genes cromosómicos y plasmídicos (Cervantes et al., 2001). Los sistemas de resistencia localizados en cromosomas bacterianos están usualmente relacionados con estrategias de reducción de Cr(VI) a Cr(III), por medio de enzimas específicas y no específicas, reparación de daño al DNA, actividades de detoxificación y procesos relacionados al metabolismo del azufre o del hierro. Los genes plasmídicos codifican para proteínas que son principalmente transportadores de membrana, los cuales promueven la expulsión del ión cromato (Cervantes et al., 1990; Nies et al., 2003).

Para el caso de las levaduras y los hongos filamentosos, los principales mecanismos para contrarrestar el efecto tóxico del cromato así como de otros metales pesados son la reducción, la captación en biomasa-pared celular y precipitación, entre otros (Veglio y Beolchini, 1997). El principal género de levaduras aisladas de ambientes contaminados con cromato es *Candida* (Baldi et al., 1990; Pepi y Baldi 1992), cuyo mecanismo general de resistencia a cromato está relacionado en la capacidad de acumular el cromato en la biomasa con elevada eficiencia (Muter et al., 2001; Ramírez-Ramírez et al., 2004). Por otro lado, se encontró que en la resistencia fúngica hacia el cromato esta involucrado un mecanismo que conlleva a la acumulación del ión en la biomasa (Levinskaite, 2001) o en la pared celular (Tunali et al., 2005; Das et al., 2007). Se ha reportado que la cepa Ed8 del hongo filamentoso *Aspergillus niger* var. *tubingensis* tiene la capacidad de reducir el Cr(VI) a Cr(III) con una alta eficiencia (Acevedo Aguilar et al., 2006); en extractos libres de células de dicha cepa se ha detectado actividad de reducción de Cr(VI), aunque hasta la fecha se desconoce el mecanismo bioquímico responsable y el papel de esta actividad en la reducción *In vivo* del ión (Coreño-Alonso et al., 2007). Esto indica que los hongos tienen mecanismos o sistemas que pueden contrarrestar el efecto del cromato.

3. Proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*

ChrA es una proteína de 416 aminoácidos (a.a) codificada por el gen *chrA* del plásmido pUM505 de una cepa clínica de la bacteria *P. aeruginosa* (Cervantes et al., 1990). Por las características de los aminoácidos que la conforman (63 % de los cuales son hidrofóbicos) y por su perfil hidropático se determinó que ChrA es

una proteína transmembranal (Cervantes y Silver, 1992). Jiménez-Mejía et al., (2006) demostraron que la proteína consta de 13 segmentos transmembranales unidos a 6 asas periplasmáticas y 6 asas citoplasmáticas, donde los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran en el citoplasma y periplasma, respectivamente. ChrA de *P. aeruginosa* confiere resistencia a cromato mediante un sistema de expulsión (Pimentel et al., 2002). Este mecanismo depende del potencial de membrana generado en el proceso de bombeo de protones por la cadena respiratoria (Alvarez et al., 1999) **(Figura 2)**.

4. Análisis filogenético de las proteínas ChrA

Un análisis filogenético detallado de las proteínas ChrA determinó que las secuencias homólogas existen en dos tamaños: proteínas de cadena corta (SCHR) de longitud entre 123 – 234 a.a con un solo dominio y proteínas de cadena larga (LCHR), de longitud entre 345-495 a.a con dos dominios homólogos (Díaz-Pérez et al., 2007). De las 135 secuencias de proteínas homólogas identificadas, 77 están dentro de la familia de proteínas grandes LCHR **(Figura 3)**. Esta familia contiene a su vez siete subfamilias: LCHR1 a LCHR6 de bacterias y una subfamilia LCHR de hongos (Fungal LCHR). El grupo perteneciente a hongos, con un tamaño aproximado entre 400 a 900 a.a, está estrechamente relacionada con la subfamilia bacteriana LCHR1 **(Figura 3)**. La subfamilia de hongos incluye secuencias de *N. crassa*, *A. nidulans*, *U. maydis*, *G. zea* y *M. grisea* **(Figura 4)**.

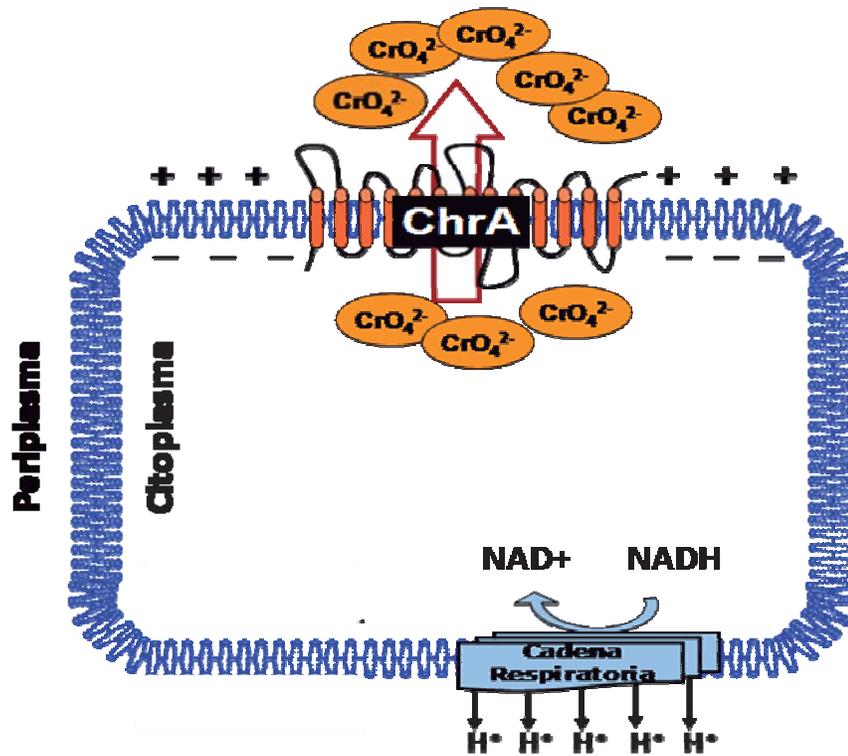


Figura 2. Sistema ChrA bacteriano. La proteína ChrA expulsa el cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma hacia el exterior empleando el potencial de membrana generado durante el bombeo de protones en la cadena respiratoria. Adaptada de Alvarez et al., (1999).

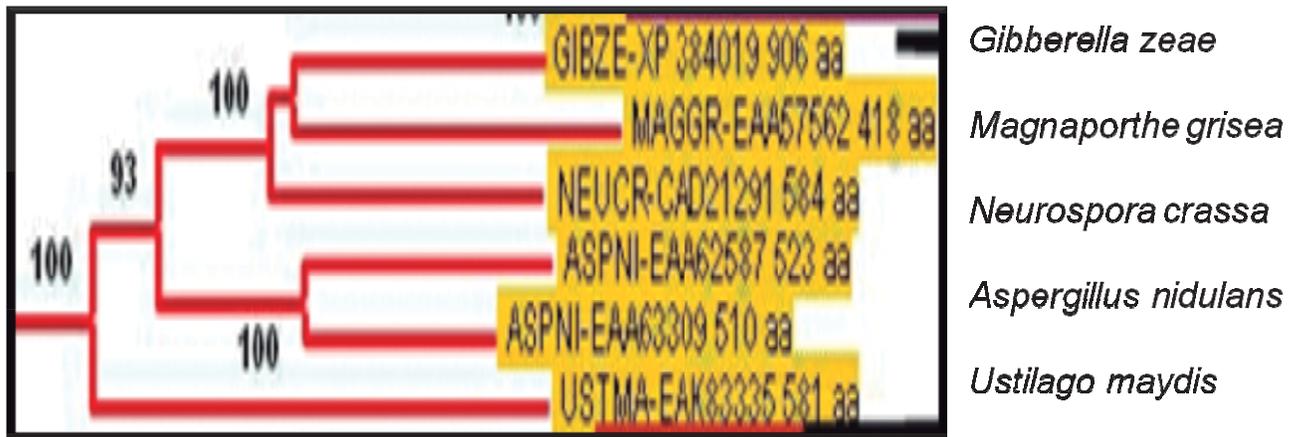


Figura 4. Subfamilia LCHR de hongos. Se muestra la subfamilia LCHR de hongos. En el árbol se indica la abreviatura del nombre del organismo descrito, así como el número de acceso en la base de datos del NCBI y el número de aminoácidos de la proteína correspondiente. Tomada de Cervantes y Campos-García, 2007.

5. *Neurospora crassa* como modelo biológico

N. crassa es un hongo filamento, saprófito que tiene la particularidad de tener conidas asexuales con una pigmentación de color naranja (Shear y Dodge, 1927). Pertenece al Orden Sordariales, Familia Sordariaceae, Clase Sordariomycetes, *Phylum* Ascomycota. Las investigaciones realizadas en *N. crassa* a principios del siglo XX fueron un parteaguas para la genética y la biología molecular (Galagan et al., 2004), además de ser uno de los primeros organismos modelo utilizado, mucho antes que la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *Escherichia coli*. Este hongo fue la base para trabajos tales como los realizados por Beadle y Tatum en 1941 donde establecieron la relación entre genes y proteínas, resumida en la hipótesis “un gen-una enzima”. A mediados del siglo XX, *N. crassa* tuvo un rol central como organismo modelo, contribuyendo al entendimiento fundamental de sistemas de defensas del genoma, metilación de DNA, importación de proteínas en mitocondrias, ritmos circadianos, silenciamiento post-transcripcional de genes y reparación del DNA (Davis, 2000). Debido a que *N. crassa* es un hongo multicelular, también provee un sistema de estudio para la diferenciación y desarrollo celular así como de otros aspectos de la biología eucariótica (Davis y Perkins, 2002). El legado de 70 años de investigación (Perkins, 2001) acompañado de herramientas moleculares y genéticas modernas, ofrecieron un gran potencial para poder secuenciar todo el genoma de *N. crassa*. Como consecuencia de la secuenciación de su genoma (Galagan et al., 2003), resurgió el interés por este organismo que ahora considerado un excelente modelo para los eucariotes superiores en muchos aspectos de la biología celular (Osiewacz, 2002),

al grado de ser considerado como un organismo central en la historia de la genética y biología molecular en el siglo XX (Galagan et al., 2003). El genoma de *N. crassa* consta de siete cromosomas, 40,000 kilopares de bases, mucho más grande que el de las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae* (ambos de un tamaño aproximado de 12,000 kilopares de bases). *N. crassa* codifica aproximadamente 10,000 proteínas, sólo un 25 % menos que la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), que es aproximadamente de 13,000 proteínas.

II. ANTECEDENTES

Como resultado del análisis filogenético de los miembros de la superfamilia CHR (Díaz-Pérez et al., 2007), se observó una proteína con un tamaño de 507 aminoácidos (a.a) citada con anterioridad por Kiranmayi y Mohan (2006), correspondiente a ChrA de *N. crassa*. Este se incluyó en el grupo de cuatro organismo que contenían un homólogo proteico en la subfamilia LCHR de hongos. En ninguno de estos hongos se ha demostrado la función del homólogo ChrA. Las proteínas bacterianas ChrA descritas hasta la fecha: la de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes et al., 1990), *Cupriavidus metallidurans* (Nies et al., 1990), *Shewanella* sp. (Aguilar-Barajas et al., 2008), *Burkholderia xenovorans*, *B. vietnamiensis* (León-Márquez, 2008), *Ochrobactrum tritici* (Branco et al., 2008), *Bacillus subtilis* (Díaz-Magaña et al., 2009) y *Synechococcus elongatus* (Aguilar-Barajas, 2010), se ha demostrado que confieren resistencia a cromato. Estos datos han llevado a nuestro grupo de trabajo a proponer que todos los miembros de la superfamilia CHR son transportadores de cromato. Esta observación sugiere que las proteínas ChrA de hongos posiblemente tengan también esa función.

III. JUSTIFICACIÓN

El análisis de la expresión y de la función de *chrA* de *N. crassa* 74-A recae en que no se han reportado hasta la fecha estudios sobre las proteínas ChrA de hongos o de otros organismos eucarióticos. Es por eso que habiendo identificado a través de un análisis informático un determinante que codifica una proteína de la superfamilia de transportadores de cromato CHR en *N. crassa*, es de importancia estudiar su posible relación con la resistencia a cromato en este organismo así como la regulación de su expresión. Esto ayudaría a entender más acerca del funcionamiento en organismos eucarióticos de un mecanismo hasta hoy sólo descrito en bacterias.

IV. HIPÓTESIS

La proteína ChrA de *Neurospora crassa* confiere resistencia a cromato por un mecanismo de transporte.

V. OBJETIVOS

A) General:

Determinar la expresión y la participación de la proteína ChrA de *Neurospora crassa* en la resistencia a cromato.

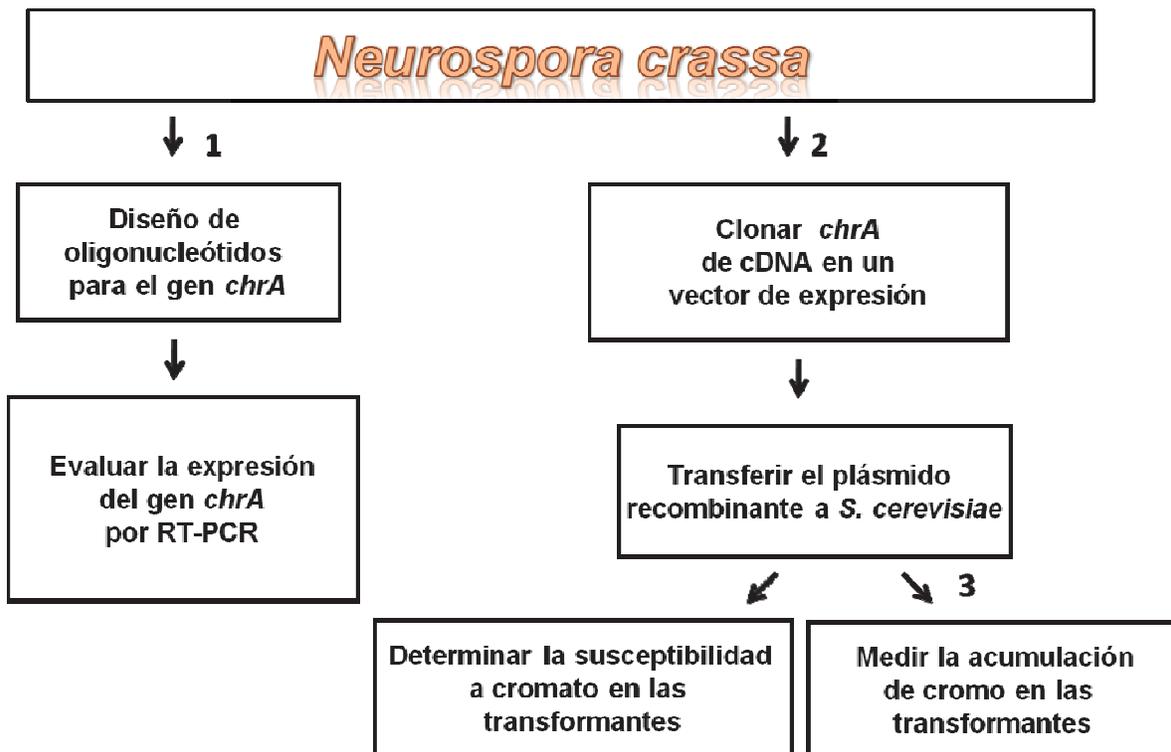
B) Específicos:

1. Evaluar la expresión del gen *chrA* en *N. crassa*.
2. Determinar si el producto del gen *chrA* de *N. crassa* confiere resistencia a cromato en *S. cerevisiae*.
3. Establecer el mecanismo de resistencia en las transformantes de *S. cerevisiae* con el gen *chrA* de *N. crassa*.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estrategia experimental planteada para cumplir con los objetivos específicos 1, 2 y

3.



VII. MATERIALES Y METODOS

1. Análisis bioinformático del gen *chrA* y la proteína ChrA de *N. crassa* 74-A

A) Análisis de secuencia y diseño de árboles filogenéticos

Se partió de la secuencia de la proteína ChrA de *N. crassa*. Se utilizó la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para realizar una búsqueda exhaustiva de secuencias proteicas eucarióticas mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Utilizando el protein Blast con los valores establecidos por defecto y el número de acceso CAD21291, se limitó la búsqueda a organismos eucariotes. Las secuencias proteicas obtenidas del programa BLAST se tomó el valor de E de hasta 1e-13, guardándolas en formato FASTA y en formato Gen-Pept. Se editaron las secuencias utilizando el programa Bio Edit. Con el programa ClustalX las secuencias obtenidas se alinearon. Se guardaron en el formato por defecto establecido con los cambios antes mencionados. Utilizando el programa Mega4, el archivo obtenido de ClustalX se convirtió en formato .aln FASTA. Este último se utilizó para diseñar los árboles filogenéticos en el mismo programa Mega4, mediante el método UPGMA, Maximum Parsimony, Minimum Evolution y Neighbor Joining. Utilizando un Bootstrap de 500 y en Neighbor Joining, Minimum Evolution y UPGMA modificando en el menú de opciones (Summary options) en Gaps/Missing Data modificándolo a Parwise Deletion.

B) Análisis de la región 5' del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A

Las secuencias río arriba (hasta 1000 nt) del codón de inicio del gen *chrA* de *N. crassa*, obtenidas de la base de datos de la página del *Neurospora crassa* Data Base (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/Home.html>), se analizaron en forma manual para la identificación de promotores conservados. También se usó la página <http://www.yeasttract.com> para identificar posibles reguladores transcripcionales.

C) Análisis de la estructura secundaria de ChrA de *N. crassa*

Para determinar la estructura secundaria de la proteína ChrA de *N. crassa*, se utilizó el programa TOPPRED (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>), utilizando los parámetros empleados para determinar la topología de ChrA de *P. aeruginosa* (Jiménez-Mejía et al., 2006) con los siguientes parámetros específicos:

| Full window size | Core window size | Wedge window size | Cutoff for certain transmembrane segment | Cutoff for putative transmembrane segment | Hydrophobicity file | Critical loop length | Kingdom |
|------------------|------------------|-------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------|----------------------|---------|
| 18 | 8 | 5 | 1.00 | 0.5 | KD-scale | 60 | Euk |
| 16 | 6 | 5 | 1.00 | 0.4 | Ges-scale | 60 | Euk |

D) Secuenciación y análisis de datos

El DNA se mandó a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del CINVESTAV-I.P.N, Irapuato, Gto. Los alineamientos de las secuencias se realizaron empleando el programa Clustal W.

2. Cepas empleadas

- *Neurospora crassa* :
 - Cepa silvestre 74-A (wt A), mat A (Donada por Dr. Jesús Aguirre Linares, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.).
- *Saccharomyces cerevisiae*:
 - JCY100: Mat A, leu::HisG, his3 Δ ::hisG, trp::hisG, ura3-52 (Donada por Dr. José Ruíz Herrera, CINVESTAV, Irapuato, Gto.).
- *Escherichia coli*:
 - JM101: supE, thi-1 Δ (lac-proAB) (F', traD36, proAB, laqI^qZ Δ M15) (Yanisch-Perron et al., 1985)
 - XL1-Blue *end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17 supE44 rec A1 lac* [F'proAB laqI^qZ Δ M15Tn10(Tc)](Stratagene)

3. Medios de cultivo

- Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1 %, peptona de caseína 1 % y extracto de levadura 0.5 %.
- Agar Luria Bertani (AL): CL con agar bacteriológico 1.5 %.
- Synthetic Complete and Dropout (S.C.U.): Bacto–Yeast Nitrogen Base (Y.N.B) sin aminoácidos 0.67 %, glucosa 2 %, y suplementando con aminoácidos de acuerdo con las auxotrofias (Dropout mix 0.2 %).

- Synthetic Complete and Dropout (S.C.U.) para cajas: Synthetic Complete and Dropout (S.C.U.) y se le adicionó agar bacteriológico 2 %.
- Medio Vogel líquido: Sacarosa 1.5 g/L, 1X sales de Vogel 50X: 150 g citrato de sodio-5H₂O, 250 g KH₂PO₄ anhidro, 100 g NH₄NO₃ anhidro, 10 g MgSO₄-7H₂O, 5 g CaCl₂-2H₂O, 5 ml de solución de elementos traza, 2.5 ml solución de botina (0.1 mg/ml). Lo anterior se aforó a 1 L de agua. *Solución de elementos traza*: En 195 ml de agua destilada se disolvió: 5 g de ácido cítrico-1H₂O, 5 g ZnSO₄-7H₂O, 1 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂-6H₂O, 0.25 g CuSO₄-5H₂O, 0.05 g MnSO₄-1H₂O, 0.05 g H₃BO₃ anhidro y 0.05 g Na₂MoO₄-2H₂O (tomado del Fungal Genetic Stock Center- www.fgsc.net).
- Medio Vogel sólido: Al medio Vogel líquido se adicionó agar bacteriológico al 1.5 %.
- Medio P.D.B. natural (Potato Dextrose Broth): Se preparó con 200 g de papa pelada hervida 1 h, 2 % glucosa en 1 L de agua.
- Medio mínimo sintético modificado para levaduras: Glucosa 2 %, por cada litro de medio preparado se agregó: 850 mg KH₂PO₄, 100 mg CaCl₂, 3.5 g NH₄Cl, 100 mg NaCl, 100 µl de vitaminas MEM solución 100X, elementos traza (500 µg H₃BO₃, 40 µg Cu₂SO₄, 100 µg KI, 200 µg FeCl₃, 400 µg MgSO₄, 200 µg Na₂MoO₄, 400 µg ZnSO₄) y suplementado con los aminoácidos de acuerdo con las auxotrofías de cada cepa (2 mM Leucina, 0.3 mM Histidina, 0.4 mM Triptófano).

- Medio YPD: Extracto de levadura 1 %, peptona caseína, dextrosa 2 %.

4. Plásmidos

- pJET1.2/blunt (Fermentas): Plásmido para clonación, replicón (pMB1), gen letal *eco47/R*, promotor Plac modificado, promotor T7, sitios de policlonación, AmpR.
- pYES2 (Invitrogen): Plásmido binario para clonación en *E. coli/S. cerevisiae*, promotor GAL1, sitio promotor T7, múltiples sitios de clonación, terminador transcripcional CYC1, orígenes pUC, y f1, AmpR, URA3.

5. Reactivos

- K₂CrO₄ (Merck). La sal de cromato fue utilizada a partir de una solución stock 1M preparada en agua destilada y mantenida a temperatura ambiente.
- D- Glucosa anhidra (J.T. Baker).
- D-(+) Rafinosa pentahidratada (Sigma y/o Merck).
- D-(+) Galactosa (Sigma).

6. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos

A) Aislamiento de DNA genómico de *Neurospora crassa* 74-A

Para la extracción de DNA genómico de *N. crassa* 74-A, se creció en 35 ml de medio Vogel 30 °C/150 rpm. Se recuperó el micelio por filtración y se pulverizó en un mortero (estéril) usando nitrógeno líquido. Al micelio pulverizado se le adicionó 600 µl de buffer de urea (Urea 7 M, NaCl 0.35 M, Tris 0.05 mM pH 8.0, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.02 M, Sarcosina N-lauril 1 %, agua destilada

cbp 50 ml), se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se agregó 300 µl fenol y 300 µl cloroformo. Se centrifugó 15 min/ 10,000 rpm (este proceso se repitió dos veces), se recuperó el sobrenadante para después agregarle 300 µl de isopropanol y 600 µl etanol absoluto frío más 1/10 del volumen de acetato de sodio 2 M. Se mezcló suavemente y se centrifugó 10 min/ 10,000 rpm. Se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 70 % y se dejó secar para posteriormente resuspender con 100 µl agua destilada desionizada estéril y se almacenó a 4 °C.

B) Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico de cepas de *E. coli* se realizó por el método de lisis alcalina (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979; Ish-Horowicz y Burke, 1981).

C) Aislamiento de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae* JCY100

El aislamiento de DNA genómico de *S. cerevisiae* JCY100 se realizó mediante el método de extracción de DNA total de levaduras (modificado de Guthrie, 2004).

D) Restricción con endonucleasas

Las muestras de DNA fueron digeridas con endonucleasas empleando 1 unidad de enzima de restricción (Promega) por cada microgramo de DNA e incubando a 37 °C por un mínimo de 2 h o durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de la mezcla de restricción en un gel de agarosa al 1 % para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

E) Ligaciones

Los fragmentos de DNA se ligaron manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) y utilizando 1 unidad de enzima T4 DNA ligasa (Promega). La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche.

7. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA se sometieron a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.40 M y EDTA 0.001 M pH 8) a 100 voltios. Las muestras de DNA se mezclaron antes de ser corridas en el gel con amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5 %, sacarosa 40 %). El desarrollo del gel se visualizó a través de tinción con una solución de bromuro de etidio al 0.01 %. El DNA así teñido se observó en un transluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc). Como marcador de tamaño molecular se utilizó el DNA del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y/o *HindIII*.

8. Aislamiento del DNA de geles de agarosa

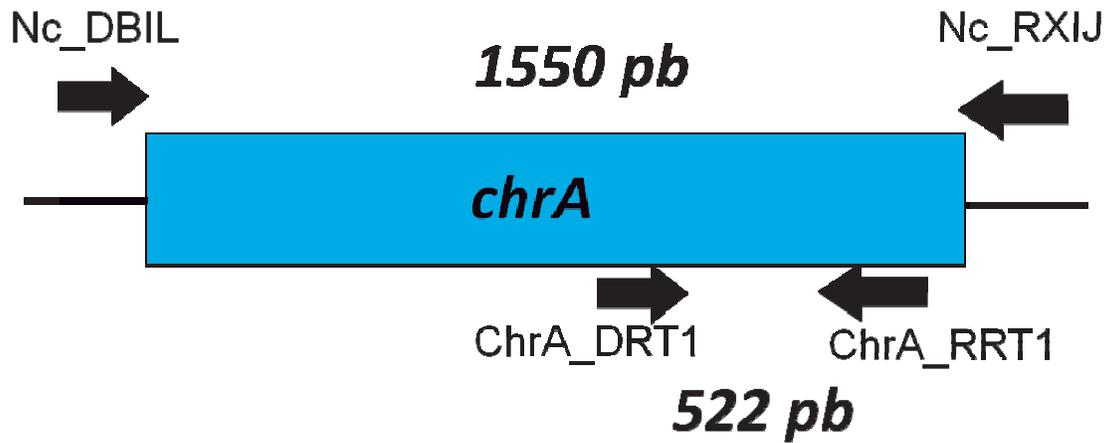
Para la purificación del DNA empleado en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial “Wizard SV Gel and PCR Clean-UpSystem” de Promega, siguiendo las indicaciones del proveedor.

9. Diseño de oligonucleótidos

Con el número de acceso de la proteína homóloga a ChrA de *N. crassa* (CAD21291) contenida en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> se obtuvo la secuencia de nucleótidos correspondiente. De igual forma se obtuvo la secuencia

de nucleótidos del gen en la página de *Neurospora crassa* Data Base (NCDB) del Instituto Broad (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/Home.html>). Con ayuda de estas dos páginas y del programa Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) se diseñaron los diferentes oligonucleótidos. Para amplificar el gen *chrA* de *N. crassa* se diseñaron los oligonucleótidos Nc_BIL, el cual comprende el codón de inicio del gen e incluye un sitio de restricción *Bam*HI (GGATCC); su pareja Nc_RXIJ que contiene el codón de terminación del gen en cuestión y un sitio de restricción *Xba*I (TCTAGA) (**Figura 6**). El par de oligonucleótidos empleados para amplificar una región interna del gen *chrA*: ChrA_DRT1 y su pareja ChrA_RRT1 (**Figura 6**). También se diseñó el par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento interno del gen de actina de *N. crassa* Nc_AcDL2i y Nc_AcRJ2i (**Figura 7**). Finalmente se diseñó el par de oligonucleótidos para amplificar el producto que se ligaría en el vector pJET1.2/blunt, pJET1.2fow y pJTE1.2rev (**Figura 8**).

A

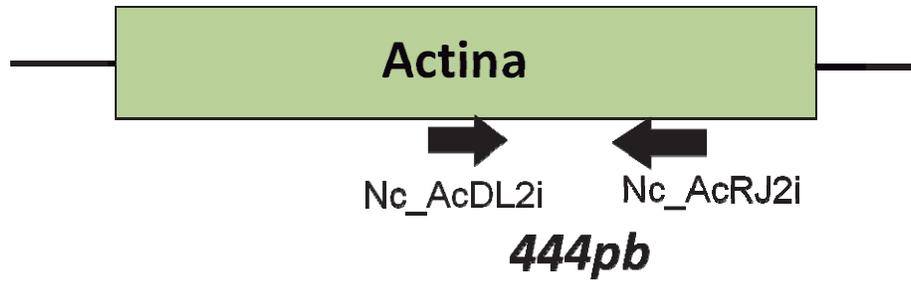


B

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Nc_DBIL | 5' GGATCC ATG TCA CCT CAA CCT CCA GTA CCT AAC AAC 3' <i>Bam</i> Hl |
| Nc_RXIJ | 5'- TCTAGA CTA ACT CGC AAA GCC ATC GAA AGC -3' <i>Xba</i> l |
| ChrA_DRT1 | 5'- AAC AAG AAG CAT CCA CGT CGT CCT CCA -3' |
| ChrA_RRT1 | 5'- CCC TGA GCA CAG CCT TTA CCC ATC TTT -3' |

Figura 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de regiones del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A. A) Localización y orientación de los oligonucleótidos Nc_DBIL, Nc_RXIJ, ChrA_DRT1 y ChrA_RRT1 así como el tamaño de los fragmentos amplificados. **B)** Secuencia de oligonucleótidos, indicando los sitios *Bam*Hl y *Xba*l; en verde el codón de inicio y en rojo el codón de paro correspondiente.

A

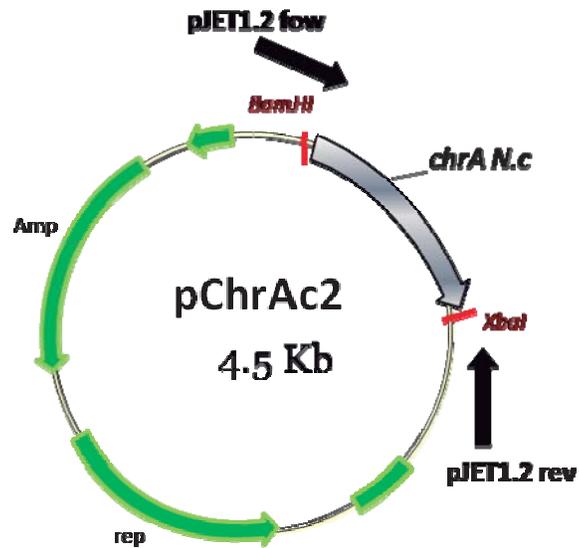


B

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-----------------|------------------------------------------|
| Nc_AcDL2i | 5'- GTA TCG TCC TCG ACT CCG GTG AC-3' |
| Nc_AcRJ2i | 5'- GTT GCC ATA GAG ATC CTT CCT GAC G-3' |

Figura 6. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de actina de *N. crassa* 74-A. A) Localización y orientación de los oligonucleótidos Nc_AcDL2i y Nc_AcRJ2i así como el tamaño del fragmento de *chrA* amplificado. **B)** Secuencia de oligonucleótidos.

A



B

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-----------------|---------------------------------|
| pJET1.2 fow | 5'- CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' |
| pJET1.2 rev | 5'- AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3' |

Figura 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de *chrA* para el PCR en colonia. A) Representación esquemática de la localización y orientación de los oligonucleótidos pJET1.2fow y pJET1.2rev y B) su correspondiente secuencia.

10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de DNA, se empleó la DNA polimerasa Accuprime Super Mix II. Se utilizó como molde 200 ng de DNA genómico correspondiente, empleando los oligonucleótidos a 20 pmol/μl. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes:

| Genes | Desnaturalización inicial | Condiciones de amplificación (30 ciclos) | | | |
|---------------|---------------------------|------------------------------------------|--------------|-----------|-----------------|
| | | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | Extensión final |
| <i>chrA</i> | 94°C/2min | 94°C/30seg | 65°C/2min | 72°C/2min | 72°C/10min |
| <i>Actina</i> | | | 60°C/30seg | 72°C/1min | 72°C/10min |

11. Reacción en cadena de la polimerasa en colonia (PCR-colonia)

Las transformantes seleccionadas de *E. coli* se inocularon en tubos con 3 ml de CL, se crecieron 12 h a 37 °C/220 rpm. Se centrifugó 20 seg a 13,000 rpm en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 gotas de glicerol estéril y se agregó 500 μl de CL con su respectivo antibiótico (100 μg/ml ampicilina). Se tomó 1 μl de la suspensión de las transformantes y se completó la mezcla para realizar la PCR siguiendo las especificaciones del proveedor (DreamTaq™ DNA Polymerase Fermentas) y los oligonucleótidos diseñados para determinar el fragmento en cuestión (**Figura 7**). Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes:

| Condiciones de amplificación (30 ciclos) | | | | |
|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| Desnaturalización inicial | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | Extensión final |
| 95°C/3min | 95°C/30seg | 55°C/30seg | 72°C/30seg | 72°C/30seg |

12. Aislamiento de RNA total

A) Aislamiento de RNA total de *N. crassa* 74-A

El RNA total se obtuvo utilizando el reactivo TRI Reagent Solution (Applied Biosystems), de acuerdo al siguiente protocolo: Se creció un cultivo de *N. crassa* 74-A en medio líquido (P.D.B) agregando 5×10^5 esporas/ml y se incubó a 30 °C/150 rpm a intervalos. Se recolectó el micelio por filtración a intervalos, se molieron las muestras en nitrógeno líquido, se tomó aproximadamente 5 mg de tejido molido, se colocó en un tubo de 1.5 ml y se agregó 1 ml de reactivo TRI. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se adicionó 500 µl de isopropanol, se agitó vigorosamente durante 10 seg y se centrifugó 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se removió cuidadosamente, se transfirió a otro tubo, se le adicionó 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C. Se removió el etanol, se secó la pastilla de 3-5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 µl de agua libre de nucleasas. La integridad de la muestra se analizó por electroforesis tomando una alícuota del RNA y se colocó en un gel de agarosa al 1.5 % corriéndola 75 volts/40 min, además para cuantificar el RNA total se tomó una alícuota y se hizo

una lectura al espectrofotómetro a 260 nm en una celda de cuarzo. Las muestras se almacenaron a -70 °C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5 %.

B) Extracción de RNA de transformantes de *S. cerevisiae*

A partir de un preinóculo de 12 h en medio mínimo S.C.U. sin uracilo con glucosa 2 % de las transformantes de *S. cerevisiae*, se inoculó con 100 µl en tubos con 3 ml del mismo medio y se incubó por 24 h 30 °C en agitación constante. Se cosecharon las células por centrifugación a 13,000 rpm/2 min, se lavaron con S.C.U. al menos 2 veces y al final se resuspendieron con 1 ml de medio S.C.U. Se ajustó a una densidad óptica conocida para un volumen de 3 ml de medio mínimo, S.C.U. sin uracilo con glucosa 2 % y S.C.U. sin uracilo con galactosa 2 % y rafinosa 2 %. Se incubó a 28 °C/24 h en agitación constante. Se centrifugó el cultivo 13,000 rpm/3 min. La pastilla se pulverizó con N₂ líquido y se agregó 1 ml de reactivo TRI. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se adicionó 500 µl de isopropanol, se agitó vigorosamente durante 10 seg y se centrifugó 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se removió cuidadosamente, se transfirió a otro tubo, se le adicionó 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C. Se removió el etanol, se secó la pastilla de 3-5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 µl de agua libre de nucleasas. La integridad de la muestra se analizó por electroforesis tomando una alícuota del RNA y se corrió en un gel de agarosa al

1.5 % a 75 volts/40 min. Para cuantificar el RNA total se tomó una alícuota y se hizo una lectura al espectrofotómetro a 260 nm en una celda de cuarzo. Las muestras se almacenaron a -70 °C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5 %.

C) Tratamiento con DNasa

El RNA total fue tratado con RQ1 RNase –Free DNase (Promega) utilizando 1 unidad por µg de RNA. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 10 min. Las muestras se almacenaron a -70 °C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

13. Cinética de crecimiento de *N. crassa* 74-A

A partir de un concentrado de esporas de *N. crassa* 74-A, se realizó el cálculo correspondiente para agregar 5×10^5 esporas por ml de medio, utilizando matraces con 35 ml de medio caldo papa dextrosa con y sin cromato. Los matraces se incubaron a 28 °C/175 rpm, tomaron muestras a intervalos. Para determinar el peso seco, micelio generado por el hongo se recuperó en un papel filtro de poro mediano previamente pesado. Las muestras se secaron en una estufa a 70 °C, tomando el peso del micelio y el papel filtro, se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el peso del micelio; restando el peso del micelio seco con el peso del papel filtro; multiplicado por 1,000, para obtener el dato en mg.

14. Reacción de la cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR)

El protocolo para el RT-PCR se hizo siguiendo las especificaciones del proveedor (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit; Fermentas). El protocolo consiste, en un tubo para PCR se colocó una cantidad de entre 10 ng- 5 µg de RNA total, 15-20 pM de oligonucleótido específico (Nc_RXIJ) y c.b.p de H₂O DEPC. Se mezcló y dio un pulso en la centrifuga, enseguida se agregó 5 µl de buffer de reacción 5X, 1 µl de ribonucleasa Ribolock y 2 µl de dNTP's 10 mM. Se incubó a 37 °C/5 min. Finalmente se agregó 1 µl de la RevertAid™ H-Minus M-MULV, para tener un volumen final de 20 µl. Se incubó a 42 °C/60 min y para detener la reacción se incubó a 70 °C/10 min.

15. Aislamiento de *chrA* proveniente de cDNA

Sintetizado el cDNA de *chrA*, se realizó una reacción de PCR utilizando las condiciones descritas para llevarla a cabo. La muestra se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % a 100 volts/45 min. Identificado el fragmento correspondiente al gen *chrA*, éste se purificó utilizando el método descrito para purificar bandas de geles de agarosa.

16. Clonación del cDNA de *chrA* de *N. crassa* 74-A

El producto de PCR resultado de la amplificación del fragmento homólogo a ChrA de *N. crassa* 74-A proveniente del cDNA que se purificó, una vez analizado electroforéticamente se clonó en el vector pJET1.2/blunt. El producto de PCR se mezcló con 10 µl de buffer de reacción 2X, 1 µl enzima DNA blunting y c.b.p. 18 µl de agua libre de nucleasas. Se mezcló e incubó a 70 °C/5 min, enseguida se

agregó 1 µl del vector pJET1.2/blunt (50 ng/ µl) empleando una proporción 3:1 (inserto vector) y 1 µl de T4 DNA ligasa dejándola incubar toda la noche 4 °C; después se purificó el producto mediante un tratamiento que consistió en mezclar 20 µl producto de ligación con 180 µl agua grado HPLC, 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo. La mezcla fenol-cloroformo se colocó en el vortex en agitación por 10 min, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se le agregó 10 % del volumen de acetato de potasio 5 M (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial pH 4.8) completando el volumen total del tubo con etanol absoluto. Se mezcló y se almacenó a -80 °C/10 min. Se centrifugó, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol 70 %, dejando secar la pastilla para resuspenderla en 10 µl de agua grado HPLC, almacenándolos a 4 °C hasta su uso.

17. Subclonación del cDNA de *chrA* de *N. crassa* 74-A

Para la subclonación de *chrA*, el plásmido recombinante fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xba*I. Al fragmento liberado se le realizó una electroforesis en geles de agarosa, el producto fue purificado siguiendo el protocolo descrito para el aislamiento del DNA en geles de agarosa y ligado en el vector pYES2 linealizado con las mismas enzimas, siguiendo el protocolo descrito para restricción de endonucleasas. La ligación fue siguiendo el protocolo antes descrito.

18. Transformación de *Escherichia coli*

A) Preparación de las células electrocompetentes

Un cultivo de la cepa de *E. coli* se creció durante toda la noche a 37 °C, se tomó 4 ml para inocular 250 ml de CL en un matraz de 1L. Se incubó a 37 °C en agitación

constante hasta una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Enseguida se pasó el cultivo a hielo durante 20 min y se centrifugaron las células 10 min a 9,500 rpm a 4°C. Las células se lavaron dos veces con agua desionizada estéril fría y se centrifugó entre cada lavado a 9,500 rpm por 10 min a 4°C. En el último lavado se resuspendieron las células con agua estéril con glicerol al 20 %. Las células competentes se distribuyeron en alícuotas de 200 µl para su almacenamiento a -80 °C para su uso posterior.

B) Electroporación

La transformación se realizó en un electroporador Eppendorf 2510. En un tubo Eppendorf se mezclaron 100 µl de células competentes con 2 µl de DNA plasmídico. La mezcla se colocó entre los electrodos de una celda de electroporación fría. Se ajustó el micropulso a 1800 V, la celda se colocó en la cámara deslizable del electroporador y se dio un pulso eléctrico de 4-5 milisegundos. Inmediatamente la mezcla se transfirió a un tubo con 2 ml de CL. Se incubó a 37 °C/1 h con agitación constante. Se distribuyeron 100 µl del cultivo en cajas de AL adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C/12 h. Las colonias obtenidas se crecieron en 4 ml de CL para realizar aislamiento y purificación de DNA.

19. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se transformó siguiendo las especificaciones del kit comercial para *S. cerevisiae* (Frozen EZ Yeast Transformation II; ZYMO RESEARCH). Primero se generaron células competentes de *S. cerevisiae*, para lo cual las levaduras se crecieron en

un matraz con 10 ml de YPD y se incubaron a 30 °C hasta fase logarítmica intermedia (absorbencia de 0.8-1 a 600 nm). Una vez crecida a esa absorbencia, las células se centrifugaron a 750 rpm/ 4 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió con la solución EZ 1 (Tris/ácido clorhídrico 1 %, Ácido etilendiaminotetracético 1 % pH 8), se centrifugó a 750 rpm/ 4 min, se descartó el sobrenadante y se agregó la solución EZ 2 (Sorbitol 1 M). Se agregó 50 µl de células competentes y entre 0.2-1 µg de DNA. A la mezcla se agregó la solución EZ 3 (Dimetil sulfóxido 7 %). Se incubó a 30 °C/45 min, mezclando a intervalos de 15 min. Enseguida se plaqueó de 50-150 µl de las células transformadas en cajas con medio S.C.U sin uracilo con glucosa 2 %. Se incubó 2-4 días a 30 °C.

20. Pruebas de susceptibilidad a cromato en transformantes de *S. cerevisiae*.

A) En medio sólido

A partir de un preinóculo de 12 h en medio mínimo S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo de las transformantes de *S. cerevisiae*, se centrifugó a 12,000 rpm/2 min, se lavaron las células con S.C.U. al menos 2 veces, se resuspendieron con 3 ml de medio S.C.U. y se ajustó la absorbencia a 0.4 a 600 nm. Se hicieron diluciones del inóculo 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 y se colocaron 3 µl en cajas de S.C.U. sin uracilo con galactosa 2 % y rafinosa 2 % con concentraciones crecientes de cromato. El crecimiento se registró mediante fotografías de las cajas a intervalos.

B) En medio líquido

A partir de un preinóculo de 12 h en medio mínimo S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo de las transformantes de *S. cerevisiae*, se inoculó con 100 µl en un matraz

con 20 ml de S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo el cual se dejó por 12 h 30 °C/1,750 rpm. Se cosecharon las células por centrifugación a 5,000 rpm/5 min, se lavaron las células con S.C.U. al menos 2 veces y al final se resuspendieron con 1 ml de medio S.C.U. Se ajustó la absorbencia a 0.1 para un volumen de 10 ml de medio S.C.U. con galactosa 2 % y rafinosa 2 %. Se incubó entre 3-6 h 30 °C/150 rpm, se realizó la lectura de nuevo de la absorbencia y se ajustó a 0.05 para tubos de 5 ml de medio S.C.U. con galactosa 2 % y rafinosa 2 % y con diferentes concentraciones de cromato de potasio. Se incubó a 28°C en agitación constante, y el crecimiento se cuantificó a intervalos midiendo absorbencia a 600 nm.

21. Determinación de la acumulación de cromo total en transformantes de *S. cerevisiae*

A partir de un preinóculo de 12 h en medio mínimo S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo de las transformantes de *S. cerevisiae*, se inoculó con 100 µl en un tubo con 3 ml de S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo el cual se incubó por 24h 30 °C en agitación constante. Se cosecharon las células por centrifugación a 13,000 rpm/2 min, se lavaron con S.C.U. al menos 2 veces y al final se resuspendieron con 1 ml de medio S.C.U. Se ajustó a una absorbencia conocida a 600 nm para un volumen de 30 ml de S.C.U. con galactosa 2 % y rafinosa 2 % sin uracilo con diferentes concentraciones de cromato de potasio. Se incubó a 28 °C/24 h/180 rpm. Se recuperó la biomasa en un tubo de 1.5 ml estéril, previamente pesado, se centrifugó a 13,000 rpm/5 min, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células con H₂O deionizada estéril al menos dos veces. La pastilla se congeló a -80 °C por al menos 1 h y enseguida se liofilizó la pastilla por 6 h. A la muestra liofilizada se le

realizó una digestión utilizando HNO₃ concentrado y H₂O₂ al 30 % por lo menos 1 h. El cromo total se determinó en un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo modelo 7500ce (Agilent Technologies). Con una alícuota (1 ml) de la muestra digerida de las diferentes concentraciones de cromato y diluidas con agua desionizada. Los isótopos monitoreados fueron ⁵²Cr y ⁵⁵Mn (¹¹⁵In como estándar interno). Todos los análisis fueron por triplicado.

22. Evaluación del efecto del sulfato sobre la toxicidad del cromato

A partir de un preinóculo de 12 h en medio mínimo S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo de las transformantes de *S. cerevisiae*, se inoculó con 100 µl en un tubo con 3 ml de S.C.U. con glucosa 2 % sin uracilo el cual se incubó 24 h/30 °C en agitación constante. Se cosecharon las células por centrifugación a 13,000 rpm/2 min, se lavaron con S.C.U. al menos 2 veces y al final se resuspendieron con 1 ml de medio S.C.U. Se ajustó a una absorbencia conocida a 600 nm para un volumen de 3 ml de medio mínimo modificado con galactosa 2 % y rafinosa 2 % y diferentes concentraciones de cromato de potasio y sulfato de magnesio. Se incubó a 28 °C/24 h en agitación constante y el crecimiento se cuantificó midiendo absorbencia a 600 nm.

VIII. RESULTADOS

1. Actualización del árbol filogenético de la subfamilia LCHR de hongos

Debido a que después del análisis de Díaz-Pérez et al., (2007) han aparecido nuevos genomas secuenciados de diversos organismos, se realizó una actualización del árbol filogenético con la finalidad de identificar organismos con homólogos a ChrA. El resultado del análisis Blast mostró 38 nuevas secuencias de proteínas homólogas a ChrA, de las cuales 31 secuencias son de hongos (24 diferentes géneros fúngicos) 5 son de algas (*Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Thalassiosira pseudonana*), 1 secuencia del musgo *Physcomitrella patens* subsp. *patens* y 1 secuencia de un protozoo (*Paramecium tetraurelia* d4-2). El árbol filogenético mostró que cada uno de los organismos se agrupó en su respectivo Reino (*Fungi*, *Protista* y *Plantae*) cuando se analizó utilizando el algoritmo de Neighbor Joining. El árbol se nombró LCHREUK, debido a que incluye a otros organismos aparte de los hongos, nombrando a este último grupo, la subfamilia LCHRF (**Figura 9**). Se encontró que en su mayoría eran hongos del *Phylum Ascomycetes*, teniendo las proteínas un tamaño promedio de 400-560 a.a. (**Tabla 1**). De este análisis se concluye que preliminarmente que todas estas proteínas provienen de un ancestro común la cual está ampliamente distribuida en varios *phylum* de hongos.

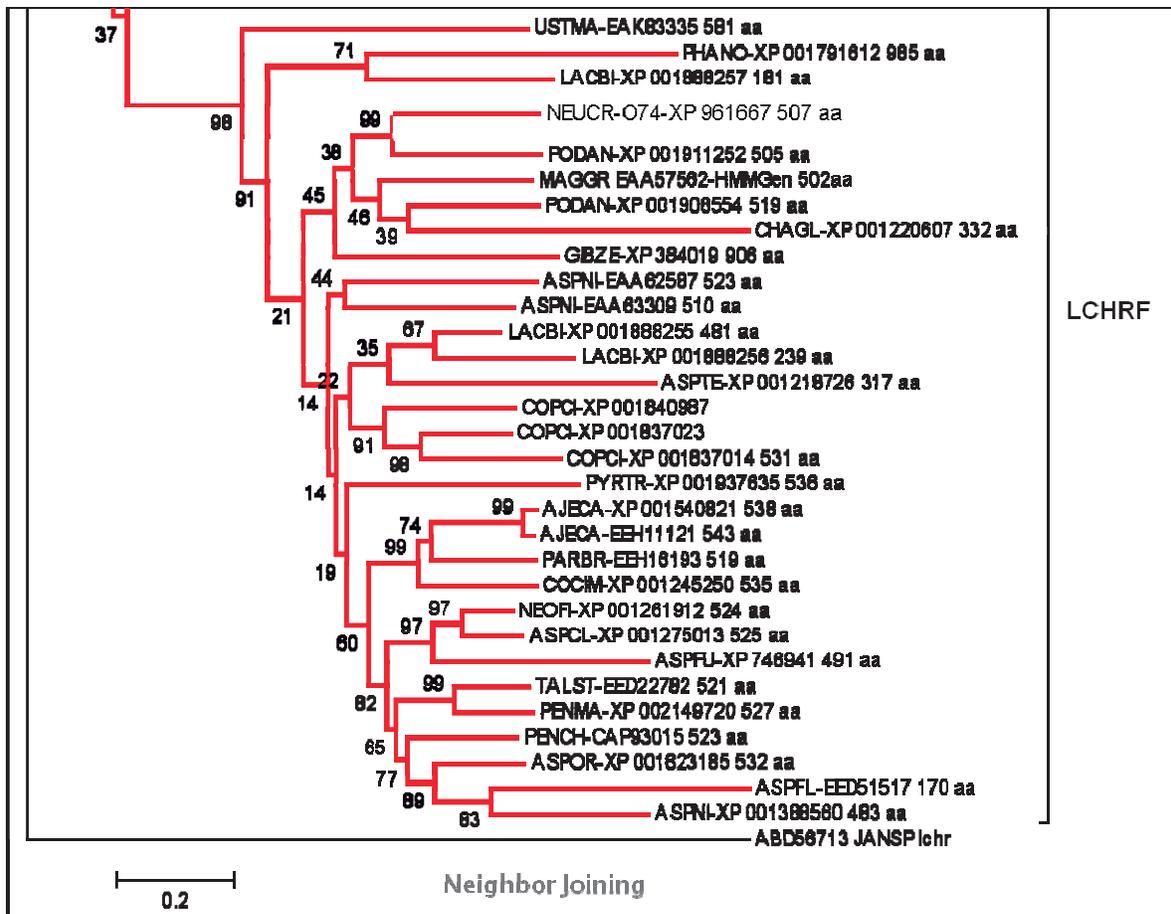


Figura 8. Dendrograma de la subfamilia LCHRF de hongos. Clado del dendrograma obtenido mediante el método Neighbor Joining, el cual abarca las 31 secuencias homólogas de hongos. Se muestra dentro del árbol el porcentaje de identidad entre secuencias de las proteínas. Además de indicar la abreviatura del nombre del organismo, número de acceso en la base de datos del NCBI y el número de aminoácidos (a.a) de la proteína. En la parte inferior izquierda se indica la escala del número de cambios que ha tenido la proteína.

Tabla1. Hongos con homólogos ChrA

Se muestra en la primera columna los hongos identificados en el análisis. En la segunda columna la abreviatura utilizada en el dendrograma, en la tercera columna su Phylum correspondiente y enseguida el tamaño de la proteína.

| Especies | Abreviatura | Phylum | Tamaño (aa) |
|--------------------------------------------------|-----------------------|----------------|-------------|
| <i>Ajellomyces capsulatus</i> G186AR | AJECA-XP001540821 | Ascomycetes | 538 |
| <i>Ajellomyces capsulatus</i> NAM1 | AJECA-EEH11121 | Ascomycetes | 543 |
| <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1 | ASPCL-XP001275013 | Ascomycetes | 525 |
| <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 | ASPFL-EED51517 | Ascomycetes | 170 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 | ASPFU-XP746941 | Ascomycetes | 491 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 | ASPNI-EAA62587 | Ascomycetes | 523 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 | ASPNI-EAA63309 | Ascomycetes | 510 |
| <i>Aspergillus niger</i> | ASPNI-XP001388560 | Ascomycetes | 483 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 | ASPOR-XP001823185 | Ascomycetes | 532 |
| <i>Aspergillus terreus</i> NIH262 | ASPTA-XP001218726 | Ascomycetes | 317 |
| <i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51 | CHAGL-XP001220607 | Ascomycetes | 332 |
| <i>Coccidioides immitis</i> RS | COCIM-XP001245250 | Ascomycetes | 535 |
| <i>Gibberella zeae</i> PH-1 | GIBZE-XP384019 | Ascomycetes | 906 |
| <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15 | MAGGR-EAA57562-HMMGen | Ascomycetes | 502 |
| <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 | NEOFI-XP001261912 | Ascomycetes | 524 |
| <i>Neurospora crassa</i> OR74A | NEUCR-074-XP961667 | Ascomycetes | 507 |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03 | PARBR-EEH16193 | Ascomycetes | 519 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 | PENCH-CAP93015 | Ascomycetes | 523 |
| <i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224 | PENMA-XP002149720 | Ascomycetes | 527 |
| <i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15 | PHANO-XP0017916112 | Ascomycetes | 985 |
| <i>Podospora anserina</i> | PODAN-XP001911252 | Ascomycetes | 505 |
| <i>Podospora anserina</i> | PODAN-XP001908554 | Ascomycetes | 519 |
| <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP | PYRTR-XP001937635 | Ascomycetes | 536 |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500 | TALST-EED22782 | Ascomycetes | 521 |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130 | COPCI-XP001837014 | Basidiomycetes | 531 |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130 | COPCI-XP001840987 | Basidiomycetes | 809 |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130 | COPCI-XP001837023 | Basidiomycetes | 532 |
| <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82 | LACBI-XP001888255 | Basidiomycetes | 481 |
| <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82 | LACBI-XP00888256 | Basidiomycetes | 239 |
| <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82 | LACBI-XP001888257 | Basidiomycetes | 181 |
| <i>Ustilago maydis</i> 521 | USTMA-EAK83335 | Basidiomycetes | 581 |

2. Análisis de la estructura secundaria de la proteína ChrA de *Neurospora crassa*

La finalidad de este análisis fue predecir la estructura secundaria de la proteína ChrA de *N. crassa*. El análisis se realizó con el programa predictor Toppred utilizando los parámetros de KD-scale y GES-scale. Se usaron parámetros bacterianos (Jiménez-Mejía et al., 2006) con la finalidad de tener un análisis cercano al descrito para esta proteína. Se obtuvo que ChrA de *N. crassa* es una proteína formada por 11 segmentos transmembranales. La porción amino terminal se encuentra en el citoplasma y el carboxilo terminal se encuentra en el espacio extracelular (**Figura 10**). Con lo que permite concluir que el gen *chrA* codifica para una proteína de membrana cuya estructura secundaria tiene un plegamiento muy similar al descrito para ChrA's bacterianas.

3. Amplificación del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A

Con la finalidad de amplificar el gen *chrA* en *N. crassa* 74-A se empleo DNA genómico de *N. crassa* (**Figura 11 A**). El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa observándose el fragmento del tamaño esperado (1.7 kb) (**Figura 11 B**). El fragmento de DNA genómico de 1.7 kb amplificado, se clonó y se secuenció parcialmente, obteniéndose aproximadamente gen *chrA* de *N. crassa* 74-A amplificado de DNA genómico se secuenció un 50 % de la secuencia. Al realizar un alineamiento con la secuencia se identificaron dos intrones predichos por el NCDB, localizados a +43 nt río abajo del

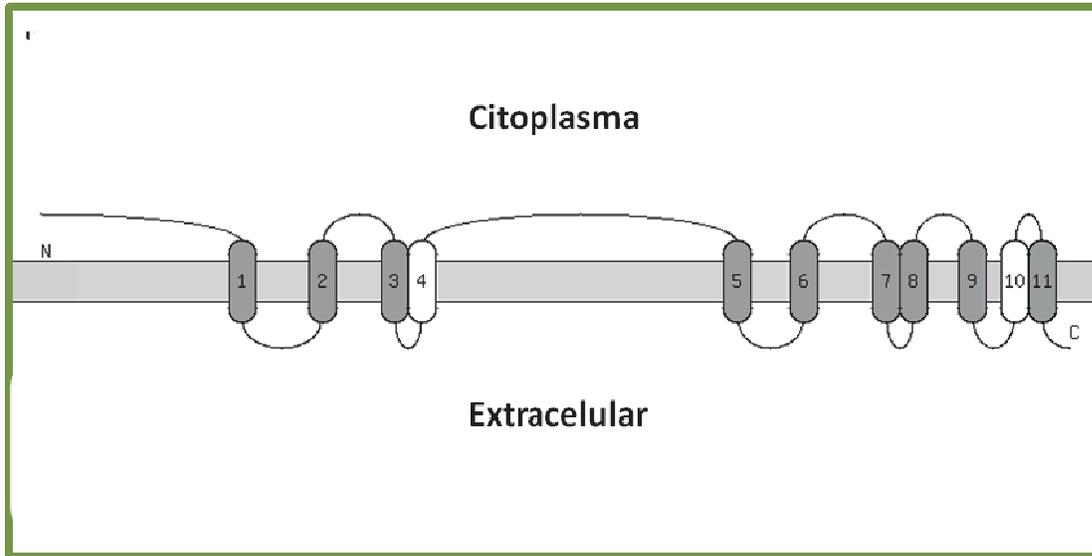


Figura 9. Modelo topológico de la proteína ChrA de *N. crassa*. Posible acomodo en la membrana de la proteína ChrA de *N. crassa* bajo los parámetros GES y KD del programa Toppred. Se muestra una topología de 11 segmentos transmembranales (STM; cilindros numerados). Se indica además la localización de los extremos amino terminal (N) (citoplasma) y carboxilo terminal (C) (extracelular).

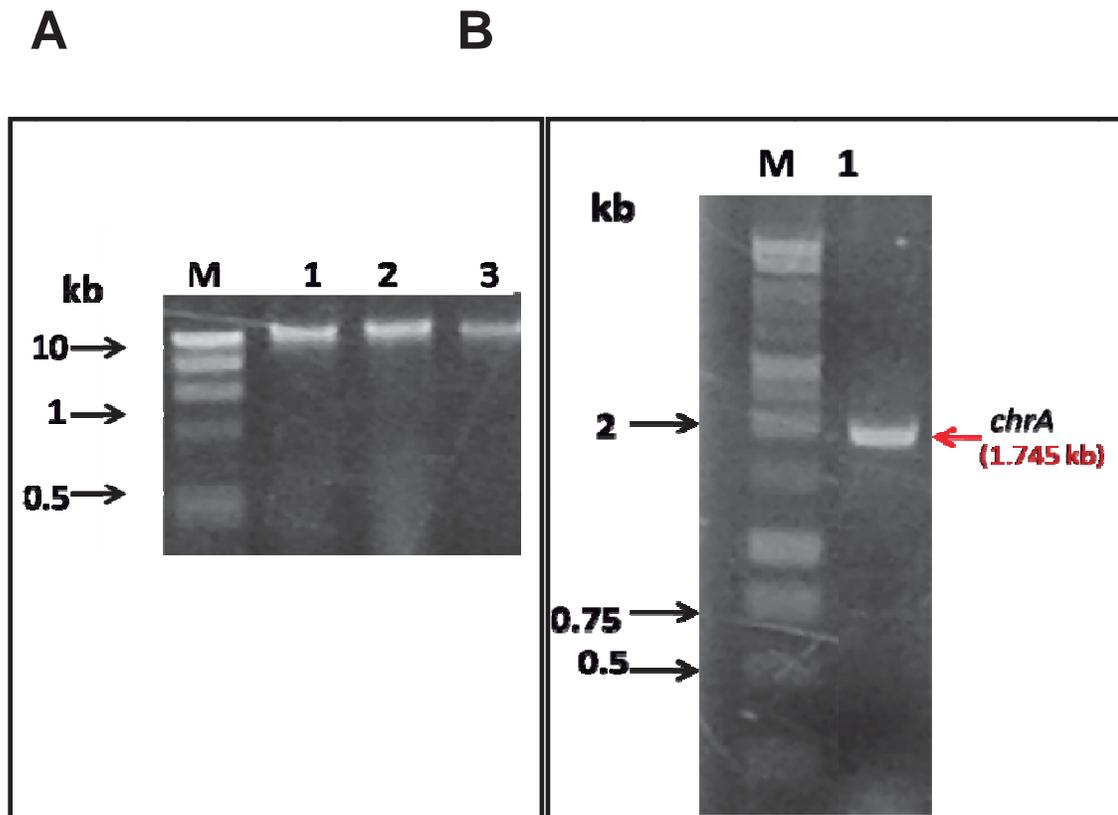


Figura 10. Amplificación del gen *chrA* de *N. crassa* mediante PCR. **A)** Electroforesis del DNA total de *N. crassa*. M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA. Carriles: 1, 2, 3, diferentes muestras de DNA genómico de *N. crassa*. **B)** Electroforesis del producto de amplificación del gen *chrA* (carril 1). M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA.

codón de inicio de *chrA* (de un tamaño de 111 pb) y +350 (de un tamaño de 84 pb), respectivamente (**Figura 12**). Se concluyó que los oligonucleótidos empleados amplificaron de manera específica para el gen completo de *chrA* de *N. crassa* 74-A y se corroboró la presencia de los dos intrones predichos en la bibliografía.

4. Análisis de la región 5' del gen *chrA* de *N. crassa*

Debido a que no había algún reporte sobre regularación el gen *chrA* de *N. crassa*, se realizó una búsqueda de elementos de un promotor con ayuda de programas informáticos así como de forma manual. Como resultado del análisis, se identificó una caja CAAT y una caja GC (en el gen *chrA* de *N. crassa* de la base de datos del NCDB), las cuales son elementos que forman parte de la región promotora conservada en los organismos eucarióticos (Klug y Cummings, 1999). Las cajas CAAT y GC se localizó a 68 y 200 nt río arriba del codón de inicio (ATG) respectivamente (**Figura 13**). Se identificaron varias regiones consenso (CGGN) de un regulador transcripcional (factores-elementos que actúan en trans y que facilitan el inicio de la transcripción) de tipo Stb5p (Klug y Cummings, 1999). Se concluyó que el gen *chrA* de *N. crassa* tiene elementos potenciales de un promotor río arriba del codón de inicio (ATG). Además de tener secuencias consenso de reconocimiento de un regulador transcripcional.

5. Análisis de la expresión del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A mediante RT-PCR

Para determinar si el gen *chrA* de *N. crassa* se expresaba de manera constitutiva o de manera inducible, se diseñó una estrategia experimental que consistió

DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL GEN *chrA* DE *Neurospora crassa* 74-A

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------|-----|
| pchrAint1 | NNNNNNNNGGNNNAGCTCGGNNCCNTGTCNCCTCAACCTCCAGTACCTAACAACTTTACC | 60 |
| chrADNA . | -----TGTCACCTCAACCTCCAGTACCTAACAACTTTACC | 35 |
| | *** ** | |
| pchrAint1 | GGTCGCGGAGATCATTGNCATCGCGAAGCTGGAATGCTTCCGAGTCAACTGGCACTTG | 120 |
| chrADNA . | GGTCGCGGAGATCATTGGCATCGCGAAGCTGGAATGCTTCCGAGTCAACTGGCACTTG | 95 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | GGCTTACGGCTTTTGGTGGGCCACCGGTCCACTTTAGGATAGTGAGTGCAGCTGTACT | 180 |
| chrADNA . | GGCTTACGGCTTTTGGTGGGCCACCGGTCCACTTTAGGATA----- | 137 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | GTGAAACGGCCTGAACTGCAACAACCTAATTAGTCTGCTTAAAACCTGGCAAACCTGTAAG | 240 |
| chrADNA . | ----- | |
| pchrAint1 | ATTACCTATGGGCTGACAAGGAGACGATAACAGTTTAATGTCAAATTCGTGCAAAGACC | 300 |
| chrADNA . | -----TTTAATGTCAAATTCGTGCAAAGACC | 164 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | AAATGGATCGATGAGCAGGTGTACCAAGAGCTTTCAGCGTCTCGCAGGCCCTCAGCGGA | 360 |
| chrADNA . | AAATGGATCGATGAGCAGGTGTACCAAGAGCTTTCAGCGTCTCGCAGGCCCTCAGCGGA | 224 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | CCAGGCAGCACCAAGATGTTGTACTGTATCAACTTGATACAAGACGGATTCTTGCTGCC | 420 |
| chrADNA . | CCAGGCAGCACCAAGATGTTGTACTGTATCAACTTGATACAAGACGGATTCTTGCTGCC | 284 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | GTGTTACAGCTTCTGCTGTGGAGTAAGTCACAGACAGCATCCGACCATCCACACAAGAT | 480 |
| chrADNA . | GTGTTACAGCTTCTGCTGTGGAG----- | 307 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | TACCTAGGTACCTACCGTGAACGACGAGTCTAACAAGACGCAACCAGTTTACCGGGTGCC | 540 |
| chrADNA . | -----TTTACCGGGTGCC | 320 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | ATAGGCATGTACGCGCTCGCTGTGGCGGTGTCAAAGATTGACGAAACCTTCCGAGACCG | 600 |
| chrADNA . | ATAGGCATGTACGCGCTCGCTGTGGCGGTGTCAAAGATTGACGAAACCTTCCGAGACCG | 380 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | GTATATGCTCTACTATCGGGCCTTAACGCCGGTACTGTGGCGTCATTGCTCTTGCTGCC | 660 |
| chrADNA . | GTATATGCTCTACTATCGGGCCTTAACGCCGGTACTGTGGCGTCATTGCTCTTGCTGCC | 440 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | GTCGAACTATCCGAAAAGGCCATTACGGATCGGCTAACGAGAATCCTGGTCTTCTCGGC | 720 |
| chrADNA . | GTCGAACTATCCGAAAAGGCCATTACGGATCGGCTAACGAGAATCCTGGTCTTCTCGGC | 500 |
| | ***** | |
| pchrAint1 | GCTACTGCCGGCATGCTGTACAATGCCCTCTGGTACTTCCCGGTCTTGATGCTAGCATCT | 780 |
| chrADNA . | GCTACTGCCGGCATGCTGTACAATGCCCTCTGGTACTTCCCGGTCTTGATGCTAGCATCT | 560 |
| | ***** | |

Figura 11. Localización de los intrones de las secuencias de *chrA* copia genómica. Alineamiento de la secuencia del gen *chrA* (secuenciada; chrA DNA) y *chrA* de la base de datos (*Neurospora crassa* Data Base; pchrAint1), utilizando el programa ClustalW. Se muestra de color verde el codón de inicio y sombreada la región de los intrones.

```

TTGACGACCGCATTGCCCCAACATTATCGTCTTTTGGGGTCCGTAACAGCTCGGA
ACGGTGGGTGGCAGGAGACCCTGACACTGTAAAGATCAGCTACTATAACACC
AAGAGICAGAACAACCIACCGAGAGGAIACAGAGCICAACAGGGGCCAA
CACGCACCATCAATACAGCATATGTACCTATAGTGCGACCCCGCACCACTAAAACA
CAACACCACCACCACGAAAAGATCACCAAGCTTCGAACGGGGACCTCACCATGA
CCTCTACTTGCTGTACATTCAAACCGGCGAGGGACGAAAGGGGCATTTCGTACGA
TAGCAATGTCACCTCAACCTCCAGTACCTAACAACTTTACCGGTCGCGCGA
GATCATTGGCATCGCGAAGCTGGAATGTCTTCCGAGTCAACTGGCACTTGGGC
TTCACGGCTTTTGGTGGGCCACCGTCCACTTTAGGATAGTGAGTGCGACCTGTA
CTGTGAAACGGCCTGAACTGCAACAACCTAATTAGTCTGCTTAAACTGGCAAAC
CTGTAAAGATTACCTATGGGCTGACAAAGGAGACGATACAGTTTAAATGTCMAATTCC
TGCAA
    
```

Figura 12. Análisis de la región 5' del gen *chrA* de *N. crassa*. Secuencia de nucleótidos río arriba del codón de inicio (letras de color verde) ATG del gen *chrA* de *N. crassa*. En letras cafés se muestra la secuencia consenso de la caja CAAT y en letras azules la caja GC, del presunto promotor del gen. También se muestran en letras rojas las regiones consenso de unión para el regulador transcripcional Stbp5p.

en hacer una cinética de crecimiento de *N. crassa* 74-A en caldo papa dextrosa (P.D.B) con y sin cromato. Se usó 0.1 mM cromato ya que en esta concentración el crecimiento de *N. crassa* no se vio seriamente afectado en su desarrollo (**Figura 14**). El resultado de esta cinética, fue que al agregar las conidias en el medio correspondiente con cromato, a las 12 h se vio un retraso en la germinación de la conidias, comprobándolo al analizar el peso seco, ya que al recolectar el micelio en este tiempo casi no había desarrollo de biomasa, mientras que en los tiempos subsecuentes (24, 36, 60 h) la germinación de las conidias de *N. crassa* se recuperó; este comportamiento se observó al compararlo con el análisis de peso seco del hongo crecido sin cromato (**Figura 14**).

Para el análisis de expresión, se utilizaron alícuotas de micelio a intervalos de tiempo de cada condición antes mencionada y se emplearon para hacer una extracción de RNA total del cual se utilizó 1 µg para el RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados para este análisis se probaron mediante PCR, amplificando una región interna del gen *chrA* (ChrA_DRT1 y ChrA_RRT1) (**Figura 6**) y una región interna del gen de actina, como control interno de expresión; Nc_AcDL2i y Nc_AcRJ2i (**Figura 7**). Una alícuota de los productos de la reacción se analizó en un gel de agarosa observándose los fragmentos esperados de 522 pb para *chrA* y de 444 pb para actina (**Figura 15**). Como resultado del RT-PCR fue que analizando la amplificación del fragmento interno de *chrA* (522 pb), se encontró que en las muestras sin cromato en los tiempos 24, 36 y 60 h, la expresión de *chrA* se mostró de forma basal; en contraste, en la muestra de 12 h la expresión fue mayor (**Figura 16 A**). En cambio, en las muestras obtenidas

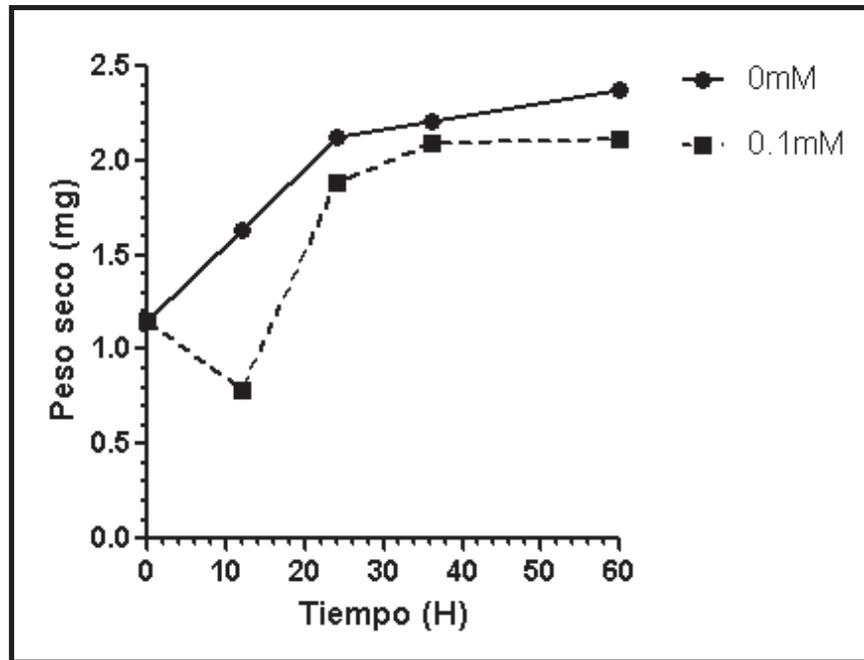


Figura 13. Cinética de crecimiento de *N. crassa* 74-A. Los cultivos se crecieron en medio P.D.B. a 28 °C/175 rpm, tomando el micelio en los tiempos indicados, y determinando el peso seco. Control sin cromato (●) y muestra tratada con 0.1 mM de cromato (■). n=2 (duplicado).

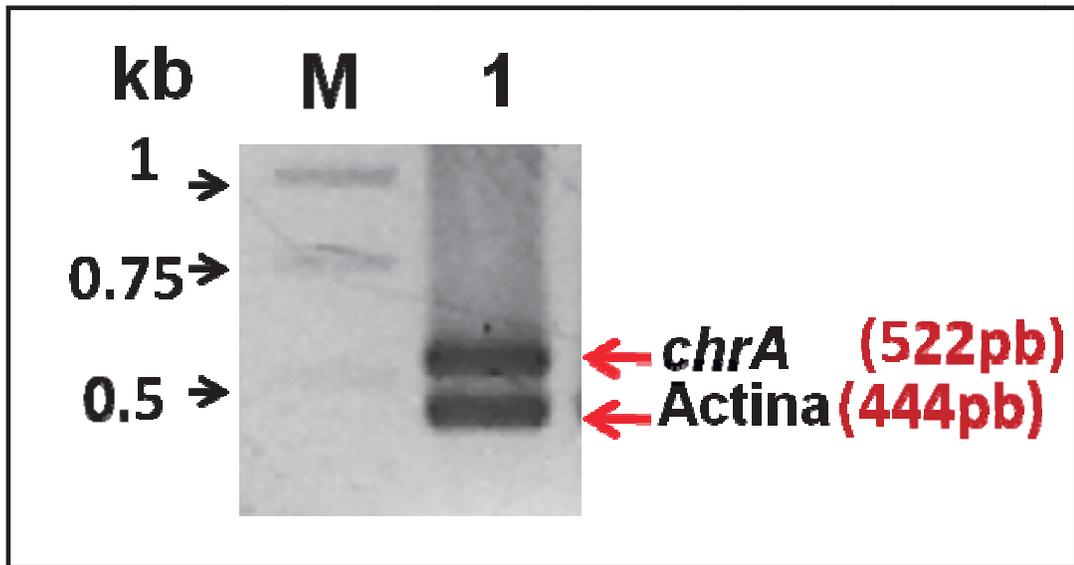


Figura 14. Amplificación de fragmentos internos de los genes *chrA* y actina de *N. crassa* mediante PCR. Análisis electroforético de los productos de los genes *chrA* y actina mediante PCR. Carriles: M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA; 1, productos de PCR de los genes *chrA* y actina.

en presencia de cromato, aunque al tiempo de 12 h la expresión se mostró baja, a las 24, 36 y 60 h se observó una expresión mayor que las muestras sin cromato (**Figura 16 A**). Estos resultados indicaron que el gen *chrA* se induce en presencia de cromato y se genera más transcrito bajo esta condición. Como control interno de expresión se observó que en todas las muestras el fragmento del gen constitutivo de actina (444 pb) se amplificó (**Figura 16 B**), confirmando que se había cargado la misma cantidad de RNA en las reacciones. También se verificó la integridad del RNA mediante electroforesis (**Figura 16 C**). Con esto se concluyó que el gen *chrA* de *N. crassa* 74-A se expresa y además se induce en presencia de cromato.

6. cDNA de *chrA* de *N. crassa* 74-A

A) Amplificación del cDNA de *chrA* de *N. crassa* 74-A

Con el objetivo de determinar la función de *chrA* de *N. crassa* 74-A, primero se amplificó el gen *chrA* partir de cDNA. Utilizando RNA total extraído de *N. crassa* y empleando los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *chrA* Nc_DBIL y Nc_RXIJ se realizó el RT-PCR (**Figura 6**). El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa, observando que el tamaño de los productos es de aproximadamente de 1.550 kb (**Figura 17**), menor al obtenido a partir de DNA genómico que fue de mayor tamaño (1.745 kb) (**Figura 17**). La diferencia de tamaño se debe a que *chrA* genómico que contiene los dos intrones ya previamente identificados, mientras que *chrA* de cDNA no los contiene. Esta banda se purificó para subsecuentemente clonarla en un vector para recuperar fragmentos de PCR.

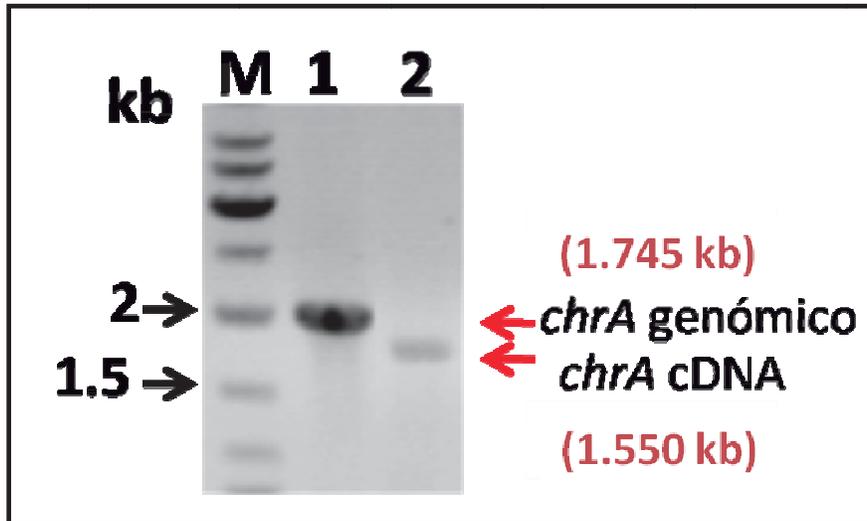


Figura 16. Amplificación de *chrA* de *N. crassa* a partir de cDNA. Análisis electroforético del producto de amplificación del fragmento de *chrA*. Carriles: M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA; 1, producto de PCR del gen *chrA* copia genómica; 2, producto de PCR del gen *chrA* copia cDNA.

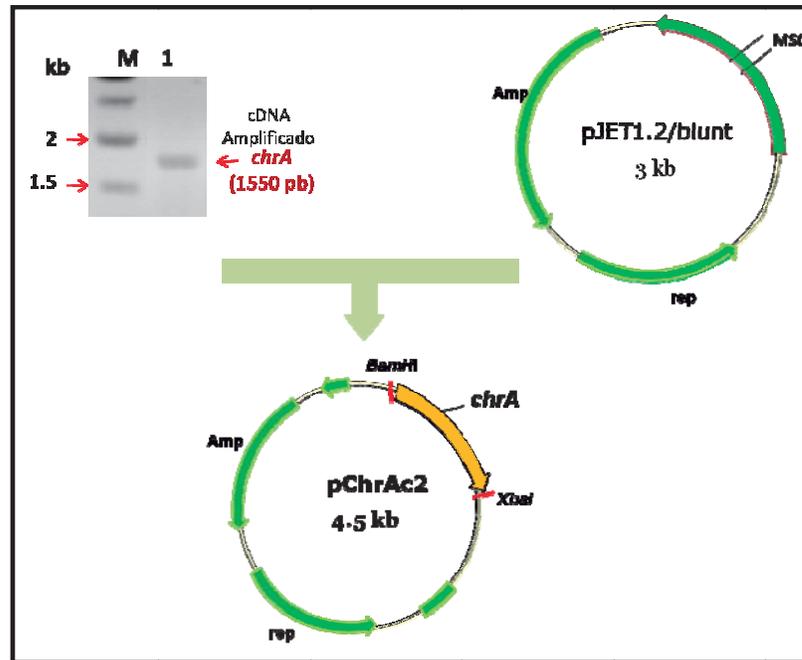
B) Clonación de *chrA* de cDNA en el vector pJET 1.2/blunt

El fragmento correspondiente a la amplificación del cDNA del gen *chrA* de *N. crassa*, se clonó en el vector pJET 1.2/blunt generando así el plásmido recombinante pChrAc2, el cual se utilizó para transformar a *E. coli* cepa JM101 (**Figura 18 A**). Para verificar la construcción, las transformantes de *E. coli* seleccionadas se analizaron por PCR empleando los oligonucleótidos Nc_DBIL y Nc_RXIJ (**Figura 6**) y el producto de la amplificación generó un fragmento del tamaño esperado (**Figura 18 B**). El plásmido recombinante pChrAc2 se utilizó para la subclonación del gen *chrA* en el vector pYES2.

C) Subclonación del gen *chrA* en el vector pYES2

Una vez recuperado *chrA* en el vector pJET1.2/blunt, se subclonó el fragmento en cuestión del plásmido generado pChrAc2 en el vector de expresión para *S. cerevisiae* pYES2, el fragmento *BamHI/XbaI* purificado a partir de un gel de agarosa se ligó con este vector previamente linearizado con las mismas enzimas (**Figura 19 A**) generando el plásmido recombinante pSCNC2 (7.4 kb) (**Figura 19 B**). El producto de esta ligación fue utilizado para transformar *E. coli* XL1-Blue. A las clonas seleccionadas como positivas se les verificó la correcta clonación del fragmento a través de un análisis de restricción con las enzimas *BamHI/XbaI*. Se obtuvo el fragmento de 1.550 kb correspondiente a *chrA* y el fragmento de 5.8 kb correspondiente al vector pYES2 (**Figura 19 B**).

A



B

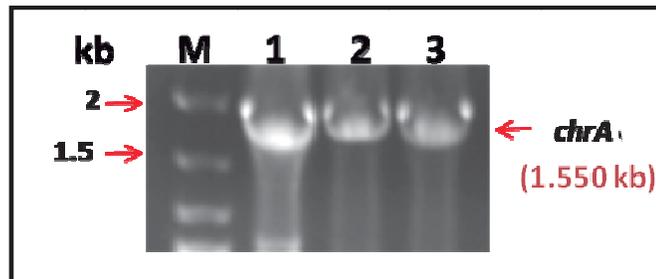
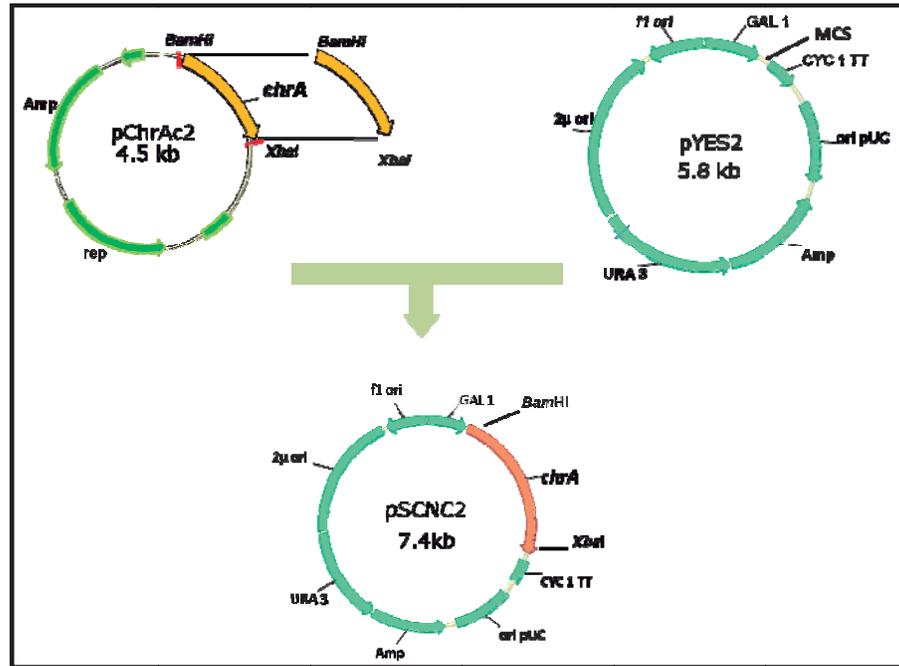


Figura 17. Clonación del cDNA del gen *chrA* de *N. crassa* 74-A. **A)** el producto de amplificación correspondiente al cDNA *chrA* fue clonado en el vector pJET1.2/blunt generando al plásmido recombinante pChrAc2. **B)** Análisis electroforético del producto de amplificación del fragmento de cDNA *chrA* del plásmido pChrAc2 por PCR con los oligonucleótidos Nc_DBIL y Nc_RXIJ. Carriles: M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA; 1, 2, 3, Producto de PCR de tres de las transformantes seleccionadas.

A



B

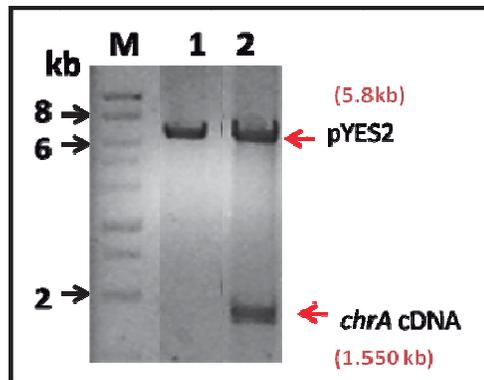


Figura 18. Subclonación del cDNA del gen *chrA* de *N.crassa* 74-A en pYES2.

A) A partir de la digestión del plásmido pChrAc2 con las enzimas *BamHI/XbaI*, se recuperó el fragmento correspondiente a cDNA *chrA*, mismo que fue ligado en el vector pYES2, generando el plásmido pSCNC2. B) Análisis electroforético de la restricción de pYES2 (carril 1) y pSCNC2 (carril 2) con las enzimas *BamHI/XbaI*. M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA.

Para confirmar la identidad del fragmento clonado, éste fue secuenciado utilizando Nc_DBIL y T7 como oligonucleótidos directos y ChrA_DRT1 como reverso. Con la secuencia obtenida se llevó a cabo un alineamiento con el programa ClustalW, teniendo como secuencia de referencia la obtenida del *Neurospora crassa* Data Base (NCDB). El resultado mostró que se había secuenciado el 100 % de *chrA* de cDNA y que éste tenía un 100 % de identidad con la secuencia de referencia de la NCDB (**Figura 20**). La construcción con *chrA* en el vector pYES2 (pSCNC2) se utilizó para transformar a *S. cerevisiae* y seguir la estrategia experimental propuesta.

D) Selección de transformantes de *S. cerevisiae*

Con la construcción pSCNC2, se transformó la cepa JCY100 de *S. cerevisiae* que es auxótrofa a uracilo, seleccionando por el fenotipo silvestre (protótrofa a uracilo). También, se realizó una extracción de DNA total a las mismas y una vez verificada su calidad (**Figura 21 A**), el DNA se utilizó para la transformación de la cepa *E. coli* XL1-Blue. A las transformantes seleccionadas se les realizó una extracción de plásmido por lisis alcalina. Los plásmidos se digirieron con las enzimas *Bam*HI/*Xba*I. Las transformantes con la construcción pSCNC2 mostraron la liberación de los fragmentos de *chrA* (1.550 kb) y de pYES2 (5.8 kb) (**Figura 21 B**). El análisis se les realizó a varias clonas de *E. coli*, mostrando todas ellas el mismo patrón. Con esto se concluyó que las transformantes de *S. cerevisiae* obtenidas poseen el plásmido pSCNC2, que contiene el cDNA del gen *chrA* de *N. crassa*, además que se pudieron caracterizarlas a nivel molecular por el patrón de

DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL GEN *chrA* DE *Neurospora crassa* 74-A

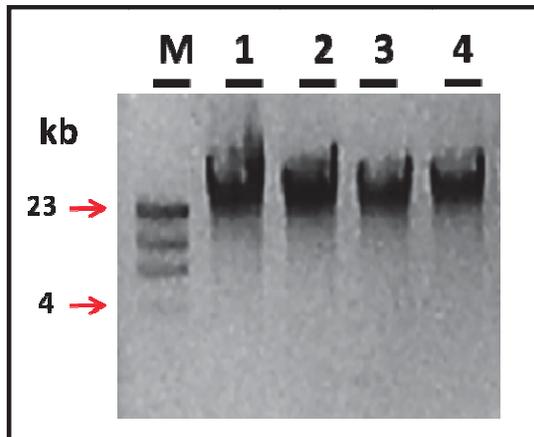
| | |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| chrA . NcDB chrA . cDNA | ATGTCACCTCAACCTCCAGTACCTAACAACCTTACC GGTCGCGCGAGATCATTGGCATCG 60 -TGTCACCTCAACCTCCAGTACCTAACAACCTTACC GGTCGCGCGAGATCATTGGCATCG 59 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CGAAGCTGGAATGTCTTCCGAGTCAACTGGCACTTGGGCTTCACGGCTTTTGGTGGGCCA 120 CGAAGCTGGAATGTCTTCCGAGTCAACTGGCACTTGGGCTTCACGGCTTTTGGTGGGCCA 119 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CCGGTCCACTTTAGGATATTTAATGTCAAATTCGTGCAAAAGACCAAATGGATCGATGAG 180 CCGGTCCACTTTAGGATATTTAATGTCAAATTCGTGCAAAAGACCAAATGGATCGATGAG 179 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CAGGTGTACCAAGAGCTCTTCAGCGTCTCGCAGGCCCTCAGCGGACCAGGCAGCACCAAG 240 CAGGTGTACCAAGAGCTCTTCAGCGTCTCGCAGGCCCTCAGCGGACCAGGCAGCACCAAG 239 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | ATGTTGTACTGTATCAACTTGATACAAGACGGATTCCCTGCTGCCGTGTTTCAGCTTCCTG 300 ATGTTGTACTGTATCAACTTGATACAAGACGGATTCCCTGCTGCCGTGTTTCAGCTTCCTG 299 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CTGTGGAGTTTACCGGGTGCCATAGGCATGTACGCGCTCGCTGTCGGCGTGTCAAAGATT 360 CTGTGGAGTTTACCGGGTGCCATAGGCATGTACGCGCTCGCTGTCGGCGTGTCAAAGATT 359 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | GACGAAACCCCTCCGAGACCGGTATATGCTCTACTATCGGGCCTTAACGCCGTTACTGTC 420 GACGAAACCCCTCCGAGACCGGTATATGCTCTACTATCGGGCCTTAACGCCGTTACTGTC 419 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | GGCGTCATTGCTCTTGCTGCCGTCGAAGTATCCGAAAAGGCCATTACGGATCGGCTAACG 480 GGCGTCATTGCTCTTGCTGCCGTCGAAGTATCCGAAAAGGCCATTACGGATCGGCTAACG 479 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | AGAATCCTGGTCTTCTCGCGCTACTGCCGGCATGCTGTACAATGCCCTCTGGTACTTC 540 AGAATCCTGGTCTTCTCGCGCTACTGCCGGCATGCTGTACAATGCCCTCTGGTACTTC 539 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CCGGTCTTGATGCTAGCATCTGGTATCGCGACTTGTACATGACTTGAGATGGATGCAC 600 CCGGTCTTGATGCTAGCATCTGGTATCGCGACTTGTACATGACTTGAGATGGATGCAC 599 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CAACCGATTTCCGCCATCGTTGGTTTTGGTACGGATCTGAAGGGCAAGCTCATCAGGGCA 660 CAACCGATTTCCGCCATCGTTGGTTTTGGTACGGATCTGAAGGGCAAGCTCATCAGGGCA 659 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | TGGCCTTTTGAAAAGTGGCCCGGATCAGCTTCAGATGCGGGTAACGATAACAATGCCGCG 720 TGGCCTTTTGAAAAGTGGCCCGGATCAGCTTCAGATGCGGGTAACGATAACAATGCCGCG 719 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | GTGCAAGGGCGAAGGAACAGTGCAGATGACGAAGAAAGCATCGAAATGTCGAGTGTGGCA 780 GTGCAAGGGCGAAGGAACAGTGCAGATGACGAAGAAAGCATCGAAATGTCGAGTGTGGCG 779 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | AAGGCAACAGCGACGGCGTCAAGCAGCTCCGGTGCCCGACCGAGAGCTGGACAACAGTCG 840 AAGGCAACAGCGACGGCGTCAAGCAGCTCCGGTGCCCGACCGAGAGCTGGACAACAGTCG 839 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | CAGCTGTCCGACCTTCCAGTTACCGAACAAGAAGCATCCACGTCGCTCCACAGGCGAA 900 CAGCTGTCCGACCTTCCAGTTACCGAACAAGAAGCATCCACGTCGCTCCACAGGCGAA 899 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | AACGAACCACGCACTATTTCAACTGAGTTTCGACTCGACTTTTCCTGGAAAATCGGAACG 960 AACGAACCACGCACTATTTCAACTGAGTTTCGACTCGACTTTTCCTGGAAAATCGGAACG 959 ***** |
| chrA . NcDB chrA . cDNA | GCCATCGTCGCTTGCTTCTTCGCCACCTTTGTTGCCGTCATGGTCACTCGCGCGCTCTTC 1020 GCCATCGTCGCTTGCTTCTTCGCCACCTTTGTTGCCGTCATGGTCACTCGCGCGCTCTTC 1019 ***** |

DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL GEN *chrA* DE *Neurospora crassa* 74-A

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------|------|
| chrA.NcDB | CCGAATCCGCCTGGACTTCCCTCTTGTACCACTTGTTTGTCAACATGTATCTTGCCGGC | 1080 |
| chrA.cDNA | CCGAATCCGCCTGGACTTCCCTCTTGTACCACTTGTTTGTCAACATGTATCTTGCCGGC | 1079 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | ACAATTATCTTTGGCGGCGCCCTGTCGTTATTCCTCTGTTGCGGGAATACGTGGTTGCC | 1140 |
| chrA.cDNA | ACAATTATCTTTGGCGGCGCCCTGTCGTTATTCCTCTGTTGCGGGAATACGTGGTTGCC | 1139 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | GAGGGCTGGGTGAATCCCCGCGACTTTCTCATCGGACTTGCTCTGATCCAGGCCTCCCA | 1200 |
| chrA.cDNA | GAGGGCTGGGTGAATCCCCGCGACTTTCTCATCGGACTTGCTCTGATCCAGGCCTCCCA | 1199 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | GGGCCAACTTCAACTTTGCCGTGTTCTGGGGCCCTTGACCGCCATCGGCAGCGGTAAT | 1260 |
| chrA.cDNA | GGGCCAACTTCAACTTTGCCGTGTTCTGGGGCCCTTGACCGCCATCGGCAGCGGTAAT | 1259 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | AACCCGGTAGCAGGTGCGGTCCTCGCCTGGGTCGGCATTTCAGCCGGGCTTGATCTTG | 1320 |
| chrA.cDNA | AACCCGGTAGCAGGTGCGGTCCTCGCCTGGGTCGGCATTTCAGCCGGGCTTGATCTTG | 1319 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | GTCCATGGTACAATGGGGATTGGAGTGCAGGAGAGAAAAGATGGGTAAGGCTGTG | 1380 |
| chrA.cDNA | GTCCATGGTACAATGGGGATTGGAGTGCAGGAGAGAAAAGATGGGTAAGGCTGTG | 1379 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | CTCAGGGCGTGAATGCTAGCGCAGTCGGGCTGATTTATACCGCGTTTACCGGATTGG | 1440 |
| chrA.cDNA | CTCAGGGCGTGAATGCTAGCGCAGTCGGGCTGATTTATACCGCGTTTACCGGATTGG | 1439 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | TGTGTTGGCTACATCGATGAGGGCTTTCAGTATGGTAAGAGCTTGGGCGCTGACCCATGG | 1500 |
| chrA.cDNA | TGTGTTGGCTACATCGATGAGGGCTTTCAGTATGGTAAGAGCTTGGGCGCTGACCCATGG | 1499 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | TGGGTCGTGGTAACGGCGACGACTACGTCGGTGGGCGATGGTTCAACCTCAAGGCACCT | 1560 |
| chrA.cDNA | TGGGTCGTGGTAACGGCGACGACTACGTCGGTGGGCGATGGTTCAACCTCAAGGCACCT | 1559 |
| | ***** | |
| chrA.NcDB | GTAGCAATTATTCTTGGTGCAATCATGGGGTTGATCAGGTACGGCGTTGTGTCGGCTTGA | 1620 |
| chrA.cDNA | GTAGCAATTATTCTTGGTGCAATCATGGGGTTGATCAGGTACGGCGTTGTGTCGGCTTGA | 1619 |
| | ***** | |

19. Análisis de la secuencia de *chrA* de cDNA de *N. crassa* 74-A. Alineamiento de la secuencia del gen *chrA* (*Neurospora crassa* Data Base; chrA.NcDB) y del producto de la secuenciación de *chrA* proveniente de cDNA(chrA.cDNA), utilizando el programa ClustalW.

A



B

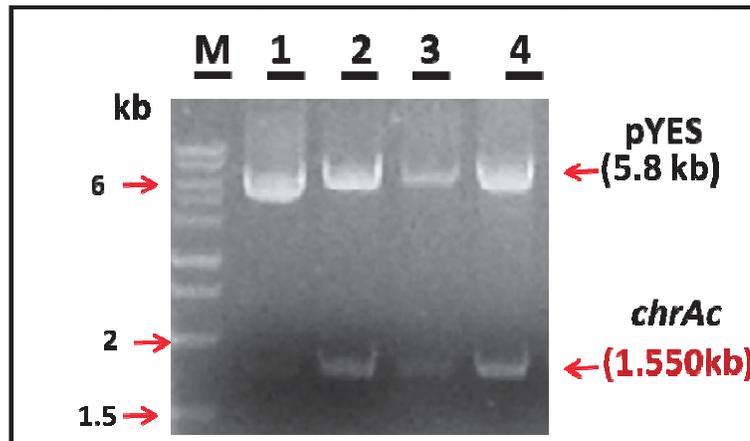


Figura 20. Verificación de la presencia del plásmido pSCNC2 en transformantes de *S. cerevisiae*. **A)** Carriles: M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA; carriles 1, 2, 3, 4, DNA genómico de las transformantes seleccionadas de *S. cerevisiae*. **B)** Carriles: M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA; carriles 1, 2, 3, 4, Producto de restricción *Bam*HI/*Xba*I del plásmido extraído de las transformantes seleccionadas de *E. coli*.

digestión por enzimas de restricción.

7. Análisis transcripcional de *chrA* en las transformantes de *S. cerevisiae*.

Las transformantes seleccionadas denominadas chrAc, se analizaron a nivel transcripcional mediante RT-PCR, con la finalidad de determinar la expresión del cDNA *chrA*, considerando a que el vector pYES2 contiene un promotor inducible por galactosa (por lo tanto, gen que esté río abajo de este promotor será expresado cuando se añade el azúcar). Las transformantes de *S. cerevisiae* se crecieron en presencia de galactosa (inducción) o glucosa (represión), se utilizaron para extraer el RNA total para realizar el RT-PCR utilizando los oligonucleótidos que amplificarían una región interna del gen *chrA*, ChrA_ DRT1 y ChrA_RRT1 (**Figura 6**). La cepa chrAc2 en condición de represión mostró sólo una ligera expresión, mientras que en condiciones inductoras manifestó una expresión más elevada de *chrA* (**Figura 22 A**). La cepa control pYES bajo inducción o represión no presentó señal de expresión (**Figura 22 A**). La integridad del RNA total extraído se verificó por electroforesis (**Figura 22 B**). Se confirmó con estos ensayos que el gen *chrA* se expresa en presencia de galactosa en las transformantes de *S. cerevisiae*.

8. Pruebas de susceptibilidad a cromato

A) Pruebas de susceptibilidad a cromato en medio sólido

Se diseñó una estrategia experimental para determinar la susceptibilidad de las transformantes de *S. cerevisiae* en medio sólido. Las transformantes chrAc2 se crecieron en medio S.C.U. sin uracilo con glucosa (para obtener biomasa) y las

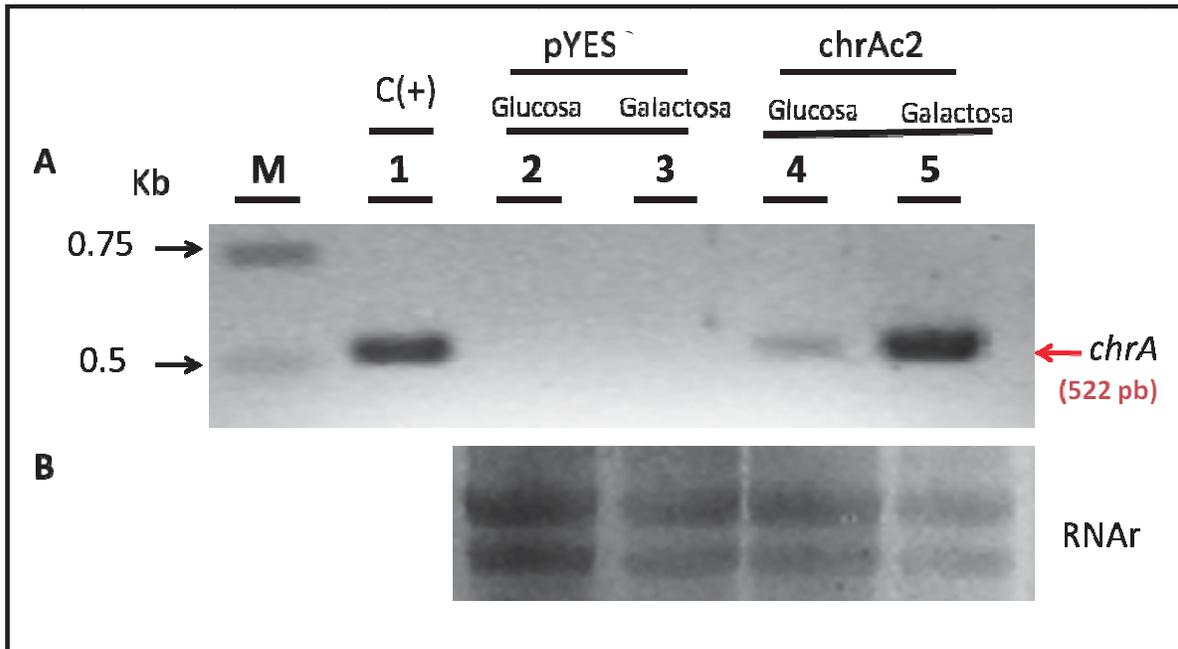


Figura 21. Análisis transcripcional mediante RT-PCR del cDNA *chrA* de *N. crassa* en las transformantes de *S. cerevisiae*. **A)** Gel de agarosa que muestra la ausencia o presencia del fragmento correspondiente a la amplificación del cDNA *chrA* (522 pb). Carriles: M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA; 1 Producto de PCR Control (+) DNA genómico *N. crassa*; carriles 2 y 3, producto de PCR de la transformante pYES (pYES2) crecida en medio S.C:U ura⁻ utilizando como represor (glucosa 2%) y como inductor (galactosa 2%), carriles 4 y 5, producto de PCR de la transformante chrAc2 (pSCNC2) crecida en medio S.C:U ura⁻ utilizando como represor (glucosa 2%) y como inductor (galactosa 2%). **B)** RNA total de las muestras obtenidas de las transformantes de *S. cerevisiae*.

células se lavaron y se resuspendieron en medio mínimo S.C.U sin uracilo. De las suspensiones se realizaron diluciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200) y se inoculó una gota de 3 μ l en medio mínimo S.C.U sólido sin uracilo en condiciones inductoras (galactosa). Se obtuvo como resultado que la cepa chrAc2 en las cajas con 0.1 mM de cromato, mostró una inhibición de crecimiento desde las últimas tres diluciones y presentó nulo crecimiento en las cajas de 0.15 mM (**Figura 23**). Por su parte, la cepa control pYES tuvo una afectación mínima de crecimiento en la caja con 0.1 mM de cromato, aunque en la caja de 0.15 mM se observó un efecto drástico en el desarrollo de las células, pero aún se percibió un mínimo desarrollo (**Figura 23**). Estos resultados mostraron que la cepa chrAc2 que contiene el gen *chrA* presenta un fenotipo de mayor sensibilidad a cromato en comparación con la cepa control pYES. Debido a que estos resultados no eran los esperados, por la razón de que casi todas las ChrA (de bacterias) descritas confieren resistencia a cromato en esos sistemas, se hicieron pruebas de susceptibilidad en medio líquido, para confirmar lo observado en medio sólido con la cepa chrAc2.

B) Prueba de susceptibilidad a cromato en medio líquido

Para determinar el fenotipo de las transformantes de *S. cerevisiae* en medio líquido, se creció a las transformantes de *S. cerevisiae* pYES (pYES2) y chrAc2 (pSCNC2) en medio mínimo S.C.U. sin uracilo en condiciones inductoras, con diferentes concentraciones de cromato. Se observó que a los tiempos analizados 12, 24, 48 h que se tomó la lectura de crecimiento de la transformante chrAc2,

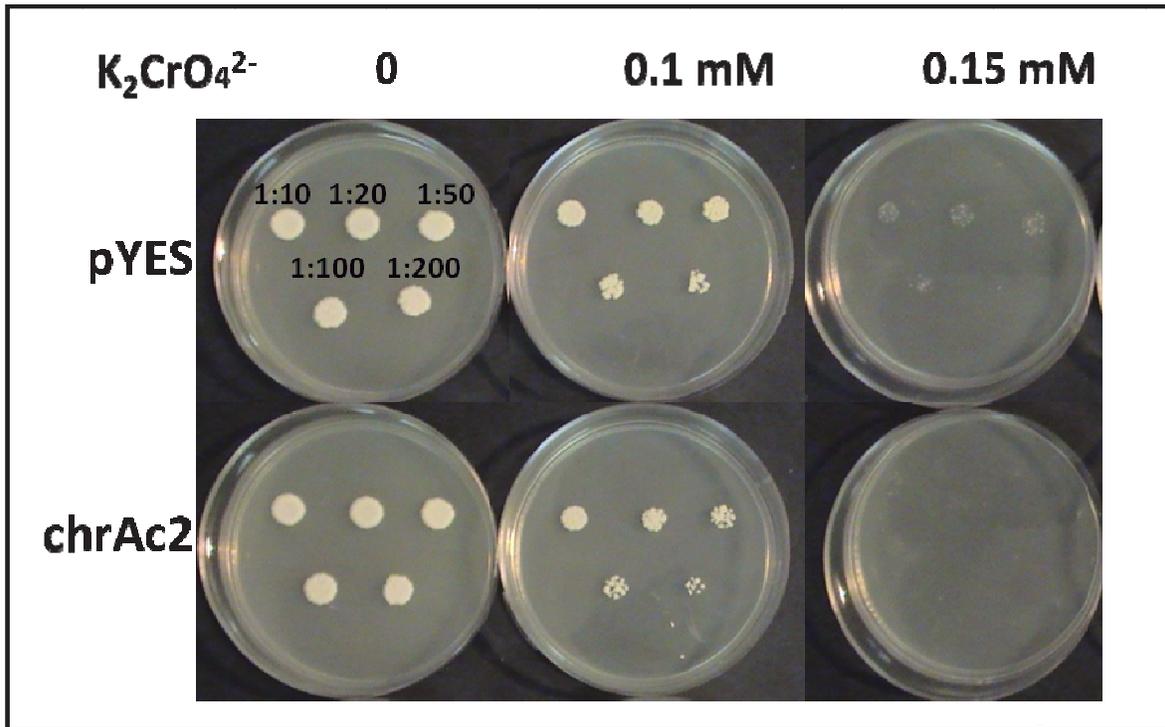


Figura 22. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *S. cerevisiae* en medio sólido. A partir de un preinóculo de 12 h crecido en glucosa 2 %, se aplicaron gotas de 3 μ l de las diluciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200), en cajas con medio sólido S.C.U. ura- (Galactosa 2 %-Rafinosa 2 %) con las concentraciones de cromato indicadas. Se incubaron 96 h/28°C. Control transformante de *S. cerevisiae* (pYES2), chrAc2 cepa con *chrA* proveniente de cDNA. Se muestra foto representativa de n=2.

esta se mostró más sensible al cromato con respecto al control pYES (**Figura 24**). En la concentración de cromato 0.025 mM el crecimiento a las 12 h en la transformante chrAc2 disminuyó hasta 2 veces con respecto a la transformante control pYES; a concentraciones mayores de cromato la diferencia entre las transformantes se acentúa ligeramente debido a mayor sensibilidad de la transformante chrAc2. Por otra parte, en los tiempos de 24 y 48 h, es claro que la diferencia en la sensibilidad a cromato entre las cepas transformantes es mayor, casi de 3 veces, en la concentración más baja del ión (0.025mM), observándose que en las concentraciones más altas de cromato el crecimiento de la transformante chrAc2 se inhibió hasta 6 veces más con respecto al control pYES (**Figura 24**). Se corroboró con esto lo observado en medio sólido, en donde la transformante chrAc2 se vio más seriamente afectada por el cromato, comparado con la cepa control pYES que no se vio afectado por el ión (**Figura 23**). Estos resultados sugieren que la proteína ChrA de *N. crassa* 74-A en *S. cerevisiae* tiene una función contraria a la descrita en bacterias, que es la de conferir resistencia a cromato por un sistema de expulsión. Se puede considerar que, en hongos ChrA tiene una función opuesta de ingresarlo al interior de la célula haciendo más sensible a cromato a *S. cerevisiae*.

9. Determinación de cromo total en biomasa de *S. cerevisiae*

Debido a que el fenotipo de sensibilidad a cromato de las transformantes chrAc2 sugiere que estas transportan cromato al interior de la célula, se determinó si éstas acumulan cromo en su biomasa en mayor proporción que la transformante con pYES2. Para ello, las transformantes mencionadas se cultivaron en presencia

de Cr(VI) y se determinó el cromo incorporado a la biomasa mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Como resultado se obtuvo que la transformante *chrAc2* en efecto acumuló cromo en su biomasa conforme se aumentó la concentración de cromato en el medio (**Figura 25**). A la concentración de 0.1 mM de cromato la cepa con el gen *chrA* (transformante *chrAc2*) mostró una acumulación de cromo 2.5 veces más alta con respecto a la cepa control pYES (**Figura 25**). Como control interno de la metodología se analizó al manganeso, dando como resultado que la concentración de este ión aumentaba de manera similar en ambas cepas pYES y *chrAc2* conforme se iba aumentando la concentración de cromato en el medio (**Figura 25**). Con estos resultados, se refuerza la interpretación de que *ChrA* de *N. crassa* es un transportador de cromato que favorece la acumulación de cromo al interior de la célula en *S. cerevisiae*.

10. Análisis del efecto del sulfato en las transformantes de *S. cerevisiae*

A continuación se determinó, de manera indirecta, si *ChrA* de *N. crassa* 74-A transporta cromato de manera específica o si es también capaz de transportar el oxianión análogo sulfato. El fundamento de este experimento consiste en que un exceso de ión sulfato, por su similitud estructural con el cromato, desplazaría a este ión, revirtiendo su efecto tóxico. El experimento consistió en crecer las cepas bajo condiciones inductoras en un medio mínimo con diferentes concentraciones del ión sulfato y de cromato, analizando el efecto de estos iones sobre el crecimiento de las cepas. Se observó que la transformante pYES sin cromato y sin

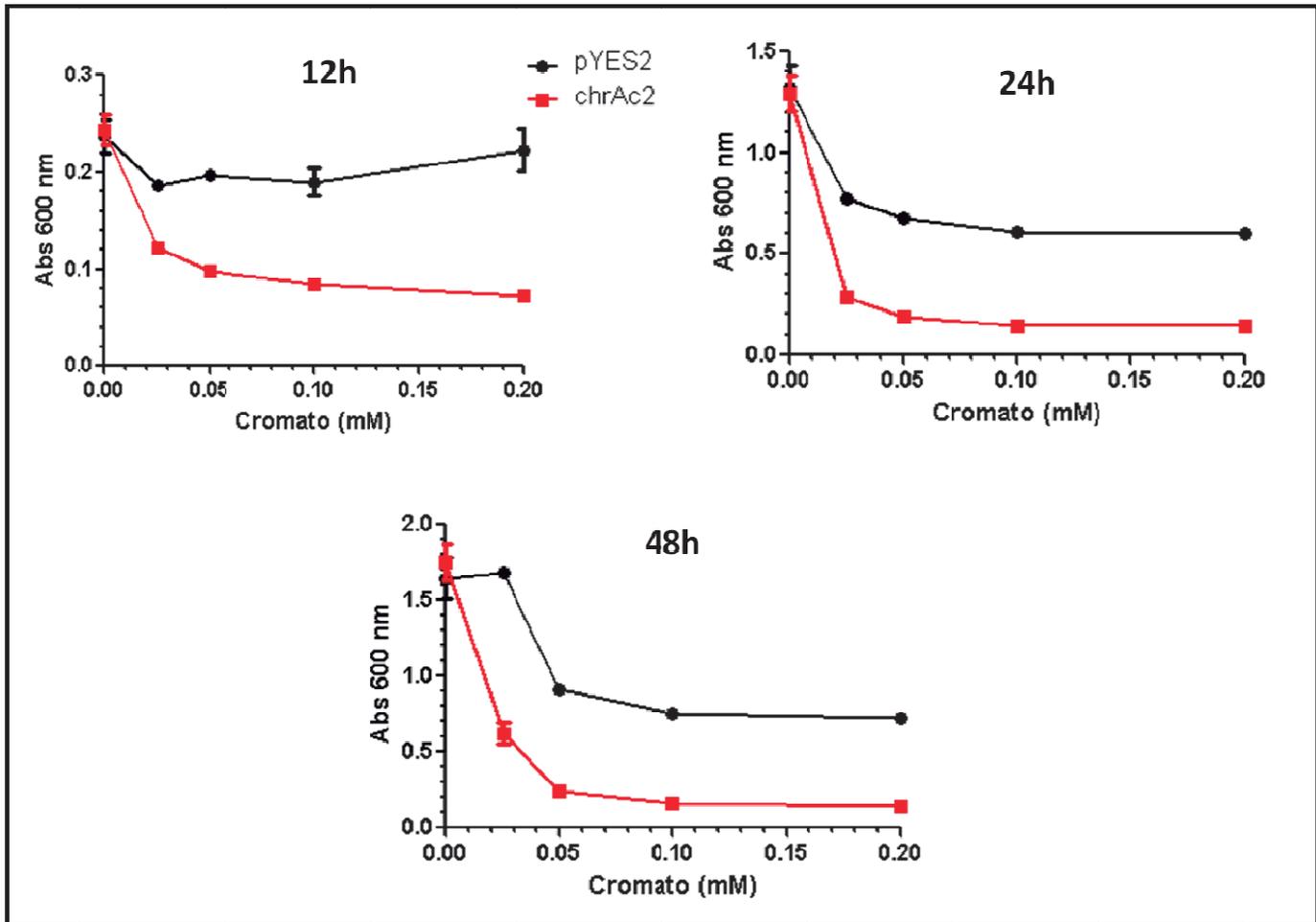


Figura 23. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *S. cerevisiae* en medio líquido. Los cultivos se crecieron en medio S.C.U. con galactosa 2 % y rafinosa 2 %, durante los tiempos señalados, con las concentraciones de cromato que se indican. Posteriormente se midió la absorbencia a 600 nm. pYES, cepa de *S. cerevisiae* con el vector pYES2 vacío; chrAc2 cepa de *S. cerevisiae* con *chrA* proveniente de cDNA. Se muestran barras de error estándar de la media, n=4 (duplicado).

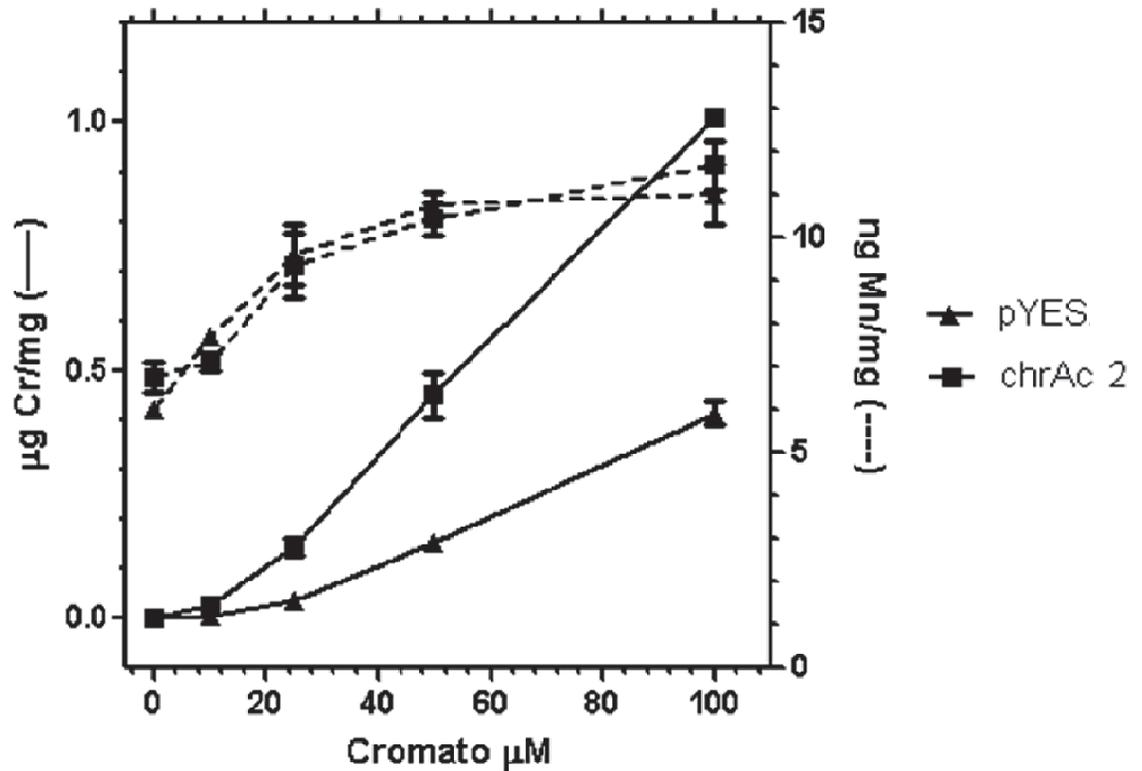


Figura 24. Acumulación de cromo total en transformantes de *S. cerevisiae*.

Los cultivos de las transformantes de *S. cerevisiae* pYES y chrAc2 se crecieron en medio S.C.U. con galactosa 2 % y rafinosa 2 %, durante 24 h con las concentraciones de cromato que se indican. Posteriormente se dio el tratamiento correspondiente a las muestras para la determinación del cromo total y manganeso por ICP-MS como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran barras de error estándar de la media, n=2 (triplicado).

sulfato sólo tuvo un ligero crecimiento, debido a la ausencia de sulfato en el medio (que es un ión esencial); y el crecimiento se recuperó al agregar 0.25 mM de sulfato de magnesio, teniendo un patrón de crecimiento similar en las otras concentraciones de sulfato (**Figura 26**). Bajo la condición con cromato 0.01 y 0.025 mM, la cepa pYES, como era de esperar, sin sulfato y en presencia del cromato mostró una disminución en su crecimiento, pero al agregar el sulfato se revirtió dicho efecto, recuperando el crecimiento casi por completo, mostrando claramente el efecto protector del sulfato sobre la toxicidad del cromato (**Figura 26**). En el caso de la transformante *chrAc2*, encontramos que sin cromato y sin sulfato tuvo un ligero crecimiento pero éste se recuperó al agregar 0.25 mM de sulfato, teniendo un comportamiento similar al de la cepa control pYES. Al agregar cromato al medio sin sulfato, *chrAc2* mostró inhibición de crecimiento, similar a lo que ocurrió en la cepa pYES (**Figura 26**). Sin embargo, lo más interesante fue que al agregar sulfato a la transformante *chrAc2*, el efecto tóxico del cromato se siguió manifestando y la cepa creció aproximadamente dos veces menos que su control sin cromato, aún agregando un exceso de 200 veces más de sulfato (**Figura 26**). Estos resultados sugieren que *ChrA* de *N. crassa* en *S. cerevisiae* transporta al interior de las células de manera específica al cromato y no a su análogo sulfato.

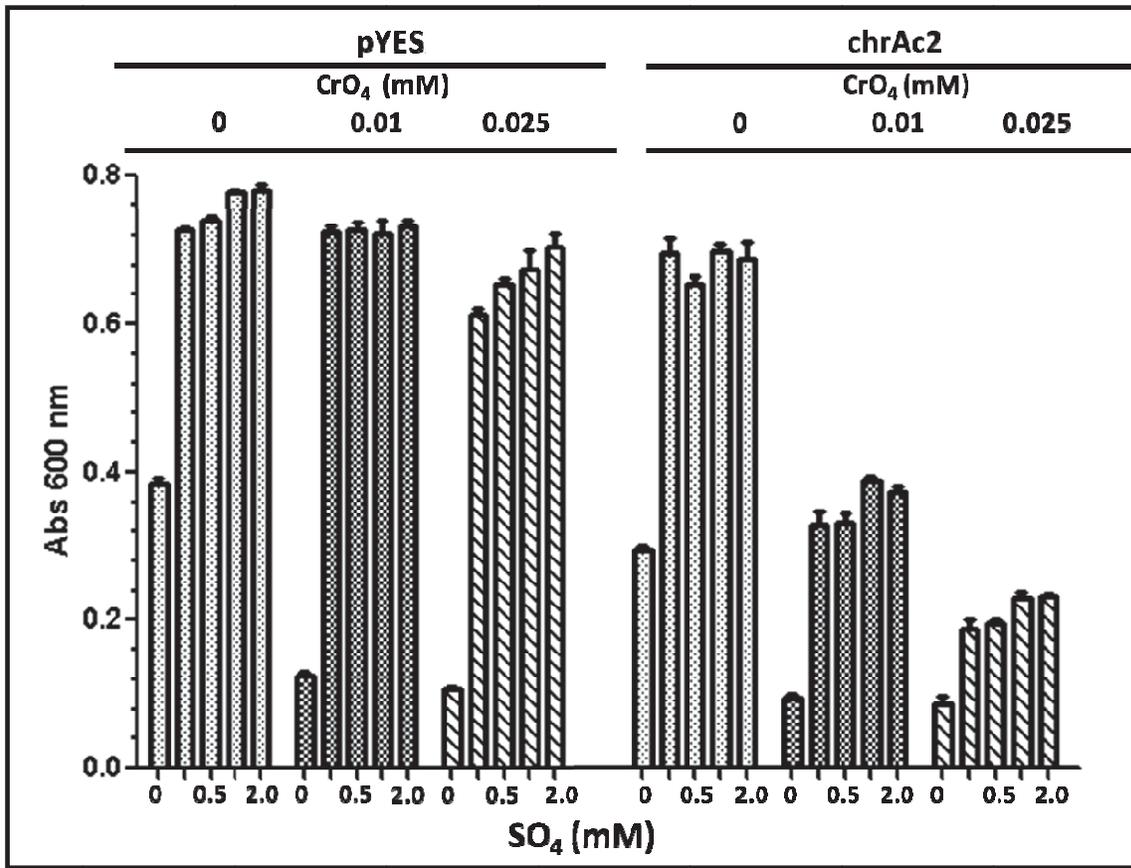


Figura 25. Efecto del sulfato en las transformantes *chrA* de *S. cerevisiae*. Los cultivos de las cepas control con el vector pYES y con la cepa chrAc2 que contiene *chrA* de cDNA se crecieron en medio mínimo modificado, por 24 h/28 °C/175 rpm, con concentraciones de sulfato de magnesio y de cromato de potasio indicadas. Se midió la absorbencia a 600 nm. Se muestran barras de error estándar de la media. n=1 (triplicado).

IX. DISCUSIÓN

En hongos, los mecanismos de resistencia a metales pesados ha sido un tema muy importante por su utilidad en biorremediación, pero sin embargo particularmente los sistemas de resistencia al cromato han sido poco estudiados en estos organismos eucarióticos. Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia al ión cromato. De los mecanismos más estudiados se encuentran las proteínas transportadoras de membrana, las cuales directamente promueven la expulsión de los iones cromato del citoplasma de las células, utilizando el potencial de membrana como fuente de energía (Alvarez, et al., 1999; Pimentel et al., 2002). En 1990, Cervantes y colaboradores describieron a la proteína ChrA como un factor de resistencia a cromato en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta proteína está codificada en el plásmido pUM505 y su expresión promueve la expulsión de cromato de forma específica. La proteína ChrA de *P. aeruginosa* se incluyó en la familia de transportadores CHR, reportada por Nies et al., (1998) quienes describieron un pequeño grupo de proteínas de origen procariota involucradas en el transporte de cromato. Más recientemente, Díaz-Pérez et al., (2007) actualizaron este análisis, identificando 135 secuencias de proteínas ChrA no redundantes agrupadas en una superfamilia denominada CHR, donde ahora se incluía a organismos como arqueas, bacterias y eucariotes. La superfamilia CHR está compuesta por dos familias: la SCHR de cadena corta o monodominio y la LCHR de cadena larga o bidominio. A su vez, la familia LCHR se subdividió en siete subfamilias: seis de origen bacteriano (LCHR1 a LCHR6) y una de origen fúngico (LCHRF) donde se incluían cinco secuencias pertenecientes

a los ascomicetos *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Gibberella zeae*, *Aspergillus nidulans* y el basidiomiceto *Ustilago maydis*. En este estudio se confirmó la ausencia de una secuencia homóloga a ChrA en levaduras (*S. cerevisiae*, *S. pombe* y *C. albicans*) como había sido descrito previamente por Nies et al., (1998). En todos los casos las secuencias homólogas estaban anotadas como proteínas hipotéticas y no existía reporte de su caracterización. En el 2006 Kiranmayi y Mohan describieron el transportoma de iones metálicos en el hongo filamentoso *N. crassa*, donde se incluía a la proteína ChrA homóloga a ChrA de *P. aeruginosa* como el transportador de cromato en este sistema.

Con el fin de establecer la presencia de nuevos homólogos CHR en eucariotes e identificar algún reporte sobre la funcionalidad de alguno de ellos, se buscaron secuencias de proteínas no redundantes en la base de datos del NCBI, utilizando como secuencia base de la búsqueda la proteína ChrA de *N. crassa* (No. Acceso CAD21291). Los resultados mostraron 38 nuevas secuencias con homología, 31 de las cuales pertenecían a sistemas fúngicos, (**Tabla 1**). Este nuevo grupo de homólogos CHR concuerda con los nuevos genomas liberados producto de proyectos de secuenciación. El análisis muestra que el *phylum* predominante de hongos fue el Ascomycota. Esto puede ser debido a que varios de sus miembros son de importancia biotecnológica (*Aspergillus sp.*) o agrícola al ser clasificados como fitopatógenos (*G. zeae*, *M. grisea*). El análisis de las secuencias para determinar su relación evolutiva y/o origen, mostró que las CHR de hongos coincidían en un solo clado (**Figura 9**), ratificando con ello su estrecha relación y apoyando con ello la existencia de un CHR ancestral, como había sido

originalmente propuesto (Díaz-Pérez, 2006) basado en su amplia distribución en los tres dominios de la vida.

Con la secuencia de la proteína ChrA de *N. crassa* deducida, se llevó a cabo un análisis predictivo para determinar las características de ésta. El análisis de la topología de la proteína, a través del sistema Toppred, mostró la presencia de 11 segmentos transmembranales (**Figura 10**). Esta proteína, como había sido descrita anteriormente, tiene las características de número de aminoácidos (≈ 400 a.a), número de segmentos transmembranales (arreglo 4 + 6) y dominios conservados particulares de los miembros de la familia de transportadores de cromato descritos por Nies et al., (1998).

Utilizando la secuencia liberada de *chrA* de *N. crassa*, se diseñó una estrategia basada en la amplificación por PCR para la clonación del gen *chrA* correspondiente y poder así abordar su caracterización. A partir de DNA total extraído del micelio de *N. crassa* se amplificó un fragmento de 1.745 kb, correspondiente a lo reportado en la literatura para el gen *chrA* de *N. crassa* (**Figura 11 B**). El fragmento se secuenció. El análisis por alineamiento utilizando como secuencia molde a *chrA* de la base de datos del NCDB, identificó dos intrones localizados a +43 nt y +350 nt río abajo del codón de inicio (**Figura 12**). La secuencia originalmente reportada en el año 2008 del gen *chrA* de *N. crassa* codificaba una proteína de 584 a.a. Sin embargo, una nueva revisión de la secuencia depositada genera ahora una proteína de 507 a.a. Este resultado coincide con la secuencia que se reporta en el presente trabajo.

Se realizó un análisis de su región 5' a fin de evidenciar la presencia de posibles elementos de regulación (**Figura 13**). El gen cuenta con los posibles elementos para llevar a cabo su expresión, esto es, una caja CATT, una caja GC y un codón de inicio ATG. Adicionalmente se encontró una región consenso de unión al regulador transcripcional Stbp5p (CGGN). Las cajas CAAT y GC del promotor *chrA* tiene varias características que de acuerdo al texto Klug y Cummings (1999) deben estar presentes. Se localizan a una distancia del codón de inicio siendo para la caja CATT de -70 a -80 nt y de -110 nt para la caja GC. La identidad de las secuencias de las cajas también es una característica particular, la caja CATT (CAATCT) y la caja CG (GGGCGG) que para *chrA* comparten un 50 % de identidad. La presencia de la secuencia regulatoria Stbp5p está asociada a una respuesta a estrés a xenobióticos y a través de la RNA polimerasa II a estrés oxidativo (<http://www.yeasttract.com>). Este resultado se correlaciona con el hecho de que el cromato está asociado a la generación de estrés oxidativo en el interior de célula, por el proceso de reducción del Cr (VI) (Shi y Dalal, 1990).

Identificada la presencia del gen *chrA* de *N. crassa* de 74-A y localizados de manera informática algunos elementos asociados a su regulación así como su función (**Figura 13**) se procedió a estudiar la expresión de éste. Basado en la metodología de RT-PCR se diseñó una estrategia para amplificar una región interna de 522 pb del transcrito de *chrA*. El RNA total de *N. crassa* 74-A fue extraído de micelio crecido en caldo papa dextrosa (PDB) adicionado o no de 0.1 mM de cromato a diferentes tiempos de cultivo y ensayado para determinar la presencia de *chrA*. El medio y la concentración de cromato fueron seleccionados

basados en su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de *N. crassa*, esto es, inhibición de al menos un 10 % del crecimiento (**Figura 14**). Se observó que a partir de las 24 h de cultivo, la expresión de *chrA* fue mayor comparada con la condición control (sin cromato) donde se observó una expresión basal (**Figura 16 A**). La expresión dependiente de la presencia del cromato alcanzó un máximo a las 36 h. Este resultado al mostrar que *chrA* de *N. crassa* era inducido por cromato apoya la hipótesis de su participación en la resistencia de cromato. En bacterias, la expresión del gen *chrA* es considerada una respuesta adaptativa, esto es, una respuesta apropiada del organismo a una demanda del ambiente, la cual genera cambios en el organismo (Karp, 1996). La regulación genética en organismos eucarióticos es compleja que en procariotes involucrando tres distintos niveles: transcripcional, procesamiento y de traducción (Karp, 1996). En el caso particular de *chrA* en *N. crassa* se demuestra que existe una regulación a nivel transcripcional, ya que la expresión basal de este gen se incrementa por efecto del cromato o probablemente del estrés oxidativo que genera este ión. Este caso es parecido al descrito para las proteínas denominadas metalotioninas (péptidos que participan en la detoxificación de algunos metales), ya que su síntesis se incrementa luego de la presencia de metales como zinc, cadmio o cromato en el medio (Butt y Jecker 1987; Karp 1996; Solis-Heredia et al., 1999). El análisis de expresión del gen *chrA* mostró que su transcrito está presente durante las etapas iniciales de crecimiento del hongo – emisión del tubo germinativo- (**Figura 16, carril 36 h**).

Al haber identificado que ChrA de *N. crassa* tiene la posibilidad de estar involucrada en algún proceso en donde el cromato estaba implicado y del antecedente de ser considerada una proteína hipotética transportadora de cromato, se investigó la posible función utilizando la expresión heteróloga en *S. cerevisiae*. El uso de este organismo fue por tener ciertas ventajas: es un organismo eucariotico modelo, con metodologías estandarizadas para su manipulación por técnicas de genética molecular, su genoma esta secuenciado y de libre acceso, y el no contener ningún homólogo *chrA* (Nies et al., 1998). Un antecedente importante es que autores como Haro et al., (1999), Benito et al., (2000) y Kiranmayi et al., (2009) expresaron transportadores de membrana de *N. crassa* en *Saccharomyces*, razón por el cual esta metodología se usó para tratar de determinar la posible función de ChrA.

Dentro de la metodología, existía la posibilidad de utilizar *chrA* genómico (con intrones), pero la decisión de no utilizarlo para determinar la función se debió a que Flores-Alvarez (2008) investigó la función con el uso de *chrA* genómico, en donde había demostrado inicialmente que sí confería resistencia a cromato en las transformantes de *S. cerevisiae*. Sin embargo, al reproducir los resultados, no fue posible explicar el fenotipo obtenido de estas transformantes. En ese trabajo se propuso que el problema del gen con intrones en *S. cerevisiae* se podría deber a que el procesamiento de los intrones no funcionaba en la levadura. En un inicio se iba a tomar la posibilidad de utilizar *chrA* genómico ya que por ejemplo Jinzhu et al., (2005) habían expresado el gen con intrones de una quitinasa de *Trichoderma aureviridea* en *S. cerevisiae* y observaron la función del gen sin ningún problema.

Sin embargo, existen reportes en donde se descarta el uso de genes con intrones ya que no podían observar su funcionalidad proponiendo el uso cDNAs provenientes de genes. Por ejemplo, Li y Ljuangdahl (1995) expresaron una xilanasa de *Aureobasidium pullulans*; Yévenes y Cardemil (2000) expresaron una fosfoenol piruvato carboxicinasa de *Trypanosoma brucei*; Lee et al., (2004) expresaron una fitasa de *E. coli*; Rezaee et al., (2005) expresaron una enterotoxina de *E. coli*; Jia, et al., (2006) expresaron una glutatión transferasa de *Arabidopsis thaliana*; Wang, et al., (2006) expresaron una delta-6 desaturasa de *Thamnidium elegans*; Li et al., (2006) expresaron una dextranasa; Liu (2007) expresaron una proteasa de *Trichoderma*, todos ellos en *S. cerevisiae* como organismo heterólogo.

Con estos antecedentes el diseño de la metodología la cual se basó en amplificar el cDNA *chrA* de *N. crassa*. Para ello se amplificó este, generando un producto de 1,550 kb (**Figura 17**) utilizando los oligonucleótidos Nc_DBIL y Nc_RXIJ (**Figura 6**), mostrando la diferencia de tamaño entre ambas *chrA*'s cDNA y genómico este ultimo de 1,745 kb (**Figura 17**). Se liberó el cDNA *chrA* de la construcción pChrAc2 mediante enzimas de restricción (*Bam*HI/*Xba*I) para subclonarlo en el vector binario pYES2 generando el plásmido recombinante pSCNC2 (**Figura 19**). El uso de este vector se debe a que antecedentes como Li y Ljuangdahl (1995), Yévenes y Cardemil (2000), Lee et al., (2004), Rezae et al., (2005), Liu y Yang (2005), Jia, et al., (2006), Wang, et al., (2006), Li et al., (2006), Liu (2007) y Cirra et al., (2007), exitosamente utilizaron este vector para la expresión heteróloga en *S. cerevisiae*. El *chrA* del plásmido recombinante pSCNC2, se secuenció. Como

resultado se comprobó que se había amplificado el 100 % del cDNA *chrA* de 1,550 kb. Al realizar el alineamiento de esta secuencia con la del *Neurospora crassa* Data Base (NCDB) mostró que tenía una identidad del 100 % (**Figura 20**).

Identificadas algunas transformantes de *S. cerevisiae*, se caracterizó la expresión mediante RT-PCR en presencia de su inductor (por el promotor Gal1) galactosa. Las transformantes de *S. cerevisiae* *chrAc* seleccionadas en presencia del inductor mostraban un nivel de transcrito muy elevado en comparación con el transcrito en presencia del represor (glucosa) o de su contraparte el control con el plásmido vacío que no mostraron ninguna señal de transcrito (**Figura 22 A**). Se demostró por lo tanto la expresión en las transformantes, de la misma manera que Flores-Alvarez (2008) lo había demostrado, excepto que en este trabajo se utilizó para comprobar la expresión de las transformantes de *S. cerevisiae* el Northern blot.

Para establecer el fenotipo de las transformantes de *S. cerevisiae*, se diseñó una estrategia experimental la cual consistió en probar el efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento, tanto en medio sólido como en medio líquido, utilizando un medio mínimo (S.C.U sin uracilo) bajo condiciones inductoras (galactosa). El resultado en medio sólido fue que las transformantes *chrAc* eran sensibles al cromato con respecto al control pYES (**Figura 23**), al mostrar una inhibición en el crecimiento en las diluciones utilizadas 1:50, 1:100 y 1:200 en las cajas con 0.1mM de cromato, siendo más clara la inhibición en las cajas de 0.15mM (**Figura 23**). Con esto se demostró que *chrA* de *N. crassa* 74-A generó sensibilidad a cromato, resultado contrario a lo que se esperaba de que confiriera resistencia al oxianión,

por los antecedentes que se tienen de que la proteína ChrA en bacterias está involucrada en la resistencia a cromato (Cervantes, et al., 1990, Nies., et al., 1990, Aguilar-Barajas et al., 2008, León-Márquez, 2008, Branco et al., 2008, Díaz-Magaña et al., 2009). Este fenómeno que se encontró en un inicio se pensó que era un evento aislado, se probaron varias transformantes para determinar si el dato era real. Esto debido a que como Li y Ljungdahl (1996) que habían utilizado el vector pYES2 para expresar un gen para una xilanasa de *Aureobasidium pullulans*, caracterizaron varias transformantes y encontraron que éstas tenían variaciones en la actividad de este producto. Para determinar si realmente el fenotipo era de sensibilidad, los experimentos de medio sólido se realizaron al menos con tres transformantes distintas y se observó que se tenía el mismo comportamiento en todas ellas. Debido a que el análisis de cajas es un método cualitativo, se corroboró el fenotipo utilizando una metodología similar pero en medio líquido que es un método más cuantitativo. Se observó que a la primera concentración de cromato (0.025mM) las transformantes chrAc mostraron una inhibición significativa de crecimiento, siendo más marcada conforme se aumentaron las concentraciones de cromato, siendo dos veces menor el crecimiento a las 12 h y hasta 6 veces menos a las 24 y 48 h, respecto al control pYES (**Figura 24**). Se corroboraba así lo encontrado en medio sólido y se demostró que ChrA de *N. crassa* en *S. cerevisiae* confiere hiper-sensibilidad al cromato. Este hallazgo indicó que podría estar involucrado un fenómeno de transporte. Existen al menos dos antecedentes acerca de ChrA's que no confieren resistencia a cromato: *chrA* copia genómica de *P. aeruginosa* PAO1 y *chrA* de *Synechococcus elongatus* PCC4972 (Aguilar-Barajas, 2010).

Este resultado, sugirió la idea de que la proteína ChrA en *S. cerevisiae* tenía una función totalmente inversa, lo que generó la hipótesis que este transportador tenía una función de ingresar el cromato (razón por la cual el crecimiento de las transformantes disminuye al estar en presencia del cromato) en vez de expulsarlo (donde veríamos, sí fuese el caso, resistencia al ión). Existen varias explicaciones a esta observación: para los hongos filamentosos, específicamente *N. crassa*, existen reportes en donde lo consideran buen acumulador de cromo mediante un sistema de adsorción (Verglio y Beolchini, 1996) utilizando la pared celular ó en el interior de la célula del hongo (bioacumulación) (Ramana y Sastry, 1994, Tunaly et al., 2004), donde el hongo ingresaba el cromato, por el transportador de sulfato (Marzluf, 1970) pero no por un transportador adicional a éste. Cabe recalcar que en hongos levaduriformes (géneros *Candida*, *Saccharomyces*) como filamentosos (género *Aspergillus*), la bioacumulación de metales pesados (Zn, Cd, Cr, Mn, etc.) es un mecanismo común (Verglio y Beolchini, 1996; Dar y Shakooli., 1999), por lo que no era de sorprender que las transformantes de *S. cerevisiae* con el gen *chrA* tuviese fenotipo de sensibilidad a cromato. Adicionalmente, se puede hacer alusión a lo reportado por Díaz-Pérez et al., (2007) de que: todos los miembros CHR por su diversidad en las subfamilias puede ser que tengan roles diferentes y/o adicionales a la expulsión a cromato. Esto se había observado para las ChrA's de bacterias, por lo que la hipótesis de Díaz-Pérez et al., (2007) puede ser apoyada por lo observado con ChrA de *N. crassa*.

Por el resultado de hipersensibilidad a cromato y los antecedentes de que varios géneros de hongos tienen mecanismos de bioacumulación de metales se generó

la hipótesis de que probablemente ChrA de *N. crassa* 74-A transportara cromato al interior de la célula en *S. cerevisiae*. Para determinar si las transformantes acumulaban cromato al interior de la célula, como inicialmente se pensaba por el fenotipo de sensibilidad, se determinó la acumulación de cromo en la biomasa de las transformantes con y sin el cDNA *chrA*, utilizando la metodología de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Los resultados mostraron que la transformante chrAc al aumentar la concentración de cromato lo acumuló en mayor proporción con respecto al control llegando a acumular 2.5 veces más cromo total en la biomasa en la concentración de cromato de 0.1mM (**Figura 25**). Con esto se comprobó que ChrA favorece la entrada de cromo a la célula. Debido al uso de células completas de levadura, había la posibilidad de que una parte del cromato quedara atrapado en la pared celular, teniendo el antecedente de Paš et al., (2004) que observaron que en células completas ó esferoplastos de *Candida* sp. que la acumulación de cromo (VI) era similar al usar los dos tipos de células, concluyendo que el ingreso a la célula del cromato no se ve afectado por la presencia de la pared celular. Consideramos que la interferencia que podía generar la pared celular de *S. cerevisiae* es mínima y que por lo tanto ChrA tiene una función de transportar cromato al interior de la célula de *S. cerevisiae*.

Finalmente, se consideró la posibilidad de que la proteína ChrA de *N. crassa* 74-A en *S. cerevisiae* pudiera, bajo cierta condición, dejar de ejercer efecto de hipersensibilidad a cromato en la levadura, por ejemplo, por un hipotético efecto de competencia con sulfato. El fundamento de este experimento consiste en que

el sulfato, agregado en exceso, por su similitud estructural tetraédrica con el cromato, al agregar un exceso de sulfato en el medio, éste desplazaría a este ión revirtiendo su efecto tóxico (fenómeno que se observa en el transportador de sulfato específicamente). Se observó que las transformantes pYES crecida en un medio mínimo sin sulfato en presencia de galactosa, al adicionar diferentes concentraciones de sulfato y de cromato, mostró que cuando no hay o existe muy poco sulfato en el medio, el cromato ejerce a un efecto tóxico, que en este caso se vio a manera de inhibición del crecimiento; sin embargo, al adicionar una concentración mínima de sulfato 0.25 mM, el crecimiento con y sin cromato eran muy similares ya que se recuperaba casi al 100 % el crecimiento aun en presencia del ión tóxico (**Figura 26**). Lo más interesante de este experimento fue que la cepa transformante chrAc2 cultivada bajo las mismas condiciones que la cepa control pYES, mostro que en presencia de cromato y de sulfato, esta no recuperaba su crecimiento, aun agregando la concentración más alta de sulfato de 2 mM (**Figura 26**). Esto sugiere que ChrA de *N. crassa* en *S. cerevisiae* reconoce de manera específica al cromato y no a su análogo sulfato. Este resultado encamina a reforzar la idea de que las proteínas CHR son transportadores de cromato. Con los antecedentes de ChrA de *P. aeruginosa* y de *Shewanella* sp. (Aguilar-Barajas, 2010), en los cuales se ha demostrado que no transportan sulfato, y los resultados obtenidos en este trabajo, se va descartando la hipótesis de que estos transportadores pudieran tener otra función aparte de la de transportar cromato, como lo habían propuesto Díaz-Pérez et al., (2007). Pero, particularmente la ChrA de *N. crassa* abría la posibilidad de que bajo alguna condición (estadio de desarrollo del hongo, condición del medio, estrés) pudiera tener alguna función

adicional debido a la evidencia del ligero aumento de la expresión que se observó en los controles en ciertos estadios del desarrollo del hongo.

Cualquier sistema ya sea de resistencia o de transporte de metabolitos, involucra varias proteínas que trabajan en conjunto, por lo que no son sistemas que trabajan de manera aislada (Nies, 2003). Al extrapolar esta información a lo que ocurría en *S. cerevisiae* existía la posibilidad de que tal vez en la levadura careciera de uno o varios elementos para manifestar una posible resistencia, caso contrario al que esperaríamos que operara para que se generara la resistencia en el organismo huésped (*N. crassa*).

Otro factor que se tomó en cuenta para explicar el fenómeno de que *chrA* de *N. crassa* en *S. cerevisiae* generaba sensibilidad a cromato, fue que las proteínas de membrana no tienen una topología única (Rapp et al., 2006). Estas proteínas, al igual que muchas otras son dinámicas (no tienen una forma única dentro de la membrana), por lo tanto existen varias teorías y algunas de ellas demostradas que algunas proteínas de membrana pueden tener una topología dual (estar en orientaciones opuestas) (Bowie, 2006, Rapp et al., 2006). Para el caso de ChrA de *N. crassa*, podría suceder que este transportador de cromato ¿podrá funcionar en sentido inverso?, por lo tanto en vez de ingresar el cromato lo expulse y podría ser que el hongo tuviera dos mecanismos en donde esta proteína bajo ciertas condiciones opte por ingresar al cromato al interior de la célula y que bajo otras lo expulse.

Todos estos resultados en conjunto, contestaron muchas preguntas tales como si *chrA* se expresaba en *N. crassa* en presencia de cromato, así como, la función de *chrA* en un organismo heterólogo (*S. cerevisiae*) y a su vez abrieron otras, ¿generara resistencia a cromato una mutante *chrA* en *N. crassa*?, ¿ChrA transporta únicamente cromato? y ¿bajo qué condición expulsa ó favorece la acumulación de cromato en *N. crassa*?. Al final esto generó una propuesta de un modelo hipotético de lo que podría ocurrir en *N. crassa*; el cromato en el medio, al estar en contacto con el hongo, una parte de este se queda atrapado de manera muy eficiente en la pared celular (Veglio y Beolchini, 1997). Por otra parte, el cromato en el hongo utiliza el transportador de sulfato para entrar a las células (Dreyfuss, 1964; Marzluf 1970; Arslan et al., 1987; Cervantes et al., 2001) ó, como la propuesta del resultado de esta investigación que pudiera entrar por la acción de la proteína ChrA, bajo ciertas condiciones y ya en el interior el cromato podría ser atrapado por el sistema de vacuolas (Ghrarieb y Gadd, 1997) o que se reduzca a cromo trivalente, el cual podría ser atrapado por vacuolas (Ghrarieb y Gadd, 1997) ó inmovilizado por enzimas como las metalotinininas (Butt y Jecker, 1987; Solis-Heredia et al., 1999; Krepkiy et al., 2003). Este fenómeno de ingresar los compuestos tóxicos para procesarlo en una forma menos tóxica o bioacumularlos no es poco común. Se ha observado en varios organismos por ejemplo, el arseniato As (V) que ingresa por el transportador de fosfato (Chang et al., 1989; Huang y Lee, 1996) en algunas bacterias y después es reducido a arsenito As(III) y es expulsado por un transportador específico para arsenito (Gladysheva et al., 1994). Otro ejemplo es el mercurio, algunas bacterias lo transportan al interior de la célula por un transportador específico de mercurio (Wilson et al., 2000), para

que éste sea reducido de manera enzimática de mercurio divalente Hg (II) a mercurio elemental Hg (0), este último se elimina por difusión pasiva por la pared (Hobman y Brown, 1997). De cierto modo por lo tanto, el transporte de compuestos tóxicos no es como se podría considerar un suicidio, sino que más bien la célula bajo ciertas ocasiones ingresa el compuesto debido a que probablemente tenga en su interior sistemas altamente eficientes para contrarrestar el efecto del agente tóxico. Finalmente con esto, la propuesta ahora de manera general hacia las proteínas ChrA es que su función en varios miembros de la superfamilia CHR tanto procariones como eucariotes apunta a que todos son transportadores de cromato.

El haber identificado que *N. crassa* tiene un transportador de cromato el cual presumiblemente favorece la acumulación de cromo circundante del medio en su biomasa y con la tendencia de utilizar organismos para la biorremediación, ya sea por adsorción (pared celular) o absorción (biomasa), *N. crassa* puede ser considerado como un muy buen candidato para una aplicación biotecnológica.

Hasta ahora es solo el comienzo de entender estos mecanismos altamente conservados en los tres dominios de la vida, pero conforme el conocimiento y la tecnología avance nos ayudara a comprender un poco más estos sistemas tan interesantes y que tal vez podamos aprender a utilizarlos para bien de la humanidad.

X. CONCLUSIONES

- En este trabajo se demostró que la expresión del gen *chrA* de *Neurospora crassa* es inducible por cromato.
- La proteína ChrA de *Neurospora crassa* 74-A funciona como un transportador que favorece la acumulación de cromato de manera independiente de sulfato en *Saccharomyces cerevisiae*.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo Aguilar, F.J., Espino Saldaña, A.E., León Rodríguez, I.L., Ávila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M. y Gutiérrez Corona, J.F. (2006). "Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated waste". *Can. J. Microbiol.* 52: 809-815.
- Aguilar-Barajas, E. (2010). "Análisis funcional de homólogos bacterianos de la superfamilia CHR". Tesis de Doctorado. I.I.Q.B. U.M.S.N.H.
- Aguilar-Barajas, E., Paluscio, E., Cervantes, C. y Rensing, C. (2008). "Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol. Lett.* 285(1): 97-100.
- Alcedo, J. A. y Wetterhahn, K. E. (1990). "Chromium toxicity and carcinogenesis." *Int. Rev. Exp. Pathol.* 31: 85-108.
- 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(23): 7398-7400.
- Arslan, P., Beltrame, M. y Tomasi, A. (1987). "Intracellular chromium reduction." *Biochim. Biophys. Acta.* 931(1): 10-15.
- ATSDR. (2000). *ToxFAQs™ for Chromium*. Undate. Atlanta, GA; USA. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Baldi, F., Vaughan, A. M. y Olson, G.J. (1990). "Chromium(VI)-resistant yeast isolated from a sewage treatment plant receiving tannery wastes." *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4): 913-918.

- Beadle, G. W. y Tatum, E. L. (1941). "Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 27(11): 499-506.
- Benito, B., Garcíadeblas, B. y Rodríguez-Navarro, A. (2000). "Molecular cloning of the calcium and sodium ATPases in *Neurospora crassa*." Mol. Microbiol. 35(5): 1079-1088.
- Bowie, J. U. (2006). "Flip-flopping membrane proteins." Nat. Struct. Mol. Biol. 13(2): 94-96.
- Branco, R., Chung, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P. y Zhitkovich, A. (2008). "The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide." J. Bacteriol. 190(21): 6996-7003.
- Butt, T. R. y Jecker, D. (1987). "Yeast Metallothioneins and applications in Biotechnology." Microb. Rev. 51: 351-364.
- 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(1): 287-291.
- Cervantes, C. y Silver, S. (1992). "Plasmid chromate resistance and chromate reduction." Plasmid. 27(1): 65-71.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Talavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno-Sánchez, R. (2001). "Interactions of chromium with microorganisms and plants." FEMS Microbiol. Rev 25(3): 335-347.

- Cervantes C. y Campos-García, J. (2007). "Reduction and efflux of chromate by bacteria." En: Nies DH, Silver S (eds) Molecular Microbiology of Heavy Metals. Springer – Verlag, Berlin. Pag. 407-420.
- Chang, E. C., Kosman, D. J. y Willsky, G. R. (1989). "Arsenic oxide-induced thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." J. Bacteriol. 171: 6349-6352.
- Cheng, T. H., Li, Y. C. y Gartenberg, M. R. (1998). "Persistence of an alternate chromatin structure at silenced loci in the absence of silencers." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95(10): 5521-5526.
- Cira, L. A., González, G. A., Torres, J. C., Pelayo, C., Gutiérrez, M. y Ramírez, J. (2008). "Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must." Springer – Anton Van Lee. 93(3): 259-266.
- Coreño-Alonso A., Acevedo-Aguilar F. J., Wrobel-Zasada K., Wrobel-Kaczmarczyk, K., Reyna-López G.E. y Gutiérrez-Corona, J. F. "Estudio para la identificación del sistema de reducción de Cr(VI) de la cepa ED8 de *Aspergillus niger*, var. *tubingensis*." VII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. Guanajuato, Gto. Del 5 al 8 de noviembre del 2007.

- Dar, N. y. Shakoory, A. R. (1999). "Chromium tolerant yeast strains isolated from industrial effluents and their possible use in environmental clean-up." Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63(6): 744-750.
- Das, S. K. y Guha, A. K. (2007). "Biosorption of chromium by *Termitomyces clypeatus*." Elsevier-Coll Surf B: Biointerfaces. 60(1): 46-54.
- Davis, R. H (2000). *Neurospora: contributions of a model organism*. Oxford Univ. Press, New York.
- Davis, R. H. y Perkins, D. D. (2002). "Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes." Nat. Rev. Genet. 3(5): 397-403.
- Díaz-Magaña, A., Aguilar-Barajas, E., Moreno-Sánchez, R., Ramírez-Díaz, M.I., Riveros-Rosas, H., Vargas, E. y Cervantes C. (2009). "Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. 191(17): 5441-5445.
- Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Campos-García, J., Julián-Sánchez, A. y Riveros-Rosas, H. (2007). "Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily." Febs. J. 274(23): 6215-6227.
- Díaz-Pérez, C. (2006) "Filogenia y evaluación de aminoácidos conservados en la función de la proteína transportadora de cromato ChrA". Tesis de Maestría en Biología Experimental. I.I.Q.B.-U.M.S.N.H.
- Dreyfuss, J. (1964). "Characterization of a sulfate- and thiosulfate-transporting system in *Salmonella typhimurium*." J. Biol. Chem. 239: 2292-2297.

- Flores-Alvarez, L. J. (2008). Análisis funcional del gen *chrNC* de *Neurospora crassa* en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. Fac. Q.F.B. U.M.S.N.H.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum C. y Birren B. (2003). "The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*." *Nature* 422(6934): 859-868.

- Galli, A., Boccardo, P., Del Carratore, R., Cundari, E. y Bronzetti G. (1985). "Conditions that influence the genetic activity of potassium dichromate and chromium chloride in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mutat Res.* 144(3): 165-169.
- Gharieb, M. M. y Gadd G. M. (1998). "Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite." *Biometals.* 11(2): 101-106.
- Gladysheva, T. B., Oden, K. L. y Rosen, B. P. (1994). "Properties of the arsenate reductase of plasmid R773." *Biochemistry.* 33(23): 7288-7293.
- Haro, R., Sainz, L., Rubio, F. y Rodríguez-Navarro, A. (1999). "Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Microbiol.* 31(2): 511-520.
- Henderson, G. (1989). "A comparison of the effects of chromate, molybdate and cadmium oxide on respiration in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biometals.* 2(2): 83-88.
- Hobman, J. L., Wilson, J. R. y Brown, N. L. (2000). "Bacterial Mercury-Resistance Genes. Metal ions in Biological Systems." *Enviro. Metal-Microbe Interactions.* (Lovely, D. R.,ed.), A.S.M. Press, Washington, 177–197.
- Huang, R. N. y Lee, T. C. (1996). "Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium" *Toxicol. App. Pharmacol.* 136: 243-249.

- Jia, X. D., Chen, X. W., Chen, D. F. y Chen, J. (2006). "Expression of glutathione S-transferase zeta class genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yi Chuan*. (5):551-556.
- Jiménez-Mejía R., Campos-García J. y Cervantes, C. (2006). Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.* 262 (2):178–184.
- Jinzhu, S., Qian, Y., Beidong, L. y Dianfu, C. (2005). "Expression of the chitinase gene from *Trichoderma aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(1): 39-43.
- Karp, G. (1998). "Biología Celular y Molecular". Mc. Graw-Hill-Interamericana. México. Pag: 488-579.
- Kharab, P. y Singh, I. (1985). "Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast." *Mutat Res* 155(3): 117-120.
- Kiranmayi, P. y Mohan, P. M. (2006). "Metal transportome of *Neurospora crassa*." *In Silico Biol.* 6(3): 169-180.
- Kiranmayi, P., Tiwari, A., Sagar, K. P., Haritha, A. y Maruthi Mohan, P. (2009). "Functional characterization of *tzn1* and *tzn2-zinc* transporter genes in *Neurospora crassa*." *Biometals* 22(3): 411-420.
- Klug, W. S. y Cummings, M. R. (1999). *Conceptos de Genética*, 5ª Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. Pag: 549-597.

- Krepkij, D., Antholine, W. E. y Petering, D. H. (2003). "Properties of the reaction of chromate with metallothionein." *Chem. Res. Toxicol.* 16(6): 750-756.
- Lee, S., Kim, T., Stahl, C. H. y Lei, X. G. (2005). "Expression of *Escherichia coli* AppA2 phytase in four yeast systems." *Biotechnol Lett.* 27(5): 327-334.
- León-Márquez, Y.L. (2009). "Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR." Tesis de Maestría en Biología Experimental. I.I.Q.B. U.M.S.N.H.
- Levinskaite, L. (2002). "Response of soil fungi to chromium (VI)". *Ekologija.* 1:10-13.
- Li, X., Millson, S. H., Coker, R. D. y Evans, I. H. (2006). "Cloning and expression of *Penicillium minioluteum* dextranase in *Saccharomyces cerevisiae* and its exploitation as a reporter in the detection of mycotoxins." *Biotechnol. Lett.* 28(23): 1955-1964.
- Li, X. L. y L. Ljungdahl, G. (1996). "Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and secretion of the xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*." *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1): 209-13.
- Liu, P.G. y Yang, Q. (2005). "Cloning and expression in yeasts of the class V chitinase cDNA gene from *Trichoderma harzianum*." *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 45(2):253-257.
- Marzluf, G. A. (1970). "Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate resistant and sulfate transport-negative mutants." *J. Bacteriol.* 102(3):716-721.

- McGrath, S. P. y Smith, S. (1990). "Chromium and nickel". Heavy Metals in Soils. A. B. J. Glasgow, Blackie. Pag: 125-150.
- Mertz, W. (1969). "Chromium occurrence and function in biological systems." *Physiol. Rev.* 49(2): 163-239.
- Miranda, A. T. (2003). "Genes de resistencia a cromato en el cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa*". Tesis de Maestría. I.I.Q.B. U.M.S.N.H.
- Muter, O., Patmalnieks A. y Rapoport, A. (2001). "Interrelations of the yeast *Candida utilis* and Cr(VI): Metal reduction and its distribution in the cell and medium." *Process. Biochem.* 36(10):963–970.
- Nieboer, E. y Richardson, D. H. S. (1980). "The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions." *Environ. Pollut. (Ser. B)* 1: 3-26.
- 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(10): 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(21): 5799-5802.
- Nies, D. H. (2003). "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes." *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3): 313-339.
- Osiewacz, H. D. (2002). "Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi". *Ageing. Res. Rev.* 1(3): 425-442.

- Paš, M., Milacic, R., Drašlar, K., Pollak, N. y Raspor, P. (2004). "Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell". *Biometals*. 17(1):25-33.
- Pardee, A. B., Prestidge, L. S., Whipple, M. B. y Dreyfuss, J. (1966). "A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*." *J. Biol. Chem.* 241(17): 3962-3969.
- Pepi, M. y Baldi, F. (1992). "Modulation of chromium(VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes." *Biometals*. 5(3): 179-185.
- Perkins, D. D., Radford, A. y Sachs, M. S. (2002). *The Neurospora Compendium: Chromosomal Loci*. Academic, San Diego, California.
- Pimentel, B. E., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (2002). "Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein." *FEMS Microbiol. Lett.* 212(2): 249-254.
- Ramana, V. V. y Sastry, K. S. (1994). "Chromium toxicity in *Neurospora crassa*." *J. Inorg. Biochem.* 56(2): 87-95.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García J. y Cervantes, C. (2008). "Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds." *Biometals*. 21(3): 321-332.
- Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R. y Gutiérrez-Corona, J. F. (2004). "Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry." *Springer – Anton Van Lee*. 85(1): 63-68.

- Rapp, M., Granseth, E., Seppala, S. y von Heijne, G. (2006). "Identification and evolution of dual-topology membrane proteins." *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(2): 112-116.
- Rezaee, M. A., Rezaee, A., Moazzeni, S. M., Salmanian, A. H., Yasuda, Y., Tochikubo, K., Pirayeh, S. N. y Arzanlou, M. (2005). "Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Microbiol* 43(4): 354-60.
- Shear, C. L. y Dodge, B. O. (1927). "Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group". *J Agric.* 34: 1019-1042.
- Shi, X. G. y Dalal, N. S. (1990). "On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species." *Arch. Biochem. Biophys.* 277(2): 342-350.
- Sims, I. R. y Reynolds, P. J. (1999). "Effects of atmospheric pollution on a *Lichenophagous lepidopteran*." *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42(1): 30-34.
- Solis-Heredia, M. J., Quintanilla-Vega. B., Hernández, J. M., Brambila, E., Cebrián, M. E. y Albores, A. (1999). "Chromium increases pancreatic metallothionein in the rat." *Toxicology.* 142(2): 111-117.
- Sumner, E.R., Shanmuganathan, A., Sideri, T.C., Willetts, S.A., Houghton, E.J. y Avery, S. (2005). "Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast". *Microbiol.* 151: 1939–1948.
- Tunali S., Kiran, I. y Akar, T. (2005). "Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass". *Miner. Eng.* 18(7):681-689.

- Veglio, F. y Beolchini, F. (1997). "Removal of metals by biosorption: a review." *Hydrometallurgy*. 44(3): 301-316.
- Venier, P., Montaldi, A., Majone, F., Bianchi, V. y Levis, A. G. (1982). "Cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of industrial chromium compounds." *Carcinogenesis*. 3(11): 1331-1338.
- Wang, D. P., Li, M. C., Wei, D. S., Zhang, Y. H. y Xing, L. J. (2006). "Cloning and expression of delta6-desaturase gene from *Thamnidium elegans* in *Saccharomyces cerevisiae*." *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 46(1):74-79.
- Wilson, J. R., Leang, C., Morby, A. P., Hobman, J. L. y Brown, N. L. (2000). "MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters?." *FEBS Lett*. 472, 78-82.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene*. 33:103-119.
- Yévenes, A. y Cardemil, E. (2000). "Expression of the *Trypanosoma brucei* phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochimie*. 82(2):123-127.