



**UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“ESTUDIO DEL ARREGLO ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS
SCHR DE *Bacillus subtilis* 168”**

Tesis

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad en:

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

QFB. RENE MARTÍNEZ VALENCIA

Asesor:

Dr. CARLOS CERVANTES VEGA

Co-asesora

Dra. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ

Morelia Mich.. Febrero de 2011.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL DC. CARLOS CERVANTES VEGA Y LA DC. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ.

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UMSNH Y DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

DEDICATORIA:

A MIS PADRES

LUIS MARTÍNEZ GONZÁLEZ

MARÍA GUADALUPE VALENCIA RÍOS

POR EL CARIÑO Y EL APOYO INCONDICIONAL E INTERMINABLE QUE ME BRINDAN SIN ESCATIMAR ESFUERZOS PARA QUE YO CUMPLA TODAS MIS METAS.

CON CARIÑO, ADMIRACIÓN Y AGRADECIMIENTO PARA MIS HERMANOS: LUIS MANUEL, IRMA, JORJE, HERIBERTO, ISMAEL, ERNESTO, MARIO, JAIME Y EFRAÍN, QUIENES ESTUVIERON APOYÁNDOME SIEMPRE QUE LOS NECESITÉ.

A TODA MI FAMILIA POR ESTAR CONMIGO EN LOS MOMENTOS MÁS IMPORTANTES DE MI VIDA.

A PAULINA, PORQUE ADEMÁS DE SER MI PAREJA Y BRINDARME SU CARIÑO, SE HA CONVERTIDO EN UNA AMIGA QUE ME ESCUCHA, ME APOYA Y CON QUIEN COMPARTO MOMENTOS MARAVILLOSOS DE MI VIDA.

A LA FAMILIA JERÓNIMO RODRÍGUEZ POR DARMER LA CONFIANZA Y ABRIRME LAS PUERTAS DE SU CASA Y A QUIENES AGRADEZCO EL APOYO QUE ME BRINDAN DÍA CON DÍA.

A REBECA Y ALEJANDRO POR BRINDARME SU AMISTAD Y SU POYO EN TODO MOMENTO.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: AMADA, ESTHER, GUSTAVO, KARINA, LUIS JOSÉ, LUPITA, MAURINO, MILAGROS, PAULINA, SELENE, YOHANA, MARTHA PATRICIA, CESAR, ALMA Y RAFA.

A MIS COMPAÑEROS DE GENERACIÓN EN QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA: ALFREDO ALEMÁN, ALFREDO CARRILLO, JOAQUÍN, YOLANDA VALENCIA, YOLANDA BRAVO, PAULA, ANGÉLICA, BLANCA, LULÚ, EDGAR Y ÓSCAR.

AGRADECIMIENTOS:

A MIS ASESORES:

DC. CARLOS CERVANTES VEGA Y DC. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ POR LA CONFIANZA Y EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA MC. ERENDIRA VARGAS DE QUIEN RECIBÍ APOYO Y AMISTAD DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LUPITA POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN PARTE DEL TRABAJO REALIZADO PARA ESTA TESIS.

A MIS SINODALES:

DC. JESÚS CAMPOS GARCÍA, DC. HOMERO REYES DE LA CRUZ Y AL DC. VÍCTOR MEZA CARMEN POR SU PARTICIPACIÓN EN LA REVISIÓN DE ESTA TESIS.

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL:

A LA DC. MARÍA ESTHER AGUILAR BARAJAS POR HABER FORMADO PARTE IMPORTANTE DE ESTE PROYECTO, AL APOYARME DEDICADAMENTE EN LA REALIZACIÓN DE IMPORTANTES EXPERIMENTOS PARA ESTE PROYECTO.

RESUMEN

La superfamilia de transportadores de cromato (CHR) se divide en dos familias de acuerdo a su tamaño: proteínas de cadena larga o bidominio (LCHR) y proteínas de cadena corta o monodominio (SCHR), esta última dividida a su vez en tres subfamilias (SCHR1-SCHR3). Los genes *chr3N* y *chr3C* de *Bacillus subtilis* 168 codifican proteínas homólogas de la subfamilia SCHR3, las cuales se ha propuesto que forman heterodímeros antiparalelos para conferir resistencia a cromato. Hasta la fecha no existen reportes acerca del arreglo estructural de proteínas homólogas pertenecientes a la subfamilia SCHR. El objetivo de este trabajo fue determinar la topología membranal de la pareja de proteínas Chr3N y Chr3C mediante el uso de fusiones traduccionales en regiones hidrofílicas de las proteínas Chr3N y Chr3C con los genes reporteros *phoA* y *LacZ*. Se construyeron trece fusiones traduccionales en el vector pUCP_{phoA} y siete fusiones en el vector pUCPlacZ. A las fusiones se les midió la actividad enzimática en *Escherichia coli* CC118. Los resultados de actividad en la proteína Chr3N permitieron establecer un modelo topológico de cinco segmentos transmembranales (STM) conectados por dos asas periplásmicas y dos asas citoplásmicas, con su extremo amino terminal en el periplasma y su extremo carboxilo terminal en el citoplasma. Por su parte, en la proteína Chr3C se determinó una topología de cinco STM conectados por dos asas periplásmicas y dos asas citoplásmicas, con el extremo amino terminal localizado en el citoplasma y el extremo carboxilo terminal en el periplasma. Estos resultados indican un arreglo antiparalelo de los STM de Chr3N y Chr3C. Una topología de membrana antiparalela sugiere que las mitades amino y carboxilo del transportador llevan a cabo una función diferente. El estudio topológico representa un avance en el entendimiento de la estructura de las proteínas pertenecientes a la subfamilia SCHR3 y puede aportar información para conocer la localización más precisa de residuos o regiones que son esenciales para el transporte de cromato llevado a cabo por las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis*.

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades del cromosoma.....	1
2. Resistencia bacteriana a cromosoma.....	1
a) Resistencia cromosómica.....	3
b) Resistencia plasmídica.....	3
3. La superfamilia CHR.....	4
4. Análisis filogenético de proteínas SCHR.....	4
5. Proteínas homólogas a ChrA.....	6
6. Proteínas de membrana.....	9
7. Estudio de la topología de proteínas de membrana.....	11
II. ANTECEDENTES	15
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
a) Objetivo general.....	23
b) Objetivos específicos.....	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
A) MATERIALES	24
1. Medios de cultivo.....	24
2. Cepas.....	24
3. Plásmidos.....	25
B) MÉTODOS	25
1. Aislamiento de plásmidos.....	25
2. Electroforesis en geles de agarosa.....	25
3. Aislamiento de DNA de geles de agarosa.....	29
4. Tratamientos enzimáticos de moléculas de DNA.....	29
a) Restricción con endonucleasas.....	29
b) Ligación.....	30

5. Amplificación por PCR de los genes <i>chr3N</i> y <i>chr3C</i>	30
6. Transformación de <i>E. coli</i>	31
a) Preparación de células competentes.....	31
b) Transformación de células competentes.....	31
7. Determinación de la secuencia de nucleótidos.....	32
8. Obtención de extractos celulares.....	32
9. Obtención de fracciones membranales y solubilización de proteínas...	33
10. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	34
a) Preparación del gel.....	34
• Gel de separación.....	35
• Gel de condensación.....	35
b) Preparación y corrimiento de las muestras.....	35
c) Tinción del gel.....	35
11. Inmunodetección de las proteínas Chr3N y Chr3C.....	36
12. Diseño de oligonucleótidos para las fusiones traduccionales de las proteínas Chr3N y Chr3C.....	37
13. Amplificación por PCR de fragmentos de <i>chr3N</i> y <i>chr3C</i>	37
14. Clonación en pJET1.2/Blunt.....	42
15. Construcción de fusiones traduccionales.....	42
16. Transformación de las fusiones traduccionales en <i>E. coli</i> CC118.....	42
17. Ensayos enzimáticos.....	43
a) Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina.....	43
b) Determinación de la actividad de β -galactosidasa.....	44
VI. RESULTADOS	46
1. Construcción y caracterización de los plásmidos recombinantes pTrSN y pTrSC.....	46
2. Separación de las proteínas Chr3N y Chr3C en SDS-PAGE.....	51
3. Inmunodetección de las proteínas Chr3N y Chr3C.....	51
4. Amplificación de los fragmentos de <i>chr3N</i> y <i>chr3C</i> por PCR.....	53
5. Clonación de los productos de PCR.....	55

6. Construcción de fusiones traduccionales en los vectores de expresión pUCPphoA y pUCPlacZ.....	59
7. Cuantificación de la actividad enzimática de las fusiones traduccionales.....	59
a) Actividad PhoA/LacZ en las fusiones de la proteína Chr3N.....	62
b) Actividad PhoA/LacZ en las fusiones de la proteína Chr3C.....	64
8. Localización de las fusiones en el modelo topológico propuesto para las proteínas Chr3N y Chr3C.....	66
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia al ion cromato en bacterias.....	2
Figura 2. Distribución y longitud de secuencia de proteínas de la superfamilia CHR.....	5
Figura 3. Análisis filogenético de proteínas LCHR bidominio y de pares en tándem de proteínas SCHR.....	7
Figura 4. Esquema de proteínas integrales de membrana.....	10
Figura 5. Fusiones traduccionales con las proteínas reporteras fosfatasa alcalina (PhoA) y β -galactosidasa (LacZ).....	13
Figura 6. Topología de la proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
Figura 7. Topología antiparalela de las proteínas homólogas YdgE/YdgF de <i>E. coli</i>	18
Figura 8. Perfil hidropático de proteínas de la subfamilia SCHR3.....	20
Figura 9. Topología membranaral predicha para las proteínas Chr3N y Chr3C.....	21
Figura 10. Esquema del plásmido pTrcHis C.....	26
Figura 11. Mapa del vector pJET 1.2/blunt.....	27

Figura 12. Mapa de los vectores de expresión binarios pUCPphoA y pUCPlacZ.....	28
Figura 13. Sitios seleccionados para las fusiones traduccionales de Chr3N de <i>Bacillus subtilis</i> 168.....	38
Figura 14. Sitios seleccionados para las fusiones traduccionales de Chr3C de <i>Bacillus subtilis</i> 168.....	39
Figura 15. Caracterización del plásmido recombinante pTrSN.....	47
Figura 16. Caracterización del plásmido recombinante pTrSC.....	48
Figura 17. Secuencia de la región codificante del gen <i>chr3N</i>	49
Figura 18. Secuencia de la región codificante del gen <i>chr3C</i>	50
Figura 19. Separación de extractos celulares de la cepa XL10 GOLD con los plásmidos pTrSN y pTrSC.....	52
Figura 20. Western blot de extractos celulares de la cepa XL10 GOLD (pTrSN) y XL10 GOLD (pTrSC).....	54
Figura 21. Amplificación de fragmentos del gen <i>chr3N</i> por PCR.....	56
Figura 22. Amplificación de fragmentos de <i>chr3C</i> por PCR.....	57
Figura 23. Construcción y caracterización de los plásmidos pJ.....	58
Figura 24. Construcción de fusiones traduccionales en el vector de expresión pUCPphoA.....	60
Figura 25. Caracterización de fusiones traduccionales en los vectores pUCPphoA y pUCPlacZ.....	61
Figura 26. Actividad de las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa de las fusiones de Chr3N.....	63
Figura 27. Actividad de las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa de las fusiones de Chr3C.....	65
Figura 28. Modelo topológico de Chr3N.....	67
Figura 29. Modelo topológico de Chr3C.....	68
Figura 30. Topología antiparalela de las proteínas Chr3N y Chr3C de <i>B. subtilis</i> 168.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos del gen <i>chr3N</i> por PCR.....	40
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos del gen <i>chr3C</i> por PCR.....	41

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del cromo

El cromo (Cr) es un metal de transición ubicado en el grupo VI de la tabla periódica. Se encuentra en estados de oxidación que van desde -2 hasta +6, siendo las formas más comunes +2, +3 y +6 (McGrath y Smith, 1990). Los efectos tóxicos del Cr dependen de su estado de oxidación. En el exterior de la célula el Cr(III) es relativamente inócuo debido a la baja solubilidad de sus compuestos en medio acuoso (Pardee y col., 1966). Por otro lado, la toxicidad del Cr(VI) se relaciona con el proceso de reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) (**Fig. 1**), causando un daño importante al DNA, además del daño oxidativo generado a través de intermediarios reactivos (Voitkun y col., 1998).

2. Resistencia bacteriana a cromato

Una gran variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato han sido reportados, y los mecanismos de resistencia a este ion pueden ser codificados ya sea por plásmidos o por genes cromosómicos (Nies y col., 1998; Cervantes C. y Campos-García, 2007). Los sistemas de resistencia codificados dentro de cromosomas bacterianos generalmente están relacionados con reducción específica ó inespecífica del Cr(VI), reparación del daño al DNA y procesos asociados con la homeostasis del hierro o el azufre. Los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales directamente median la expulsión de iones de cromato del citoplasma de las células (**Fig. 1**).

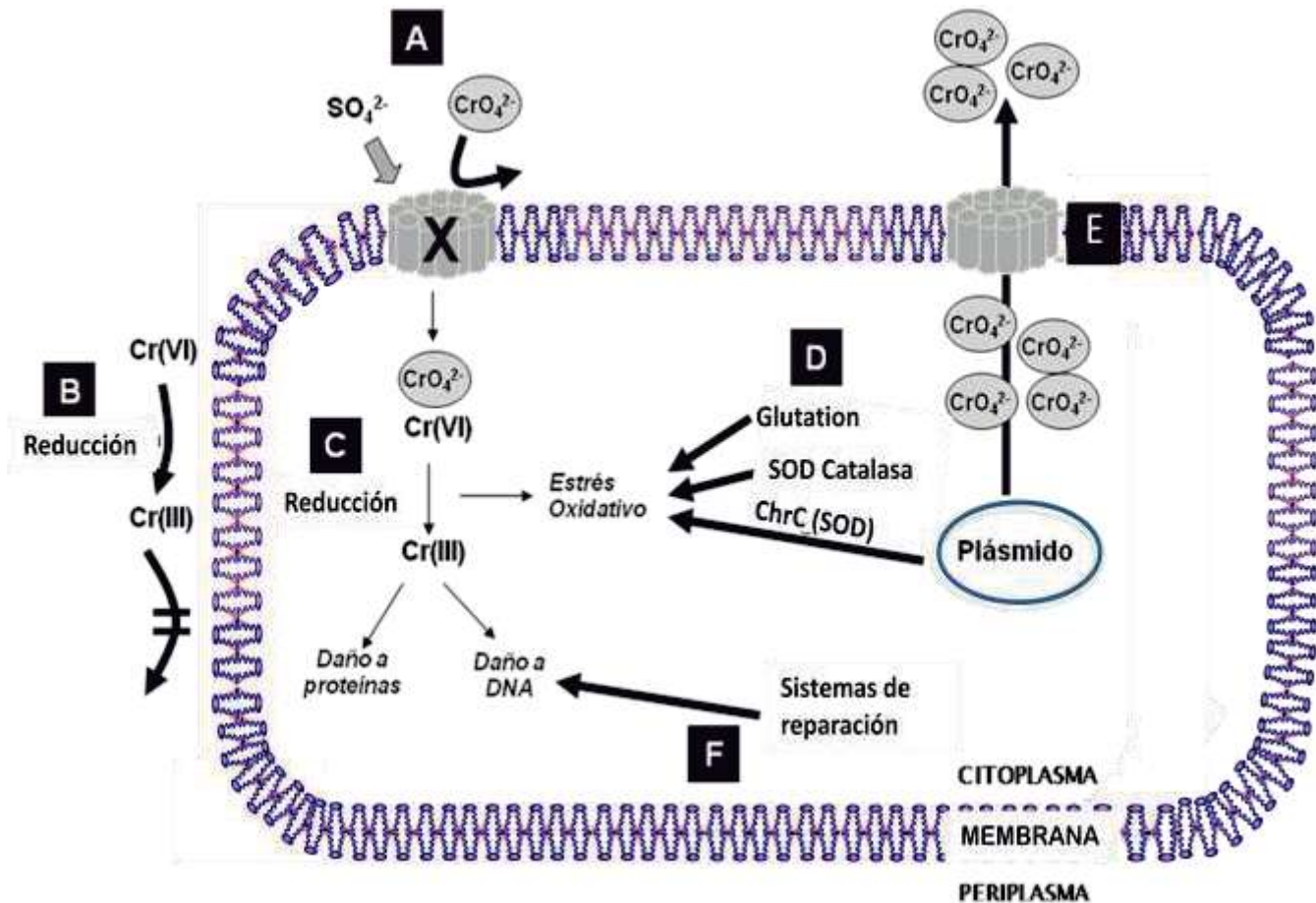


Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia al ion cromato en bacterias. Los mecanismos de daño y resistencia son indicados por flechas delgadas y gruesas, respectivamente. (A) transportador de sulfato codificado por el cromosoma el cual es también usado por el cromato para entrar a la célula; cuando éste es mutado (X) el transporte de cromato disminuye. (B) reducción extracelular de Cr(VI) a Cr(III) cuando no cruza la membrana. (C) la reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) puede generar estrés oxidativo, así como daño a proteínas y al DNA. (D) enzimas destoxicantes involucradas en la protección contra estrés oxidativo, minimizando los efectos tóxicos del cromato. (E) los transportadores codificados por plásmidos pueden expulsar el cromato del citoplasma. (F) los sistemas de reparación al DNA participan en la protección del daño generado por los derivados del cromo (Ramírez-Díaz y col., 2008).

a) Resistencia cromosómica

Algunas de las estrategias importantes que se han observado en bacterias resistentes a cromato comprenden: a) La modificación del sistema de captación de sulfato (Ohta y col., 1971) y b) la reducción del Cr(VI) a Cr(III) considerado como un mecanismo cromosómico alternativo (o secundario) el cual puede ocurrir en el citoplasma, en la membrana o en el espacio periplásmico (Campos-García y col., 1995). El proceso de reducción de Cr(VI) a Cr(III) es un mecanismo de protección para las bacterias con esta capacidad, debido a que evaden el poder oxidante del cromato y sus efectos tóxicos (Komori y col., 1990).

b) Resistencia plasmídica

Se han descrito plásmidos que confieren resistencia a cromato en diferentes cepas bacterianas (Cervantes-Vega y col., 1986). De las cepas bacterianas resistentes a cromato aisladas, los determinantes de resistencia codificados por los plásmidos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de *Alcaligenes eutrophus* (Nies y col., 1990) fueron los primeros caracterizados a nivel molecular. El determinante del plásmido pUM505 fue clonado y secuenciado y del análisis de la secuencia se detectó un gen que codifica una proteína hidrofóbica de 416 aminoácidos denominada ChrA (Cervantes y col., 1990). Esta proteína funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa el cromato del citoplasma utilizando la energía generada por el potencial de membrana (Álvarez y col., 1999).

3. La superfamilia CHR

Un total de 135 secuencias de proteínas no redundantes fueron identificadas como miembros de la superfamilia de transportadores del ion cromato CHR (Díaz-Pérez y col., 2007). De estas, 128 pertenecen a bacterias, una a arqueas y seis a hongos. Hasta el 2007 no se habían encontrado miembros de esta superfamilia en plantas o animales, sin embargo, se ha reportado el hallazgo de secuencias homólogas en el protozoario alveolata *Paramecium tetraurelia* (Aury y col., 2006) y en el alga verde *Ostreococcus lucimarinus* (Palenik y col., 2007). Esta amplia distribución filogenética (Arquea, Bacteria y Eukarya) sugiere un origen ancestral para la superfamilia CHR. Dos principales tamaños de proteínas CHR se han encontrado: Proteínas bacterianas monodominio con una longitud de secuencia de 123-234 aminoácidos, llamadas CHR de cadena corta (subfamilia SCHR); y proteínas bidominio de bacterias con una longitud de secuencia de 345-495 aminoácidos, llamadas CHR de cadena larga (subfamilia LCHR) (**Fig. 2**).

4. Análisis filogenético de proteínas SCHR

Los genes *chrA* que codifican proteínas monodominio se encuentran principalmente organizados como pares de genes en tándem en cada organismo. Ningún gen *chrA* no apareado fue encontrado hasta el análisis realizado por Díaz-Pérez y col. (2007); sin embargo, cuatro secuencias no apareadas se encontraron después de este análisis filogenético en diferentes organismos: Los genes *chrA* monodominio de las bacterias firmicutes *Desulfotomaculum reducens* MI-1, *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863 y *Carboxydothemus*

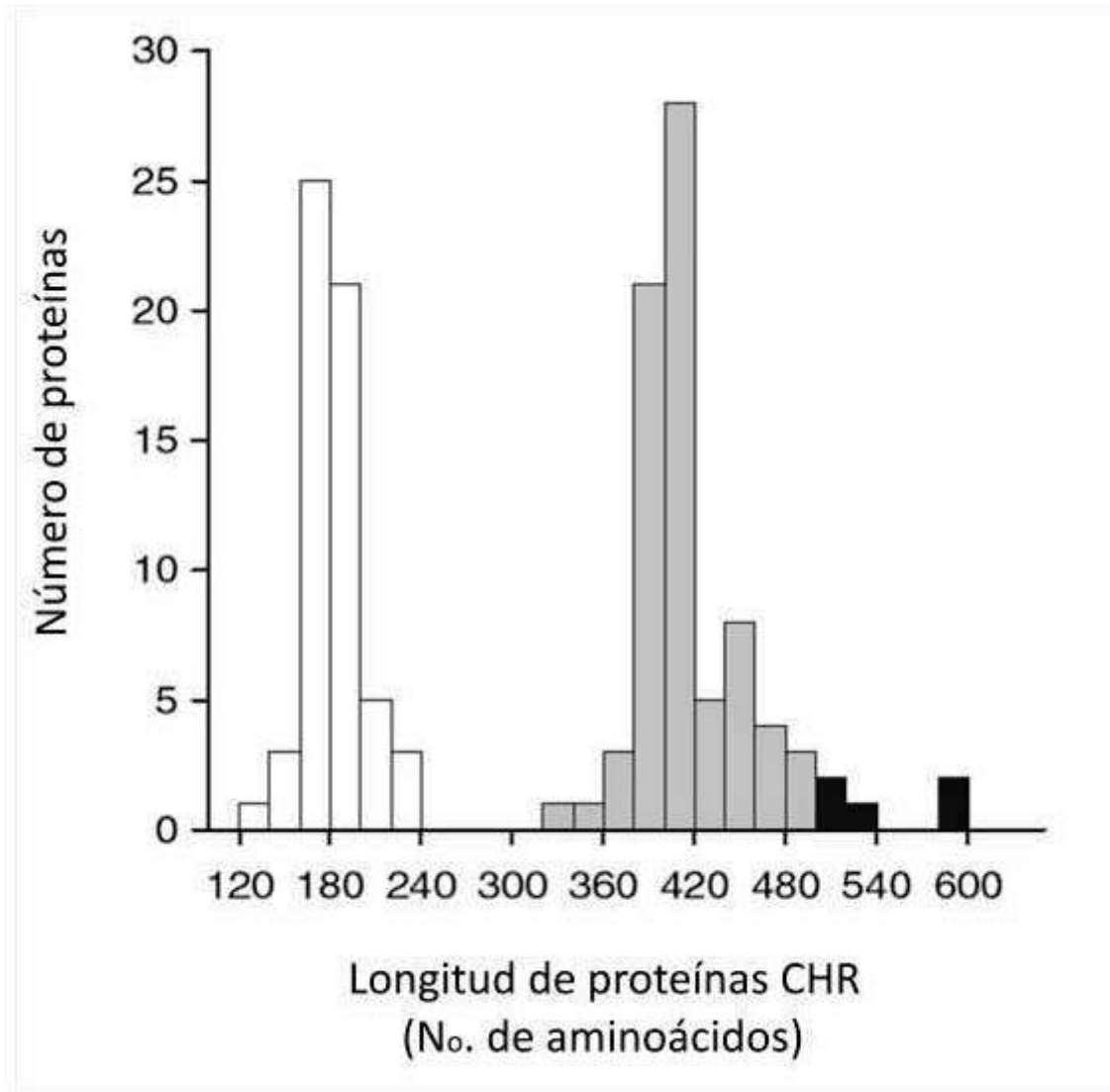


Figura 2. Distribución y longitud de secuencia de proteínas de la superfamilia CHR. El primer grupo (123-234 aminoácidos) en el histograma (barras blancas) corresponde a la longitud de proteínas monodominio de cadena corta (SCHR); el segundo grupo (columnas grises; 345-495 aminoácidos) corresponde a proteínas de cadena larga (LCHR bacterianas); un tercer grupo incluye proteínas de cadena larga bidominio (LCHR fúngicas) (barras negras; 502-584 aminoácidos). (Adaptada de Díaz-Pérez y col., 2007).

hydrogenoformans Z-2901 y la proteobacteria *Legionella pneumophila* str. *Lens* con números de acceso UniProt A4J468, Q67QP8, Q3AEF8 y Q5WZN7, respectivamente. Esta observación sugiere fuertemente que: a) la mayoría de las proteínas SCHR no son funcionales como monómeros; b) La subsecuente fusión de un par de genes monodominio *chrA* condujo a la formación de las proteínas LCHR bidominio. Para comprobar si existe relación entre proteínas CHR monodominio y bidominio, se realizó un alineamiento de proteínas LCHR y se identificó una región interdominio poco conservada. Cada proteína LCHR se dividió a la mitad para obtener dominios individuales los cuales se alinearon con las proteínas SCHR, y se realizó un análisis filogenético de este alineamiento usando diferentes métodos (**Fig. 3**). Las proteínas SCHR se agruparon en tres subfamilias (SCHR1, SCHR2 y SCHR3) y se separaron en dos ramas con los primeros y segundos genes de cada par (Díaz-Pérez y col., 2007). La separación de estas proteínas sugiere que cada miembro de proteína en un par no puede ser intercambiado y por lo tanto llevan a cabo una función diferente. Esta hipótesis es consistente con los datos experimentales que sugieren que las dos mitades de la proteína LCHR ChrA de *P. aeruginosa* llevan a cabo diferente papel en su función de transporte (Aguilera y col., 2004; Jiménez-Mejía y col., 2006).

5. Proteínas homólogas a ChrA

En los últimos años, ha sido posible identificar genes cuyos productos de expresión presentan similitud con la proteína ChrA del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 2001). Entre estas proteínas se encuentran ChrA de

Cupriavidus metallidurans (Nies y col., 1990) y de la cianobacteria *Synechocystis* sp. (Kaneko y col., 1996). Recientemente se encontró que el plásmido 1 de *Shewanella* sp. ANA-3 posee el gen *chrA* que codifica la proteína ChrA de 455 aminoácidos, la cual es un 29% y 28% idéntica a las proteínas ChrA de pMOL28 y pUM505, respectivamente (Aguilar-Barajas y col., 2008). La expresión del gen *chrA* en *Escherichia coli* confirió un alto nivel de resistencia a cromato tanto en el vector de alto número de copias pGEMT-Easy, como en el vector de bajo número de copias pACYC184. Para evaluar la función de la proteína ChrA de *Shewanella* sp. en *P. aeruginosa*, el gen *chrA* fue clonado en el vector binario pUCP20. El plásmido resultante pUCP20-ChrA confirió resistencia a cromato en *P. aeruginosa* PAO1, aunque en un menor nivel que en *E. coli* (Aguilar-Barajas y col., 2008). Otro reporte en el que se han encontrado genes homólogos a *chrA* incluye aquellos que codifican las proteínas Chr3N y Chr3C de *Bacillus subtilis* y Chr1N y Chr1C de *Burkholderia xenovorans* (Díaz-Magaña et al., 2009). Existen bacterias que poseen varios homólogos CHR en su genoma, un caso particular es el de la bacteria *Burkholderia vietnamiensis* G4 que posee cinco homólogos LCHR y dos SCHR, mientras que *B. xenovorans* LB400 posee cuatro homólogos LCHR y dos SCHR (León-Márquez, 2009). En estudios recientes se demostró que los genes *lchr1*, *lchr2*, *lchr5* y *lchr6* de la cepa *B. xenovorans* LB400 confieren resistencia cromato en *E. coli* (León-Márquez, 2009; Luna-Luna, 2010). Con estos homólogos suman ya cuatro las subfamilias bacterianas LCHR, dos SCHR en las que se han identificado miembros funcionales, distribuidos a lo largo del árbol filogenético de la superfamilia CHR. Por otra parte, se ha reportado la existencia de determinantes de resistencia a cromato *chrA* que codifican proteínas homólogas a

ChrA de pUM505 en el genoma de la bacteria Gram (+) *Arthrobacter* sp. FB24 (Henne y col., 2009), así como en el transposón TnOtChr de la α -proteobacteria *Ochrobactrum tritici* 5bvl1 (Branco y col., 2008). En el plásmido pANL de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* se localizó el gen denominado *srpC* que se expresa a bajas concentraciones de sulfato (Nicholson y Laudenbach, 1995). Este gen codifica una proteína membranal de 393 aminoácidos que presenta un 23% de similitud con ChrA de pUM505, y la cual mostró que es capaz de conferir resistencia a cromato cuando se clonó en un vector de bajo número de copias y se expresó en *E. coli* (Jerónimo-Rodríguez, 2010). En un trabajo reciente se reportó la existencia de un gen *chrA* en el cromosoma del ascomiceto *Neurospora crassa* el cual codifica una proteína funcional de 507 aa, que a diferencia del mecanismo habitual de resistencia a cromato encontrado en los homólogos ChrA estudiados, se ha sugerido que esta proteína transporta el cromato hacia el interior de la célula como un mecanismo de resistencia a este ion (Flores-Álvarez, 2010).

6. Proteínas de membrana

Las membranas biológicas son estructuras complejas constituidas principalmente por una bicapa lipídica y por numerosas proteínas asociadas a ella (Jiménez-Mejía y col., 2006). Las proteínas de membrana median y controlan las interacciones entre el interior y el exterior de las células y los organelos (Rapp y col., 2006). Las proteínas transmembranales son aquellas que pueden atravesar la bicapa lipídica una vez (unipaso) o varias veces (multipaso) (**Fig 4**). A estas se les conoce

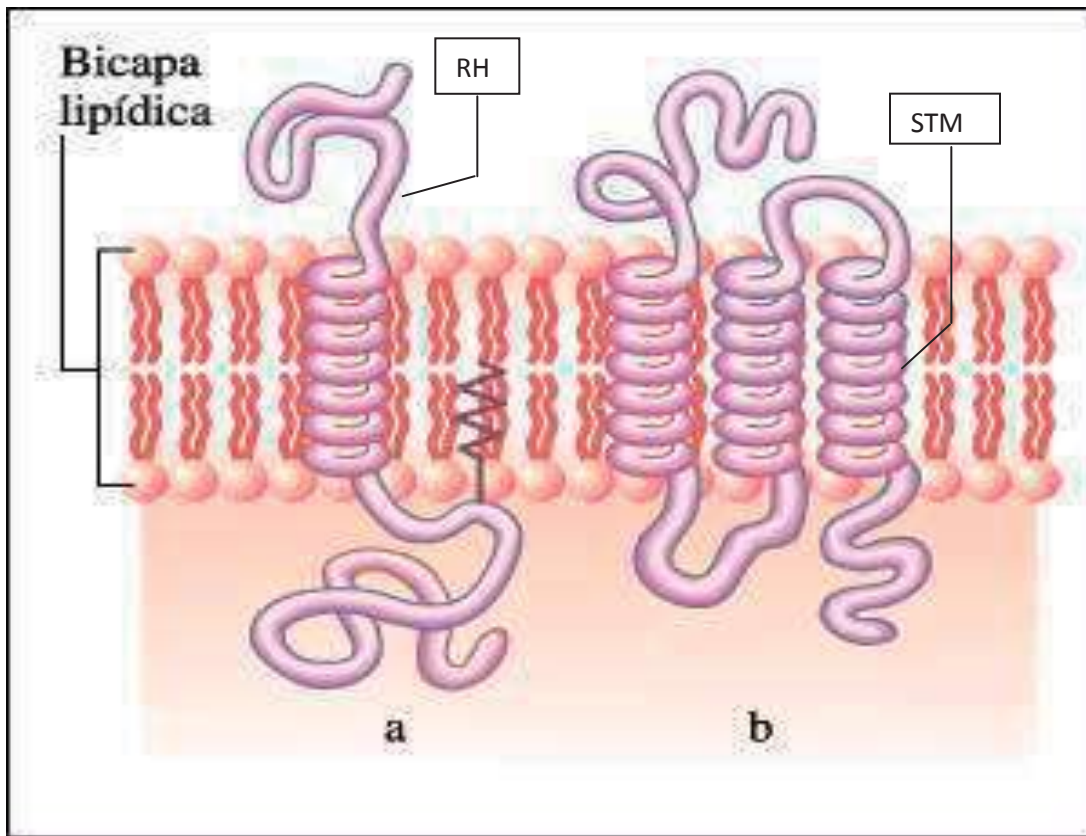


Figura 4. Esquema de proteínas integrales de membrana. a) Proteína que atraviesa una sola vez la membrana (unipaso), b) proteína que atraviesa varias veces la membrana (multipaso). RH; región hidrofílica; STM; segmento transmembranal.

también como proteínas integrales de membrana las cuales presentan regiones anfipáticas que les permiten insertarse en el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica. Estas proteínas se localizan en la membrana por medio de regiones específicas llamadas dominios o segmentos transmembranales (STM), que consisten de un segmento de 21 a 26 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos. A cada lado del dominio transmembranal comúnmente se encuentran regiones hidrofílicas que sobresalen hacia el citoplasma o hacia el periplasma (**Fig. 4**) (Alberts y col., 1996). A las regiones hidrofílicas que conectan los STM en una proteína de membrana se les denomina “asas”, las cuales pueden encontrarse en el citoplasma o en el periplasma (Van Geest y Lolkema, 2000).

7. Estudio de la topología de proteínas de membrana.

El papel de las proteínas de membrana depende en gran parte de sus interacciones con la fase lipídica, por lo que la determinación de su topología, es decir, el número y la orientación de sus STM, es esencial. La predicción de la topología de proteínas de membrana está basada en dos aspectos esenciales: a) las hélices- α transmembranales poseen un alto valor de hidrofobicidad y b) la distribución de cargas de las asas hidrofílicas que conectan los STM siguen la regla de “los positivos adentro”, la cual establece que las asas no translocadas o citoplásmicas son ricas en aminoácidos que poseen grupos R cargados positivamente, comparadas con las asas translocadas hacia el periplasma (Bowie, 2006). El análisis topológico comienza con la obtención de un perfil hidropático empleando herramientas informáticas (Mollers y col., 2001). Este perfil permite

identificar regiones o dominios hidrofóbicos que representan STM potenciales, así como las posibles asas hidrofílicas que los conectan. Las técnicas bioquímicas utilizadas para analizar la topología de las proteínas están basadas en la modificación de los genes estructurales que codifican para esas proteínas (Van Geest y Lolkema, 2000).

Una de las herramientas más ampliamente utilizadas se basa en el uso de fusiones traduccionales con proteínas reporteras. Este tipo de análisis se basa en que un gen que codifica una proteína reportera se fusiona con el gen que codifica la proteína de membrana en estudio, en sitios en los que se predice codifican asas hidrofílicas. La proteína generada por la fusión es el resultado de la transcripción y traducción de los genes, unidos de tal forma que conservan sus marcos de lectura “en fase”. Las propiedades de la proteína reportera (por ejemplo su actividad) indicarán la localización celular del sitio donde ocurrió la fusión (Van Geest y Lolkema, 2000) (**Fig. 5**). La proteína reportera más utilizada para estudios de fusiones génicas en bacterias es la enzima fosfatasa alcalina (PhoA), codificada por el gen *phoA* de *E. coli*. La forma activa de PhoA se localiza en el espacio periplásmico y se sintetiza como un precursor con una secuencia señal N-terminal que es eliminada durante su transporte a través de la membrana (Derman y Beckwith, 1991). El plegamiento correcto y el ensamble de PhoA ocurren después de su exportación al periplasma, por lo que sólo en este compartimiento la enzima es activa (**Fig. 5**). Las fusiones con la enzima β -galactosidasa (LacZ), también de *E. coli*, con frecuencia son usadas de manera complementaria a las fusiones con PhoA. A diferencia de PhoA, LacZ sólo tiene actividad en el citoplasma (**Fig. 5**),

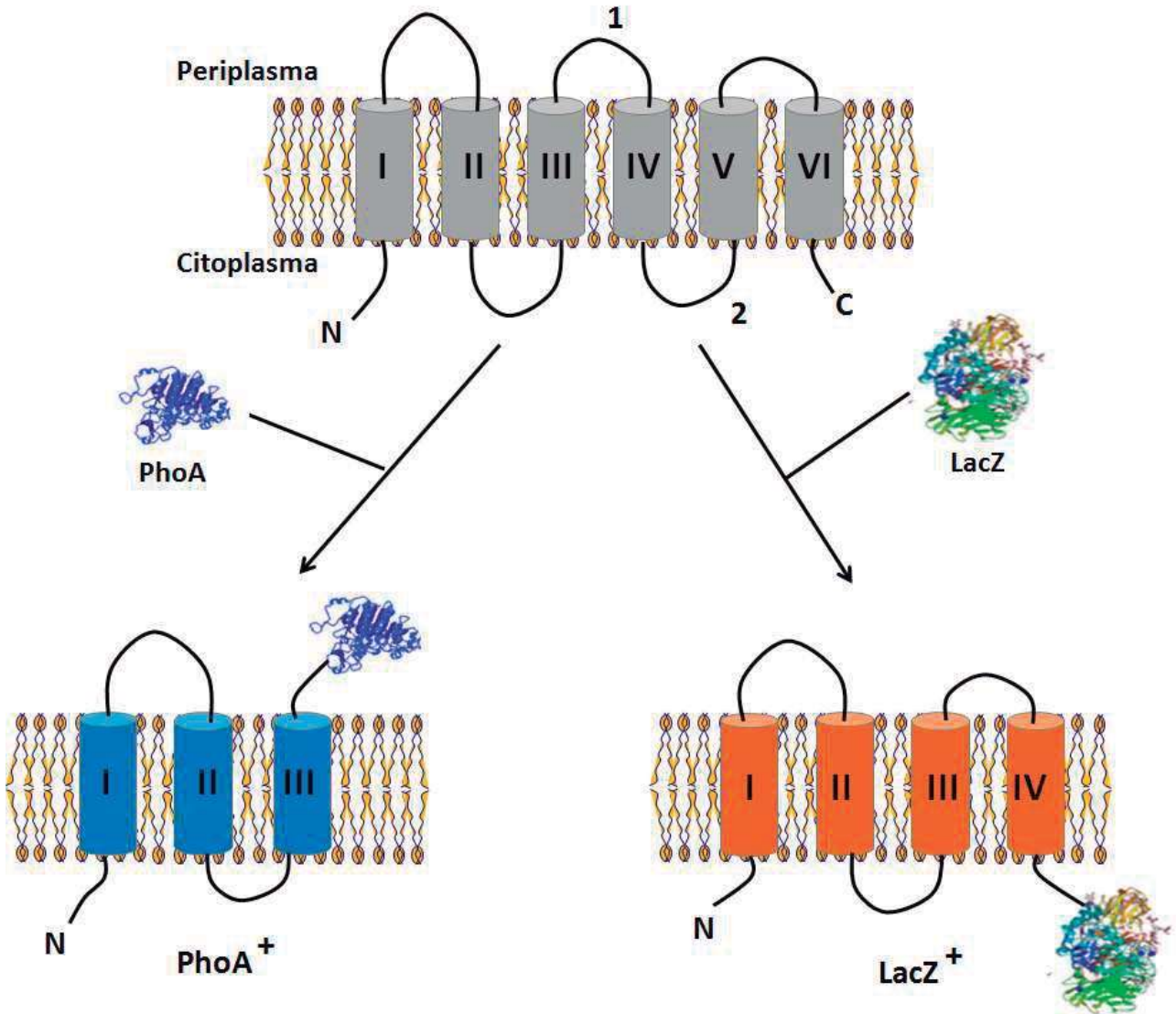


Figura 5. Fusiones traduccionales con las proteínas reporteras fosfatasa alcalina (PhoA) y β -galactosidasa (LacZ). Se representa una proteína de membrana con seis STM con los extremos amino y carboxilo orientados hacia el espacio citoplásmico. Se muestra un ejemplo de una fusión diseñada en el periplasma (fusión 1), que produce actividad con fosfatasa alcalina, mientras que la fusión diseñada en el citoplasma (fusión 2), origina actividad de β -galactosidasa (adaptada de Manoil y Beckwith, 1986).

debido a que los grupos sulfhidrilo de sus residuos de cisteína permanecen reducidos por el pH más ácido de este compartimiento (Snyder y Silhavy, 1995). Cuando LacZ se une a una señal de exportación, la enzima queda atrapada en la membrana, lo cual evita su plegamiento apropiado y la enzima es inactiva (Van Geest y Lolkema, 2000). De esta manera, la determinación de la actividad de estas dos enzimas, en fusiones construidas de distintas regiones de la proteína de membrana en estudio, permite conocer su localización celular.

II. ANTECEDENTES

Se ha reportado que la proteína ChrA de *C. metallidurans* (perteneciente a la subfamilia LCHR2), posee 10 STM con las mitades amino y carboxilo orientadas de manera paralela con respecto al eje de la membrana (Nies y col., 1998). Por medio de un perfil hidropático y utilizando fusiones traduccionales con las proteínas reporteras PhoA y LacZ, se propuso que ChrA de *P. aeruginosa* consta de 13 dominios o segmentos transmembranales (STM) conectados por seis asas periplásmicas y seis asas citoplásmicas, con el extremo amino localizado en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma (**Fig. 6**). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las mitades homólogas amino y carboxilo de ChrA reveló que los primeros seis STM son muy similares a los últimos seis STM. Sin embargo, aun con esta similitud se encontró que la orientación de los grupos de STM en cada dominio mantienen una orientación antiparalela con respecto a la inserción en la membrana (Jiménez-Mejía y col., 2006). Se ha propuesto que la inserción de un STM adicional (STM VII) a la mitad de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* causó la diferencia en orientación de las mitades amino y carboxilo con respecto al eje de la membrana celular (Díaz-Pérez y col., 2007). En este contexto se ha hipotetizado que la orientación opuesta en los dominios amino y carboxilo terminales de ChrA de *P. aeruginosa* indica que estos llevan a cabo una función distinta durante el transporte de cromato.

A la fecha han sido reportados muchos ejemplos de proteínas orientadas de manera opuesta en la membrana, ya sea como polipéptidos separados o como proteínas de fusión en tándem (Rapp y col., 2006). Un ejemplo está representado

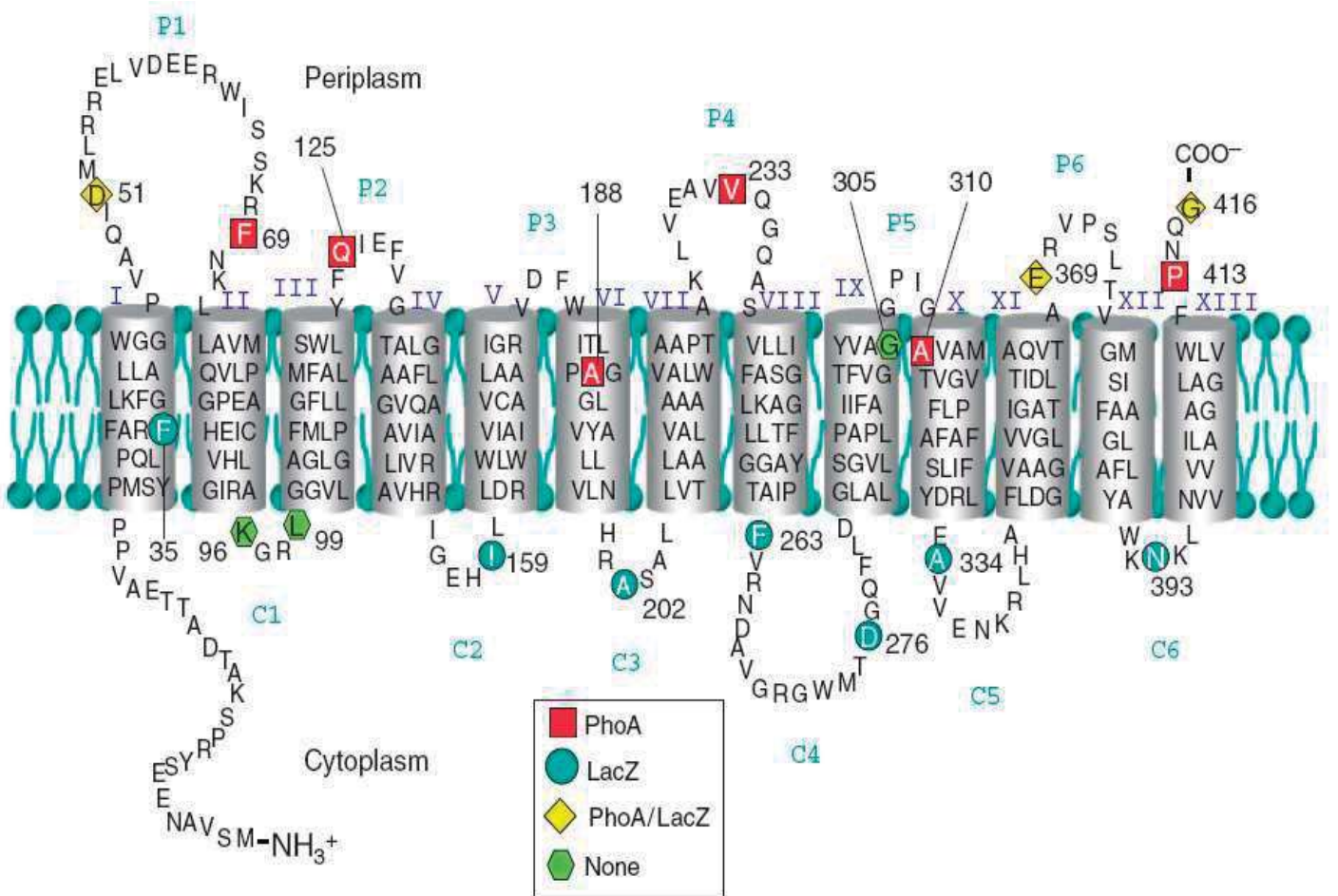


Figura 6. Topología de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. Los 416 aminoácidos se muestran por abreviaturas con letras simples. Los STM predichos (numerados del I-XIII) se muestran como cilindros unidos por asas periplásmicas (P1-P6) o citoplásmicas (C1-C6). La localización de las fusiones traduccionales se muestra por símbolos enumerados con diferentes formas y colores de acuerdo a la actividad enzimática del reportero (PhoA, LacZ, ambas enzimas o ninguna actividad) como se muestra en el recuadro inferior. (Tomada de Jiménez-Mejía y col., 2006).

por la pareja de proteínas homólogas YdgE/YdgF de *E. coli*. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró una tendencia opuesta en la proporción de residuos positivos en las asas hidrofílicas de ambas proteínas (**Fig. 7A**). Esta diferencia predice una topología antiparalela del par YdgE/YdgF en la membrana, de manera que cada STM homólogo de YdgE se inserta en orientación opuesta con respecto a los STM correspondientes de YdgF (**Fig. 7B**).

La superfamilia de transportadores de cromato CHR se divide en proteínas de cadena larga o bidominio (LCHR) y proteínas de cadena corta o monodominio (SCHR). Las proteínas de cadena corta se dividen en tres subfamilias (SCHR1-SCHR3). Estas proteínas son codificadas por genes en tándem los cuales codifican proteínas homólogas con un tamaño promedio de 200 aminoácidos denominadas dominio amino (a la proteína codificada por el primero de los genes en tándem) y dominio carboxilo (a la proteína codificada por el segundo de los genes que codifican el par de proteínas homólogas) (Díaz-Pérez y col., 2007).

Se encontró que *B. subtilis* 168 posee en el cromosoma el par de genes *ywrB* y *ywrA* que codifican proteínas pertenecientes a la subfamilia SCHR3 de transportadores de cromato (Díaz-Pérez y col., 2007). En un trabajo reciente los genes *ywrB* y *ywrA* fueron amplificados a partir del DNA genómico de *B. subtilis* 168 y se clonaron en vectores de expresión. La transcripción del par de genes *ywrB* y *ywrA* (renombrados *chr3N* y *chr3C*, respectivamente), ocurre vía un RNAm bicistrónico generado a partir de un promotor río arriba del gen *chr3N* (Díaz-Magaña y col., 2009). Cuando el gen *chr3N* fue clonado solo, este no confirió resistencia a cromato en *E. coli*, lo que sugiere que ambos genes *chr3N* y *chr3C*

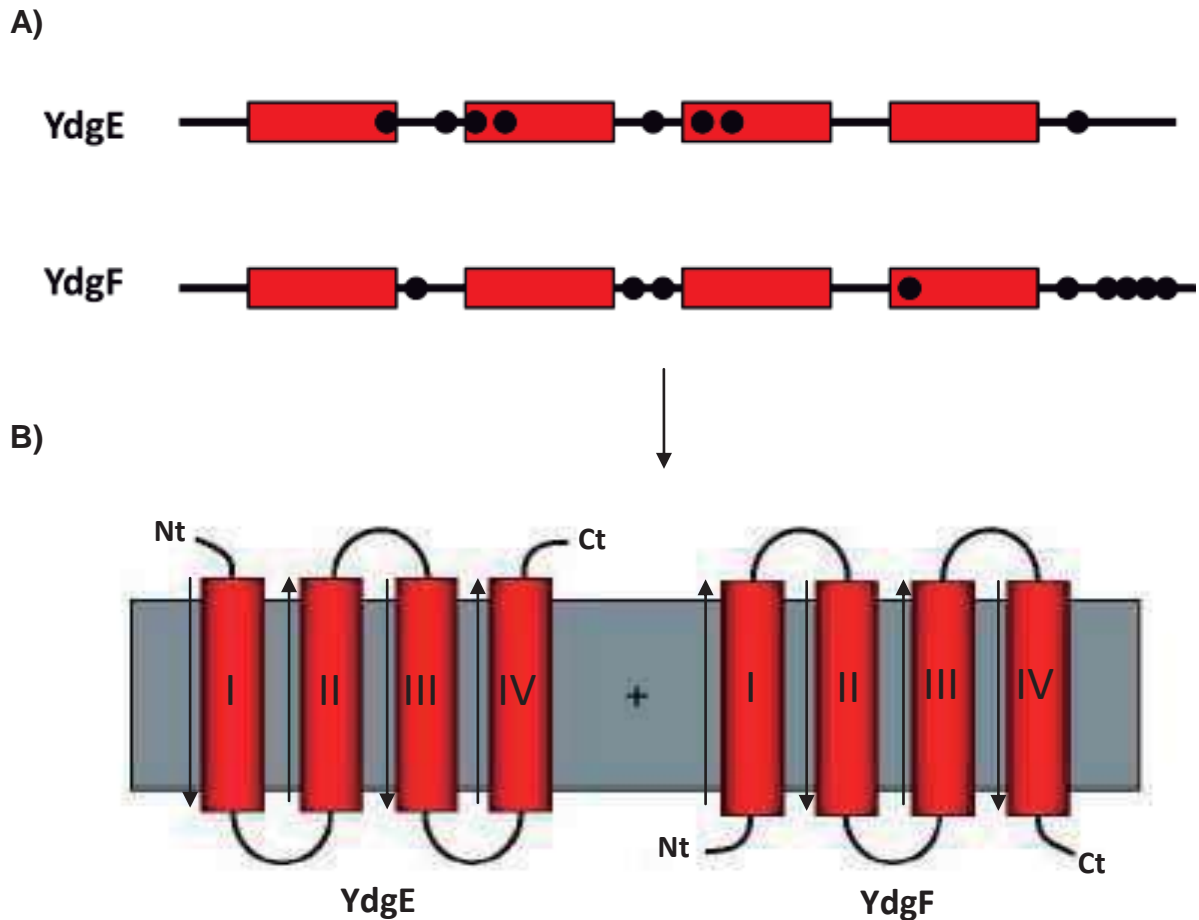


Figura 7. Topología antiparalela de las proteínas homólogas YdgE/YdgF de *E. coli*. **A)** Secuencia lineal de aminoácidos. Rojo, STMs; círculos negros, tendencia de aminoácidos con grupos R positivos en las asas hidrofílicas. **B)** Topología inversa de las proteínas homólogas YdgE/YdgF en la membrana celular. Nt, extremo amino terminal; Ct, extremo carboxilo terminal. Las flechas indican la orientación de cada STM en la membrana celular. Modificada de (Rapp y col., 2006).

son requeridos para la función. A partir de un ensayo de captación de cromato en células completas de *E. coli* en los genes *chr3N* y *chr3C*, se encontró que estas son capaces de captar una menor cantidad de cromato en comparación con las que no los poseen; con base en este resultado se sugirió que las proteínas expresadas a partir de los genes *chr3N* y *chr3C* de *B. subtilis* confieren resistencia a cromato por un mecanismo que involucra la expulsión de los iones de cromato del citoplasma cuando son expresadas en *E. coli* (Díaz-Magaña y col., 2009).

Cuando se analizó la distribución de residuos cargados positivamente (Lys + Arg), de las asas hidrofílicas en las proteínas Chr3N y Chr3C se encontró que las asas con alto contenido de residuos cargados positivamente (Lys + Arg) son opuestas y que esta diferencia en la distribución de aminoácidos predice que los grupos de STM en cada proteína se insertan en orientaciones opuestas. Esto sugiere que a lo largo de la evolución estas proteínas han sufrido cambios en su secuencia de aminoácidos y que estos cambios probablemente influyen en un arreglo topológico diferente entre proteínas homólogas transportadores de cromato SCHR.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la subfamilia SCHR3 realizado mediante el programa TopPred (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.toppred>) reveló la presencia de seis STM para las proteínas correspondientes al dominio amino y seis STM para las proteínas correspondientes al dominio carboxilo (**Fig. 8**). Sin embargo, los resultados mostraron un valor bajo de confiabilidad en la predicción del STM II en ambas proteínas (**Fig. 9**). Adicionalmente se analizó la distribución de aminoácidos con

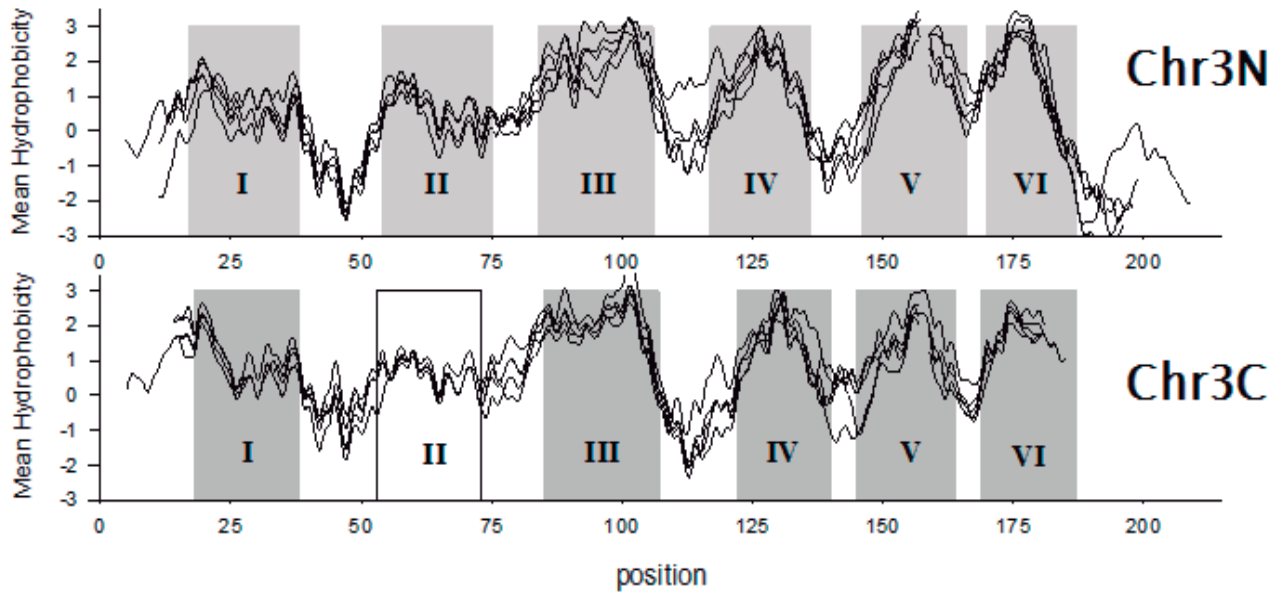


Figura 8. Perfil hidropático de proteínas de la subfamilia SCHR3. Predicción topológica para las proteínas correspondientes al dominio equivalente amino Chr3N (A) y al dominio equivalente carboxilo Chr3C (B). Se indican las proteínas analizadas mediante el perfil en la subfamilia (líneas), se representan también cada uno de los segmentos transmembranales predichos (rectángulos), resaltando en blanco el STM que presentó un valor de confiabilidad bajo usando el predictor informático TopPred. Tomada de Riveros-Rosas (Datos no publicados).

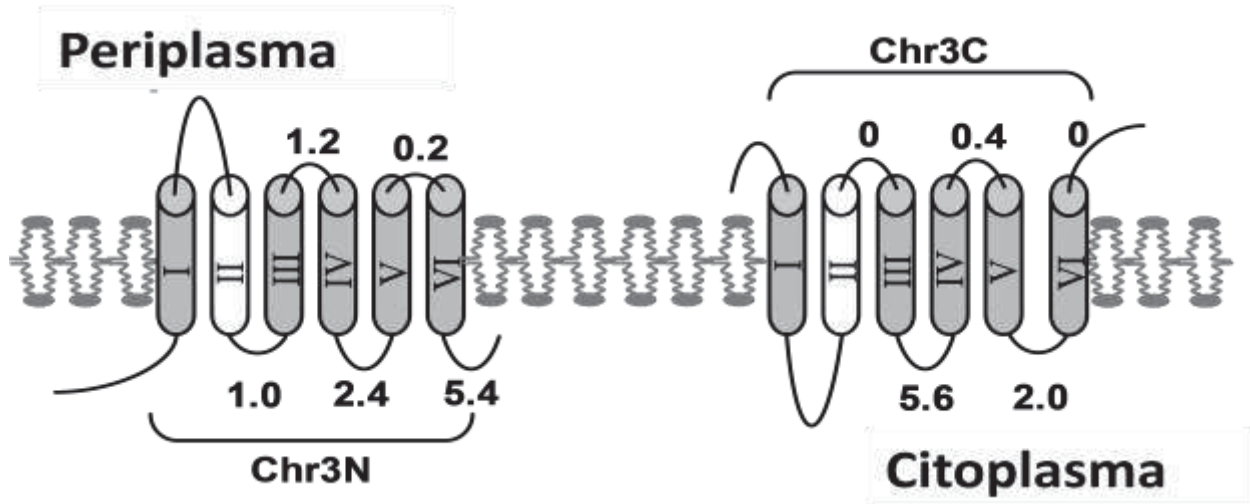


Figura 9. Topología membranar predicha para las proteínas Chr3N y Chr3C.

Los cilindros numerados del I-VI representan los STM predichos para las proteínas Chr3N y Chr3C. Los cilindros blancos representan un valor de confiabilidad bajo obtenido a partir del perfil hidropático en los STM II de las proteínas Chr3N y Chr3C. Los números representan los promedios de los residuos positivos encontrados en cada una de las asas hidrofílicas que conectan los STM (Riveros-Rosas, datos no publicados).

grupos R cargados positivamente (Lys + Arg) en las asas hidrofílicas en ambos dominios de las proteínas de la subfamilia SCHR3 y se encontró que el contenido de aminoácidos con grupos R positivos es opuesto en las asas hidrofílicas del dominio equivalente N-terminal y C-terminal (**Fig. 9**).

III. HIPOTESIS

Las proteínas SCHR de *Bacillus subtilis* forman heterodímeros antiparalelos en la membrana para su funcionamiento.

IV. OBJETIVOS

a) Objetivo general:

Determinar el arreglo estructural de las proteínas SCHR de *Bacillus subtilis* en la membrana.

b) Objetivos específicos:

1. Evaluar la formación de heterodímeros entre las proteínas SCHR de *B. subtilis*
2. Determinar la topología membranal de las proteínas SCHR.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A) MATERIALES

1. Medios de cultivo

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

- a) Caldo Luria-Bertani (CLB). Composición: NaCl 1%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%.

- b) Agar Luria-Bertani (ALB). Composición: la misma que el agar Luria, excepto que contiene agar bacteriológico 1.5%.

2. Cepas

Para los ensayos de sobreexpresión en *E. coli* se utilizó la cepa BL21 pLysS (Sambrook y col., 1989), la cual carece de ciertas proteasas, incrementando la estabilidad de proteínas sintetizadas. Se utilizó adicionalmente para ensayos de expresión la cepa *E. coli* XL10 GOLD [*TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]* (Stratagene®).

Para las fusiones traduccionales se utilizaron como cepas receptoras de los plásmidos a *E. coli* XL1-Blue genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proA+B+lac^q ZΔM15 Tn10 (Tetr)]* (Bullock y col., 1987) y CC118,

araD139 Δ (*ara leu*) 7697 Δ *lacX74* *phoA* Δ 20 *galE* *galK* *thi* *rpsE* *rpoB* *argE*(Am)
recA1 (Manoil y Beckwith, 1986).

3. Plásmidos

Se utilizó el plásmido pTrcHis C, el cual posee una secuencia que codifica para seis residuos de histidinas (6xHis) que se fusionan en el extremo N-terminal de la proteína recombinante (**Fig. 10**).

Para la recuperación de fragmentos de PCR se utilizó el vector pJET 1.2 blunt (**Fig. 11**).

Para la construcción de las fusiones traduccionales con las proteínas SCHR se emplearon los vectores de expresión para *E. coli* y *P. aeruginosa* pUCPphoA y pUCPlacZ (**Fig. 12**).

B) MÉTODOS

1. Aislamiento de plásmidos

El aislamiento del DNA plasmídico proveniente de las colonias transformantes se obtuvo por el método de lisis alcalina (adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981).

2. Electroforesis en geles de agarosa

La separación del DNA de plásmidos se realizó en geles de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE [Tris acetato 40 mM y EDTA (Acido etilendiamino tetracético) 1 mM]. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal

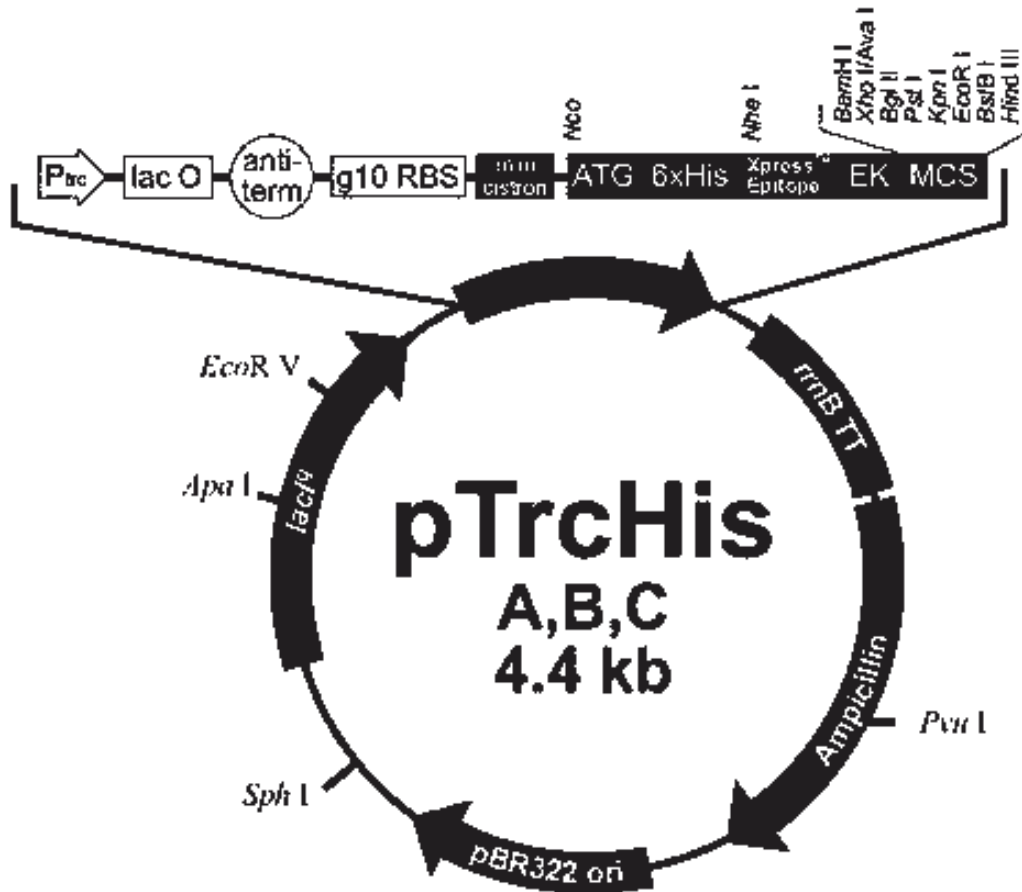


Figura 10. Esquema del plásmido pTrcHis C. Contiene una secuencia de seis histidinas (6xHis) en el extremo amino. Abreviaturas relevantes: pBR322, origen de replicación para *E. coli*. Ampicillin, gen de resistencia a ampicilina. *Lac^I*, represor del operón *lac*. MCS, sitio múltiple de clonación. *P_{trc}*, región promotora. *lacO*, operador *lac* (Tomada de Invitrogen).

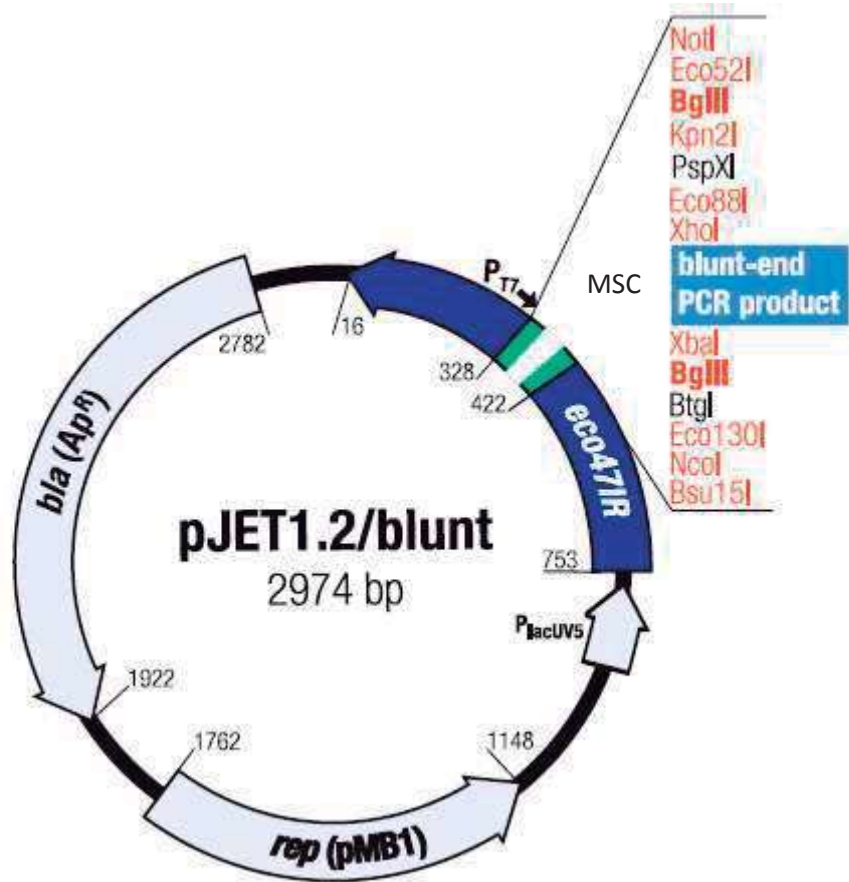


Figura 11. Mapa del vector pJET 1.2/blunt. Contiene el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (Ap^R), un origen de replicación para *E. coli* *rep* (pMB1), un sitio múltiple de clonación (MCS), contiene el promotor T7 para la transcripción in vitro del inserto y el promotor PlacUV5, además de los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (Fermentas).

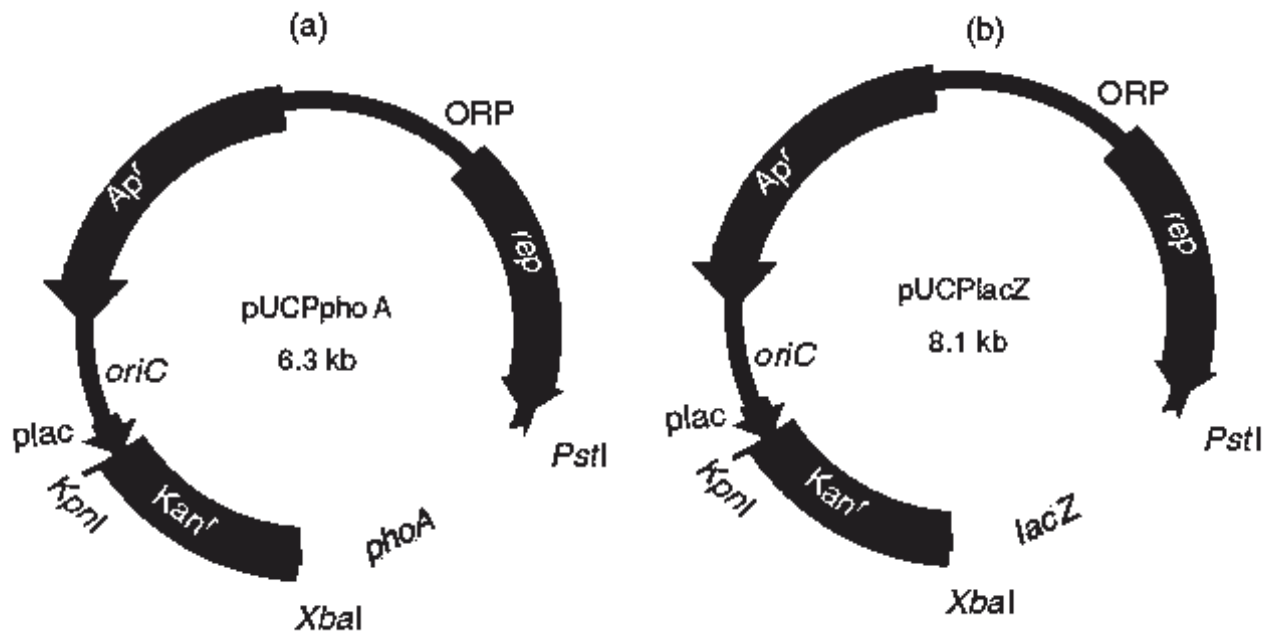


Figura 12. Mapa de los vectores de expresión binarios pUCPphoA y pUCPlacZ. Se muestra la posición y orientación del promotor (Plac), Kan^r, gen que confiere resistencia kanamicina y de los genes *phoA* (A) y *lacZ* (B) que codifican la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa, respectivamente. Ap^r, gen de resistencia a ampicilina. Se muestran también los orígenes de replicación para *P. aeruginosa* (*rep*) y *E. coli* (*oriC*), así como algunos de los sitios de restricción presentes (Jiménez-Mejía y col., 2006).

conteniendo el amortiguador TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con azul de bromofenol en solución de glicerol al 30% y se colocaron en los orificios del gel. Se realizó el corrimiento electroforético en un voltaje constante de 100 voltios durante 30-60 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas teñidas se observaron por medio de un transluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc.) y posteriormente se fotografió. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* o el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

3. Aislamiento de DNA de geles de agarosa

Para purificar los productos de DNA que se utilizaron en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) como se indica por el proveedor. La presencia y concentración del DNA recuperado se verificó en un gel de agarosa al 1% por comparación con DNA de tamaño y concentración conocida del marcador de tamaño molecular.

4. Tratamientos enzimáticos de moléculas de DNA

a) Restricción con endonucleasas

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

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

b) Ligación

Los fragmentos de DNA fueron ligados manteniendo una proporción 3:1 (inserto: vector) utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4 (Fermentas). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche y después se hizo la transformación como se describe más adelante.

5. Amplificación por PCR de los genes *chr3N* y *chr3C*

Para realizar la amplificación por PCR de los genes *chr3N* y *chr3C*, se utilizó como molde el DNA del plásmido pUCywrB_A. Para este proceso se empleó un termociclador de gradiente MultiGene (Labnet International, Inc). La mezcla de reacción se completó adicionando DNA (~150 ng), oligonucleótidos (10 pmol/μl) y 12.5 μl de mezcla de reacción Accuprime SuperMix II (Invitrogen) en un volumen final de 25 μl. Se sometió a 30 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 94°C/1min (desnaturalización), 48°C/45 s (alineamiento), 72 °C/45 s (polimerización), con un ciclo final de polimerización a 72°C/5 min.

Para la ligación de fragmentos de PCR, 100 ng del producto de PCR se mezclaron con 50 ng del vector pJET 1.2 blunt, incubando 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Para la ligación de los vectores pTrcHis con las regiones codificantes de *chr3N* y *chr3C*, se utilizaron 100 ng de DNA del vector y 100 ng de DNA del inserto empleando las condiciones de ligación anteriormente descritas.

6. Transformación de *E. coli*

a) Preparación de células competentes

Se inocularon 200 ml de CLB con 4 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa JM101 de *E. coli*. Las células se dejaron crecer a 37°C con agitación a 250 rpm hasta que alcanzaron una absorbencia de 0.5-0.6 a 600 nm. Posteriormente las células se mantuvieron en hielo por 20 min y para todos los pasos subsecuentes, tanto las células como el material que se utilizó, se mantuvieron a temperatura cercana a 4°C. Las células se colectaron centrifugando a 7,000 rpm a 4°C en una centrifuga Thermo IEC por 10 min. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y las células obtenidas se lavaron en dos ocasiones con agua desionizada, fría y estéril, centrifugando a 7,000 rpm por 10 min a 4°C en cada lavado. Al final las células se resuspendieron en 2 ml de agua desionizada al 10% de glicerol, estéril y fría y la suspensión se guardó en alícuotas de 100 µl a -80°C.

b) Transformación de células competentes

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

Las células competentes fueron descongeladas en hielo. Para cada muestra a electroporar se colocó un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y una celda de electroporación en hielo. En el tubo frío se mezclaron 100 µl de células competentes con aproximadamente 100 ng de DNA plasmídico. Se ajustó el micropulso a 1,800 V y se transfirió la mezcla a una celda de electroporación fría colocando la suspensión en la base. La celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador Eppendorf 2510, ésta se colocó entre los electrodos y se dio

un pulso de 4-5 milisegundos. Se sacó la celda de la cámara e inmediatamente se transfirió la mezcla de la transformación a un tubo con 2 ml de CLB. Se incubó a 37°C por 1 h con agitación constante. Posteriormente se concentraron las células centrifugando a 12,000 rpm durante 1 min, resuspendiendo en el caldo que quedo en el tubo después de decantar. Se distribuyeron 100 µl en cajas de ALB adicionado de 100 µg/ml de ampicilina, para seleccionar clonas con los plásmidos recombinantes. Las colonias transformantes obtenidas se crecieron en 4 ml de CLB para realizar el aislamiento y purificación del DNA.

7. Determinación de la secuencia de nucleótidos

Para la secuenciación del DNA, éste fue purificado como se describió anteriormente y se emplearon los oligonucleótidos BsywrBD (directo) y BsywrBR (reverso), correspondientes al gen *chr3N*, y BsywrAD (directo) y BsywrAR (reverso) para el gen *chr3C*.

8. Obtención de extractos celulares

A partir de cultivos de BL21 (pTrSN) ó (pTrSC), crecidos durante 18 h a 37°C con agitación constante, se inocularon matraces de 500 ml con CL en una dilución 1:50 adicionando 100 µg/ml de ampicilina (Ap), y 35 µg/ml de cloranfenicol (Cm). Se incubaron a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 590 nm. Se adicionó 0.2, 0.5 ó 1.0 mM del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma) y se continuó la incubación tomando muestras a diferentes intervalos de tiempo. Las muestras se procesaron para la obtención

de extractos crudos, fracciones citosólicas o de membrana, o bien se almacenaron a -20 °C.

Los cultivos fueron procesados de la siguiente manera:

- a) Se centrifugó a 12000 rpm/1 min en una centrifuga Eppendorf 5415 D, para obtener la pastilla celular y se desechó el sobrenadante.
- b) Las pastillas obtenidas a partir de 1 ml tomados de cada cultivo se resuspendieron en 100 µl del amortiguador frio Tris-HCl 1 M pH 8.0, SDS 10% y se calentaron a 70°C por 10 min.
- c) Los extractos obtenidos fueron tratados con 1 mM de inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (Sigma) y se sometieron a electroforesis o se almacenaron a -20°C.

9. Obtención de fracciones membranales y solubilización de proteínas

Los cultivos fueron procesados de la siguiente manera:

- a) Se centrifugó el cultivo a 7000 rpm, durante 10 min a 4°C para obtener la pastilla celular y se desechó el sobrenadante.
- b) Se resuspendió la pastilla celular (de 1 L de cultivo), en 5 ml buffer PBS (NaH₂PO₄-H₂O 50 mM, NaCl 300 mM y Tween 20 al 0.05 %, pH 7.4) y se adicionó a la resuspensión 1 mM de PMSF y lisozima (10 mg/ml) y se incubó 30 min con agitación constante a 4°C.
- c) Se adicionó a la mezcla Triton X-100 al 1% y se mantuvo en hielo durante 1 h.
- d) La muestra fue sonicada por 2 min con intervalos de 10 segundos ente cada impulso de sonido con una amplitud de 50%.

- e) Se centrifugó la muestra durante 15 min a 7,000 rpm a 4°C, se separó la pastilla del clarificado y se centrifugó este último a 40,000 rpm/1h/4°C. en una ultracentrífuga Beckman-L8, rotor 80 Ti.
- f) Se separó la fracción membranal de la citosólica, se resuspendió la fracción de membrana en 500 µl del amortiguador PBS y se midió la concentración de proteína por el método de Bradford (1976).
- g) Se hizo una dilución de 10 mg/ml y se adicionó el detergente Dodecil-β-D-Maltósido (DDM) a una concentración de 1 g de detergente por cada gramo de membrana y finalmente se mantuvo a 4°C con agitación constante durante toda la noche.
- h) Las muestras se guardaron a -20°C o se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12%.

10. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El análisis de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12% y se utilizó una cámara de corrimiento electroforético Thermo EC Ec120 Mini vertical gel system.

a) Preparación del gel

Los geles de separación y condensación se hicieron con los siguientes componentes (Sambrook y col., 1989):

Gel de separación

Acrilamida/bisacrilamida 30%	3 ml	H ₂ O desionizada	2.4 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.95 ml	Persulfato de amonio 30%	75 µl
SDS 10%	75 µl	TEMED	3 µl

Gel de condensación

Acrilamida/bisacrilamida 30%	333 µl	H ₂ O desionizada	1.4 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	250 µl	Persulfato de amonio 30%	20 µl
SDS 10%	20 µl	TEMED	3 MI

b) Preparación y corrimiento de las muestras

Se cargaron en los geles de acrilamida 15 µl de muestra correspondientes a los extractos crudos, y en otro gel se cargaron 15 µl de cada una de las fracciones celulares provenientes de la solubilización y ultracentrifugación de las muestras de proteínas utilizando 3 µl de amortiguador de corrida 5X (Tris 0.25 M, SDS 20%, glicerol 25% v/v, mercaptoetanol 14 mM, azul de bromofenol 0.3%; pH 6.8). El corrimiento se realizó por 20 min a 70 v (gel de condensación), seguido por 1h a 120 v (gel de separación), empleando el amortiguador Tris glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3) (Sambrook y col., 1989).

c) Tinción del gel

Todos los pasos se hicieron con agitación suave a temperatura ambiente. Se colocó el gel en una solución de tñido [0.25 g de azul brillante de Coomassie, 90 ml de una mezcla metanol-agua (proporción 1:1), 10 ml de ácido acético glacial] por 3 min. Finalmente se incubó en solución de desteñido (metanol 10%, ácido acético glacial 10% y H₂O destilada cbp 1 L) por ~30 minutos.

11. Inmunodetección de las proteínas Chr3N y Chr3C

Luego del corrimiento en SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC) Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech) por electroforesis en cámara húmeda empleando el equipo EC120 Mini Blot Module (Thermo EC) y el módulo de transferencia con el amortiguador Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % y SDS 0.1 % pH 8.3) por 90 min a 150 mA (según el manual del equipo).

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TTBS [100 ml de TBS 1X (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.5), 50 μ l de Tween 20] durante 1 h. Se eliminó la solución bloqueadora y se lavó tres veces con amortiguador TTBS por periodos de 10 min en cada lavado a temperatura ambiente y con agitación suave. Después de desechar la solución de bloqueo y lavar con TTBS, se añadió a la membrana el níquel activado HisProbe-HRP (Amersham), en TBS-Tween a una dilución 1:5000 incubando durante 1 h con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana cuatro veces con 10 ml de la solución de TBS-Tween en cada lavado, por 10 min con agitación suave; finalmente se mantuvo durante la noche a 4° C sin agitación para aumentar la sensibilidad de la detección.

Se realizó la detección con el Kit ECL + plus Western blotting system (Amersham) siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente la membrana se colocó sobre una película de rayos X (Kodak) por 5 min y la película se procesó con una solución de revelado (Kodak).

12. Diseño de oligonucleótidos para las fusiones traduccionales de las proteínas Chr3N y Chr3C

Para la obtención de fusiones traduccionales se diseñaron parejas de oligonucleótidos en base a los sitios seleccionados en las secuencias de las proteínas Chr3N y Chr3C (**Figs. 13 y 14**), obtenidas mediante un perfil hidropático utilizando el programa de cómputo TopPred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal>). Las parejas fueron formadas por el oligonucleótido ODNS1(+), localizado hacia el extremo 5' del gen *chr3N*, que adiciona un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *KpnI*, con cada uno de los diferentes oligonucleótidos localizados en los sitios elegidos hacia el extremo 3' de *chr3N* (**Tabla 1**). Para el gen *chr3C* las parejas fueron formadas por el oligonucleótido ODCS1 (+), localizado hacia el extremo 5' y el cual también adiciona un sitio para *KpnI*, con los oligonucleótidos localizados en los sitios elegidos hacia el extremo 3' del gen *chr3C* (**Tabla 2**). Tanto los oligonucleótidos diseñados para el gen *chr3N* como para *chr3C* poseen además un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XbaI*. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en forma comercial (Invitrogen).

13. Amplificación por PCR de fragmentos de *chr3N* y *chr3C*

Para la amplificación de los fragmentos de *chr3N* y *chr3C* por PCR, se utilizó como molde el DNA del plásmido pUCywrB_A (Díaz-Magaña y col., 2009), aislado mediante lisis alcalina. El proceso se llevó a cabo empleando un termociclador de gradiente. La mezcla de reacción se completó adicionando DNA (~100 ng), oligonucleótidos (10 pmol/μl) y 12.5 μl de mezcla de reacción Accuprime SuperMix

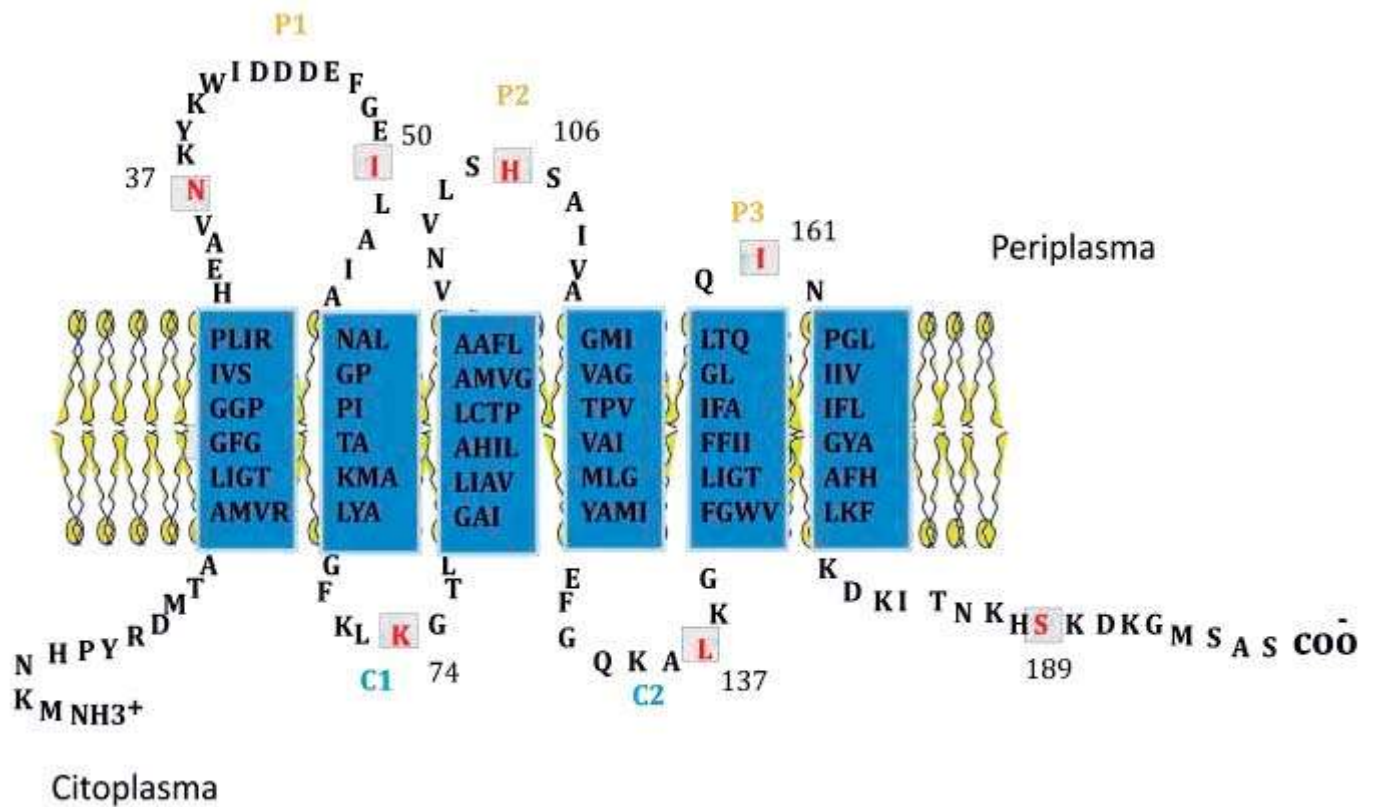


Figura 13. Sitios seleccionados para las fusiones traduccionales de Chr3N de *Bacillus subtilis* 168. Se muestra el modelo topológico predicho para Chr3N. En azul se representan los STM predichos (I-VI). Se indican en recuadros los sitios seleccionados para la construcción de las fusiones en dominios hidrofílicos (rojo), asas periplásmicas 1, 2 y 3 (P1-P3), y asas citoplásmicas 1 y 2 (C1 y C2).

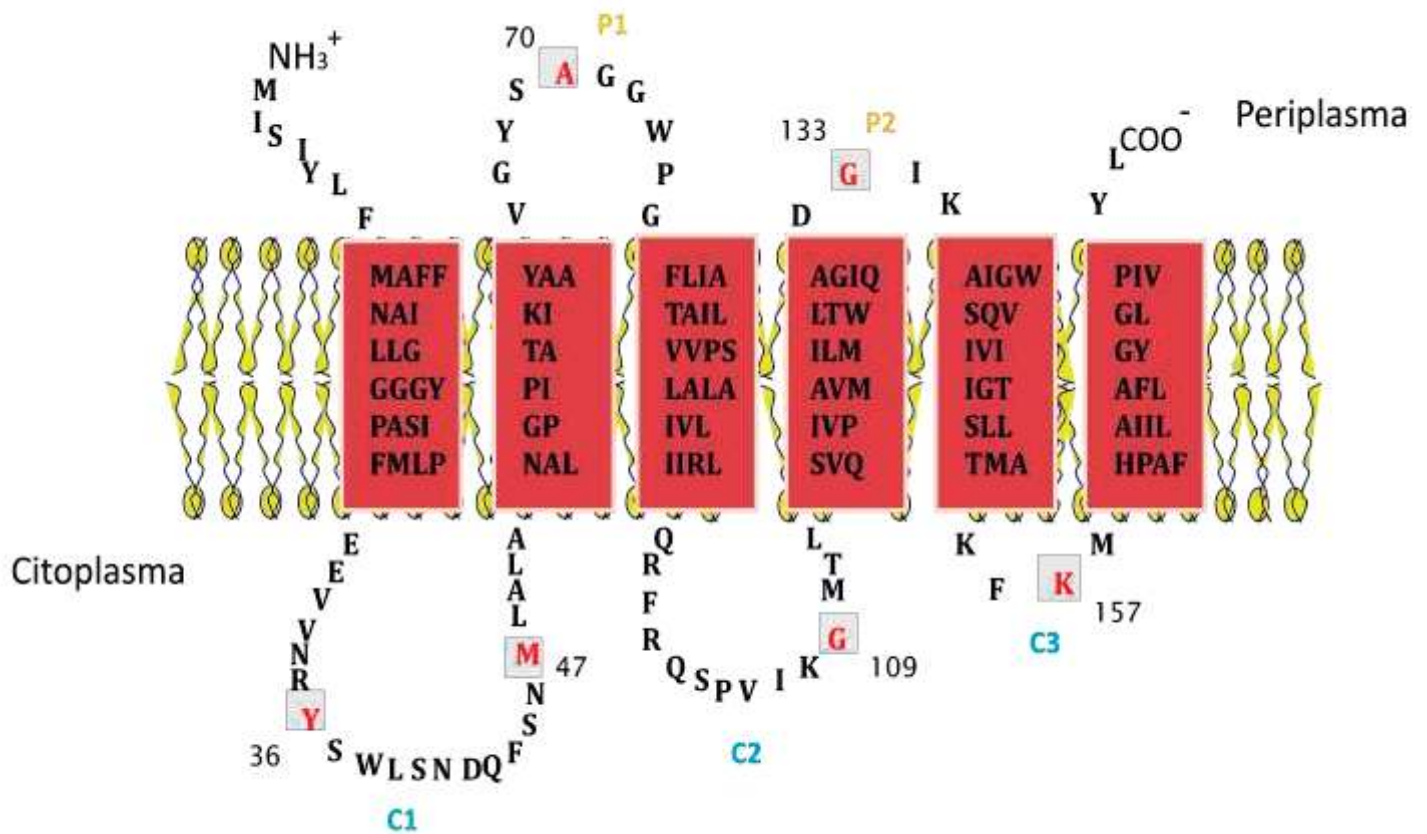


Figura 14. Sitios seleccionados para las fusiones traduccionales de Chr3C de *Bacillus subtilis* 168. Modelo topológico predicho para Chr3C. En marrón se representan los STM predichos (I-VI). Se indican en recuadros los sitios seleccionados para la construcción de las fusiones en dominios hidrofílicos (rojo), asas periplásmicas 1 y 2 (P1 y P2), asas citoplásmicas 1, 2 y 3 (C1-C2).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos del gen *chr3N* por PCR.

Nombre	Fragmento amplificado (pb)	Posición en la proteína (aa)	Secuencia 5' → 3'	Orientación
ODSN1(+)	–	–	<u>GAGGTACCCTGTAAAGGAGAG</u>	Directo
N37-SN	159	37	CATTTTCTAGAATTGACCGCTTC	Reverso
I50-SN	194	50	GGAAGCGCATTTCAGATGC	Reverso
K74-SN	259	75	CCTAATCTAGATTTTAGCTTAAAGCCC	Reverso
H106-SN	360	106	CTGCAACAATTCTAGAATGG	Reverso
L137-SN	451	137	CAGCCGAATCTAGAAAGCG	Reverso
I161-SN	524	161	GACCAGGCCTCTAGAAATCTG	Reverso
S189-SN	616	189	GAGGCTGACATTCCTTTCTAGATG	Reverso

A. Se subraya el sitio de restricción introducido en cada uno de los oligonucleótidos para las enzimas *KpnI* (oligonucleótido directo) y *XbaI* (oligonucleótidos reversos).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos del gen *chr3C* por PCR.

Nombre	Fragmento amplificado (pb)	Posición en la proteína (aa)	Secuencia 5' → 3'	Orientación
ODSC1(+)	–	–	CATTGGTACCATAAAGGAATGTCAG	Directo
Y36-SC	146	36	GAGAGTCTAGAGTATCTGTTTACGAC	Reverso
M47-SC	180	47	CGCAAGTCTAGACATATTTGAG	Reverso
A70-SC	246	70	CCATCTAGATGCGCTGTAGCC	Reverso
G109-SC	363	109	CAGTCTAGAGCCTTTGATGAC	Reverso
G133-SC	438	133	GATCGCTCTAGAGCCGTCTG	Reverso
K157-SC	507	157	CGGTCTAGATTTGAATTTGTGCATGGC	Reverso

A. Se subraya el sitio de restricción introducido en cada uno de los oligonucleótidos para las enzimas *KpnI* (oligonucleótido directo) y *XbaI* (oligonucleótidos reversos).

II (Invitrogen) en un volumen final de 25 μ l. Se sometió a 30 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 94°C/1min (desnaturalización), 48°C/45 s (alineamiento) variando entre cada gen, 72 °C/45 s (polimerización), con un ciclo final de polimerización a 72°C/5 min.

14. Clonación en pJET1.2/Blunt

Los fragmentos de DNA correspondientes a los genes *chr3N* y *chr3C* amplificados, fueron clonados en el vector para la clonación de fragmentos de PCR pJET1.2/blunt, se digirieron con las endonucleasas *KpnI/XbaI* y se purificaron por el método comercial PCR Clean-Up System (Promega).

15. Construcción de fusiones traduccionales

Los fragmentos clonados en el vector pJET1.2/blunt fueron digeridos con las endonucleasas *KpnI/XbaI* y se utilizaron para la reacción de ligación con los vectores binarios de expresión pUCPphoA o pUCPlacZ (**Fig. 11**) digeridos con las mismas enzimas y purificados de la misma manera. Las construcciones fueron transferidas a células competentes de *E. coli* XL1 blue y las transformantes fueron seleccionadas en ALB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml).

16. Transformación de las fusiones traduccionales en *E. coli* CC118

Se prepararon células competentes de la cepa *E. coli* CC118 como se describió anteriormente y se transformaron mezclando 100 μ l de células competentes con 100 ng de DNA de los vectores pUCPphoA ó pUCPlacZ con cada una de las fusiones a partir de los genes *chr3N* y *chr3C*. Se distribuyeron 100 μ l de la mezcla

de transformación en cajas de ALB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina para seleccionar las transformantes. La presencia de los plásmidos se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

17. Ensayos enzimáticos

Para la determinación de las actividades enzimáticas, un cultivo de 2 ml de cada cepa que lleva el vector con cada fusión (PhoA o LacZ) se creció toda la noche a 37°C con agitación en CL adicionando ampicilina (100 µg/ml). Se inoculó un matraz de 10 ml de CL con 250 µl del cultivo de toda la noche, se incubó por 3 h más a 37°C con el mismo antibiótico y se crecieron las células hasta fase exponencial. Con estos cultivos se realizaron los ensayos de actividad.

a) Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de fosfatasa alcalina de las fusiones se midió por el método de Brickman y Beckwith (1975) como sigue:

Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Se centrifugo 1ml del cultivo y las células fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de ensayo (Tris-HCl 1M pH 8.0 y ZnCl₂ 1 mM) y permeabilizadas con 20 µl de cloroformo y 15 µl de SDS al 0.1 % a 37°C durante 5 min. La velocidad de hidrólisis se midió adicionando 200 µl de pNPP (p-nitrofenil fosfato; Sigma). El ensayo se realizó incubando por 4 h a 37°C y la reacción se detuvo adicionando 120 µl de EDTA 80 mM pH 8.0 y K₂HPO₄ 2M. Se midió la densidad óptica a 420 nm y a 550 nm y se llevaron a cabo los cálculos de actividad usando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de fosfatasa alcalina} = \frac{1000 \times \text{DO}_{420} - 1.75 \times \text{DO}_{550}}{t \times V \times \text{DO}_{600}}$$

DO_{420} y DO_{550} = Densidades ópticas de la mezcla de reacción

DO_{600} = Densidad óptica tomada antes del ensayo

t = Tiempo de reacción (h)

V = Volumen de cultivo usado en el ensayo (ml)

b) Determinación de la actividad de β -galactosidasa

La actividad de β -galactosidasa de las fusiones se midió por el método de Brickman y Beckwith (1975) como sigue:

Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 600 nm e inmediatamente se añadió 0.1 ml del cultivo a 0.9 ml de buffer Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM y β -mercaptoetanol 50 mM). Las células se permeabilizaron con 20 μl de cloroformo y 15 μl de SDS 0.1%, se agitaron en vortex por 10 s y los tubos se incubaron a 37°C durante 5 min. La reacción comenzó con la adición de 0.2 ml de ONPG (o-nitrofenil- β -D-tiogalactopiranosido; Sigma) [(4 mg/ml en buffer de fosfatos (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 0.1 M pH 7.0)] a cada tubo, agitando por 10 s suavemente. Se incubó por 15 min a 37°C y se detuvo añadiendo 0.25 ml de una solución de Na_2CO_3 2 M. Se centrifugó la mezcla de reacción 1 min a 13000 rpm, se registró la densidad óptica del sobrenadante a 420 y 550 nm y se efectuaron los cálculos de actividad mediante la siguiente fórmula:

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

DO_{420} y DO_{550} = Densidades ópticas de la mezcla de reacción

DO_{600} = Densidad óptica tomada antes del ensayo

t = Tiempo de reacción (min)

V = Volumen de cultivo usado en el ensayo (ml)

VI. RESULTADOS

1. Construcción y caracterización de los plásmidos recombinantes pTrSN y pTrSC

El DNA de la cepa *E. coli* BL21 pLysS transformada con los plásmidos recombinantes pTrSN y pTrSC, fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Después de la restricción se observó una banda de ~4.4 kb correspondiente al plásmido lineal pTrcHis C, una banda de ~600 pb, correspondiente al gen *chr3N* (**Fig. 15**) y una banda de ~500 pb correspondiente al gen *chr3C* (**Fig. 16**), respectivamente. Determinando con esto que ambos plásmidos poseen los genes *chr3N* y *chr3C* clonados de manera correcta.

Para comprobar la conservación de fase de secuencia correspondiente al marco de lectura de los genes *chr3N* y *chr3C*, así como la secuencia codificante de las seis histidinas adicionales por el vector pTrcHis C, se obtuvo la secuencia del DNA de los genes, incluyendo el codón de inicio del vector así como las histidinas adicionales a la proteína. Una región de nucleótidos sustituyó el codón de inicio del gen representado (*chr3N* o *chr3C*) por el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente (**Figs. 17 y 18**). A partir del análisis de las secuencias obtenidas, se corroboró la correcta fusión de la región codificante de los genes en los plasmidos pTrSN y pTrSC. Como era de esperar, de acuerdo al acomodo de los nucleótidos en la región de policlonación del vector pTrcHis C, los marcos de lectura se conservaron.

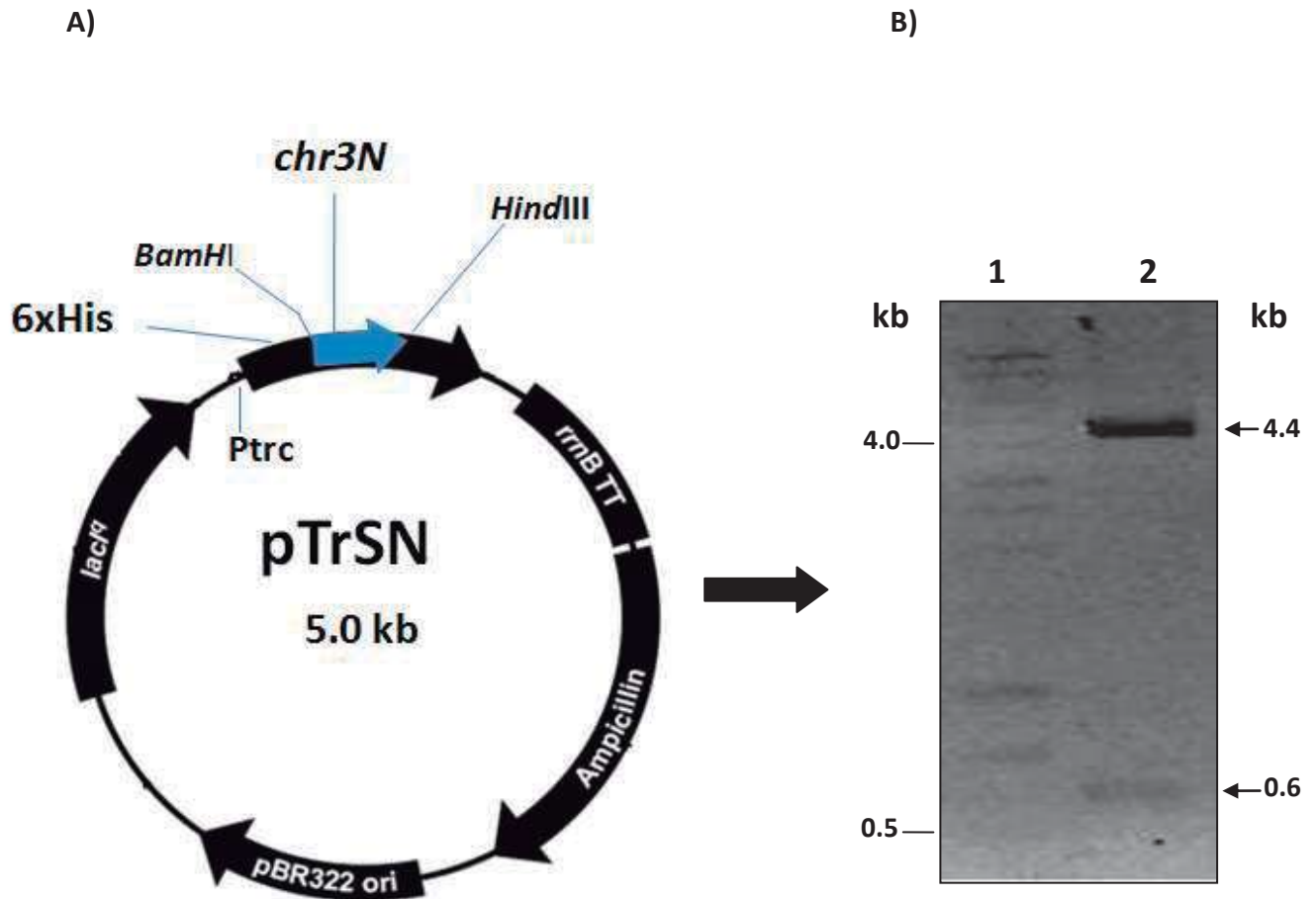


Figura 15. Caracterización del plásmido recombinante pTrSN. **A)** Esquema del plásmido pTrSN proveniente de la ligación del vector pTrcHis C, el cual adiciona una etiqueta de seis histidinas, y el gen *chr3N* de *Bacillus subtilis*. **B)** Corrimiento electroforético en gel de agarosa. Carril 1, marcador de tamaño molecular λ *HindIII*; Carril 2, DNA del plásmido pTrSN digerido con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, la banda de 4.4 kb corresponde al plásmido lineal pTrcHis C y la banda de ~ 0.6 kb indica la presencia de el gen *chr3N*.

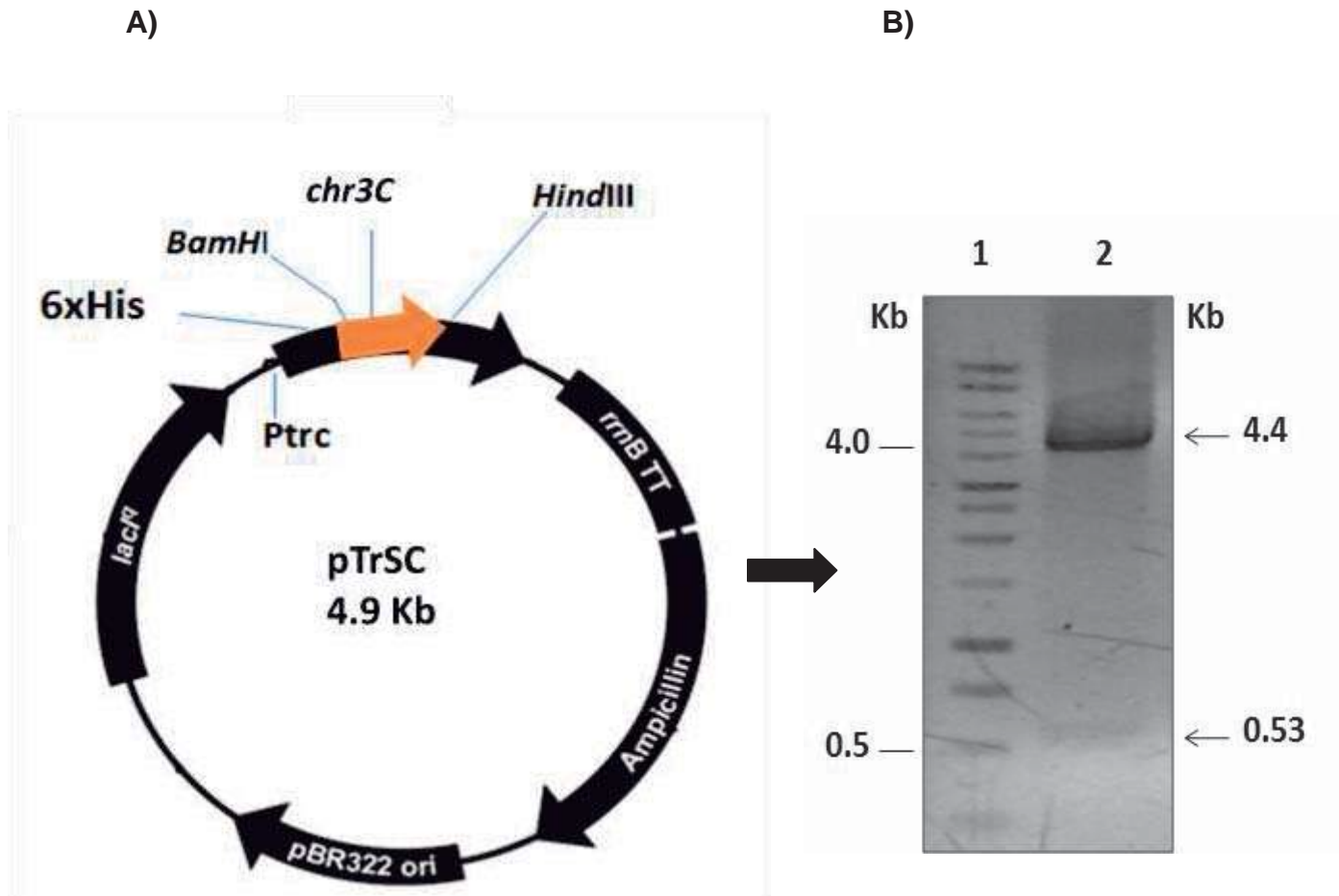


Figura 16. Caracterización del plásmido recombinante pTrSC. A) Esquema del plásmido pTrSC proveniente de la ligación del plásmido pTrcHis C y el gen *chr3C* de *B. subtilis*. B) Corrimiento electroforético en gel de agarosa. Carril 1, marcador de tamaño molecular λ *HindIII*; Carril 2, DNA del plásmido pTrSC digerido con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, la banda de 4.4 kb corresponde al plásmido lineal pTrcHis C y la banda de ~ 0.5 kb indica la presencia de el gen *chr3C*.

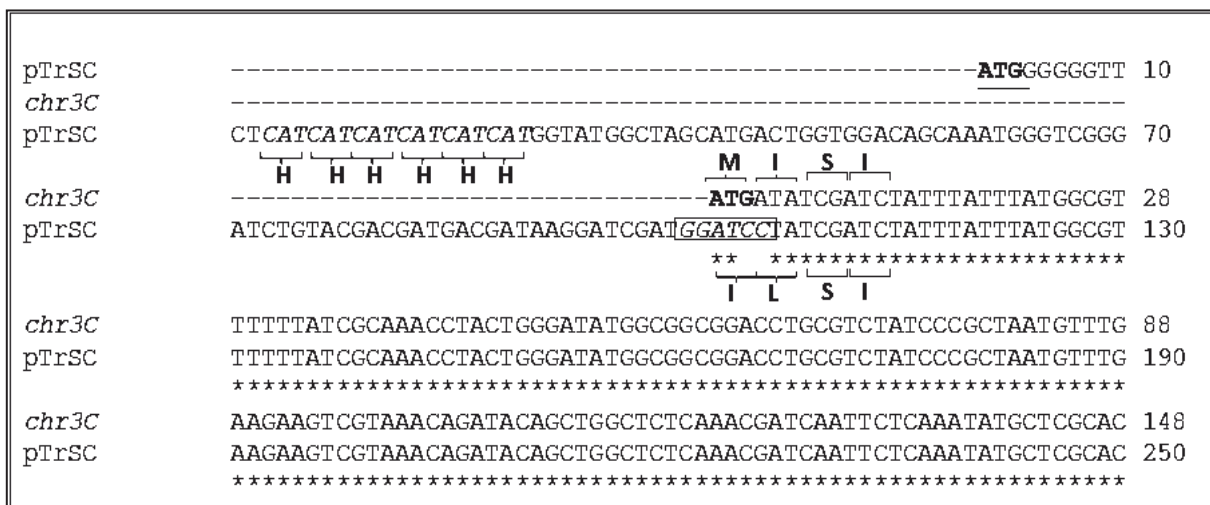


Figura 18. Secuencia de la región codificante del gen *chr3C*. Alineamiento del ORF *chr3C* clonado en el plásmido pTrcHis C (pTrSC), comparado con el gen (*chr3C*) obtenido de la secuencia del genoma de *Bacillus subtilis* 168. Secuencia que codifica a la etiqueta de seis histidinas (**6xH**), codón de inicio adicionado por el plasmido pTrcHis C (**ATG**), sitio de restricción para *Bam*HI (Recuadro), nucleótidos conservados (*), espacios vacíos (--), aminoácidos conservados (corchete).

2. Separación de las proteínas Chr3N y Chr3C en SDS-PAGE

Con el propósito de observar la presencia de las proteínas Chr3N y Chr3C en SDS-PAGE, los plásmidos recombinantes pTrSN y pTrSC fueron transferidos a células competentes de *E. coli* XL10 Gold (Stratagene). Una vez obtenidas las cepas XL10 GOLD (pTrSN) y XL10 GOLD (pTrSC), y después de variar las concentraciones del inductor IPTG, el tiempo de inducción y la temperatura, se obtuvieron fracciones solubles y de membrana, a partir de cultivos inducidos con 1.0 mM de IPTG en fase exponencial (~ 0.5 absorbencia a 590 nm) y a una temperatura de 37°C. Se tomaron muestras de 4 h post-inducción y las células se lisaron y solubilizaron en las condiciones antes descritas, cargándose cantidades equivalentes de fracciones solubles y de membrana en los geles SDS-PAGE al 12%. A partir del análisis de los geles se determinó que no existe la presencia de una banda correspondiente a la proteína en las fracciones solubles y de membrana bajo las condiciones empleadas (**Fig. 19**).

3. Inmunodetección de las proteínas Chr3N y Chr3C

A pesar de no haber sido posible la localización de bandas diferenciadas correspondientes a las proteínas Chr3N y Chr3C, ya sea en los extractos celulares crudos, solubles o de membrana de las cepas *E. coli* BL21(pTrSN) o (pTrSC), se encontró una banda intensa en extractos crudos con un tamaño ~ 24 kD, similar al de la proteína Chr3N (24.7 kD). Por lo anterior, se consideró que la presencia de esta banda dificultó la visualización de las proteínas Chr3N y Chr3C en el gel SDS-PAGE. Para descartar que el problema de la visualización de proteínas en los extractos se deba a la baja expresión de proteínas, se llevó a cabo la detección

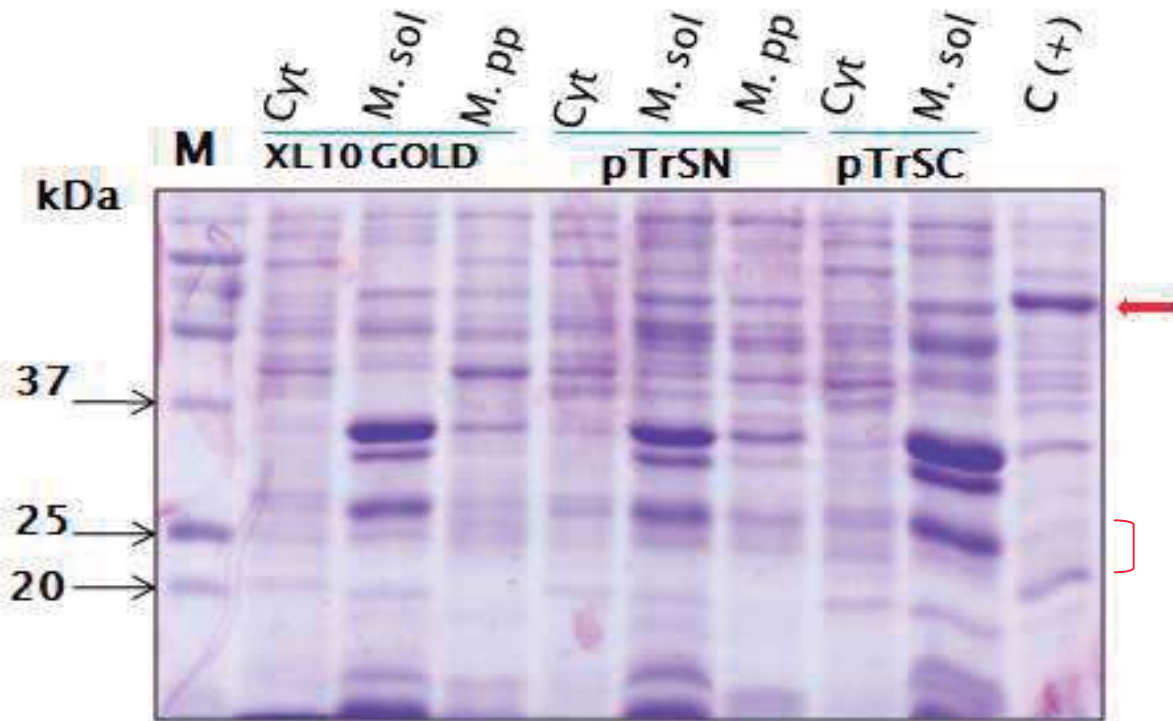


Figura 19. Separación de extractos celulares de la cepa XL10 GOLD con los plásmidos pTrSN ó pTrSC. SDS-PAGE 12%. M (marcador de peso molecular); Cyt (Fracción citosólica); M. sol (membrana solubilizada con DDM); M. pp (Fracción de membrana). Se muestra el control negativo (extracto de XL10 GOLD sin vector); extractos de la cepa que expresa vector pTrcHis C con el gen *chr3N* (pTrSN) y extractos de la cepa que expresa el vector con el gen *chr3C* (pTrSC). Se señala con una flecha a la derecha la banda correspondiente a la proteína LiuB-His de 63 kD [C (+)]. El corchete a la derecha indica el tamaño esperado de las proteínas His-Chr3N y His-Chr3C (24.7 y 23 kD, respectivamente).

por western blot a partir de fracciones celulares de las cepas XL10 GOLD (pTrSN) y XL10 GOLD (pTrSC), obtenidos siguiendo la metodología descrita anteriormente. Tras el revelado de las membranas de NC se buscó la detección de bandas con un tamaño que correspondiera con el de las proteínas Chr3N (24.7 kD) o Chr3C (23 kD). A pesar que se realizaron varios intentos modificando diversas condiciones, no se logró detectar ninguna banda que sugiriera la presencia de las proteínas Chr3N y Chr3C (**Fig. 20**). La clara detección de la proteína purificada LiuB-His (control positivo), fusionada a 6xHis con un tamaño de 63 kD, validó el experimento como se muestra en la fotografía.

4. Amplificación de los fragmentos de *chr3N* y *chr3C* por PCR

Con base en los sitios seleccionados para la construcción de las fusiones traduccionales en el modelo topológico propuesto para las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis* (**Figs. 13 y 14**), se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos correspondientes a los genes *chr3N* y *chr3C* por PCR, empleando para ello los oligonucleótidos enlistados en las **Tablas 1 y 2**, respectivamente. Para los fragmentos del gen *chr3N*, las parejas de oligonucleótidos se formaron por el oligo directo ODSN1 (+), que fue común para todas las amplificaciones, y cada uno de los oligos reversos de acuerdo al sitio seleccionado. Para la amplificación de los fragmentos a partir de *chr3C*, las parejas de oligos se formaron por el oligo directo ODSC1 (+), común para todas las amplificaciones y cada uno de los oligos reversos. Se amplificaron un total de siete fragmentos de *chr3N* y seis fragmentos de *chr3C*, los cuales fueron sometidos a corrimientos

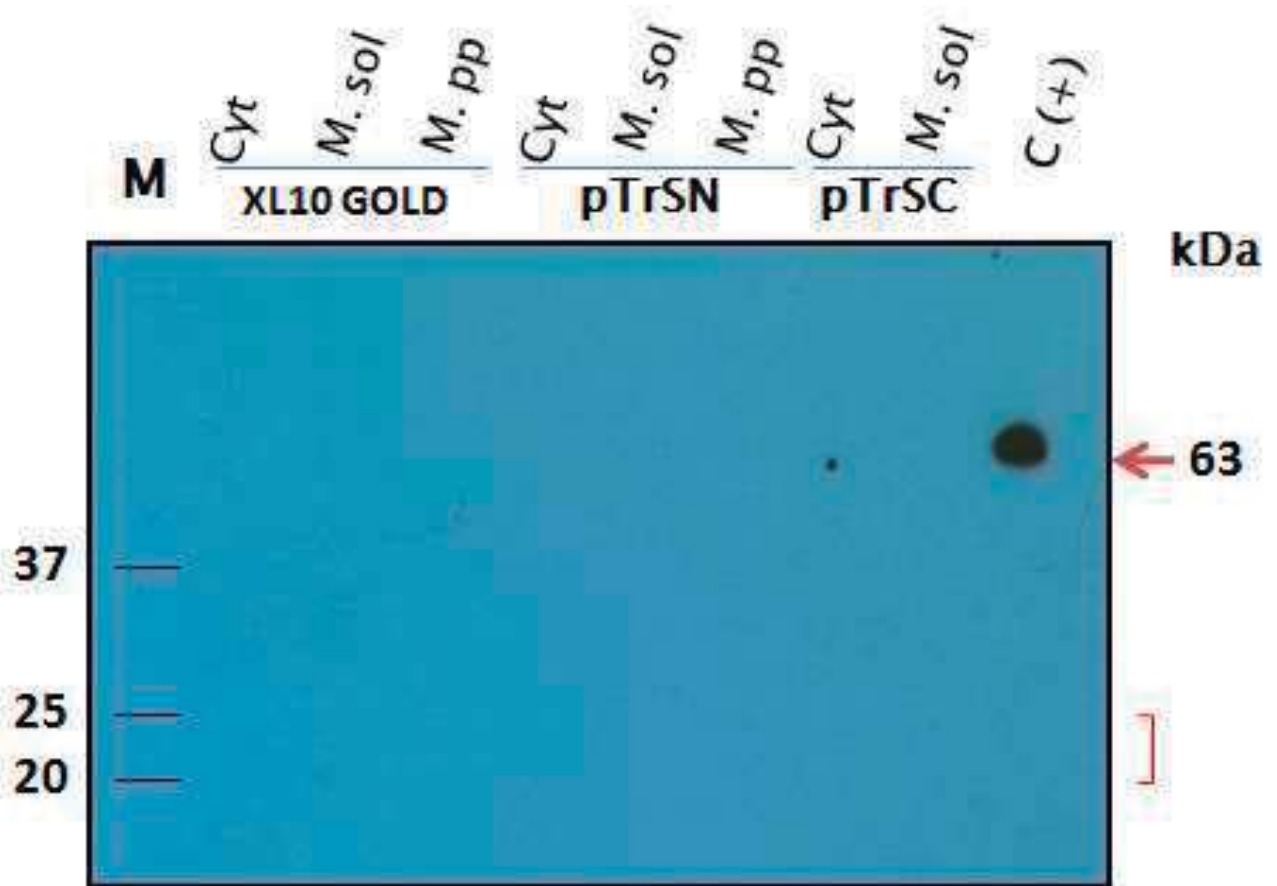


Figura 20. Western blot de extractos celulares de las cepas XL10 GOLD (pTrSN) y XL10 GOLD (pTrSC). M (marcador de peso molecular); Cyt (Fracción citosólica); M.sol (membrana solubilizada con DDM); M. pp (Fracción de membrana). Se muestra el control negativo (muestras de XL10 GOLD sin vector); muestras de la cepa que expresa vector pTrcHis C con el gen *chr3N* (pTrSN) y muestras de la cepa que expresa el vector con el gen *chr3C* (pTrSC). Respectivamente. Se señala con una flecha a la derecha la banda correspondiente a la proteína LiuB-His de 63 kD [C (+)]. El corchete a la derecha indica el tamaño esperado de las proteínas Chr3N y Chr3C (24.7 y 23 kD, respectivamente).

electroforéticos para verificar su tamaño. El tamaño esperado de los fragmentos de *chr3N* y *chr3C* se indica en las tablas **1** y **2**, respectivamente. En las **figuras 21** y **22** se muestran los ejemplos de bandas de ADN en un gel de agarosa al 1%, las cuales representan cada uno de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a los genes *chr3N* y *chr3C*, respectivamente.

5. Clonación de los productos de PCR

Una vez que se tuvieron los productos de PCR y su tamaño fue verificado, estos fueron purificados como se describió en Materiales y Métodos y se ligaron en el vector de clonación pJET1.2/blunt. Con las mezclas de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* XL1 blue y de las transformantes se seleccionaron algunas para la digestión y la identificación de los fragmentos ligados en el vector. A estos plásmidos recombinantes se les denominó “pJ” seguido de la letra correspondiente al residuo de aminoácido en el que se diseñó la fusión así como el número que hace alusión a la posición del residuo donde se realiza la fusión en la proteína como se muestra para la clonación del fragmento M47 de *chr3C* en el vector de clonación pJET 1.2/Blunt denominando pJM47 al plásmido recombinante obtenido (**Fig. 23A**). La estrategia anterior es representativa para la clonación de los fragmentos amplificados a partir de *chr3N* y *chr3C*. La presencia y el tamaño de los insertos en pJET1.2/blunt fue verificada por digestión con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, liberando el vector pJET1.2/blunt (de 2974 pb) y cada uno de los insertos de *chr3N* y *chr3C*. Esto permitió identificar mediante corrimiento electroforético en geles de agarosa cada uno de los productos de PCR ligados, como se muestra para el ejemplo en pJM47 (**Fig. 23B**).

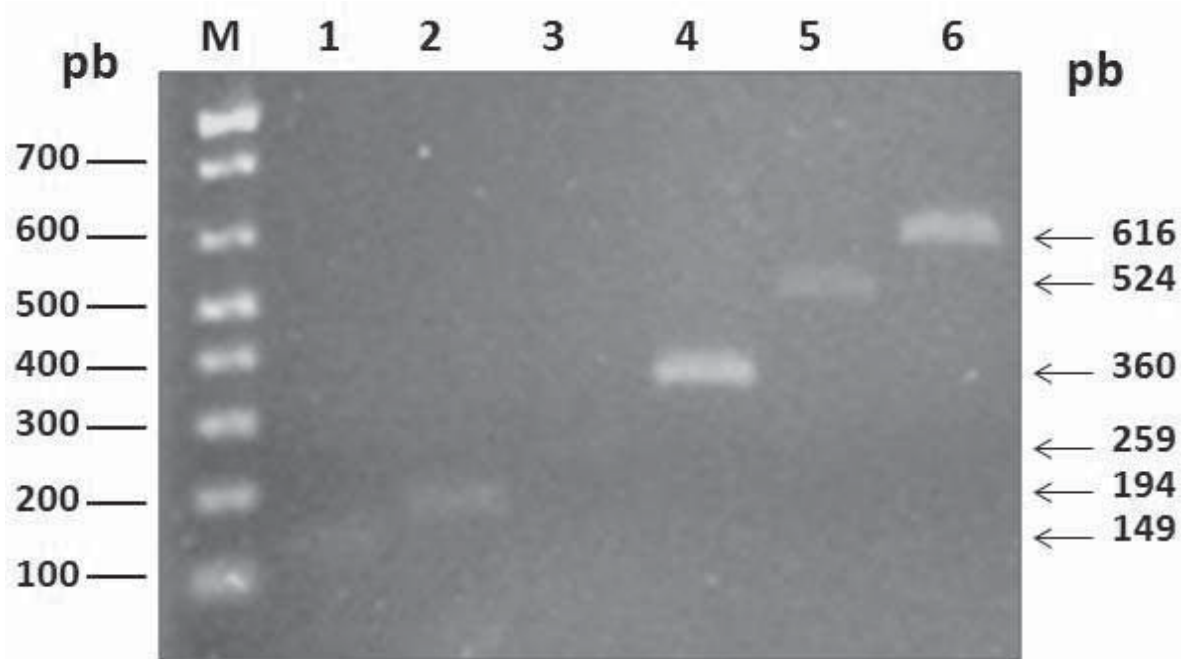


Figura 21. Amplificación de fragmentos del gen *chr3N* por PCR. Fotografía del gel de agarosa mostrando el corrimiento electroforético. M, marcador de tamaño molecular. Carriles 1-6, fragmentos amplificados por PCR de 149,194, 259, 360, 524 y 616 pb, respectivamente.

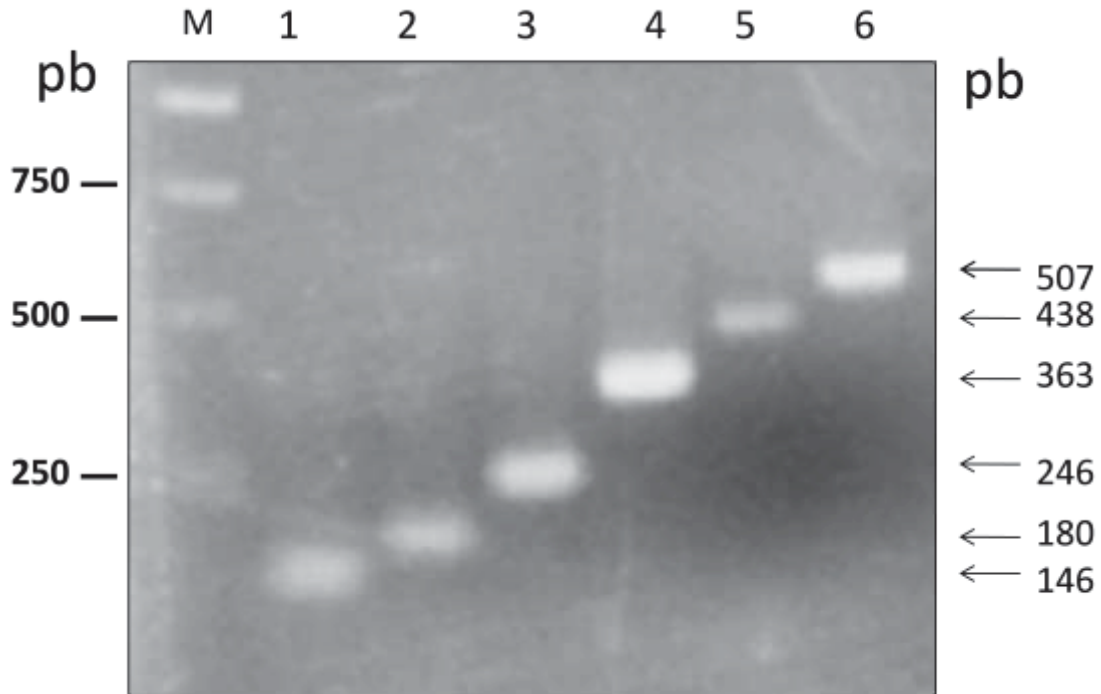


Figura 22. Amplificación de fragmentos del gen *chr3C* por PCR. Fotografía del gel de agarosa mostrando el corrimiento electroforético. M, marcador de tamaño molecular. Carriles 1-6, fragmentos amplificados por PCR de 146,180, 246, 363, 438 y 507 pb, respectivamente.

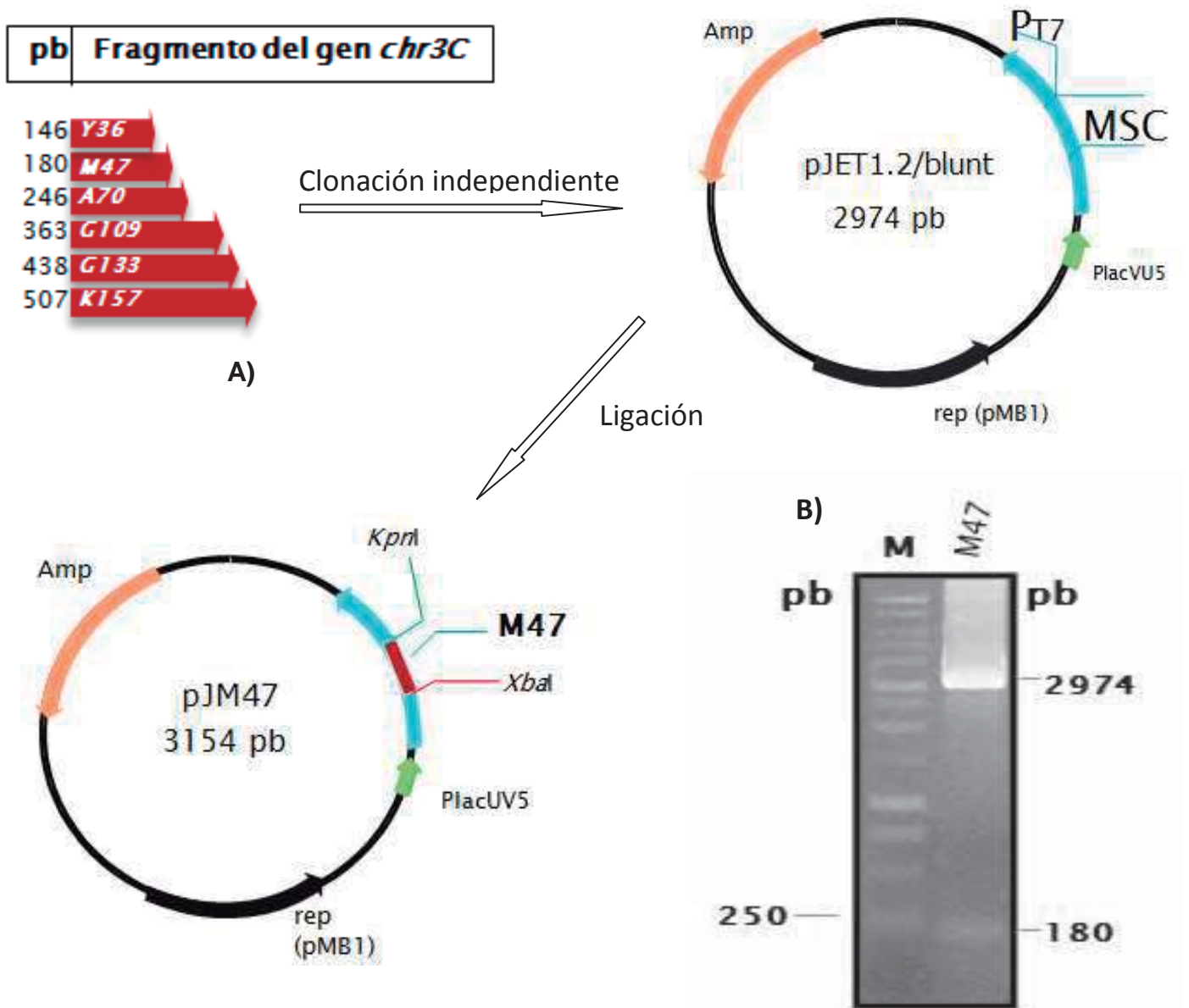


Figura 23. Construcción y caracterización de los plásmidos pJ. A) Esquema de la clonación de los fragmentos de PCR del gen *chr3C* en pJET1.2 Blunt para generar los plásmidos recombinantes pJ. B) Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, mercador de tamaño molecular 1 kb; carril 1, digestión con *KpnI* y *XbaI* del plásmido recombinante pJM47 que se muestra como ejemplo. A la derecha se indica el tamaño del vector linealizado (2974 pb) y del inserto (180 pb).

6. Construcción de fusiones traduccionales en los vectores pUCPphoA y pUCPlacZ

Se construyeron las fusiones en los vectores de expresión pUCPphoA y pUCPlacZ (**Fig. 12**). Los vectores se digirieron con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, lo cual liberó el gen de resistencia a kanamicina (Kan^r) y el resto del vector que posee el gen reportero *phoA* o *lacZ*; este último fragmento fue purificado y usado para las reacciones de ligación. Por otro lado, cada uno de los fragmentos de *chr3N* y *chr3C* fue recuperado por digestión con las mismas enzimas a partir de los plasmidos pJET. Se realizaron reacciones de ligación para la obtención de las fusiones traduccionales pUCchr::*phoA* (**Fig. 24**), las cuales poseen los vectores con el gen reportero ya sea *phoA* o *lacZ*, con cada uno de los fragmentos en estudio. Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron caracterizados con base en su patrón de restricción. Para el caso de las fusiones pUCchr::*phoA*, la digestión con *KpnI/XbaI* liberó un fragmento de 5.1 kb correspondiente al vector y de tamaño variable para los fragmentos correspondientes a los genes *chr3N* y *chr3C* ligados como se muestra en el ejemplo del fragmento S189 (**Fig. 25**). Para las fusiones en pUCchr::*lacZ* se liberan los fragmentos de 6.9 kb del vector y el de los fragmentos ligados como se muestra en el ejemplo representativo de la **Figura 25**.

7. Cuantificación de la actividad enzimática de las fusiones traduccionales

Una vez obtenidas las fusiones se procedió a cuantificar su actividad enzimática como se describió en Materiales y Métodos. La cuantificación de la actividad de

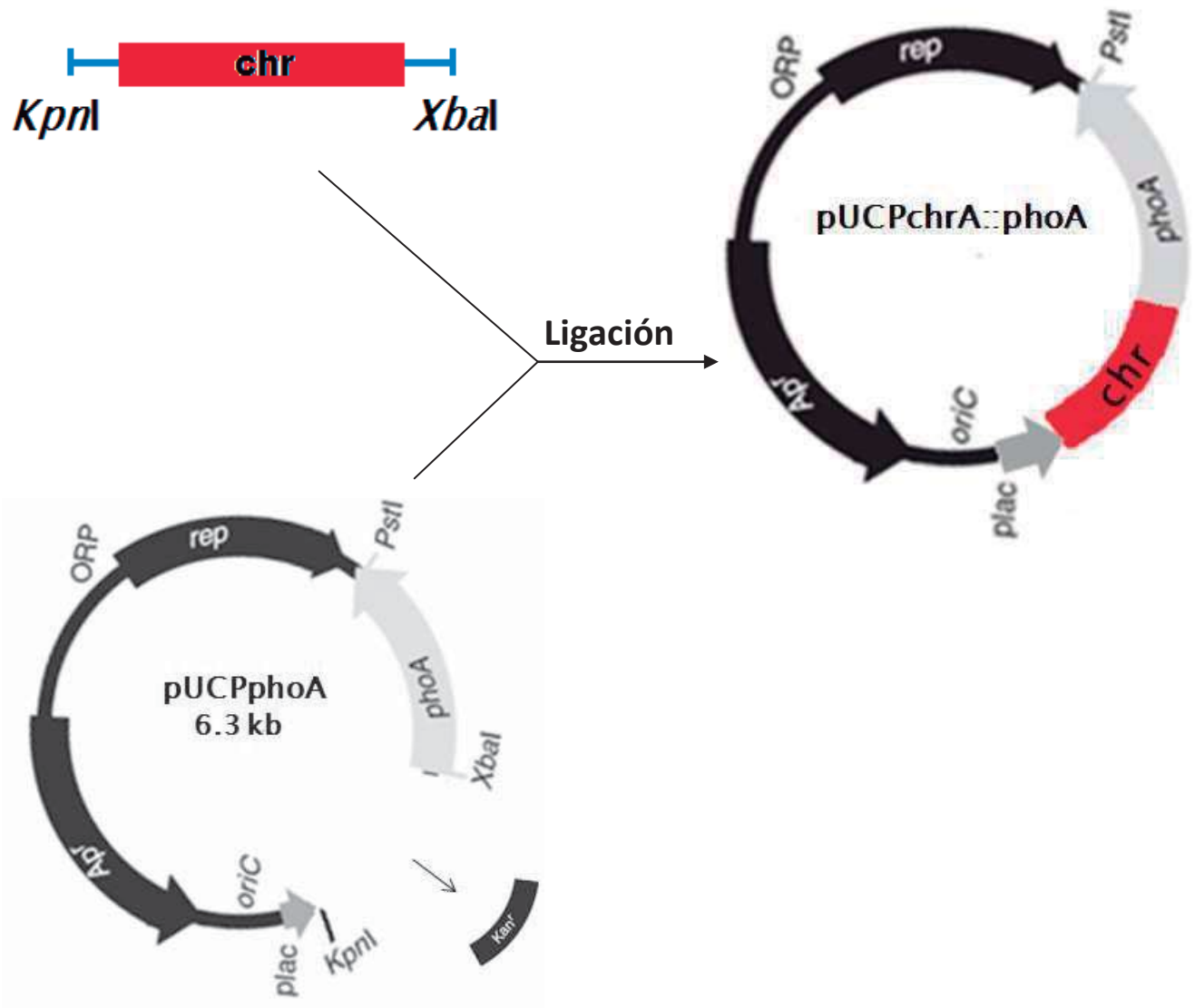


Figura 24. Construcción de fusiones traduccionales en el vector de expresión pUCPphoA. Chr representa cada uno de los fragmentos amplificados de los genes *chr3N* y *chr3C*. En la parte inferior se muestra la liberación de gen de kanamicina (*kan*) con las enzimas *KpnI* y *XbaI*. A la izquierda se representa el resultado de la clonación de un fragmento *chr* (de *chr3N* o de *chr3C*) en el vector de expresión con el gen reportero *phoA*.

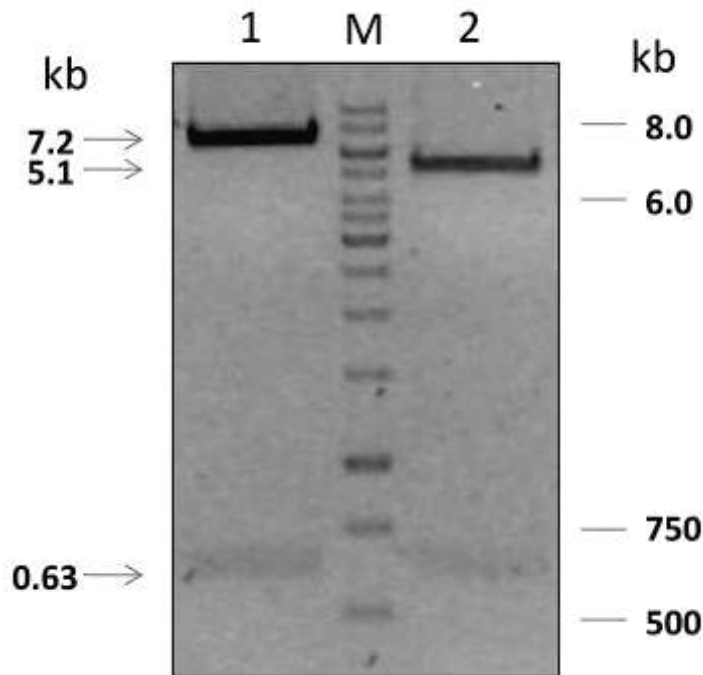


Figura 25. Caracterización de las fusiones traduccionales en los vectores pUCPlacZ y pUCPphoA. Fotografía de un gel de agarosa. Carril 1, Digestión de la fusión Ser189::*lacZ* con *KpnI* y *XbaI* que libera un fragmento correspondiente al vector pUCPlacZ y el fragmento de *chr3N* (Ser189); M, marcador de tamaño molecular; carril 2, digestión de la fusión S189::*phoA* con *KpnI* y *XbaI* que libera el fragmento correspondiente al vector pUCP*phoA* y el fragmento Ser189. A la izquierda se representan los tamaños de los vectores y del fragmento.

un total de 20 fusiones en las proteínas Chr3N y Chr3C, se realizó en la cepa *E. coli* CC118 (pUCchr::phoA) o (pUCchr::LacZ). Para establecer la relación entre la actividad de ambas enzimas reporteras en el mismo sitio de fusión, los datos de actividad fueron normalizados, tomando como 100% la fusión que presentó mayor actividad, ya sea con PhoA o con LacZ (Jiménez-Mejía y col., 2006). Los resultados de actividad obtenidos de las fusiones que fueron positivas para cada enzima reportera mostraron diferencias entre los valores de actividad, por lo que se estableció el criterio de tomar como resultado positivo sólo aquellas fusiones que presentaran actividad igual o mayor de 15% de cualquiera de las enzimas reporteras, como se reportó en Jiménez-Mejía y col., (2006).

a) Actividad PhoA/LacZ en fusiones de la proteína Chr3N

De las actividades determinadas correspondientes a la proteína Chr3N, las fusiones His106 (100%) e Ile161 (83%) mostraron actividad significativa de PhoA (**Fig. 26**). La actividad complementaria en la fusión Ile161 no produjo actividad significativa de LacZ, lo que indica que las regiones donde se localizan estos aminoácidos se encuentran en el periplasma. Por otra parte, las fusiones Asn37 (100%), Ile50 (58.4), Lys74 (26.03) mostraron actividad significativa de LacZ y no produjeron actividad significativa de PhoA (**Fig. 26**), lo cual indica que estas regiones se localizan en el citoplasma. Por su parte, las fusiones en los aminoácidos Leu137 y Ser189, en los que se fusionó únicamente *phoA*, no mostraron un valor significativo de PhoA, lo que indica que estas regiones se localizan en el citoplasma (**Fig. 26**).

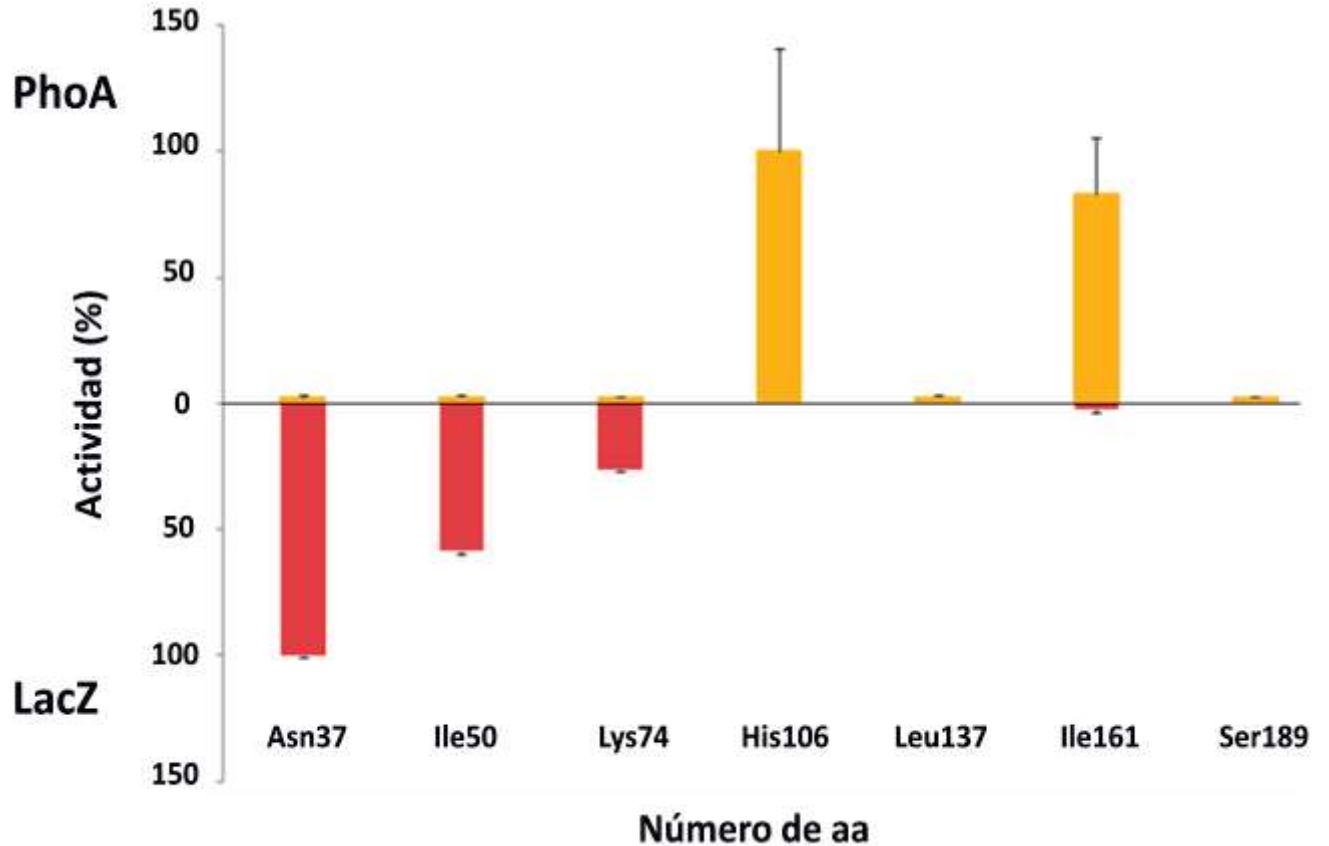


Figura 26. Actividad de las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa de las fusiones de Chr3N. En la parte inferior de la gráfica se indica el número de los aminoácidos donde fueron construidas las fusiones. En la parte superior se muestra la actividad normalizada de PhoA (barras amarillas) y en la parte inferior la actividad normalizada de LacZ (barras rojas). Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces y con las barras se indica la desviación estándar.

b) Actividad PhoA/LacZ en fusiones de la proteína Chr3C

Los resultados de la actividad en las fusiones de la proteína Chr3C fueron los siguientes: las fusiones Tyr36 (77%), Met47 (88%) y Gly133 (100%) presentaron actividad significativa de PhoA. De estas, sólo se midió actividad de LacZ a la fusión Met47 la cual no mostró actividad significativa, lo que indica que estas regiones se localizan en el periplasma. La fusión Lys157 (100%) presentó actividad significativa de LacZ y no mostró actividad significativa de PhoA, al igual que la fusión Gly109 en la que sólo se midió la actividad de esta última enzima, lo que indica que estos residuos se localizan en el citoplasma. En el caso de la fusión Ala70 no se obtuvo actividad significativa de LacZ ó de PhoA. Lo cual sugiere que el aminoácido se localiza en un STM o bien se encuentra interaccionando con la membrana (**Fig. 27**).

8. Localización de las fusiones en el modelo topológico de la proteína Chr3N

Una vez obtenidas las actividades enzimáticas de las fusiones, se localizaron los sitios de fusión en el modelo topológico de seis STM propuesto para Chr3N (**Fig. 13**). Los resultados obtenidos de las fusiones construidas hacia el extremo carboxilo terminal (Lys74, His106, Ile161 y Ser189) en la proteína Chr3N concuerdan con el modelo topológico predicho de seis STM (**Fig. 13**). Sin embargo, las fusiones Asn37 e Ile50, localizadas en el asa periplásmica 1 (P1), sólo presentaron actividad significativa de LacZ, lo cual indica que esta región está localizada en el citoplasma y no en el periplasma (**Fig. 13**). Con los resultados

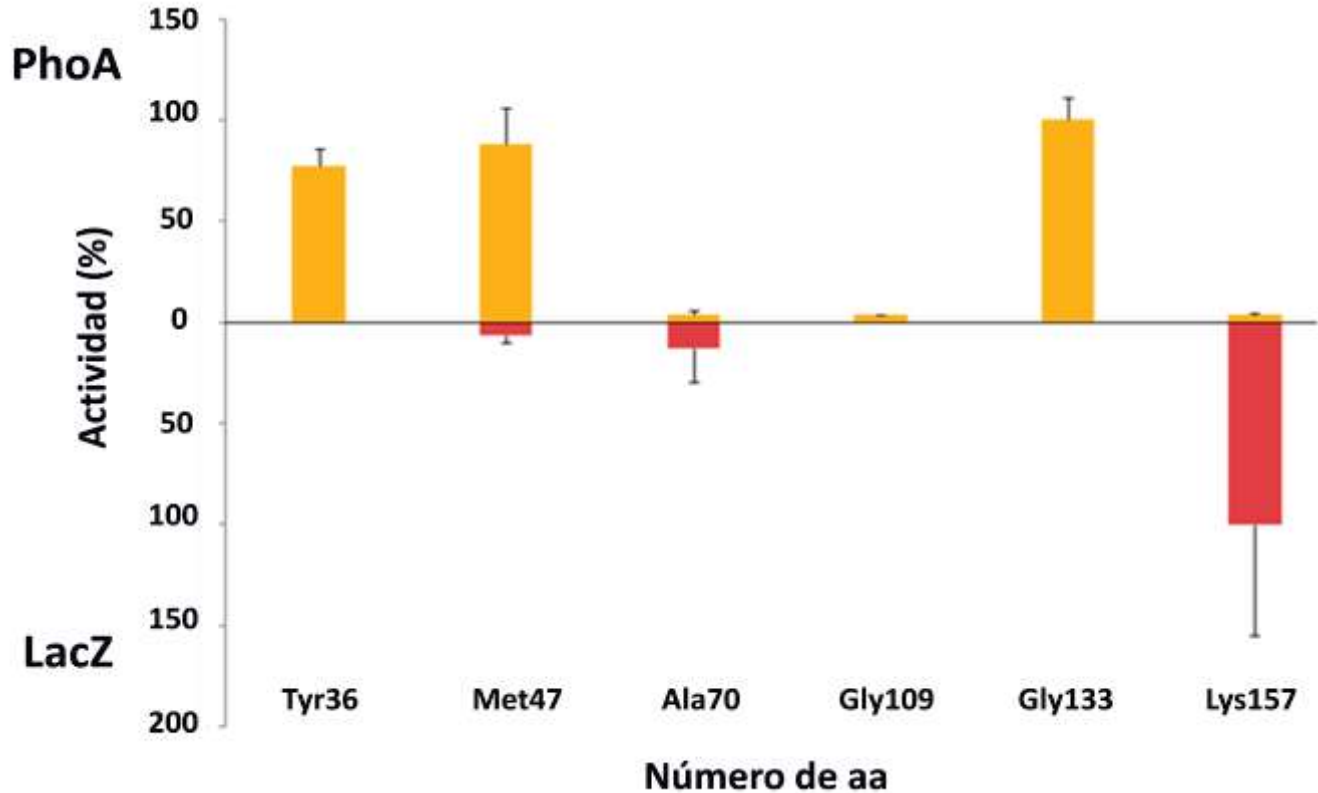


Figura 27. Actividad de las enzimas reporteras fosfatasa alcalina y β -galactosidasa de las fusiones de Chr3C. En la parte inferior de la gráfica se indica el número de los aminoácidos donde fueron construidas las fusiones. En la parte superior se muestra la actividad normalizada de PhoA (barras amarillas) y en la parte inferior la actividad normalizada de LacZ (barras rojas). Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces y con las barras se indica la desviación estándar.

obtenidos se construyó un nuevo modelo de cinco STM. En este modelo se observan dos asas citoplásmicas y dos asas periplásmicas, con el extremo amino localizado en el periplasma y su extremo carboxilo en el citoplasma (**Fig. 28**).

9. Localización de las fusiones en el modelo topológico de la proteína Chr3C

Una vez obtenidas las actividades enzimáticas de las fusiones en Chr3C se localizaron los sitios de fusión en el modelo topológico de seis STM (**Fig. 14**). Los resultados de actividad obtenidos de las fusiones diseñadas hacia el extremo carboxilo de Chr3C (Gly109, Gly133 y Lys157), correspondieron con el modelo propuesto mediante el perfil hidropático (**Fig. 14**). Sin embargo, las fusiones en los aminoácidos Tyr36 y Met47 predichas en el asa citoplásmica 1 (C1), sólo produjeron actividad significativa de PhoA, lo cual indica que esta región debería estar en el periplasma y no en el citoplasma como se predijo en el perfil hidropático (**Fig. 14**). Por su parte, la fusión Ala70 no presentó actividad significativa de ninguna de las enzimas reporteras; sin embargo, los resultados de actividad obtenidos con PhoA en las fusiones Tyr36 y Met47, sugieren que esta región se localiza en el interior de un STM o interaccionando con la membrana lipídica. Con los resultados obtenidos se construyó un nuevo modelo de cinco STM para la proteína Chr3C. El modelo topológico consta de dos asas citoplásmicas y dos periplásmicas, con su extremo amino localizado en el citoplasma y su extremo carboxilo localizado en el periplasma (**Fig. 29**).

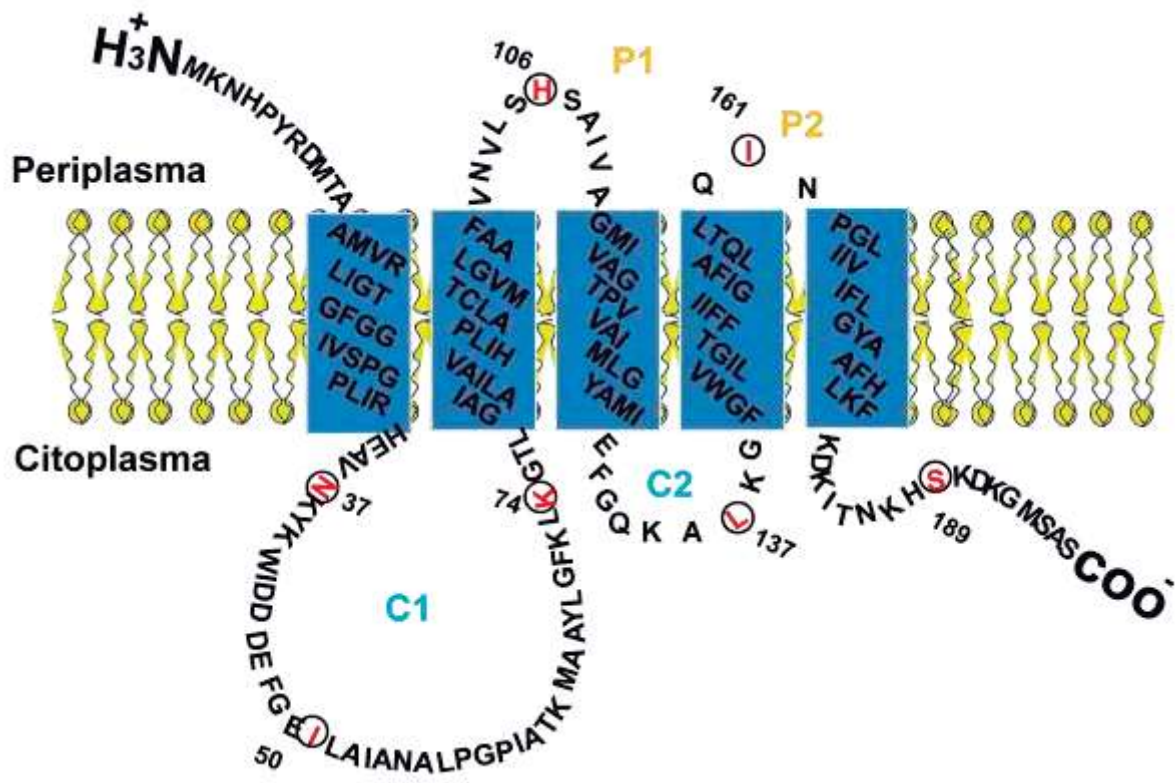


Figura 28. Modelo topológico de Chr3N. Se muestra el modelo de cinco STM representados por los rectángulos conectados por dos asas periplásmicas (P1 y P2) y dos asas citoplásmicas (C1 y C2), con el extremo amino localizado en el periplasma y el carboxilo en el citoplasma. En círculos se representa la localización de los sitios de fusión a partir de los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos.

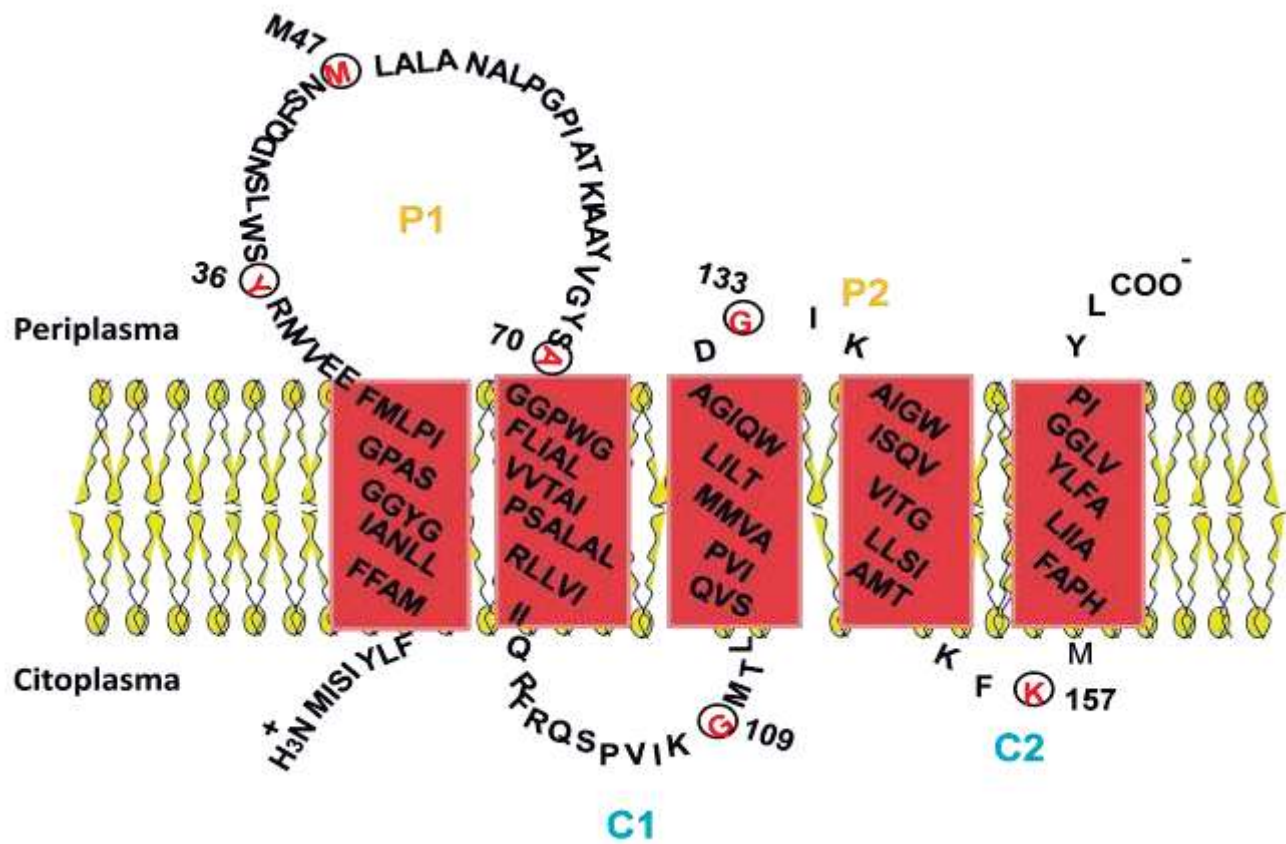


Figura 29. Modelo topológico de Chr3C. Se muestra el modelo de cinco STM representados por los rectángulos conectados por dos asas periplásmicas (P1 y P2) y dos asas citoplásmicas (C1 y C2), con el extremo amino localizado en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma. En círculos se representa la localización de los sitios de fusión a partir de los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos.

Los resultados obtenidos a partir de las actividades enzimáticas en las fusiones de las proteínas Chr3N y Chr3C permitieron establecer un modelo topológico de cinco STM para cada una de las proteínas en la que Chr3N mantiene su extremo amino localizado en el periplasma, mientras que en la proteína Chr3C el extremo amino se localiza en el citoplasma, la diferencia en la localización de los extremos en cada una de las proteínas permite establecer una topología inversa de las proteínas en la membrana celular (**Figs. 28 y 29**).

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El gen *chrA* del plásmido pUM505 codifica la proteína hidrofóbica ChrA de 416 aminoácidos, la cual confiere resistencia a cromato en *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990). El mecanismo de resistencia conferido por ChrA está basado en la expulsión de iones de cromato en un proceso dependiente de la energía generada por el potencial de membrana (Pimentel y col., 2002). A partir de un análisis de proteínas homólogas a ChrA de *P. aeruginosa*, se encontraron 135 secuencias como miembros de la superfamilia CHR (Díaz-Pérez y col., 2007). De éstas, 77 pertenecen a proteínas de cadena larga o bidominio (LCHR) y 58 secuencias de cadena corta o monodominio (SCHR), organizadas como pares de genes en tándem y agrupadas en tres subfamilias (SCHR1-SCHR3). Se identificaron pocas excepciones de organismos con sólo una copia de genes *chrA* monodominio (Díaz-Pérez y col., 2007). Este hecho sugiere fuertemente que: a) las proteínas SCHR no son funcionales como monómeros; y b) la fusión de un par de genes *chrA* monodominio generó las LCHR bidominio.

Los transportadores de membrana frecuentemente comprenden entre diez y catorce segmentos transmembranales (STM) (Saier y col., 2003). Sin embargo, también han sido reportados transportadores con 13 STM (Jung y col., 1998; Jiménez-Mejía y col., 2006). Las proteínas de membrana con 12 STM son bastante comunes y se ha propuesto que éstas evolucionaron por un evento de duplicación interna a partir de genes ancestrales que codifican proteínas con seis STM (Paulsen y col., 1996). Este evento evolutivo ha sido propuesto para las proteínas transportadoras de la familia CHR (Nies y col., 1998; Saier, 2003), la

cual incluye a la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos mostró homología entre las mitades N-terminal y C-terminal de ChrA: la mitad N-terminal (aminoácidos 25 al 203), mostró un 26/43% de identidad/similitud con la mitad C-terminal (aminoácidos 236 al 411). Por lo que se estableció que la estructura actual de ChrA es el resultado de un evento de duplicación intragénica y posterior fusión, en la que los STM I-VI, que forman la mitad N-terminal, muestran similitud con los STM VIII-XIII, correspondientes a la mitad C-terminal. Sin embargo cuando se determinó la topología de la proteína mediante fusiones traduccionales, se encontró que los STM equivalentes de las mitades amino y carboxilo presentaron una orientación antiparalela. Es decir, cada uno de los STM en el dominio amino terminal cruzan la membrana celular en dirección opuesta a los STM homólogos en el dominio carboxilo terminal (Jiménez-Mejía y col., 2006).

En un trabajo reciente se determinó que *B. subtilis* 168 es más resistente a cromato que *E. coli* W3110, y que esta resistencia se debe a la pareja de genes en tándem *chr3N* y *chr3C* presentes en el cromosoma de *B. subtilis*. Estos genes codifican las proteínas homólogas Chr3N y Chr3C, pertenecientes a la subfamilia SCHR3 (Díaz-Magaña y col., 2009). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Chr3N y Chr3C mostró un 34% de identidad y un 54% de similitud entre ellas. Cuando se determinó la función de los genes *chr3N* y *chr3C* de *B. subtilis* se encontró que únicamente cuando se expresaron en pareja fueron capaces de conferir resistencia a cromato en *E. coli* (Díaz-Magaña y col., 2009) mientras que cuando fueron expresados de manera individual no fueron capaces de conferir resistencia al ion tóxico. Esto sugirió que las proteínas codificadas por

los genes *chr3N* y *chr3C* interactúan para formar heterodímeros en la membrana de la célula para llevar a cabo la expulsión de cromato. Tomando en cuenta que se trata de proteínas homólogas, se esperaba encontrar que la inserción de los STM en cada proteína, esto es su topología membranal, se llevara a cabo en un mismo sentido en ambas proteínas. Sin embargo, el análisis de la localización de los residuos positivos predijo una orientación opuesta de los STM de Chr3N con respecto a Chr3C (**Fig. 9**). Situación similar a la encontrada en las mitades N y C terminales de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*.

El objetivo de este trabajo fue determinar el arreglo estructural de las proteínas homólogas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis* y con ello determinar si interactúan entre sí para formar un sistema funcional de transporte de cromato en la célula.

Para determinar la interacción entre las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis*, se realizaron corrimientos electroforéticos en SDS-PAGE y de detección por Western blot a partir de extractos celulares de las cepas de *E. coli* BL21 ó *E. coli* XL10 GOLD con los plásmidos recombinantes pTrSN ó pTrSC. Estos plásmidos recombinantes fueron obtenidos mediante la clonación de las regiones codificantes de los genes *chr3N* y *chr3C* en el vector pTrcHis C (**Figs. 15 y 16**) respectivamente, el cual ha sido ampliamente utilizado para la sobreexpresión de proteínas bajo el control de un promotor fuerte (*trc*) inducible con IPTG. Adicionalmente, los vectores pTrcHis2C añaden una etiqueta de seis histidinas hacia el extremo amino de la proteína expresada. La etiqueta de histidinas funciona como epítipo para el reconocimiento por el reactivo HisProbe-HRP que reacciona como un anticuerpo en la detección de las proteínas por Western blot. Los ensayos de expresión y detección realizados estuvieron encaminados a

localizar alguna banda de proteína diferencial que sugiriera la presencia de las proteínas Chr3N y Chr3C en los extractos celulares de *E. coli* que poseen los plásmidos recombinantes.

Existen algunos factores que dificultan ya sea la purificación o la detección de proteínas de membrana. Un aspecto importante es la baja expresión de algunas proteínas de membrana, lo cual dificulta su visualización en los corrimientos electroforéticos y por lo tanto su detección (Aguilar-Barajas, 2010). Para tratar de eludir esta dificultad, las regiones codificantes de los genes *chr3N* y *chr3C* se clonaron en distintos vectores de expresión bajo el control de diferentes promotores, mediante los cuales se puede regular la expresión, así como mediante la adición de epítopes en ambos extremos de las proteínas clonadas. Se emplearon además distintas cepas de *E. coli* las cuales poseen características particulares que favorecen la sobreexpresión de proteínas, como la cepa BL21 que permite una alta eficiencia de expresión de cualquier gen que se encuentre bajo el control del promotor T7. *E. coli* BL21 es una cepa deficiente en las proteasas *lon* y *ompT* y contiene el plásmido pLysS en el que se encuentra el gen que codifica la lisozima T7 la cual disminuye la expresión basal de los genes bajo el control del promotor T7 sin interferir en la expresión post-inducción. Otra cepa utilizada fue XL10 GOLD, que es deficiente en todos los sistemas de restricción [$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$], en la endonucleasa (*ednA*) y en los sistemas de recombinación (*recA*), lo que permite asegurar la estabilidad de los insertos expresados, además de poseer el fenotipo *Hte* que incrementa la eficiencia de transformación de moléculas grandes de DNA ligado. Sin embargo,

aun con las modificaciones antes mencionadas no fue posible expresar las proteínas Chr3N y Chr3C (**Fig. 19**).

También se trató de detectar las proteínas Chr3N y Chr3C en extractos de las cepas *E. coli* XL10 Gold (pQE3N8H) y de *E. coli* BL21 (pTr3NH6), en las cuales las regiones codificantes de los genes *chr3N* y *chr3C* fueron clonados en el vector pTrcHis2A, que adiciona a la proteína expresada una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo. Sin embargo, aun con estas modificaciones, no fue posible detectar las proteínas SCHR de *B. subtilis*, empleando anticuerpos anti-His (HisProbe-HRP) (**Fig. 20**). Una propuesta derivada de estos resultados es que probablemente las proteínas se encuentren en la membrana en muy baja cantidad, razón por la cual no ha sido posible su detección.

Otro factor importante que limita su detección es la baja solubilidad de las proteínas de membrana, ya que se encuentran en un ambiente altamente hidrofóbico, por lo que es necesario emplear detergentes para solubilizarlas (Wang y col., 2003). Para tratar de solucionar este problema se utilizó el detergente DDM para la solubilización de las proteínas Chr3N y Chr3C. Sin embargo, aún en estas condiciones no fue posible obtener bandas diferenciales en los corrimientos electroforéticos.

Aunque se exploraron diferentes condiciones de aislamiento y purificación, las cuales se han empleado para otros transportadores de membrana (Wang y col., 2003), las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis* no se lograron expresar o detectar en este trabajo. Una situación similar sucedió con las proteínas homólogas de la familia LCHR, ChrA de *C. metallidurans* (Juhnke, 2004) y ChrA

de *P. aeruginosa* (Aguilar-Barajas, 2010), las cuales tampoco han podido ser detectadas.

Es posible que al ser expresadas de manera independiente las proteínas SCHR, como fue el caso de este trabajo, no sean capaces de insertarse de manera correcta en la membrana celular, lo cual provocaría su inestabilidad estructural haciéndolas probablemente susceptibles a la degradación por proteasas. Con estos resultados se concluyó que no fue posible detectar las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis* con las herramientas utilizadas en este trabajo.

A la fecha existen métodos moleculares para el estudio de proteínas de membrana que permiten entender aspectos importantes sobre la organización estructural y su mecanismo de acción. Un aspecto fundamental para entender la estructura de proteínas de membrana es conocer su topología, es decir el número de STM y su orientación en la membrana. Mediante el análisis topológico de un transportador de membrana se puede conocer la localización de residuos o regiones esenciales para la función o para la correcta estructura de la proteína. Las técnicas bioquímicas usadas para el análisis de la topología de proteínas de membrana están basadas en la modificación de los genes estructurales que codifican a esas proteínas (Van Geest y Lolkema, 2000). La estrategia más ampliamente utilizada consiste en el diseño de fusiones traduccionales, en las que un gen que codifica una proteína reportera se fusiona a diferentes sitios del gen que codifica la proteína de membrana en estudio; la actividad resultante de las proteínas de fusión indica en qué lado de la membrana (citoplasma o periplasma) se localiza la fusión (Manoil, 1990).

Para determinar la topología de las proteínas SCHR, y con base en el modelo predicho mediante el perfil hidropático (**Fig. 8**), en este trabajo se seleccionaron los sitios para la construcción de fusiones traduccionales con las proteínas reporteras fosfatasa alcalina (PhoA) y β -galactosidasa (LacZ) (**Figs. 13 y 14**). El criterio para la selección de los sitios de fusión fue que cada una de las asas hidrofílicas predichas tuviera al menos una fusión. En total se seleccionaron siete sitios de fusión en la proteína Chr3N y seis en la proteína Chr3C. La distribución de los sitios se eligió partiendo de la probable asa periplásmica 1 o citoplásmica 1 (P1 o C1) y hacia el extremo carboxilo en las proteínas Chr3N y Chr3C (**Figs. 13 y 14**), respectivamente.

Primero se amplificaron por PCR cada uno de los fragmentos de los genes *chr3N* y *chr3C* a partir del DNA cromosómico de *B. subtilis* 168, utilizando los oligonucleótidos enlistados en las Tablas 1 y 2, y se ligaron en los vectores de expresión pUCPphoA y pUCPlacZ (**Fig. 24**). Para comprobar que se conservó un solo marco de lectura entre los genes *chr3N* y *chr3C* y los genes reporteros, las regiones donde ocurrieron las fusiones traduccionales fueron secuenciadas, con lo que se confirmó los genes *chr3N* y *chr3C* y el gen reportero de interés mantuvieron un mismo marco de lectura. Para la medición de la actividad enzimática de cada una de las 13 fusiones traduccionales, éstas fueron transferidas a *E. coli* CC118 (cepa deficiente en los genes *phoA* y *lacZ*).

De acuerdo a los resultados de actividad obtenidos con PhoA y LacZ, las fusiones se clasificaron en dos grupos para la proteína Chr3N (**Fig. 26**). El primer grupo comprendió las fusiones que sólo presentaron actividad de PhoA (His106 e

Ile161), por lo que a estos sitios se les asignó una localización periplásmica (**Fig. 28**). En el segundo grupo se encuentran las fusiones que sólo presentaron actividad de LacZ (Asn37, Ile50 y Lys74), por lo que a estos sitios se les asignó una localización citoplásmica (**Fig. 28**).

En la proteína Chr3C, los resultados de actividad dividieron a las fusiones en tres grupos (**Fig. 27**): En el primero se presentan las fusiones que sólo presentaron actividad de PhoA (Tyr36, Met47 y Gly133), por lo que a estos sitios se les asignó una localización en el periplasma (**Fig. 29**). El segundo grupo lo conforma la fusión que sólo presentó actividad de LacZ (Lys157), de manera que a este sitio se le asignó una localización en el citoplasma (**Fig. 29**). El tercer grupo lo conforma una fusión que no produjo actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras (Ala70). Este resultado sugiere que la región donde se localiza la alanina 70 se encuentra formando parte de un STM o interaccionando con la membrana, de tal forma que las enzimas reporteras probablemente no son activas debido a que la interacción con la bicapa lipídica no les permite una conformación correcta. Casos en los que no se ha obtenido actividad con ninguna de las dos enzimas reporteras se han reportado para otros transportadores, en donde no se logró determinar la localización precisa de ciertos sitios y se propuso que los sitios se localizaban cerca o dentro de un STM (Georgiou y col., 1988, Rensing y col., 1997).

Una vez obtenidos los resultados de actividad de PhoA y LacZ, se comparó la localización de los sitios en los que fueron construidas las fusiones traduccionales en el modelo topológico de seis STM predicho de acuerdo a la información del

perfil hidropático de las proteínas Chr3N y Chr3C (**Figs. 13 y 14**), respectivamente.

De acuerdo a las actividades en Chr3N, las fusiones se localizaron como sigue: las fusiones en His106 e Ile161 presentaron actividad con PhoA, por lo que estos sitios deben localizarse en las asas periplásmicas dos y tres (P2 y P3) (**Fig. 28**). Este resultado concuerda con el modelo predicho de seis STM (**Fig. 13**). Sin embargo, las fusiones en los aminoácidos Asn37 e Ile50 no presentaron actividad significativa de PhoA y sí presentaron actividad significativa de LacZ, lo que contrasta con la predicción de estos sitios en el asa P1 del modelo de seis STM (**Fig. 28**). De igual forma, las fusiones restantes (Lys74, Leu137 y S189), mostraron una localización en el periplasma de acuerdo a los ensayos de actividad con PhoA y LacZ (**Fig. 28**). Estos resultados claramente indican que la proteína Chr3N presenta una topología membranal de cinco STM conectados por dos asas periplásmicas y dos asas citoplásmicas con el extremo amino localizado en el periplasma y el extremo carboxilo localizado en el citoplasma (**Fig. 28**). Esta topología es claramente distinta a la predicha mediante el perfil hidropático (**Fig. 13**).

Por otra parte, y de acuerdo a las actividades enzimáticas, las fusiones en Chr3C se localizaron como sigue: la fusión Gly133 presentó actividad con PhoA, por lo que esta fusión se localizó en el periplasma (**Fig. 29**). La fusión Lys157 presentó actividad de LacZ y no presentó actividad significativa de PhoA. Mientras que la fusión Gly109 no presentó actividad significativa de PhoA, lo que permite localizar estas fusiones en el citoplasma (**Fig. 29**). Por lo tanto, la localización de estos

residuos concuerda con la predicción del modelo predicho de seis STM (**Fig. 14**). Mientras tanto, las fusiones Tyr36 y Met47 presentaron actividad de PhoA, y Met47 no presentó actividad significativa de LacZ (**Fig. 29**). Este resultado mostró una localización opuesta de estos residuos (**Fig. 29**), con respecto a la predicción en el asa C1 de acuerdo al modelo predicho de seis STM (**Fig. 14**). Con estos resultados se estableció que la proteína Chr3C presenta una topología membranal distinta a la que se propuso mediante el perfil hidropático, de cinco STM conectados por dos asas periplásmicas y dos asas citoplásmicas, con el extremo amino localizado en el citoplasma y el extremo carboxilo localizado en el periplasma (**Fig. 29**).

Con estos resultados se puede ver que la predicción de los últimos cuatro STM tanto en Chr3N como en Chr3C concuerda con las actividades enzimáticas obtenidas de acuerdo al modelo predicho mediante el perfil hidropático (**Figs. 13 y 14**). Sin embargo, en la fusión Ala70 no se obtuvo actividad con ninguna de las enzimas reporteras lo cual dificulta la localización del STM II en el modelo de cinco STM de Chr3C. Por otra parte, la actividad de PhoA en Tyr36 y Met47, así como la falta de actividad de Gly109, sugieren que entre estas dos regiones se localiza un STM. Con base en nuestros resultados y en los antecedentes presentados fue posible establecer que la proteína Chr3C presenta una topología membranal diferente a la que se propuso mediante el perfil hidropático. Un caso similar al de la proteína Chr3C fue reportado durante la determinación de la topología de la proteína transportadora de níquel de ocho STM NixA (Fulkerson y col., 2000). En este caso, las actividades de las fusiones para el STM VIII y la región hidrofílica

periplásmica que lo conecta fueron difíciles de interpretar estrictamente como región hidrofílica o STM, debido a los resultados de actividad ambiguos obtenidos en las fusiones diseñadas en ambas regiones de la proteína. Sin embargo, los resultados de las fusiones aledañas permitieron proponer la existencia del STM VIII en NixA (Fulkerson y col., 2000).

Con nuestros resultados, se estableció que las proteínas Chr3N y Cr3C constan de cinco STM cada una. Encontrando que en Chr3N estos segmentos se conectan por dos asas periplásmicas y dos asas citoplásmicas con su extremo amino orientado hacia el periplasma y el extremo carboxilo hacia el citoplasma (**Fig. 28**). Mientras que en Chr3C los STM se conectan también por dos asas periplásmicas y dos asas citoplásmicas, pero con el extremo amino en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma (**Fig 29**). De acuerdo a los resultados de actividad y al comparar el esquema de la topología en ambas proteínas, se estableció que la orientación de los STM en la membrana es antiparalela en Chr3N con respecto a Chr3C (**Fig. 30**).

Existen reportes de proteínas con topología antiparalela. Entre éstas se encuentran proteínas pertenecientes a la familia DUF606, cuya función hasta la fecha no se conoce (Lolkema y col., 2008). Dentro de esta familia se encuentran transportadores de membrana formados por dos proteínas homólogas, cada una de cinco STM, los cuales según los análisis informáticos se insertan en la membrana celular orientados en forma antiparalela. Sin embargo, hasta la fecha son pocos los ejemplos que se conocen de proteínas homólogas con topología antiparalela en las que se haya realizado un análisis topológico de forma

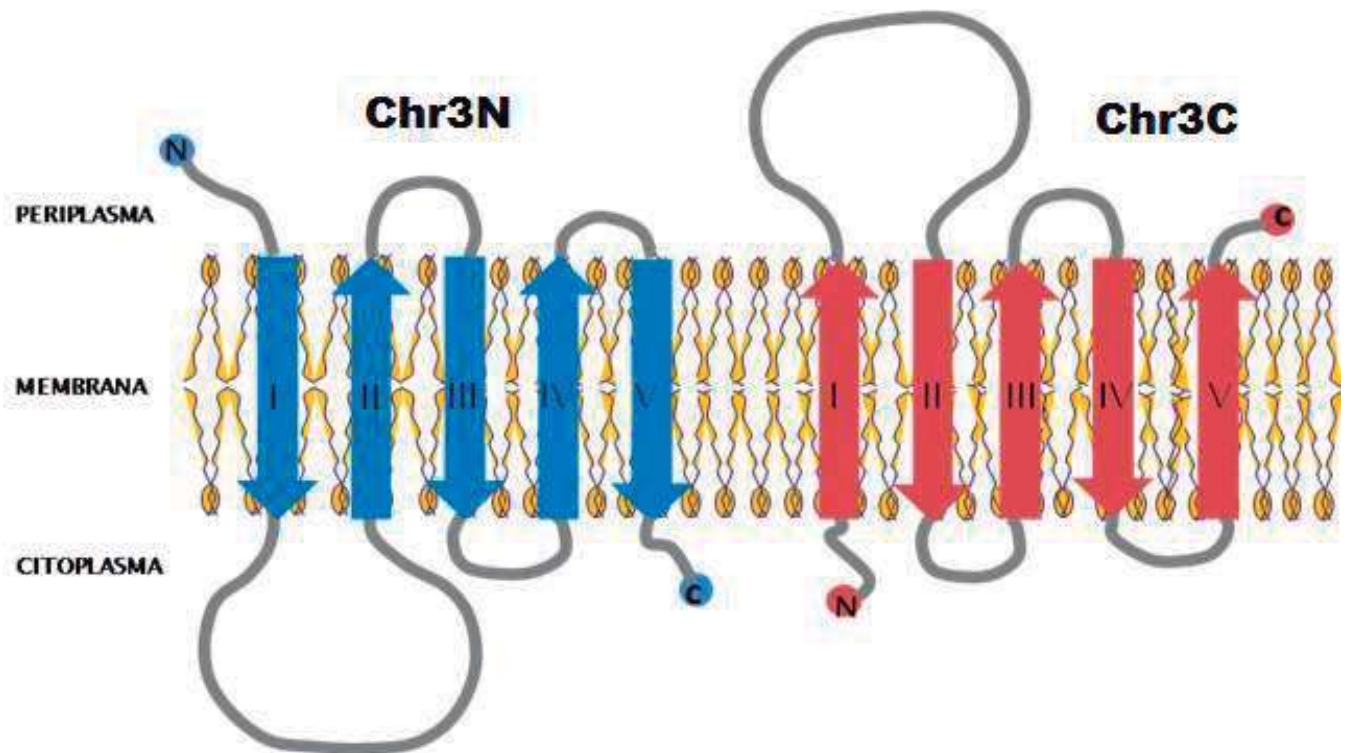


Figura 30. Topología antiparalela de las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis* 168. Se muestra la topología de cinco STM para las proteínas Chr3N, con el extremo amino hacia el periplasma y el extremo carboxilo hacia el citoplasma y la proteína Chr3C, la cual posee su extremo amino orientado hacia el citoplasma mientras que su extremo carboxilo se localiza en el periplasma. Nótese que los STM representados con flechas en cada una de las proteínas presentan una orientación opuesta

experimental. Algunas de las proteínas reportadas con topología membranal antiparalela pertenecen a la familia de proteínas pequeñas de resistencia a multidrogas (SMR), las cuales están compuestas de dos o más polipéptidos que poseen típicamente un tamaño de 100-120 aminoácidos, en el que cada polipéptido forma cuatro STM y funcionan como oligómeros para llevar a cabo su función (Kikukawa y col., 2007). Estudios recientes indican que parejas de proteínas homólogas SMR, tales como YkkC/YkkD de *B. subtilis* y YdgE/YdgF de *E. coli*, se combinan para formar transportadores activos, posiblemente como heterodímeros (Rapp y col., 2006). Datos experimentales en los que se determinó la tendencia de residuos positivos en las asas hidrofílicas de YdgE/YdgF, sugieren que YdgE se inserta formando una estructura con una asa periplásmica, dos asas citoplásmicas y ambos extremos amino y carboxilo se orientan hacia el periplasma, mientras que para YdgF se predicen dos asas en el periplasma y una en el citoplasma, con sus dos extremos en el citoplasma (Rapp y col., 2006). Al diseñar un modelo de la pareja de proteínas en la membrana se pudo determinar que los STM en cada una de ellas adopta una orientación antiparalela en la membrana celular (Rapp y col., 2006).

Se ha reportado que el genoma de *B. subtilis* contiene los genes en tándem *ebrA* y *ebrB*, los cuales codifican dos homólogos pertenecientes a la familia de transportadores SMR que expulsan multidrogas (Masaoka y col., 2000). Tanto los perfiles de resistencia a drogas como los experimentos de unión a éstas mostraron que la presencia tanto de la proteína EbrA como de EbrB es necesaria para la función de transporte (Zhang y col., 2007). Estas dos proteínas homólogas

interactúan entre sí y se combinan para generar un transportador funcional en la membrana celular (Zhang y col., 2007). En un trabajo reciente se determinó mediante análisis de topología membranal que las proteínas de membrana EbrA y EbrB poseen una orientación opuesta de los STM en la membrana celular (Kikukawa y col., 2007).

Aun cuando los STM de las proteínas Chr3N y Chr3C mantienen una orientación antiparalela, como se mostró en la predicción informática realizada por Riveros-Rosas (datos no publicados), el número de STM es diferente al que se predijo mediante el perfil hidropático. Este resultado permite proponer la pérdida de un STM en tanto en Chr3N como en Chr3C a lo largo de la evolución, probablemente mediante la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos, que formaban parte de un STM, por aminoácidos hidrofílicos. Se ha encontrado que regiones que formaban STM de algunas proteínas a lo largo de la evolución incrementaron su hidrofiliidad, de manera que ahora se localizan en el citoplasma. Un ejemplo es la proteína ChrA de *C. metallidurans* (Nies y col., 1998) cuyo origen se propuso a partir de un evento de duplicación y posterior fusión de un gen que codifica una proteína con seis STM. En este trabajo se encontró, mediante fusiones traduccionales, que ChrA consiste de dos partes en las cuales, la correspondiente al dominio amino posee cuatro STM, mientras que la correspondiente al dominio carboxilo se compone de seis STM (Nies y col., 1998). Así, se propuso que durante el curso de la evolución ChrA pudo haber perdido los primeros dos STM en el extremo amino por sustitución de aminoácidos hidrofóbicos por aminoácidos hidrofílicos en la proteína ancestral de 12 STM (Nies y col., 1998).

Una topología de membrana invertida puede sugerir que las mitades o dominios N y C terminales de un transportador poseen diferente función. En relación con esta hipótesis, se encontró que las mitades amino y carboxilo terminal de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* mostraron significativa homología de secuencia de los STM I, II, III, IV, V y VI con los STM VIII, IX, X, XI, XII y XIII, respectivamente, aunque con orientaciones opuestas en la membrana. Este antiparalelismo sugiere que ChrA evolucionó de la duplicación de un gen codificante de una proteína ancestral de seis STM, seguido por la inserción de un STM (VII) extra. Estos datos también sugieren que las dos mitades de ChrA pueden llevar a cabo diferente función durante el transporte de cromato, ya que las regiones hidrofílicas homólogas tendrán una localización opuesta (Jiménez-Mejía y col., 2006). Otro ejemplo se ha propuesto en miembros de la familia de transportadores MFS, los cuales muestran alta similitud de secuencia entre sus mitades N-terminal y C-terminal aunque con orientaciones opuestas. Se ha propuesto que la mitad amino terminal de estos transportadores es esencial para la energización del transporte, mientras la mitad carboxilo terminal está involucrada en la especificidad del sustrato (Paulsen y col., 1996).

Aunque los algoritmos de predicción basados en programas informáticos son útiles para la determinación topogénica de proteínas de membrana, éstos sólo se basan en la hidrofobicidad de los aminoácidos en la secuencia, por lo que no se puede establecer con certeza la topología de una proteína de membrana. Esto refleja la importancia del análisis experimental para determinar con mayor precisión los dominios hidrofóbicos o hidrofílicos que pueden ser importantes para la función o para el ensamble del transportador en la membrana celular.

En este trabajo se determinó una estructura topológica de las proteínas Chr3N y Chr3C de *B. subtilis* 168 considerada novedosa, ya que la mayoría de los transportadores formados por dos polipéptidos poseen seis STM (Saier, 2003; Jiménez-Mejía y Cervantes, 2005). Esto sumado a que hasta la fecha no se conocen ejemplos de proteínas homólogas SCHR analizadas experimentalmente que presenten este tipo de topología.

El estudio de la topología de las proteínas Chr3N y Chr3C representa una avance en el entendimiento de la estructura topológica de las proteínas pertenecientes a la superfamilia CHR y puede aportar información valiosa para conocer la localización más precisa de regiones o residuos que pueden ser esenciales para la función de transporte de cromato llevado a cabo por esta pareja de proteínas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Barajas M. E., E. Paluscio, C. Cervantes y C. Rensing (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 285:97-100.
2. Aguilar-Barajas, M. E (2010). Análisis funcional de homólogos bacterianos de la superfamilia CHR. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
3. Aguilera, S., M. E. Aguilar-Barajas, M. P. Chávez, J. E. López-Meza, M. Pedraza-Reyes, J. Campos-García y C. Cervantes (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 232:107-112.
4. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson (1996). Biología Molecular de la Célula. Omega (Ed.) pp. 509-556.
5. Álvarez, A. H., R. Moreno-Sánchez y C. Cervantes (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181:7398-7400.
6. Aury J. M., O. Jaillon, L. Duret, B. Noel, C. Jubin, B. M. Porcel, B. Segurens, V. Daubin, V. Anthouard y N. Aich (2006). Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. Nature 444:171-178.
7. Birnboim, H. C. y J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
8. Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.
9. Branco R., A. P. Chung, T. Johnston, V. Gurel, P. Morais y A. Zhitkovich (2008). The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium (VI) and superoxide. J. Bacteriol. 190:6996-7003.

10. Bowie J. U. (2006). Flip-flopping membrane proteins. *Nature* 13:94-96.
11. Brickman, E. y J. Beckwith (1975). Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and ϕ 80 transducing Phages. *J. Mol. Biol.* 96:307-316.
12. Campos-García, J., M. Martínez-Pacheco y C. Cervantes (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus sp.* Strain. *Antonie van Leeuwenhoek* 8:203-208.
13. Cervantes-Vega, C., J. Chávez, N. A. Cordova, P. de la Mora y J. A. Velasco (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48:159-163.
14. Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. K. Misra y S. Silver (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172:287-291.
15. Cervantes, C. y J. Campos-García (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (Nies DH & Silver S, eds), pp. 407–420. Springer-Verlag, Berlin.
16. Cervantes, C., J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzmán y R. Moreno-Sánchez (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:335-347.
17. Derman, A. I. y J. Beckwith (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* 173:7719-7722.
18. Díaz-Magaña, A., E. Aguilr-Barajas, R. Moreno-Sánchez, M.I. Ramírez-Díaz, H. Riveros-Rosas, E. Vargas y C. Cervantes (2009). Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191:5441-5445.
19. Díaz-Pérez, C., C. Cervantes, J. Campos-García, A. Julián-Sánchez y H. Riveros-Rosas (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274:6215-6227.

20. Flores-Álvarez, L. (2010). Determinación de la función del gen *chrA* de *Neurospora crassa* 74-A. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
21. Fulkerson, J. F y H. L. Mobley (2000). Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. *J. Bacteriol.* 182:1722-1730.
22. Georgiou, C. D., T. J. Dueweke y R. B. Gennis (1988). Beta-galactosidase gene fusions as probes for the cytoplasmic regions of subunits I and II of the membrane-bound cytochrome *d* terminal oxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263:13130-13137.
23. Henne, K. L., C. H. Nakatsu, D. K. Thompson y A. E. Konopka (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter sp.* strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiology* 9:199.
24. Ish-Horowicz, D. y J. F. Burke (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998.
25. Jerónimo-Rodríguez, P. (2010). Análisis de la expresión del gen *srpC* de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico-Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
26. Jiménez-Mejía, R., J. Campos y C. Cervantes (2006). Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 262:178-184.
27. Juhnke, S. (2004). Studies on the mechanism of chromate resistance in *Ralstonia metallidurans*. Tesis de Doctorado. Faculty of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg. Germany.
28. Jung, H., R. Rubenhagen, S. Tebbe, K. Leifker, N. Tholema, M. Quick y R. Schmid (1998). Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273:26400-26407.

29. Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3:109-136.
30. Kikukawa, T., S. Miyauchi, T. Arais, N. Kamo y T. Nara (2007). Anti-parallel membrane topology of two components of EbrAB, a multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 358:1071-1075.
31. Komori, K., A. Rivas, K. Toda y H. Ohtake (1990). Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotech. Bioeng.* 35:951-954.
32. León-Márquez, Y. L. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. LCHR. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
33. Lolkema J. S., A. Dobrowolski y S. Dirk-Jan (2008). Evolution of antiparallel two-domain membrane proteins: tracing multiple gene duplication events in the DUF606 Family. *J. Mol. Biol.* 378:596-606.
34. Luna-Luna, M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
35. Manoil, C. (1990). Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.* 172:1035-1042.
36. Manoil, C. y J. Beckwith (1986). A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 233:1403-1408.

37. Masaoka, Y., Y. Ueno, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima y T. Tsuchiya (2000). A two-component multidrug efflux pump EbrAB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182:2307-2310.
38. McGrath, S. P. y S. Smith (1990). Chromium and Nickel. In: Heavy metals in soils. (Alloway, B. J., Ed), p.p 125-150. Wiley, New York.
39. Mollers, S., M. D. Croning y R. Apweiler (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 17:646-653.
40. Nicholson, M. L. y D. E. Laudenbach (1995). Genes encoded on a cyanobacterial plasmid are transcriptionally regulated by sulfur availability and CysR. *J. Bacteriol.* 177:2143-2150.
41. Nies, A., D. H. Nies y S. Silver (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
42. Nies D. H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch y M. H. Saier (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.
43. Ohta, N., P. R. Galsworthy y A. B. Pardee (1971). Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 105:1053-1062.
44. Palenik, B., J. Grimwood, A. Aerts, P. Rouze, A. Salamov, N. Putnam, C. Dupont, R. Jorgensen, E. Derelle y S. Rombauts (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:7705-7710.
45. Pardee, A. B., L. S. Prestidge, M. B. Whipple y J. Dreyfuss (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 241:3962-3969.
46. Paulsen, I. T., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell y R. A Skurray (1996). Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:3630-3635.

47. Pimentel, E. B., R. Moreno-Sánchez y C. Cervantes (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 212:249-254.
48. Ramírez-Díaz, M. I., C. Díaz-Pérez, E. Vargas, H. Riveros-Rosas, J. Campos-García y C. Cervantes (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321-332.
49. Rapp, M., E. Granseth, S. Seppala y G. von Heijne (2006). Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:112-116.
50. Saier, M. H (2003). Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.* 48:1145-1156.
51. Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
52. Snyder W. B. y T. J. Silhavy (1995). β -galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:953-963.
53. Van Geest, M y J. S Lolkema (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:13-33.
54. Voitkun, V. A., Zhitkovich y M. Costa (1998). Cr(III) mediated crosslinks of glutathione or aminoacids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucleic Acids Res.* 26:2024-2030.
55. Wang, D. N., M. Safferling, M. J. Lemieux, H. Griffith, Y. Chen y X. D. Li (2003). Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1610:23-36.
56. Zhang Z., Che Ma, O. Pornillos, X. Xiu, G. Cheng y M. H. Saier (2007). Functional characterization of the heterooligomeric EbrA/B multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 46:5218-5225.