

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS

**IMPORTANCIA DE RESIDUOS BÁSICOS DE LA
PROTEÍNA ChrA DE *Pseudomonas aeruginosa***

TESIS

**Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

QFB. MARÍA GUADALUPE MORENO CONTRERAS

ASESOR

D.C. CARLOS CERVANTES VEGA

MORELIA MICH., NOVIEMBRE DE 2006

ESTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. CARLOS CERVANTES VEGA.

EN LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONOMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA PROYECTO No 41712-Q Y BECA DE MAESTRIA No. DE REGISTRO 188655.

DEDICATORIA

A mis padres

José Antonio y Evangelina

Por su amor y apoyo incondicional en todo momento

A mi esposo

Victor

Por ser mi compañero en cada aventura emprendida

Especialmente a mi hija

Lizeth Estefanía

Por que eres el mejor regalo que Dios me ha brindado

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

Al D.C. Carlos Cervantes Vega, por su guía, apoyo y amistad que forjaron mi camino durante este trabajo.

A la M. C. Eréndira Vargas, siempre dispuesta a ayudar no sólo en el trabajo sino también con tu optimismo tan contagioso y tu amistad sincera.

A D.C. Alejandro Bravo, D.C. Jesús Campos y D.C. Marco Aurelio Pardo por su valiosa intervención durante la evaluación y revisión de esta tesis.

A mis compañeros de generación: Sony, Yesí, Pat, César, Areli, Luzma, León, Arnoldo, Ido, Alí y Rosenda por los momentos compartidos felices e inolvidables

A mis compañeros de laboratorio: César, Rafa, Ma, Esther, Amada, Marthita, Rícarda, Sony, Luís, Edgar, Maurino y René por su ayuda y amistad incondicionales.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma han contribuido para convertirme en la persona que soy...

▪

RESUMEN

La proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* confiere resistencia a cromato y pertenece a la familia de transportadores CHR, la cual consta de 135 proteínas homólogas. Mediante mutagénesis al azar y sitio-dirigida se han identificado varios aminoácidos esenciales para la función de la proteína, y debido el carácter hidrofóbico de dichos aminoácidos, se les ha asignado un papel estructural. El mecanismo de resistencia de ChrA consiste en la expulsión del oxianión cromato del citoplasma, por lo que es posible que los aminoácidos básicos, cargados positivamente, arginina (Arg) y lisina (Lys), interaccionen con el cromato para su unión y expulsión. El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de aminoácidos básicos conservados en la función de ChrA. Para ello se analizaron ocho residuos: Lys-37 y Arg-34, ubicadas en el segmento transmembranal (STM) I; Lys-248, ubicada en el STM VIII; Arg-55, Arg-98, Arg-201 y Lys-394 en asas hidrofílicas y Arg-154 en la interfase del STM IV y el citoplasma. Utilizando mutagénesis dirigida se obtuvieron mutantes en los aminoácidos seleccionados, a las cuales se evaluó su nivel de resistencia a cromato con respecto a la proteína silvestre en pruebas de susceptibilidad en caldo nutritivo a 37°C. Las mutantes Lys-37(Arg, Thr y Leu), Arg-34(Thr), Arg-55(Thr), Arg-98(Lys), Arg-201(Lys), Lys-248(Arg) y Lys-394(Arg) presentaron un 75-100% de resistencia respecto a la proteína silvestre. Las mutantes Arg-55(Lys y Leu), Arg-154(Lys) y Lys-394(Thr y Leu) presentaron un 45-60% de resistencia. Las mutantes más afectadas fueron Lys-37-(Glu), Arg-154(Leu) y Arg-201(Thr y Leu) con un 14-30% de resistencia, y Lys-248(Thr y Leu) las cuales se comportaron como el control sensible. Pruebas de susceptibilidad en medio mínimo y a 42°C, llevaron a concluir que los residuos Lys-37, Arg-34 y Arg-55 son importantes probablemente para mantener una adecuada estructura de ChrA; la Arg-98 y la Arg-201 son importantes para la función de ChrA y pueden tener un papel funcional o estructural, mientras que los residuos Arg-154, Lys-248 y Lys-394 son esenciales para la función de la proteína ChrA debido a que probablemente participan de manera directa en la interacción con el cromato.

INDICE

I) INTRODUCCION.....	11
1. EL CROMO.....	11
a) Características químicas.....	11
b) Transporte del cromo al interior celular.....	12
c) Toxicidad del cromo.....	
2. RESISTENCIA BACTERIANA A CROMATO.....	14
a) Resistencia cromosómica.....	15
b) Resistencia plasmídica.....	16
3. DETERMINANTES DE RESISTENCIA A CROMATO.....	16
a) Plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	18
b) Plásmido pMOL28 de <i>C. metallidurans</i>	18
4. CARACTERISTICAS DE LA PROTEÍNA ChrA DE <i>P. aeruginosa</i>	19
5. MECANISMO DE RESISTENCIA CONFERIDO POR ChrA DE <i>P. aeruginosa</i>	19
6. FAMILIA CHR.....	20
7. AMINOACIDOS BASICOS EN PROTEINAS DE MEMBRANA.....	26
a) Estudios Estructura-Función.....	26
b) Frecuencia e importancia de residuos básicos en proteínas de membrana.....	27
II) ANTECEDENTES.....	31
III) HIPOTESIS.....	40
IV) OBJETIVOS.....	40
1. OBJETIVO GENERAL.....	40
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	40
V. MATERIALES Y METODOS.....	41
1. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	41
2. CEPAS EMPLEADAS.....	41
3. PLASMIDOS EMPLEADOS.....	42
María Guadalupe Moreno Contreras	IIQB-UMSNH
	6

4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMIDICO.....	44
5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	45
6. AISLAMIENTO DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....	45
7. TRATAMIENTOS ENZIMATICOS DEL DNA.....	46
a) Restricción con endonucleasas.....	46
b) Ligaciones.....	46
8. TRANSFORMACION DE <i>Escherichia coli</i> POR ELECTROPORACION..	47
a) Preparación de células competentes.....	47
b) Transformación.....	47
9. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> POR CHOQUE TÉRMICO.....	48
a) Preparación de células competentes.....	48
b) Transformación.....	48
10. ELECTROPORACION DE <i>P. aeruginosa</i> O <i>E. coli</i> SEMBRADAS RECIENTEMENTE EN PLACA.....	49
11. MUTAGENESIS DIRIGIDA.....	50
a) Diseño de oligonucleótidos mutagénicos.....	50
b) Síntesis de la cadena mutada.....	51
c) Digestión con <i>DpnI</i>	51
d) Transformación.....	54
12. SECUENCIACION DE NUCLEOTIDOS.....	54
a) oligonucleótidos empleados.....	54
b) Amplificación de los fragmentos utilizando didesoxirribonucleótidos.....	54
c) Purificación de las muestras.....	55
d) Secuenciación de las muestras.....	55
e) Análisis de las secuencias.....	56
13. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO.....	56
VI) RESULTADOS.....	58
1. Identificación y selección de los aminoácidos básicos conservados en la familia CHR.....	58
2. Selección de cambios en los aminoácidos elegidos para la mutagénesis dirigida.....	63
3. Obtención y caracterización de las mutantes en ChrA.....	65

4. Subclonación de los genes mutantes en pUCP20.....	70
5. Pruebas de susceptibilidad a cromato.....	71
5.1.a. Lisina 37.....	73
5.1.b.Arginina 34.....	76
Arginina 55.....	76
Arginina 98.....	78
Lisina 394.....	78
Arginina 201.....	81
Lisina 248.....	84
Arginina 154.....	84
VII) DISCUSION.....	88
1. Identificación y selección de residuos.....	88
2. Selección de cambios para evaluar el papel del aminoácido	93
3. Evaluación del posible papel de los aminoácidos mutados.....	94
4. Evaluación de los dominios amino y carboxilo de la proteína ChrA.....	111
5. Conclusiones.....	113
6. Perspectivas.....	114
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	115

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.- Plásmidos que confieren resistencia bacteriana a cromato.....	17
Tabla 2. Características de los plásmidos mutados en el gen <i>chrA</i>	32
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis.....	52
Tabla 4. Proteínas de la familia CHR empleadas para la búsqueda de residuos básicos conservados.....	60
Tabla 5. Conservación de residuos básicos de la proteína ChrA en los subgrupos CHR2 y CHR5.....	62
Figura 1. Mecanismos de transporte y toxicidad del cromato en la célula bacteriana.....	13
Figura 2. Topología de la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figura 3. Mecanismo de resistencia a cromato mediado por ChrA.....	22
Figura 4. Topología del árbol filogenético de la familia de CHR.....	24
Figura 5. Árbol filogenético de las 77 proteínas de cadena larga (LCHR) de la familia CHR.....	25
Figura 6. Dominio de unión del ligando en el modelo por homología del transportador de oxalato/formato OxIT.....	29
Figura 7. Expulsión de cromato de las mutantes del gen <i>chrA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figura 8. Alineamiento múltiple de parte de las secuencias de aminoácidos de los homólogos de la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 9. Mutagénesis de la proteína ChrA.....	37
Figura 10. Esquema de los plásmidos empleados.....	43
Figura 11. Conservación de residuos básicos de la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i>	61
María Guadalupe Moreno Contreras	9
IIQB-UMSNH	

Figura 12. Aminoácidos básicos de la proteína ChrA.....	64
Figura 13. Cambios propuestos para la evaluación de los residuos básicos seleccionados.....	66
Figura 14. Caracterización de plásmidos mutagenizados pGEMT-ChrAHis.....	68
Figura 15. Verificación de la mutación.....	69
Figura 16. Caracterización de los plásmidos pUChrA-mutación.....	72
Figura 17. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 37.....	74
Figura 18. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes K37E y R34T.....	75
Figura 19. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Arginina 55.....	77
Figura 20. Pruebas de susceptibilidad a cromato de la mutante de la Arginina 98.....	79
Figura 21. Pruebas de susceptibilidad a cromato de la mutante de la Lisina 394 en CN.....	80
Figura 22. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 394 en M9.....	82
Figura 23. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 201.....	83
Figura 24. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 248.....	85
Figura 25. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Arginina 154.....	86
Figura 26. Modelo helicoidal del segmento transmembranal I de la proteína ChrA.....	98
Figura 27. Modelo helicoidal del asa periplásmica 1 de la proteína ChrA..	101
Figura 28. Esquema del probable sitio de unión del cromato en la proteína ChrA.....	107
Figura 29. Modelo hipotético del arreglo de la proteína ChrA en la membrana.....	110
María Guadalupe Moreno Contreras	10

I) INTRODUCCION

El cromo es un contaminante ambiental ampliamente distribuido por su condición de subproducto de numerosos procesos industriales. En su forma de cromato, (CrVI), es altamente soluble, por lo que la contaminación ambiental es difícil de controlar. Esta solubilidad también permite el transporte a través de las membranas biológicas del cromato, y una vez dentro de la célula exhibe una variedad de efectos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos. La descontaminación química es un proceso costoso y difícil de implementar en el ambiente por lo que la investigación se ha dirigido al estudio de microorganismos capaces de soportar concentraciones tóxicas de cromato, con la posible aplicación de los conocimientos obtenidos, en la biorremediación del cromato.

1. EL CROMO

a) Características químicas

El cromo es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la Tabla Periódica, tiene un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.996 g/mol. Es un metal gris y quebradizo que puede ser altamente pulido y resiste el ataque por oxidación. Los estados de oxidación del cromo van desde -2 hasta +6, siendo las formas más comunes +3 y +6. El estado de oxidación trivalente es la forma más estable del cromo (McGrath y Smith, 1990).

El cromo (VI) existe como un anión y se considera la forma más tóxica del cromo; usualmente se encuentra combinado con el oxígeno formando iones

cromato (CrO_4^{2-}) o dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). En contraste, el Cr(III) se encuentra formando óxidos, hidróxidos o sulfatos. Los compuestos de Cr(VI) son altamente solubles, fuertes oxidantes y en presencia de materia orgánica son reducidos a Cr(III). Sin embargo, las altas concentraciones de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y así persistir como un contaminante (Cervantes y col., 2001)

b) Transporte del cromo al interior celular

El cromo en forma de cromato (CrO_4^{2-}) es activamente transportado a través de las membranas biológicas tanto de procariotes como de eucariotes; esta permeabilidad se basa en su similitud química con el anión sulfato (SO_4^{2-}) (**Figura 1A**), ión indispensable como fuente de azufre para la síntesis de proteínas. El ingreso del cromato por la vía del transporte del sulfato se demostró en *Salmonella typhimurium* (Dreyfuss, 1964) y *Escherichia coli* (Sirko y col., 1990). Los estudios de transporte de cromato al interior celular en *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake y col., 1987) y *Alcaligenes eutrophus* (Nies y Silver, 1989) mostraron que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato (Cervantes y col., 2001). La elevada similitud entre el cromato y el sulfato radica en que ambas son moléculas tetraédricas con distancias de enlace muy similares, por lo que el cromato es transportado mediante la hidrólisis del ATP actuando como un análogo del sulfato (Pardee y col., 1966). Una vez en el citoplasma, el Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III), el cual puede interactuar con el DNA y proteínas ejerciendo así sus efectos

tóxicos. En contraste, el Cr(III) extracelular es relativamente inocuo, puesto que es incapaz de atravesar las membranas biológicas debido a la baja

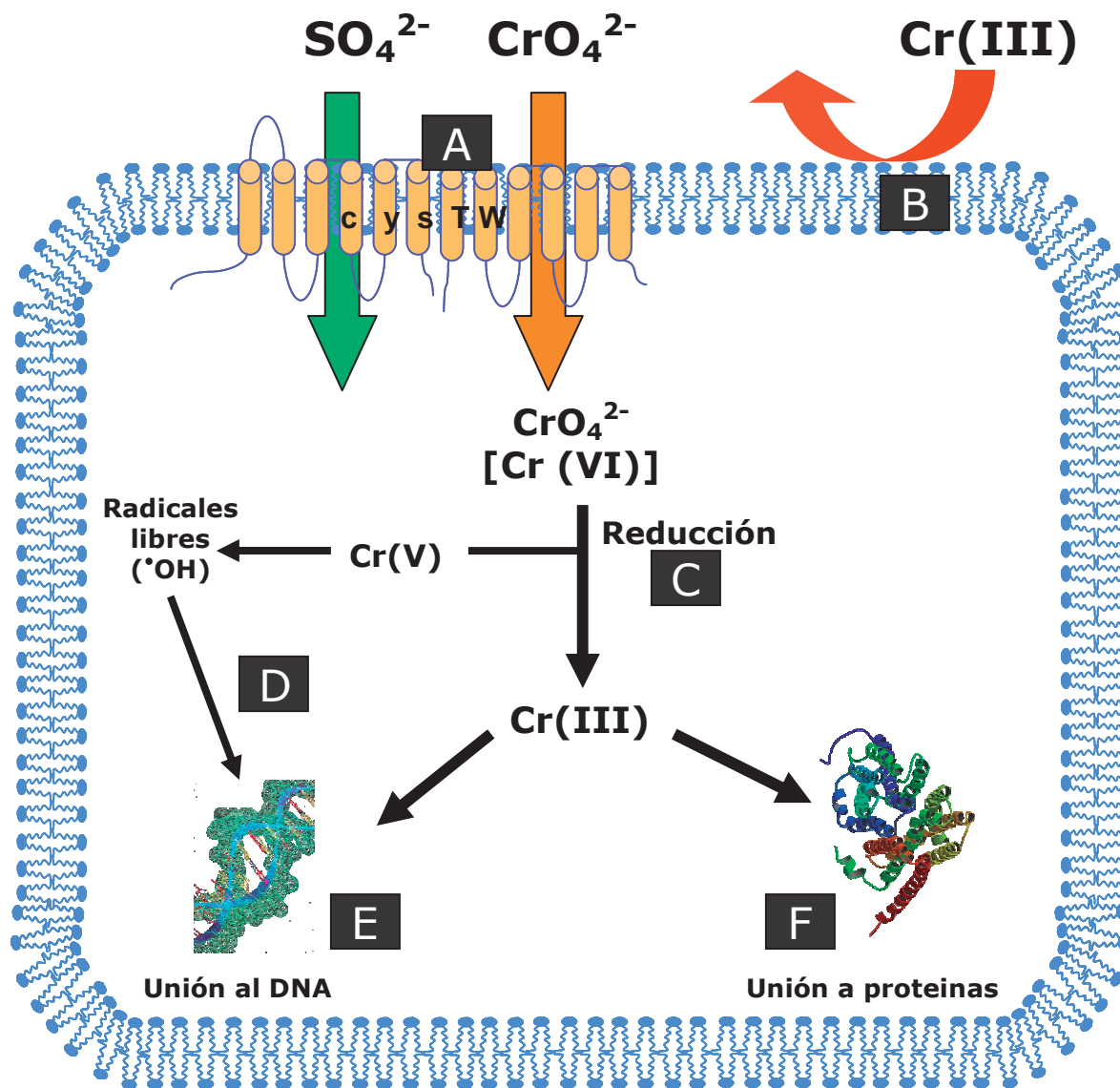


Figura 1. Mecanismos de transporte y toxicidad del cromato en la célula bacteriana. A) El cromato ingresa a la célula utilizando el sistema de transporte del sulfato. B) Las membranas biológicas son impermeables al Cr(III) por lo que éste resulta inocuo extracelularmente. C) Intracelularmente el Cr(VI) puede reducirse a Cr(III) ; D) En este proceso se pueden formar radicales libres y productos intermedios como Cr(V) que pueden interactuar con el DNA. E) El Cr(III) también puede interactuar con el DNA o F) con las proteínas. Adaptado de Tinajero, 2003

solubilidad de sus compuestos (**Figura 1B**) (Karbonowska y col., 1977, Ohtake y col., 1987).

c) Toxicidad del cromo

Las propiedades mutagénicas de las sales de Cr(VI) se deben a alta facilidad con que invaden el interior celular y el amplio espectro del daño al DNA inducido por su presencia. Una vez que ingresa a la célula, el Cr(VI) es reducido a especies reactivas como Cr(V) y Cr(IV) o a su forma más estable Cr(III) (**Figura 1C**) (Snow, 1994).

Los procesos de reducción del Cr(VI) a estados de oxidación inferiores da lugar a intermediarios reactivos siendo el Cr(V) la especie más directamente relacionada con la toxicidad del cromo (Kawanishi y col., 1986). Complejos de Cr(V) reaccionan con peróxido de hidrógeno para generar cantidades importantes de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el cual produce alteraciones directamente en el DNA así como otros efectos tóxicos como la peroxidación de lípidos de membrana (**Figura 1D**) (Shi y Dalal, 1990).

El Cr(III) intracelular puede ser secuestrado por los grupos fosfato del DNA afectando la replicación, transcripción y causando mutagénesis. El daño oxidativo al DNA es considerado la base de los efectos mutagénicos producidos por el cromo (**Figura 1E**). Por otra parte, el Cr(III) puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo y carboxilo de enzimas causando alteraciones en su estructura y actividades (**Figura 1F**) (Cervantes y col., 2001).

2. RESISTENCIA BACTERIANA A CROMATO

Las bacterias resistentes a cromato han sido aisladas del ambiente natural

(suelos, agua y sedimentos) o de entornos intrahospitalarios (Losi y col., 1994; Cervantes y col., 2001). La tolerancia a este ión se ha relacionado con la reducción del Cr(VI) a Cr(III) así como con mutaciones cromosomales que afectan el ingreso del cromato a la célula; sin embargo, los sistemas de resistencia más eficientes se han asociado con la expulsión del ión proporcionada por determinantes plasmídicos (Cervantes y col., 2001)

a) Resistencia cromosómica

Debido a que el Cr(VI) ingresa a la célula utilizando el sistema de transporte de sulfato (**Figura 1A**), mutaciones en los genes que codifican esta vía pueden originar bacterias resistentes a cromato disminuyendo la capacidad de entrada del oxianión a la célula (Cervantes y Silver, 1992).

Se ha reportado que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) constituye un mecanismo alternativo de resistencia a cromato y parece ser una reacción secundaria de una vía metabólica aún desconocida, sin embargo, este sistema confiere sólo un bajo nivel de resistencia al ión (Cervantes y Silver, 1996). Se han purificado y caracterizado reductasas de cromato, solubles y dependientes de NADPH en *Pseudomonas putida* (Ishibashi y col., 1990), *P. ambigua* (Suzuki y col., 1992) y *Bacillus sp.* (Campos y col., 1995; 1997). Reductasas unidas a la membrana se identificaron en *P. fluorescens* (Bopp y Ehrlich, 1988) y en *Enterobacter cloacae* (Wang y col., 1989). La reducción de cromato puede efectuarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y representa un proceso de detoxificación potencialmente útil para la recuperación de aguas residuales y otros desechos contaminados con cromato (Cervantes, 1999).

Se ha descrito la presencia del determinante de resistencia a cromato chr_2 , constituido por los genes $chrB_2$, $chrA_2$ y $chrF_2$, en el cromosoma de la bacteria *Cupriavidus metallidurans* (antes *Alcaligenes eutrophus* o *Ralstonia metallidurans*) (Juhnke y col., 2002). Estos genes son homólogos a algunos codificados en el determinante plasmídico chr_1 de la cepa CH34 de la misma especie y confieren resistencia a cromato aparentemente mediante una expulsión acelerada de los iones cromato (Junhke y col., 2002).

Por otra parte, en un trabajo reciente en nuestro laboratorio, se encontró que las helicasas RuvB y RecG están involucradas en la reparación de daño al DNA causado por el cromato o sus derivados en *P. aeruginosa* PAO1, dado que cepas mutantes por transposición en estos genes son más sensibles que la cepa parental (Miranda y col., 2005).

b) Resistencia plasmídica

La presencia de plásmidos de resistencia a cromato fue reportada por primera vez hace más de dos décadas en las bacterias *Streptococcus lactis* (Efstathiou y Mckay, 1977) y *P. aeruginosa* (Summers y Jacoby, 1979); posteriormente han sido encontrados en diversas especies de *Pseudomonas* (Cervantes y Silver, 1996; Mondaca y col., 1998), *A. eutrophus* (Nies y col., 1990) y *E. coli* (Verma y col., 2002) (**Tabla 1**).

3. DETERMINANTES DE RESISTENCIA A CROMATO

Únicamente dos determinantes de resistencia a cromato asociados con plásmidos han sido estudiados a nivel molecular: los determinantes de los

Tabla 1.- Plásmidos que confieren resistencia bacteriana a cromato

BACTERIA	PLÁSMIDO	ORIGEN	REFERENCIA
<i>Streptococcus lactis</i>	pLM3001	Fermentación láctea	Efstathiou y Mackay, 1977
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pMG6	Clínico	Summers y Jacoby, 1978
<i>P. fluorescens</i>	pLBH1	Sedimento de río	Bopp y col., 1983
<i>P. aeruginosa</i>	pUM505	Clínico	Cervantes y col., 1990
<i>Ralstonia metallidurans</i>	pMOL28	Suelo contaminado	Niesy col., 1990
<i>P. mendocina</i>	pARI180	Suelo contaminado	Dhakephalkar y col., 1996
<i>P. putida</i>	p(200 kb)	Afluente industrial	Mondaca y col., 1998
<i>Escherichia coli</i>	varios	Residuos de curtiduría	Verma y col., 2002

plásmidos pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de *A. eutrophus* (Nies y col., 1990).

a) Plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*

pUM505 es un plásmido conjugativo de 100 kilobases (kb) aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes-Vega y col., 1986). La resistencia a cromato está dada por la presencia del gen llamado *chrA* (Cervantes y col., 1990). Este determinante fue secuenciado y un segmento que lo contenía fue clonado en el vector pKT230 dando lugar al plásmido recombinante pCRO616, el cual al ser transferido a una cepa sensible a cromato del mismo género confirió resistencia al ión (Cervantes y col., 1990).

b) Plásmido pMOL28 de *C. metallidurans*

En un primer estudio de los genes de resistencia a cromato del plásmido pMOL28 se localizaron dos genes: *chrA* que codifica una proteína integral de membrana probablemente responsable de la expulsión de cromato y *chrB*, un probable regulador (Nies y col, 1990). Estudios más recientes describieron además los genes *chrC*, que codifica una superóxido dismutasa; *chrE*, que posee similitud con una rodanasa; *chrF₁*, propuesto como parte de un grupo de genes que regulan el sistema de resistencia a cromato; y *chrI*, para el cual no se ha propuesto ninguna función. Estos genes forman parte del determinante de resistencia llamado *chr₁* (Junhke y col., 2002).

4. CARÁCTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA ChrA DE *P. aeruginosa*

A partir de la secuencia de nucleótidos del gen *chrA* de *P. aeruginosa*, se dedujo una proteína de 416 aminoácidos de los cuales el 66% son hidrofóbicos. Con base en los datos del perfil hidropático se propuso a ChrA como una proteína de membrana (Cervantes y col., 1992). Aunque inicialmente se propuso un modelo hipotético en base al perfil hidropático de 12 segmentos transmembranales (Álvarez, 1999), en un trabajo reciente en nuestro laboratorio, se construyó una serie de fusiones traduccionales de ChrA con las proteínas reporteras fosfatasa alcalina (PhoA) y β -galactosidasa (LacZ) en vectores de expresión y los resultados obtenidos indican que la topología de la proteína ChrA consta de 13 segmentos transmembranales unidos por 6 asas citoplásmicas y 6 asas periplásmicas con el extremo amino en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma (**Figura 2**) (Jiménez-Mejía y col., 2006).

5. MECANISMO DE RESISTENCIA CONFERIDO POR ChrA DE *P. aeruginosa*

Utilizando vesículas invertidas de membrana, se demostró que la proteína ChrA participa en la expulsión de cromato: las vesículas que expresan esta proteína acumularon más cromato que las vesículas preparadas de una cepa sensible al ión. También se demostró que la expulsión de cromato es dependiente de NADH y que fue abolida por inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria, sugiriendo que la expulsión depende del potencial de membrana (Álvarez y col., 1999).

Posteriormente, el sistema de expulsión de cromato por ChrA fue demostrado en células completas de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pEPL1 que contiene el gen *chrA*. La cepa que contiene el plásmido mostró una acumulación 2 a 5 veces menor de cromato radiactivo en suspensiones de la misma cepa comparado con suspensiones de aquella que no poseía el plásmido. La expulsión de cromato por la cepa PAO1(pEPL1) fue inhibida por análogos del cromato como sulfato y molibdato, así como por inhibidores energéticos, lo que confirmó la utilización del potencial de membrana como fuente de energía para expulsar iones cromato. (Pimentel y col., 2001) (**Figura 3**).

6. FAMILIA CHR

Mediante un análisis filogenético, Díaz-Pérez (2006) encontró 135 proteínas homólogas a ChrA, las cuales constituyen la familia CHR de transportadores de cromato. La familia se divide en dos grupos bien definidos en base a su tamaño: 77 proteínas tienen un tamaño de alrededor de 400 aminoácidos y se les denomina proteínas de cadena larga (LCHR) o bidominio, mientras que 58 tienen un tamaño de alrededor de 200 aminoácidos las cuales reciben el nombre de proteínas de cadena corta (SCHR) o monodominio. Para el análisis filogenético dividieron las proteínas LCHR en sus dominios amino y carboxilo, originando 212 secuencias en total (154 de los dominios amino y carboxilo de las 77 proteínas LCHR y 58 proteínas SCHR).

El análisis filogenético apoya la hipótesis de que las proteínas de cadena larga se originaron de un evento de duplicación y fusión génica de un

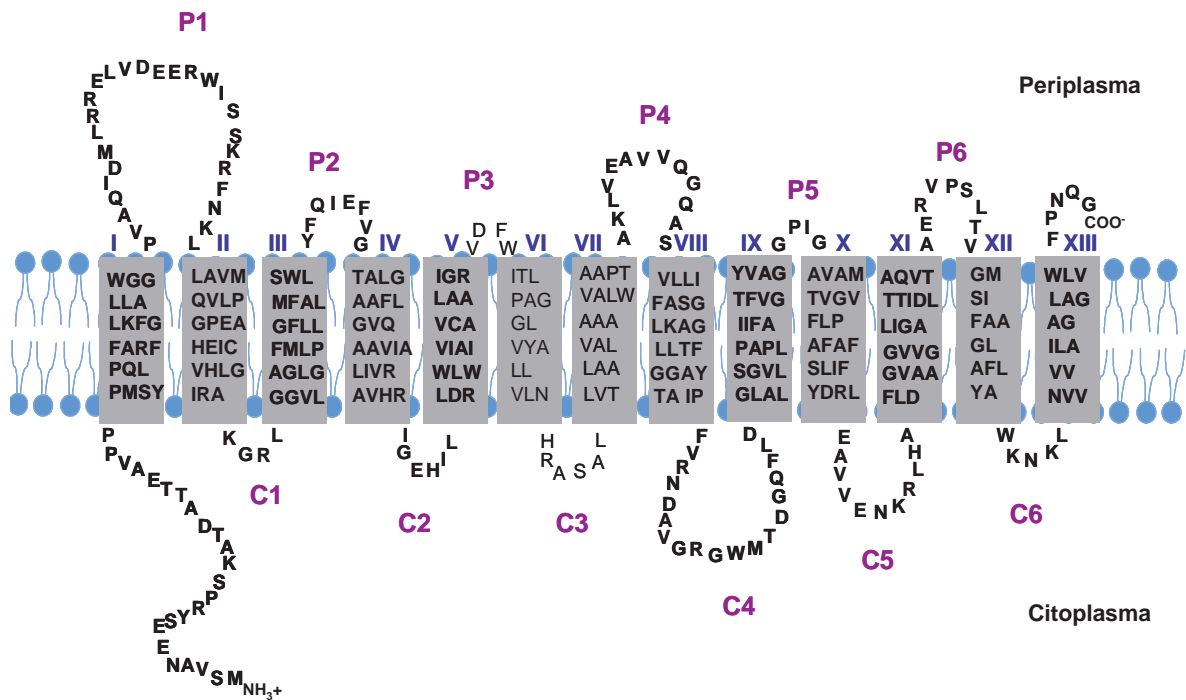


Figura 2. Topología de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Consta de trece segmentos transmembranales (I-XIII) unidos por seis asa citoplásmicas (C1-C2) y seis asas periplásmicas (P1-P6) con el extremo amino en el citoplasma y el carboxilo en el periplasma. Tomado de Jiménez-Mejía y col., 2006.

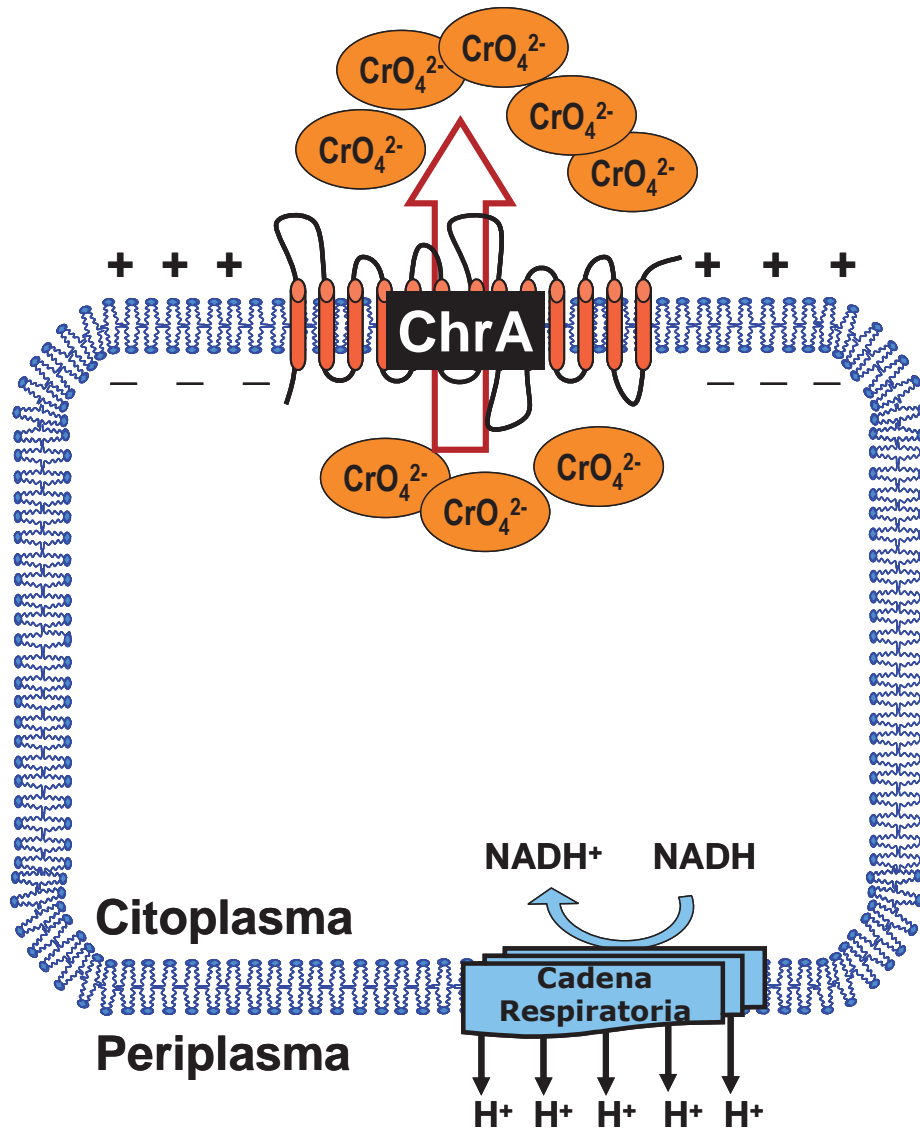


Figura 3. Mecanismo de resistencia a cromato mediado por ChrA. El cromato es expulsado por la proteína ChrA, la cual utiliza el potencial de membrana generado por los componentes de la cadena respiratoria. Adaptado de Pimentel y col., 2002.

monodominio ancestral, de manera similar a lo que sucede con miembros de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS) (Rubin y col., 1990; Nies y col., 1998; Pao y col., 1998; Díaz-Pérez, 2006). En el árbol filogenético por dominios, se encontró que los dominios amino y carboxilo de las proteínas LCHR agrupan de manera independiente (**Figura 4**), al igual que el grupo de las proteínas SCHR, lo que sugiere que el probable evento de duplicación ocurrió hace mucho tiempo, y que el gen duplicado, ahora formando los dos dominios, ha evolucionado a velocidades distintas, provocando que el grado de conservación de los dominios sea diferente, y por tanto, que la distribución de los mismos sea por separado. Puesto que el dominio amino forma un solo grupo y por tanto está más conservado, se ha propuesto que éste lleva a cabo la función del transporte del cromato mientras que el dominio carboxilo juega un papel auxiliar (Díaz-Pérez, 2006).

El árbol filogenético construido únicamente con las proteínas de cadena larga (LCHR) está formado por siete subgrupos (**Figura 5**): 1) CHR5, que incluye nuestro modelo de estudio de *P. aeruginosa*; 2) CHR2, donde agrupa la proteína ChrA de *Crupiavidus metallidurans*; 3) CHR3, donde agrupan proteínas cercanas al CHR5 pero pertenecientes principalmente a cianobacterias; 4) CHR4 formado por la proteína ChrA de *Methanococcus jannaschii*, la única proteína homóloga del dominio arquea; 5) CHR quiméricas, cuyos dominio amino y carboxilo agrupan de manera distinta al resto de las proteínas; 6) CHR de hongos, proteínas homólogas encontradas en organismos del Reino Fungi y 7) CHR1, que incluye proteínas de diverso origen pero que agrupan de manera cercana a las ChrA de hongos (Díaz-Pérez, 2006).

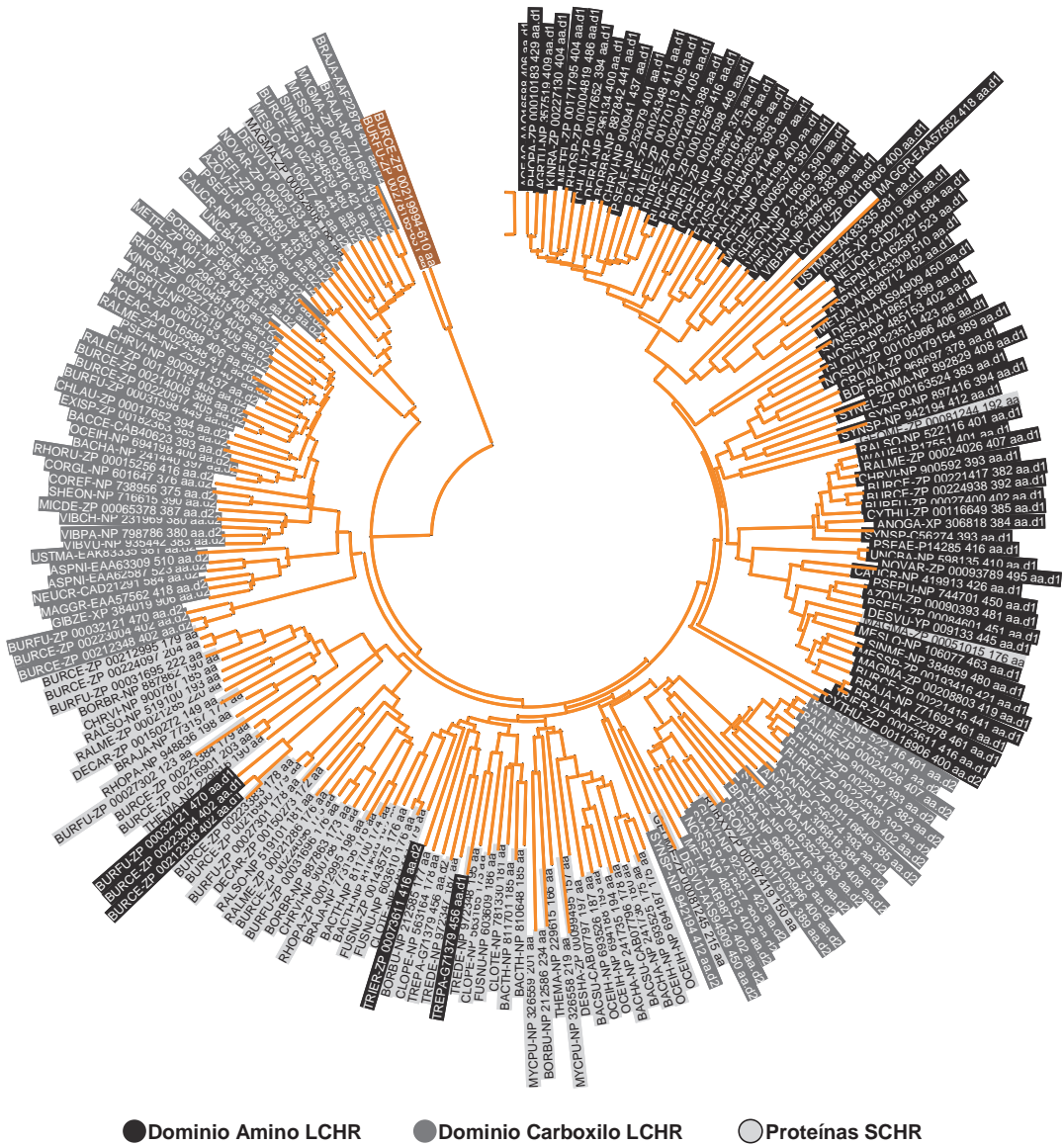


Figura 4. Topología del árbol filogenético de la familia de CHR. El árbol se reconstruyó con las 212 secuencias de los dominios de ChrA (154 de los dominios amino y carboxilo de las 77 proteínas LCHR y 58 proteínas SCHR). Tomado de Díaz-Pérez, 2006.

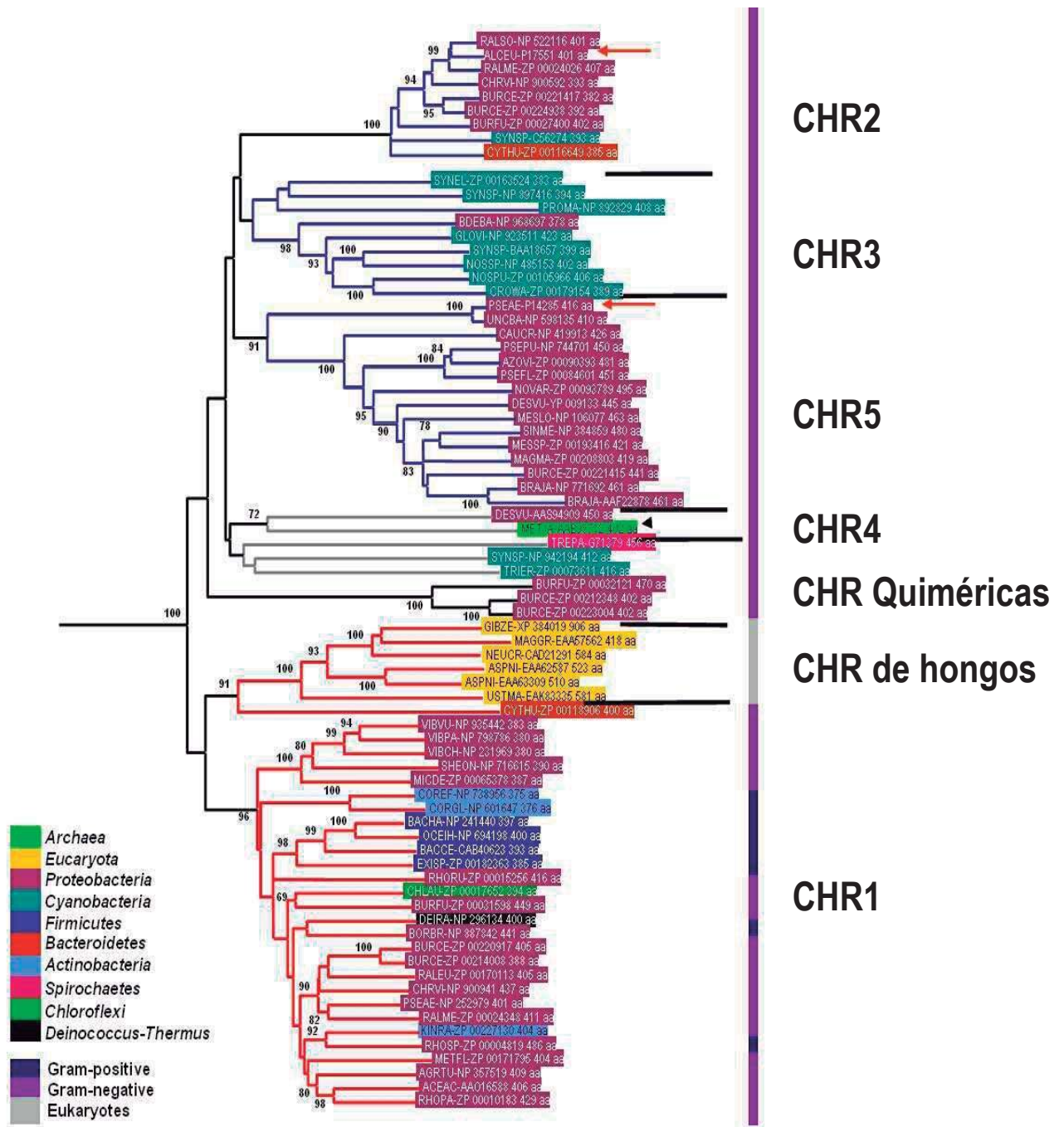


Figura 5. Árbol filogenético de las 77 proteínas de cadena larga (LCHR) de la familia CHR. El color en la leyenda indica la distribución taxonómica de los siete grupos de acuerdo a la leyenda de la izquierda. La barra derecha muestra la clasificación Gram de las bacterias. Las flechas a la derecha señalan a ChrA de *P. aeruginosa* y a ChrA de *C. metallidurans* (*A. eutrophus*) La punta de flecha señala a ChrA de *M. jannaschii*. (Nies, 2003; Díaz-Pérez, 2006).

7. AMINOACIDOS BASICOS EN PROTEINAS DE MEMBRANA

a) Estudios Estructura- Función

El funcionamiento apropiado de una proteína es debido a su conformación, la cual es a su vez una consecuencia de su secuencia de aminoácidos y de sus estructuras secundaria y terciaria. Ciertos aminoácidos en una proteína juegan papeles importantes en determinar su especificidad (por ejemplo, unión del sustrato en el caso de enzimas), termoestabilidad, regulación, conformación y otras propiedades de las proteína. Cambiando incluso un solo nucleótido de un gen que codifica una proteína blanco puede resultar en el cambio de un aminoácido que puede abatir la actividad normal o mejorar una propiedad específica de una proteína (Glick y Pasternak, 1998).

Los estudios de relaciones estructura-función son extremadamente valiosos en el entendimiento del mecanismo de una proteína de transporte. Los aminoácidos funcionales pueden ser identificados ya sea estudiando cambios que ocurren en las propiedades bioquímicas después de la modificación de un residuo específico con un compuesto reactivo, o analizando las propiedades de una mutación sitio específica en la cual aminoácidos individuales se han reemplazado. La mutagénesis dirigida es el método empleado para la producción de mutaciones específicas de un gen (Glick y Pasternak, 1998), y ofrece la ventaja de que no se tiene que considerar el efecto del reactivo en sitios diferentes al residuo de interés ni es necesario tener la proteína purificada para evitar interacciones del reactivo con otras proteínas (Trentmann y col., 2000).

Una herramienta para determinar cuáles aminoácidos de una proteína podrían ser cambiados para afectar una propiedad específica es el análisis de la estructura tridimensional de la proteína si ya ha sido bien caracterizada por análisis de cristalografía de Rayos X u otros procedimientos analíticos. Pero para la mayoría de las proteínas de membrana se carece de tal información, de forma que la mutagénesis viene a ser una estrategia de prueba y error en la que los cambios son hechos sobre aquellos aminoácidos que son más probables de generar un cambio en una propiedad de la proteína. Y luego, por supuesto, la proteína codificada por el gen mutado debe ser analizada para averiguar si el proceso de mutagénesis alteró de alguna forma la función de la proteína (Glick y Pasternak, 1998).

Por otro lado, la elección del aminoácido puede estar basada en el conocimiento del papel de un aminoácido en particular en una o más proteínas homólogas identificadas por estudios filogenéticos (Glick y Pasternak, 1998), lo que permite reducir considerablemente el número de posibles blancos para la mutagénesis.

b) Frecuencia e importancia de residuos básicos en proteínas de membrana

Los aminoácidos cargados positivamente, Arginina (Arg) y Lisina (Lys) son poco frecuentes en las proteínas de membrana, especialmente dentro de los segmentos transmembranales. De acuerdo a un análisis de 26 genomas en que se consideraron probables proteínas de membrana, estos aminoácidos constituyen en conjunto el 2% de la composición total (Liu y col., 2002). Sin

embargo, en un análisis con 56 proteínas de estructura conocida, el porcentaje aumentó hasta alrededor del 5% para cada uno en las regiones de hélice- α e irregulares cercanas a la interfase membrana-agua, lo que ha llevado a sugerir que interacciones electrostáticas con las cabezas cargadas negativamente de los fosfolípidos ayudan a estabilizar la asociación con la membrana (Granseth y col., 2004). Esto no sucede en el ambiente hidrofóbico de la membrana, donde la presencia de una carga no compensada añadiría un elemento desestabilizante a la estructura de la proteína de membrana, contradicción que puede ser reconciliada si la desventaja de una carga positiva fuera usada para disminuir el costo energético de unir o transportar un sustrato aniónico. En ausencia del sustrato, la carga podría ser estabilizada mediante interacciones con otros aminoácidos polares en la misma región (Fu y col., 2001). Esto ha sido demostrado en el transportador de oxalato/formato OxIT de *Oxalobacter formigenes*, en el cual la Arginina-272 y la Lisina-355, ambas dentro de segmentos transmembranales, forman parte del sitio de unión del sustrato (**Figura 6**) (Yang y col., 2005).

Por otro lado, está bien estudiada la denominada regla "adentro positivo" en organismos de los tres dominios de la vida (Wallin y Von Heijne, 1998), donde se ha demostrado que existe una distribución preferencial de residuos cargados positivamente en las asas citoplásmicas y que tal distribución está directamente relacionada con la adecuada inserción de la proteína dentro de la membrana, como sucede en el transportador eucariótico de glucosa GlutI (Sato y Mueckler, 1999).

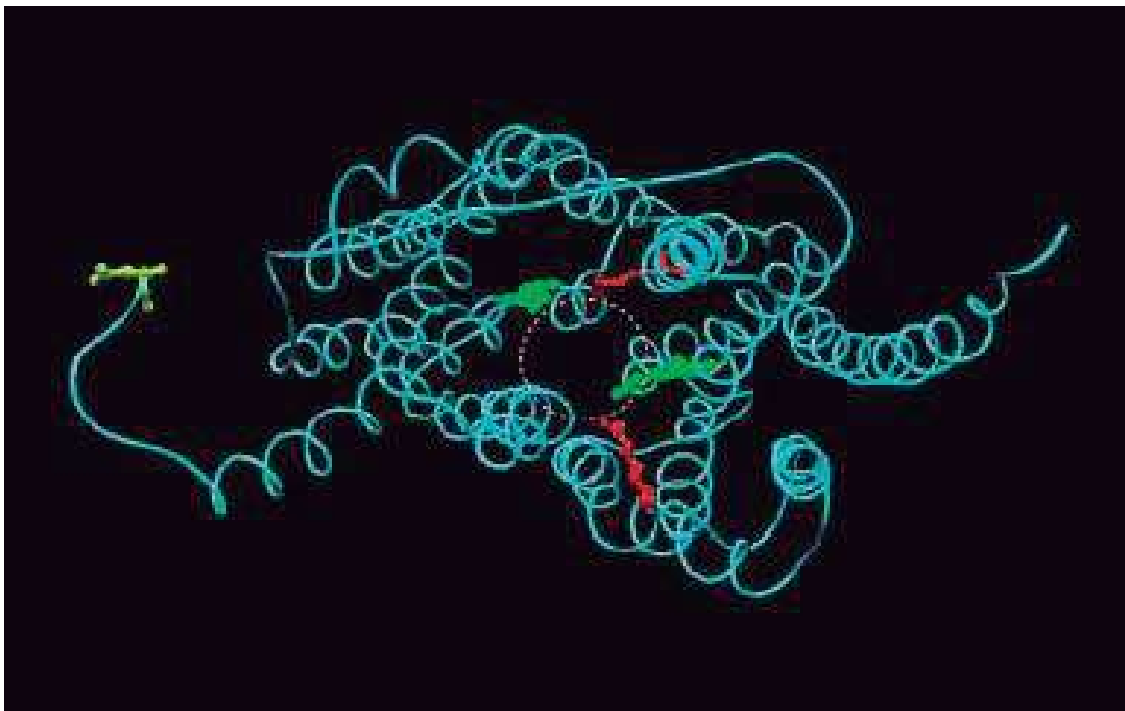


Figura 6. Dominio de unión del ligando en el modelo por homología del transportador de oxalato/formato OxIT. Modelo de OxIT, visto desde el citoplasma y mostrando los residuos de unión del ligando Arg-272 y Lys-355 en rojo, los cuales forman una región discoide de 10 Å x 3Å. Tomado de Yang y col. (2005).

Por otra parte, residuos básicos ubicados en segmentos hidrofílicos pueden tener un papel importante en el reconocimiento o unión del sustrato, formando parte de la vía de translocación, como sucede en el transportador de citrato/malato CimH de *Bacillus subtilis*, donde las Arg-143 y Arg-420 de asas citoplásmicas son accesibles del lado externo de la membrana y la Arg-432 forma parte del sitio de unión de uno de los grupos carboxilo de los sustratos (Krom y Lolkema, 2003)

II) ANTECEDENTES

Con el objetivo de identificar aminoácidos específicos que participan en la resistencia a cromato de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, Aguilera y col. (2004) aislaron mutantes sensibles a cromato. Para ello el plásmido pEPL1, que tiene clonado el gen *chrA*, se transfirió a la cepa hipermutagénica XL1-Red. Esta cepa, obtenida comercialmente, se encuentra afectada en mecanismos primarios de reparación del DNA, lo cual aumenta la frecuencia de mutación 5,000 veces más que la cepa silvestre (Greener y Callahan, 1994). Después de una incubación de alrededor de 30 generaciones, se aisló la población de plásmidos mutados que se emplearon para transformar la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Posteriormente se seleccionaron mutantes que perdieron la capacidad de tolerar concentraciones tóxicas de cromato. Se eligieron 12 mutantes que presentaron mutaciones con sentido equivocado: diez mutantes presentaron el cambio de un sólo aminoácido y dos tuvieron la alteración de dos aminoácidos. De los cambios ocurridos, 11 involucraron el cambio de un aminoácido hidrofóbico por residuos polares y dos eliminaron residuos con carga positiva (**Tabla 2**).

Se tomaron al azar cuatro de las mutantes sensibles y se realizaron pruebas de expulsión de cromato radioactivo ($^{51}\text{CrO}_4^{2-}$). Suspensiones celulares de las mutantes R98Q, G139S, V152E y I155N, previamente cargadas con cromato radioactivo, mostraron una salida de cromato significativamente menor comparada con la cepa resistente PAO1(pEPL1) (**Figura 7**). La

Tabla 2. Características de los plásmidos mutados en el gen *chrA*

Plásmido	Aminoácido reemplazado	Localización^b
pEPL1	Silvestre	---
pSAE5	G139S^a	STM IV
pSAE6	V152E	STM IV
pSAE7	R98Q	C1
pSAE8	I155N	C2
pSAE10^c	A95T P111S	STM II
pSAE11	A142P	STM III
pSAE12	G81E	STM IV
pSAE14^c	K96Q A390D	STM II
pSAE15	V269D	C1 C4
pEAB4^d	A204V	C3
pEAB5^d	F182I	P3
pEAB7^d	A202G	C3

^aSe indica el aminoácido silvestre, el número del residuo en la proteína y la abreviatura del aminoácido en la mutante correspondiente.

^bSTM, segmento transmembranal; C, asa citoplásmica; P, asa periplásmica. Posición de acuerdo a la figura 2.

^cDobles mutantes.

^dMutantes de sensibilidad a cromato intermedia

Adaptado de Aguilera y col. (2004)

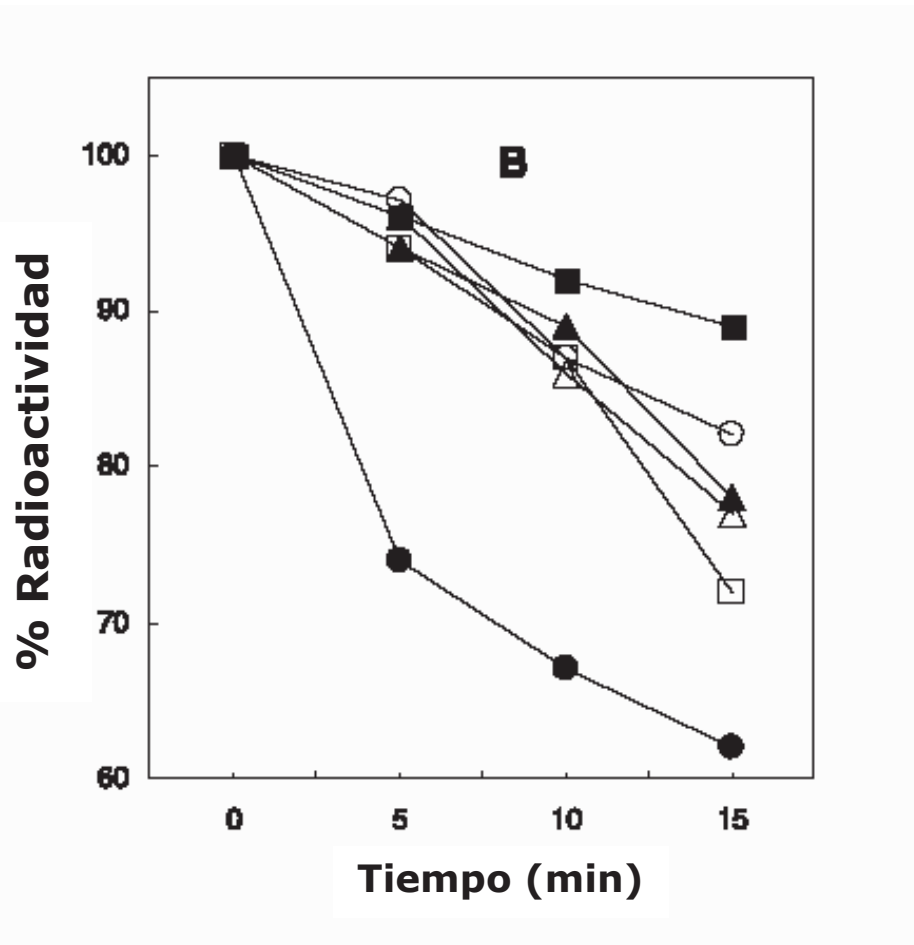


Figura 7. Expulsión de cromato de las mutantes del gen *chrA* de *P. aeruginosa*. Cepa resistente PAO1 (pEPL1) (●), cepa sensible PAO1 (○). Las mutantes PAO1 (pSAE7) con la mutación V152E (◐), PAO1 (pSAE7) con la mutación R98Q (◑), PAO1 (pSAE5) con la mutación G149S (■) y PAO1 (pSAE8) con la mutación I155N (◒). Adaptada de Aguilera y col. 2004.

velocidad inicial de salida de cromato de las mutantes fue parecida a la presentada por la cepa sensible PAO1. Con estos resultados se confirmó que las mutantes tienen alterado el sistema de expulsión de cromato (Aguilera y col., 2004).

La sensibilidad de las mutantes obtenidas se debió en algunos casos a la eliminación de cargas positivas, a la adición de cargas negativas o a una alteración en la estructura de la proteína por la introducción de residuos de distinto tamaño o polaridad. La importancia funcional de algunos residuos se demostró aún más por su alta conservación en un alineamiento múltiple de las secuencias de varios homólogos de ChrA (**Figura 8**).

Al ubicar las diferentes mutaciones obtenidas en el modelo topológico, en su mayoría se localizaron en segmentos transmembranales y asas citoplásmicas de la región amino de la proteína (**Figura 9**), razón por la cual se propuso que esta región era más importante que el dominio carboxilo, lo cual es reforzado en el análisis filogenético, en el cual se encontró que el dominio amino está más conservado que el dominio carboxilo (Díaz-Pérez, 2006). En un trabajo más reciente, Jiménez-Mejía y col. (2006) proponen que cada dominio juega un papel diferente en el funcionamiento de la proteína ChrA, debido a la característica de que el dominio carboxilo tiene una orientación inversa en la membrana con respecto al dominio amino.

Además de mutagénesis al azar se ha realizado análisis estructura-función de la proteína ChrA empleando mutagénesis dirigida, tomando como base para la

		**	*	***	*	*			
PSEAE-P14285_416_aa	42	AWGGPVAQIDMLRREL	VDEERWIS	SSKRFNKL	LAVMQVLP	GPPEAHEICVHLG	IRAKGRLLGGVLAGLGFMLP	111	
WAUHU-P17551_401_aa	37	GFGGPVALAGYMHRDL	VEARQWIT	DDGDYKEGL	ALAQLAPG	PLAAQLAIYLG	VVHYRIVGATLVGVAFVLP	106	
RALME-ZP_00024026_407_aa	43	GFGGPVALAGHMRRDL	VEARQWIT	DDGDYKEGL	ALAQLAPG	PLAAQLAIYLG	VVHYRILGATLVGIAFVLP	112	
RALSO-NP_522116_401_aa	37	GFGGPVALAGYMRRDL	VEARQWIT	SEADYKEGL	ALAQLAPG	PLAAQLAIYLG	VVHYRILGATLVGIAFVLP	106	
BURCE-ZP_00221417_382_aa	15	GFGGPVALAGYMRRDL	VDQRGWI	TEADYKEG	MTLAQMAP	GPMAAQLAIYLG	FVHYRLLGATLVGFVLP	84	
BURCE-ZP_00224938_392_aa	28	GFGGPVALAGYMRRDL	VERRGWI	TEADYKEG	LTLAQLAPG	PMAAQLAIYLG	FVHYRVAGATLVGCAFVLP	97	
CHRFI-NP_900592_393_aa	29	GFGGPVALVGYMHRDL	VERHGWIA	EADYKEGL	ALAQLAPG	MAAQTAIYLG	VVHYRTLGLATLAGLAFVLP	98	
BURFU-ZP_00027400_402_aa	38	GFGGPVALAGYMRRDL	VERRQWIT	TEADYKEGL	ALAQLAPG	PLAAQLAIYLG	FVHYRFLGATLVGLAFVLP	107	
CYTHU-ZP_00116649_385_aa	23	GFGGPVALVGYMHRDL	VETKKWIS	EEDYKEG	MALSQAPG	PLAAQLCIYLG	VVHYRITGATVAGIAFVLP	92	
SYNSP-C56274_393_aa	30	GFGGPVALVGYMHRDL	VEERQWIS	EAEYQEG	LTLAQVAPG	PLAAQLSFLYLG	VVHYGFLGSALVGLAFVLP	99	
ANOGA-XP_306818_384_aa	19	GFGGPVALVSYMHRDL	VEERKWI	SEEEYQ	QVALAQLAPG	PLAAQLGIYLG	VVHYRLLGATLVGLAFVLP	88	
SYNSP-BAA18657_399_aa	40	SFGGPAAHAMMEEV	VRRQWLS	HEKPLDL	IGVTNLI	PGPNSTELAIH	LYGERGKWAAGLIGGVAFVLP	109	
NOSSP-NP_485153_402_aa	43	AFGGPAAHIAMMDE	VNRRRWS	REKLLDL	LGITNLI	PGPNSTELAIH	IGYQGGWRGLLVAGSCFVLP	112	
GLOVI-NP_923511_423_aa	63	AFGGPAAHIAMMEDE	VRRRRLS	REAFVDDL	LGITNLI	PGPNSTEMAIH	IGLQKQAGLWVAVGVCVLP	132	
NOSPU-ZP_00105966_406_aa	23	GFGGPVAHIAMIEDE	VVKRRQW	LREHFLDL	LGATNLI	PGPNSTEMAIH	IGYIYAGWLGLIVSGVCFVLP	92	
CROWA-ZP_00179154_389_aa	23	GFGGPAAHIAMMEAE	ITDRQW	LSRQFLDL	LGATNLI	PGPNSTEMAIH	VGYIYGVWGLMVGICFVLP	92	
BDEBA-NP_968697_378_aa	27	SFGGPAAHISLMEE	FVHRRQW	VTRAEFL	LELLALT	NLI	PGPNSTELAIH	LGHRRAGWSGLVAVGVCVLP	96
UNCBA-NP_598135_410_aa	36	AWGGPVAQIDMLRREL	VDEERWIS	SSRFRNKL	LAVMQVLP	GPPEAHEICVHLG	IRAKGRLLGGVLAGLGFMLP	105	
SEPU-ZP_744701_450_aa	32	SFGGPAGQIAIMHQEL	VERRRWIS	ESRFLHAL	NFCMLLP	GPPEAQLATY	IGWLLHTRGGVIAGLAFVLP	101	
AZOVI-ZP_00090393_481_aa	63	SFGGPAGQISILHQEL	VERRRWIS	ESRFLHAL	NYCMLLP	GPPEAQLATY	IGWLLHTRGGVIAGLAFVLP	132	
PSEFL-ZP_00084601_451_aa	34	GFGGPAGQIAIMHQEL	VERRRWIS	ERRFLHAL	NYCMLLP	GPPEAQLATY	IGWLLHTRGGVLAGLAFVLP	103	
DESVO-YP_009133_445_aa	23	GFGGPAGQIALMHKTL	VEEKKWID	NERFLHAL	NYCHFLP	GPPEAQLATY	VGWLLHRTWGGIVAGTLFVLP	92	
MESLO-NP_106077_463_aa	35	SFGGPAGQIALMHREL	VEEKRWIS	EQRFHAL	NYCMLLP	GPPEAQLAIY	IGWLLHRTIGGLVAGLAFVLP	104	
SINME-NP_384859_480_aa	47	SFGGPAGQIAMHRI	VVEEKRWI	GETRFLHAL	NYCTLLP	GPPEAQLAIY	IGWLLHRTKGGVLAGLAFVLP	116	
BURCE-ZP_00221415_441_aa	9	SFGGPAGQIAVMHRI	VVEEKRWI	SETRFLHAL	NYCTLP	GPPEAHLAVV	GWLLHTRGGVLAGLAFVLP	78	
BRAJA-NP_771692_461_aa	32	SFGGPAGQIAVMHRI	VVEEKWIS	SEGRFLHAL	NYCMLLP	GPPEAQLATY	VGWLLMHRTAGGLMAGGLFVLP	101	
BRAJA-AAF22878_461_aa	32	SFGGPAGQIAVMHRI	VVEEKWIS	SEGRFLHAL	NYCMLLP	GPPEASSLR	TYVGVWLLMHRTAGGLMAGGLFVLP	101	
NOVAR-ZP_00093789_495_aa	68	SFGGPAGQIALMHREL	VDERQW	SEDOYLHAL	NFCMLLP	GPPEAQLATW	IGWLLHTRGGVLAGLAFVLP	137	
CAUCR-NP_419913_426_aa	22	GFGGPAGQIALHRE	VVEVRWID	DAEAFAR	LFCMLLP	GPPEAQLATW	IGWLLHTRGGVLAGLAFVLP	91	
CHLAU-ZP_00017652_394_aa	19	SFGGPVAHLGYFRADL	VERRRWL	DEVMYADL	IALCQFLP	GPBPASSQV	GIAGTRAGLLGGLAAWLGFTLP	88	
BURFU-ZP_00031598_449_aa	68	SFGGPAHLGYFRDEF	VRRRRLD	EHTEFSD	VVALCQFLP	GPBPASSQV	GIAGRLLGGVAGIAAALWLGFTLP	137	
PSEAE-NP_252979_401_aa	25	AFGGPIAHLGYFRDEF	VRRRRLD	ESSYADL	VALCQFLP	GPBPASSQV	GMALGLARAGYPCALAAWLGFTLP	94	
RALME-ZP_00024348_411_aa	30	SFGGPVAHLGYFRADF	VTRRRRL	TEHAYSDI	VALCQFLP	GPBPASSQV	GMVVGLSRAGYPCALAAWLGFTLP	99	

Figura 8. Alineamiento múltiple de parte de las secuencias de aminoácidos de los homólogos de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Se indica el nombre abreviado del organismo, el número de acceso de la proteína y el número de aminoácidos seguido por la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada proteína con el origen a la izquierda. Las regiones conservadas se indican mediante sombreado. Los asteriscos de la parte superior indican los aminoácidos mutados (Modificado de Díaz- Pérez, 2006)

selección de los aminoácidos su conservación en los alineamientos múltiples (**Figura 9**). Mediante este método se ha identificado o confirmado la esencialidad de ocho aminoácidos localizados en la mitad amino de la proteína (**Figura 8**) (Aguilar, 2005; Cortés, 2005; Díaz-Pérez, 2006).

Debido al carácter neutro de la mayoría de los aminoácidos identificados como esenciales en los análisis previos, se ha propuesto que estos residuos tienen un papel estructural, es decir, ayudando en la correcta formación del canal de translocación del cromato pero sin interaccionar directamente con el anión (Aguilar, 2005; Cortés, 2005; Díaz-Pérez 2006). Por ejemplo, en el caso de las glicinas (G44, G45, G81, G92 y G100) existe abundante información respecto a su papel estructural en proteínas transportadoras participando en la interacción hélice-hélice de los segmentos transmembranales (Landolt-Marticorena y col., 1993; Lemmon y Engelman, 1994; Green y col., 2000; Russ y Engelman, 2000; Wakabayashi y col., 2003; Aller y col, 2004), y en el caso de las prolinas (P80 y P82) en el interior de hélices transmembranales se ha propuesto que su importancia se debe a que generan una curvatura en la hélice, donde el lado convexo permitiría la estabilización de la hélice por medio de interacciones con otras hélices o con los lípidos de la membrana, dando rigidez a la estructura y optimizando la posición de residuos funcionalmente importantes (Brandl y Deber, 1985; von Heijne, 1991; Williams y Deber, 1991; Webb y col., 1992; Suelden y col., 2001; Labro y col., 2003).

Puesto que el sustrato de la proteína ChrA es un oxianión, los aminoácidos cargados positivamente, Arginina (Arg) y Lisina (Lys), a diferencia de los

aminoácidos hidrofóbicos, pueden interaccionar con el cromato participando en su reconocimiento y/o translocación.

III) HIPOTESIS

Los residuos básicos conservados de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* participan en el proceso de expulsión del cromato

IV) OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Establecer el papel de residuos básicos conservados en la función de la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Identificar y seleccionar residuos básicos conservados de la proteína ChrA
- b) Obtener y caracterizar mutantes de la proteína ChrA afectadas en los residuos elegidos en *E. coli*
- c) Transferir los genes mutados a *P. aeruginosa*
- d) Evaluar la susceptibilidad a cromato de las mutantes
- e) Proponer el papel de los residuos alterados en la función de la proteína ChrA

V. MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

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

- Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- Agar Luria Bertani (AL): Al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico.
- Caldo nutritivo (CN).
- Medio SOC: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.0584%, Glucosa 1%, MgCl₂ 1% y MgSO₄ 1%.
- Medio Mínimo M9: Glucosa 20 mM, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0.1 mM, mezcla de sales M9 1% (Sigma-Aldrich).
- K₂CrO₄ y MgSO₄ de los laboratorios Merck.

2. CEPAS EMPLEADAS

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

- ▶ JM101, *supE*, *thi-1Δ(lac-proAB)* [F', *traD36*, *proAB*, *laqI^qZΔM15*] (Yanisch-Perron y col., 1985).

- ▶ XL1-Blue, *end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17 supE44 recA1 lac* [F' *proAB laq1^q* ZΔM15 Tn10 (Tc)] (Stratagene).
- ▶ La cepa estándar de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 empleada como receptora de transformación (Holloway, 1969).

3. PLASMIDOS EMPLEADOS

El plásmido pUCP20 (**Figura 10A**) es un vector binario que cuenta con un origen de replicación para *E. coli* y otro para *Pseudomonas* (West y col., 1994). Tiene además un gen de resistencia a ampicilina y un segmento de DNA que codifica la región amino terminal de la β -galactosidasa (LacZ), que permite complementar la forma inactiva de LacZ de las cepas estándar de *E. coli* (sistema de α -complementación). De esta manera, las bacterias que tengan el plásmido con un inserto clonado desarrollaran colonias blancas Lac⁻, contra colonias azules Lac⁺ en presencia de un sustrato cromogénico (Xgal) cuando el vector se religue. Se empleó para la clonación de los genes de las diferentes mutantes.

Para la mutagénesis dirigida se empleó el plásmido pGEMT-ChrAHis (**Figura 10B**) el cual tiene clonado al gen *chrA* bajo la regulación del promotor *trc(trp-lac)*, fusionado en el extremo carboxilo a una secuencia que codifica para 6 histidinas (Aguilar, 2005).

El plásmido pUChrA (**Figura 10C**) consta del gen *chrAHis* silvestre clonado en el vector binario pUCP20 (Aguilar, 2005). Se empleó la cepa PAO1 transformada con este plásmido como control resistente en las pruebas de susceptibilidad a cromato.

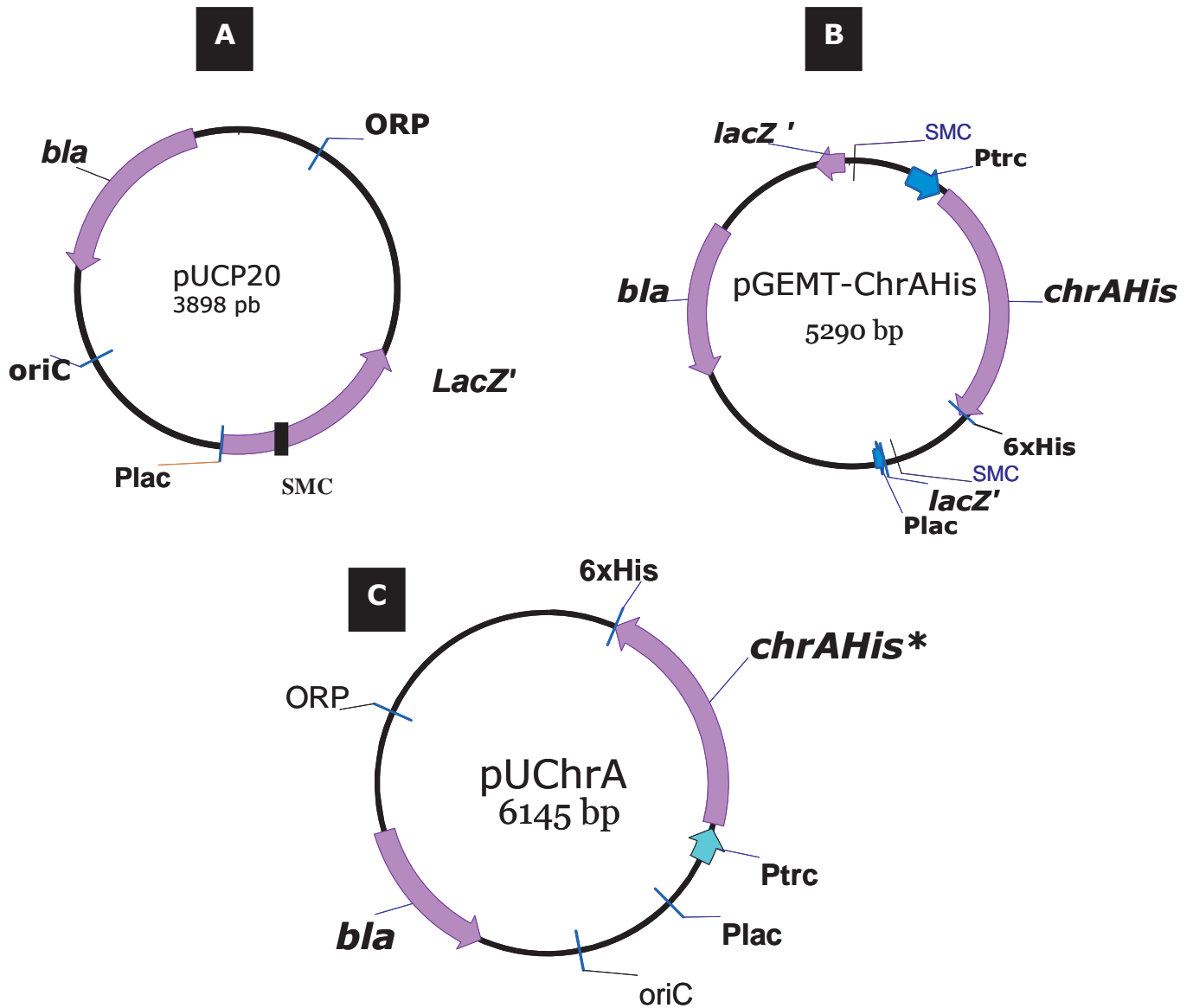


Figura 10. Esquema de los plásmidos empleados. A) pUCP20, vector binario que cuenta con orígenes de replicación para *E. coli* (*Ori C*) y *Pseudomonas* (ORP). Cuenta además con un gen de resistencia a ampicilina/carbenicilina (*bla*), el promotor del operon de lactosa (Plac), la porción que codifica para la β-galactosidasa y un sitio de policlonación (SMC). **B)** pGEMT-ChrAHis, cuenta con el gen *chrA* bajo la regulación del promotor *P_{trc}* y fusionado a una etiqueta que codifica para 6 histidinas (6xHis). **C)** pUChrA consta del gen *chrA* clonado en el vector pUCP20 (Aguilar, 2005).

4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMIDICO

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

En 4 ml de CL se creció un cultivo bacteriano durante 18-20 h a 37°C con agitación constante, posteriormente se distribuyó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugaron durante 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente.

Posteriormente la pastilla se suspendió en 100 µl de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM) y se le adicionaron 20 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Después a la suspensión formada se le agregaron 200 µl de la solución lítica recién preparada {NaOH 0.2 N y SDS (dodecilsulfato de sodio)1%}, se agitó suavemente y se incubó durante 5 min en hielo. Transcurrido este tiempo se le adicionaron 150 µl de una solución de acetato de potasio 5 M (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial pH 4.8), se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a temperatura ambiente. Se le adicionaron 500 µl de la mezcla 1:1 fenol-cloroformo y se mezcló moderadamente. Se centrifugó durante 5 min y al sobrenadante se le agregaron 500 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó durante 3 min. La fase acuosa superior se recuperó y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 1 h a -20°C. Se centrifugó durante 15 min a temperatura ambiente. Por último la pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% centrifugando durante 5 min entre cada lavado. Se recuperó la pastilla y se secó a temperatura ambiente para posteriormente resuspender la

pastilla de DNA obtenida en 50 μ l de agua desionizada estéril. Estas muestras se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a los corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El DNA aislado se sometió a un corrimiento electroforético, para ello se preparó un gel de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. Una muestra del DNA se mezcló con 2 μ l de amortiguador de carga [azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5%, sacarosa 40%] y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus Corporation modelo EC452) y se sometió a un voltaje constante de 120 voltios durante 1 h. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 10 min. Las bandas de DNA teñidas se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc.) y se fotografiaron con el "Sistema de Documentación y Análisis de electroforesis (EDAS) Kodak 120" (Eastman Kodak).

Como marcador de tamaño molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII*.

6. AISLAMIENTO DEL DNA DE GELES DE AGAROSA

Para purificar el DNA empleado en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" de Promega.

La banda de interés se cortó del gel de agarosa y se colocó en un tubo Eppendorf adicionado 10 μ l de solución de unión a membrana por cada 100 mg de gel. Se mezcló bien en el agitador y se incubó a 50-65°C hasta disolver completamente del gel. La minicolumna SV se insertó en un tubo de colección y se transfirió la solución disuelta en la columna y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 1 min a 12 000 rpm. Se lavó dos veces, primero con 700 μ l de solución de lavado de membrana y centrifugando 1 min a 12 000 rpm y después con 500 μ l con solución de lavado centrifugando ahora 5 min 12 000 rpm. La elución del DNA se hizo adicionando 40 μ l de agua grado HPLC y centrifugando 1 min a 12 000 rpm. Una alícuota del DNA se corrió en un gel de agarosa al 1% para determinar la concentración del DNA recuperado.

7. TRATAMIENTOS ENZIMATICOS DEL DNA

a) Restricción con endonucleasas

Los DNA plasmídicos se digirieron con endonucleasas empleando una unidad de enzima de restricción (Promega o Invitrogen) por microgramo de DNA e incubando a 37°C por un mínimo de 4 h o durante toda la noche. Después de este tiempo las muestras se sometieron a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

b) Ligaciones

Después de la recuperación y purificación de los fragmentos de DNA del gel de agarosa fueron ligados utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4

(Promega). Las ligaciones se dejaron como mínimo toda la noche a 4°C y las proporciones inserto-vector variaron según el experimento realizado. Se emplearon de 1-3 µl de la mezcla de ligación en la transformación.

8. TRANSFORMACION DE *Escherichia coli* POR ELECTROPORACION

a) Preparación de células competentes

De un cultivo de la cepa de *E. coli* crecido durante toda la noche se tomaron 4 ml para inocular 250 ml de CL contenidos en un matraz de 1L y se incubó durante 3 h a 37°C con agitación constante hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente se incubó el cultivo en hielo durante 20 min y se distribuyeron alícuotas en tubos para centrifugar durante 10 min a 6000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó dos veces por resuspensión con agua estéril fría y glicerol al 10% frío y se centrifugó entre cada lavado durante 10 min a 8000 rpm a 4°C. Después del último lavado la pastilla se resuspendió en agua estéril más glicerol al 20%. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 0.1 ml en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Estas células se utilizaron para la transformación o bien fueron almacenadas a -80°C.

b) Transformación

Las transformaciones realizadas por electroporación de las diferentes cepas de *E. coli* empleadas se realizaron en un electroporador 2510 de Eppendorf. Las condiciones usadas fueron las indicadas por el proveedor del equipo.

9. TRANSFORMACION DE *Escherichia coli* POR CHOQUE TERMICO

a) Preparación de células competentes

Se preparó un preinóculo de la cepa de *E. coli* en 3 ml de CL y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Al siguiente día el preinóculo se vació a un matraz con 250 ml de CL y se incubó a 37°C hasta una absorbencia de 0.45-0.55 a 560 nm. El crecimiento se detuvo incubando en hielo por 5 min, se centrifugó a 6 000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 25 ml de Tfb1 (acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15%, se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M y se esterilizó por filtración en un filtro de 0.22 µm) frío y se incubó en hielo por 20 min y posteriormente se centrifugó a 6 000 rpm por 10 min. La pastilla se resuspendió en 2 ml de Tfb2 frío [(MOPS (ácido 4-morfolino propano sulfónico) 75 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 100 mM y glicerol 15%), se ajustó el pH a 6.5 con KOH y se esterilizó por filtración en un filtro de 0.22 µm. Posteriormente se hicieron alícuotas de 100 µl de la suspensión bacteriana y se almacenaron a -80°C.

b) Transformación

Se mezcló el DNA con 100 µl de la suspensión de células bacterianas competentes y se incubó en hielo 20 min. Después de este tiempo se incubaron a 42°C en un baño de agua por 45 seg y los tubos se transfirieron al hielo incubándose por 3 min. Se les adicionó 1 ml de CL precalentado, se incubaron a

37°C por un máximo de 1 h, se concentró el cultivo resuspendiendo en 100 µl y se plaqueó en cajas de AL con ampicilina.

10. ELECTROPORACION DE *P. aeruginosa* O *E. coli* SEMBRADAS RECIENTEMENTE EN PLACA

Para la electroporación de *P. aeruginosa* se empleó el siguiente método (Enderle y col., 1998).

Se sembró en una placa de AL la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y se incubó 16 h a 37°C, posteriormente la caja se mantuvo a temperatura ambiente. Se agregó a un tubo de 1.5 ml, 500 µl de agua desionizada, estéril y fría y después se transfirieron aproximadamente 3 mg de células de la caja al tubo, usando un asa estéril. Los tubos se mezclaron moderadamente en el agitador hasta tener una mezcla homogénea y la suspensión celular se centrifugó 1 min a 14 000 rpm desechando el sobrenadante. Posteriormente las células se resuspendieron con la pipeta en 500 µl de agua desionizada estéril y fría y se centrifugaron nuevamente 2 min desechando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en agua estéril y fría en un volumen de aproximadamente 500 µl, se mantuvieron en hielo y se usaron inmediatamente para la electroporación.

El DNA usado para la electroporación se diluyó en agua destilada estéril a una concentración final entre 5-50 ng de plásmido en 5-10 µl de volumen final. Después el DNA se adicionó a 100 µl de células y se mezcló moderadamente, la mezcla se transfirió a una celda de electroporación en hielo y se les dió un pulso de 1.8 ó 2.5 KV. Inmediatamente después se le adicionó 1 µl de medio SOC a la

celda, se mezcló suavemente con la pipeta y se transfirió a un tubo con 1 ml de CL y se incubó de 1.5 a 4 h a 37°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo se plaquearon 100 a 200 µl de cultivo en cajas de AL con carbenilicina (200 µg/ml).

Para la electroporación de *E. coli*, 100 µl de células se mezclaron moderadamente con 1-3 µl del DNA usado para transformar. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación en hielo y se les dió un pulso de 1.8 ó 2.5 KV. Inmediatamente después se transfirió a un tubo con 1 ml de CL y se incubó de 1 a 1.5 h a 37°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo se plaquearon 100 a 200 µl de cultivo en cajas de AL con ampicilina (100 µg/ml).

11. MUTAGENESIS DIRIGIDA

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida se empleo el método de PCR y digestión con *DpnI* (Fisher y Pei, 1997) implementado previamente en nuestro laboratorio (Aguilar, 2005). Para este método se empleó el plásmido pGEMT-ChrAHis (**Figura 10a**).

a) Diseño de oligonucleótidos mutagénicos

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

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

La mutación se localizó al centro de los oligonucleótidos los cuales son complementarios entre sí. El diseño se realizó de manera que tuvieran un mínimo de GC de 40% y por lo menos una G o C en los extremos. Además, los oligonucleótidos no fueron fosforilados. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Invitrogen. En la **Tabla 3** se muestran los oligonucleótidos diseñados para cada mutación.

b) Síntesis de la cadena mutada

La síntesis de la cadena mutada se hizo por medio de PCR. Se puso la siguiente reacción: DNA (100-150 ng), oligonucleótido directo y reverso (250 ng), buffer de reacción 10X (5 µl), dNTPs mix 10 mM (1 µl), 1 µl de DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene) (2.5 U/µl), se ajustó la reacción a un volumen final de 50 µl con agua HPLC. La enzima siempre se adicionó al final.

Las condiciones del PCR usadas fueron las siguientes: 94°C/1 min (desnaturalización inicial), 94°C/1 min (desnaturalización), 62°C/1 min (alineamiento), 72°C/ 7.5 min (extensión) y 72°C/7.5 min (extensión final), las muestras se sometieron a 16 ciclos de amplificación.

c) Digestión con *DpnI*

Después de la amplificación de la cadena mutada la reacción se digirió con la enzima de restricción *DpnI* (Invitrogen) para la eliminación del DNA molde. Se puso la siguiente reacción: DNA (14.5 µl), buffer 10X (2 µl), BSA 1mg/ml (2 µl)

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis

Mutación ^a	Directo ^b (5'→3')	Reverso ^b (5'→3')
R34→K	CCACAGCTCTTCGCG <u>AAA</u> TTCTCAAGTTCGGC	GCCGAACCTTGAGGAA <u>TTT</u> CGCGAAGAGCTGTGG
R34→T	CCACAGCTCTTCGCG <u>ACC</u> TTCTCAAGTTCGGC	GCCGAACCTTGAGGAA <u>GGT</u> CGCGAAGAGCTGTGG
R34→L	CCACAGCTCTTCGCG <u>CTG</u> TTCTCAAGTTCGGC	GCCGAACCTTGAGGAA <u>CAG</u> CGCGAAGAGCTGTGG
K37→R	TTCGCGCGCTTCTC <u>CGC</u> TTCGGCTTGCTCGCA	TGCGAGCAAGCCGAA <u>GCG</u> GAGGAAGCGCGCGAA
K37→T	TTCGCGCGCTTCTC <u>ACG</u> TTCGGCTTGCTCGCA	TGCGAGCAAGCCGAA <u>CGT</u> GAGGAAGCGCGCGAA
K37→L	TTCGCGCGCTTCTC <u>CTG</u> TTCGGCTTGCTCGCA	TGCGAGCAAGCCGAA <u>CAG</u> GAGGAAGCGCGCGAA
K37→E	TTCGCGCGCTTCTC <u>GAG</u> TTCGGCTTGCTCGC	GCGAGCAAGCCGAA <u>CTC</u> GAGGAAGCGCGCGAA
R55→K	AGATCGACATGTTGCGC <u>AAG</u> GAGCTCGTGGACGAGGA	TCCTCGTCCACGAGCTC <u>CTT</u> GCGCAACATGTTCGATCT
R55→T	AGATCGACATGTTGCGC <u>ACG</u> GAGCTCGTGGACGAGGA	TCCTCGTCCACGAGCTC <u>CGT</u> GCGCAACATGTTCGATCT
R55→L	AGATCGACATGTTGCGC <u>CTG</u> GAGCTCGTGGACGAGGA	TCCTCGTCCACGAGCTC <u>CAG</u> GCGCAACATGTTCGATCT
R98→K	ATCCGAGCAAAGGGGA <u>AAG</u> CTGGGGGGCGTGCTG	CAGCACGCCCCCAG <u>CTT</u> CCCCCTTTGCTCGGAT
R154→K	GTGCGCGCCGTGCAC <u>AAG</u> ATCGGCGAGCACATC	GATGTGCTCGCCGAT <u>CTT</u> TGTGCACGGCGCGCAC
R154→T	GTGCGCGCCGTGCAC <u>ACG</u> ATCGGCGAGCACATC	GATGTGCTCGCCGAT <u>CGT</u> TGTGCACGGCGCGCAC
R154→L	GTGCGCGCCGTGCAC <u>CTG</u> ATCGGCGAGCACATC	GATGTGCTCGCCGAT <u>CAG</u> TGTGCACGGCGCGCAC
R179→K	CTGGCAGCCATAGGTA <u>AAG</u> TGCGACTTCTGGATC	GATCCAGAAGTCGAC <u>CTT</u> ACCTATGGCTGCCAG
R179→T	CTGGCAGCCATAGGTA <u>ACG</u> TGCGACTTCTGGATC	GATCCAGAAGTCGAC <u>GGT</u> ACCTATGGCTGCCAG
R179→L	CTGGCAGCCATAGGTA <u>CTG</u> TGCGACTTCTGGATC	GATCCAGAAGTCGAC <u>CAG</u> ACCTATGGCTGCCAG
R201→K	CTCGTGCTGAATCATA <u>AAG</u> GCCTCAGCGCTCTTG	CAAGAGCGCTGAGGC <u>CTT</u> TATGATTCAGCACGAG
R201→T	CTCGTGCTGAATCATA <u>ACG</u> GCCTCAGCGCTCTTG	CAAGAGCGCTGAGGC <u>GGT</u> TATGATTCAGCACGAG
R201→L	CTCGTGCTGAATCATA <u>CTG</u> GCCTCAGCGCTCTTG	CAAGAGCGCTGAGGC <u>CAG</u> TATGATTCAGCACGAG
K248→R	TTCGCGTCGGGCTG <u>CGC</u> GCCGGCTTGCTCACC	GGTGAGCAAGCCGGC <u>GCG</u> CAGGCCCGACGCGAA

Tabla 3 (continuación)

K248→T	TTCGCGTCGGGCCTG <u>ACG</u> GCCGGCTTGCTCACC	GGTGAGCAAGCCGGCC <u>CGT</u> CAGGCCCGACGCGAA
K248→L	TTCGCGTCGGGCCTG <u>CTG</u> GCCGGCTTGCTCACC	GGTGAGCAAGCCGGCC <u>CAG</u> CAGGCCCGACGCGAA
K394→R	TTATGCCTGGAAGAAC <u>CGC</u> CTCAACGTCGTCGTCG	CGACGACGACGTTGAG <u>GCG</u> GTTCTTCCAGGCATAA
K394→T	TTATGCCTGGAAGAAC <u>ACG</u> CTCAACGTCGTCGTCG	CGACGACGACGTTGAG <u>CGT</u> GTTCTTCCAGGCATAA
K394→L	TTATGCCTGGAAGAAC <u>CTG</u> CTCAACGTCGTCGTCG	CGACGACGACGTTGAG <u>CAG</u> GTTCTTCCAGGCATAA

^a Se indica el número de residuo en la proteína ChrA y el aminoácido por el cual se cambió, en el código de una letra

^b En negritas y subrayado se indica el codón que codifica para el nuevo aminoácido.

y 1.5 μ l de *DpnI* (10-20 U). La reacción se incubó toda la noche a 37°C.

d) Transformación

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

12. SECUENCIACION DE NUCLEOTIDOS

a) Oligonucleótidos empleados

Para la secuenciación del gen *chrA* de las mutantes se emplearon los oligonucleótidos R201K directo y K248T reverso para obtener la secuencia de las regiones que codifican las porciones carboxilo y amino de la proteína, respectivamente (**Tabla 3**).

b) Amplificación de los fragmentos utilizando didesoxirribonucleótidos

Para llevar a cabo la reacción de extensión de los fragmentos en el proceso de secuenciación, se utilizó un kit comercial Big Dye terminator 3.1 (ABI) y se utilizó DNA (300 ng/ μ l), 1 μ l de oligonucleótidos (uno para cada evento) (10 pmol/ μ l), 4 μ l de la mezcla de terminadores Big Dye, 2 μ l de amortiguador de reacción (5X), en un volumen final de 20 μ l. Para la secuenciación de los plásmidos de las mutantes, las muestras se sometieron a 25 ciclos de

amplificación en las siguientes condiciones: 96°C/30 seg (desnaturalización), 50°C/30seg (alineamiento), 60°C/4min (extensión).

c) Purificación de las muestras

El lavado de las muestras de secuenciación se hizo de la siguiente manera:

Al DNA amplificado por PCR se le adicionaron 2 µl de EDTA 125 mM pH 8.0 y 2 µl de acetato de sodio 3 M pH 4.8. Para precipitar el DNA se adicionaron 50 µl de etanol absoluto frío y se mezclaron las muestras levemente en el agitador. Las muestras se incubaron 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron por 20 min a 13 000 rpm y el sobrenadante se retiró con una micropipeta y se desechó. A la pastilla formada se le adicionaron 250 µl de etanol al 70% y se mezclaron en el agitador centrifugando por 10 min en las condiciones antes descritas. El sobrenadante se retiró nuevamente con la micropipeta y las muestras se secaron en un concentrador. Posteriormente se resuspendieron en 25 µl de amortiguador TSR y se mezclaron en el agitador de 2-3 min. Se incubaron 2 min a 95°C y se colocaron en hielo por 5 min. Finalmente se pasaron a tubos de secuenciación y se llevaron al secuenciador o se almacenaron a -20°C.

d) Secuenciación de las muestras

Una vez purificadas las muestras se colocaron en un secuenciador ABI Prism 310 bajo las siguientes condiciones de corrida: 15 kV, 50°C y 50 min de corrida en un capilar de 45 µM.

e) Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se realizó empleando el programa de computadora DNAsis V.2.0 (Hitachi Inc.), en el cual se empalmaron secuencias obtenidas con cada uno de los oligonucleótidos para obtener la secuencia completa de las muestras secuenciadas. El alineamiento de secuencias se realizó empleando el programa Clustal W para confirmar el cambio ocurrido en las mutantes.

13. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO

Se prepararon tubos con 4 ml de CN y con concentraciones variables de cromato como K_2CrO_4 . A cada tubo se le agregaron 40 μ l de un cultivo crecido en CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante. Como control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo que no contenía cromato. Los tubos inoculados se incubaron por un periodo de 18-20 h a 37°C con agitación constante. La susceptibilidad se midió en función de la absorbencia de los cultivos a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

Para las pruebas de susceptibilidad en medio mínimo, se sustituyó el CN por medio mínimo M9. los cultivos se prepararon como en las pruebas en CN y la incubación se hizo a 37°C o a 42 °C.

Se determinó el porcentaje del nivel de resistencia conferido por cada mutante obteniendo el promedio de absorbencia a las concentraciones usadas. A cada valor se le restó el obtenido para el control sensible PAO1 (pUCP20) y

estableciendo como 100% la absorbencia del control resistente PAO1 (pUChrA).

VI) RESULTADOS

Análisis de estructura-función llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo ha permitido la identificación de varios aminoácidos esenciales para la función de la proteína ChrA, la expulsión del cromato del citoplasma, en la bacteria *P. aeruginosa*. Se ha propuesto que esos residuos tienen una participación en la estructura tridimensional de la proteína. Sin embargo, hasta el momento no se ha explorado el aspecto de la interacción cromato-proteína y debido a que el cromato tiene carga negativa, es posible que los aminoácidos con una cadena lateral de carga positiva participen en el reconocimiento y unión del cromato para su translocación al exterior celular. En este trabajo nos enfocamos por lo tanto al análisis de residuos básicos conservados de la proteína ChrA, Argininas y Lisinas, que pueden estar participando en el proceso de expulsión del cromato y para esto el primer paso fue el análisis de conservación de los residuos básicos.

1. Identificación y selección de los aminoácidos básicos conservados en la familia CHR

Para la obtención de los aminoácidos con grupos R básicos más conservados se analizaron inicialmente los alineamientos múltiples con las 135 proteínas de la familia CHR que contiene las proteínas SCHR y LCHR (**Figura 4**) y después con las 77 proteínas de cadena larga (LCHR) donde se incluyen las ChrA funcionales (**Figura 5**). En estos alineamientos no se encontraron aminoácidos básicos con una alta conservación, por lo que se decidió trabajar con los subgrupos en los que se localizan las dos proteínas cuya funcionalidad ha sido

demostrada: ChrA de *Cupriavidus metallidurans*, en el subgrupo CHR2, y ChrA de *P. aeruginosa*, en el subgrupo CHR5 (**Figura 5**), 24 proteínas en total (**Tabla 4**) El análisis de conservación con estas proteínas nos permitió identificar ahora sí aminoácidos básicos conservados (**Figura 11**). En este análisis se observó que solamente seis aminoácidos tienen una alta conservación, mientras que la mayoría de los residuos básicos tienen menos del 40% de conservación (**Tabla 5**). Por esta situación, se decidió tomar como primer criterio de selección para elegir cuales aminoácidos se analizarían en este trabajo considerar solamente aquellos que tuvieran un nivel de conservación mayor al 80%, condición cumplida por los residuos Lisina 37, Arginina 55, Arginina 62, Arginina 154, Lisina 248 y Arginina 394.

El segundo criterio de selección que se utilizó fue la posición del aminoácido elegido, con respecto a la cual se decidió analizar sólo un aminoácido en cada región topológica de la proteína (asa hidrofílica o segmento transmembranal). Esto para poder abarcar en nuestro estudio al menos un residuo en diferentes regiones de la proteína y no concentrarnos en una parte muy pequeña de forma que lográramos obtener una información global, puesto que en los análisis previos de mutagénesis dirigida la mayoría de los residuos mutados se ubicaron en las regiones del segmento transmembranal (STM) I, el asa periplásmica 1 y el STM II (**Figura 8**). Dos residuos que cumplieron el primer criterio de conservación se ubican en el asa periplásmica 1, la Arg-55 y la Arg-62; con base a este criterio se decidió seleccionar para el análisis posterior a la Arg-55 que se encuentra más conservada (95% vs 85%).

Tabla 4. Proteínas de la familia CHR empleadas para la búsqueda de residuos básicos conservados

No. de acceso	Proteína/ORF	Organismo	Tamaño ¹
P14285	ChrA ^a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	416
P17551	ChrA ^b	<i>Ralstonia metallidurans</i> (ahora <i>Cupriavidus metallidurans</i>)	401
ZP_00418897	Avin2082 ^a	<i>Azotobacter vinelandii</i>	453
AAF22878	NA ^{2a}	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	461
NP_771692	Blr5052 ^a	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	461
ZP_00427390	Bucepa02004516 ^b	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> -G4	560
ZP_00427389	Bucepa02003973 ^b	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> -G4	537
ZP_00422384	Bucepa02000074 ^b	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> -G4	392
ZP_00277269	Bcep0155 ^b	<i>Burkholderia fungorum</i>	398
NP_419913	CC1097 ^a	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	426
NP_900592	chrA ^b	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	392
ZP_00310886	Chut0006 ^b	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	385
YP_009133	DVUA0093 ^a	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subs. <i>vulgaris</i> str. <i>Hildenborough</i>	445
ZP_00613901	Magn026383 ^a	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	419
NP_106077	mlr5407 ^a	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	463
ZP_00613901	MBNC02003383 ^a	<i>Mesorhizobium</i> sp BNC1	455
ZP_00872274	Saro0797 ^a	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	495
YP_347876	Plu 1843 ^a	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfo-1	447
NP_744701	PP2556 ^a	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	450
ZP_00595521	Reut3320 ^b	<i>Ralstonia metallidurans</i> (ahora <i>Cupriavidus metallidurans</i>)	408
NP_522116	chrA ^b	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	401
NP_384859	chrA ^a	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	480
C56274	SrpC ^b	<i>Synechococcus</i> sp.	393
NP_5981135	chrA ^a	<i>Pseudomonas</i> sp.	410

¹No. de aminoácidos, ²No asignada, ^aSubgrupo CHR5, ^bSubgrupo CHR2

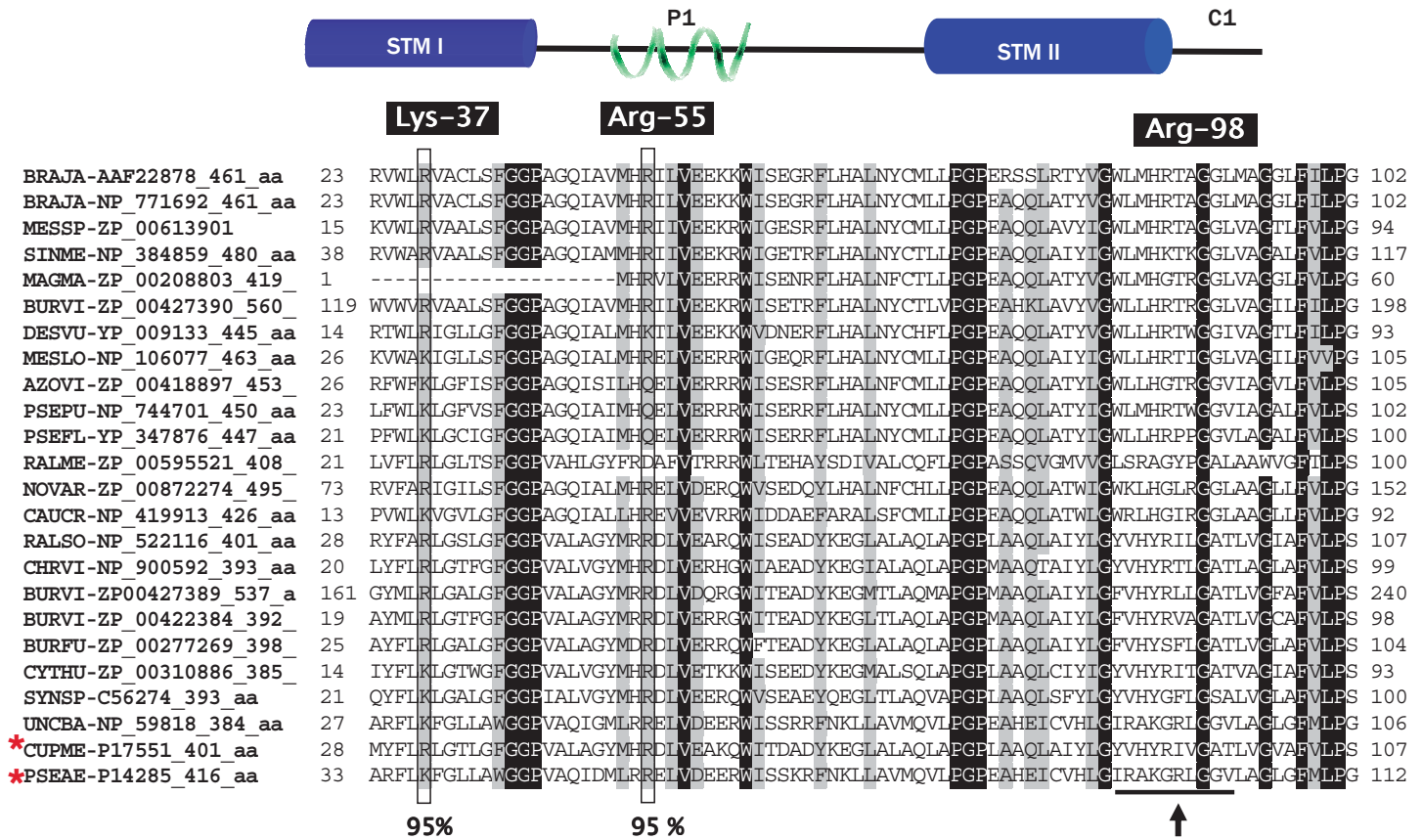
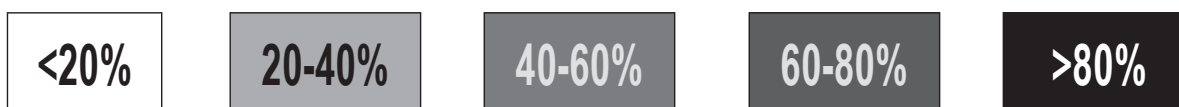


Figura 11. Conservación de residuos básicos de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Parte del alineamiento múltiple de proteínas de los subgrupos CHR2 y CHR5 de la familia CHR, donde se indica a la izquierda el nombre abreviado del organismo (con asteriscos se indican las proteínas funcionales), el número de acceso de la proteína y el tamaño; los números al inicio y final de la secuencia corresponden al número de aminoácido. En la parte superior se indica la región topológica correspondiente a la secuencia de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los recuadros señalan aminoácidos conservados con su respectivo porcentaje en la

Tabla 5. Conservación de residuos básicos de la proteína ChrA en los subgrupos CHR2 y CHR5

Residuo	Posición ^a	% Conservación (identidad/similitud)
R10	N	8/16
K13	N	4/7
R34	STM I	8/8
K37	STM I	37/95
R54	P1	25/25
R55	P1	79/95
R62	P1	51/87
K67	P1	4/29
R68	P1	54/58
K71	P1	8/45
R94	STM II-C1 ^b	12/16
K96	C1	8/8
R98	C1	8/8
R150	STM IV	8/25

Residuo	Posición	% Conservación (identidad/similitud)
R154	STM IV-C2 ^b	62/95
R163	C2	33/58
R179	STM V-P3 ^b	16/20
R201	C3	8/8
K227	P3	8/8
K248	STM VIII	60/87
R265	C4	8/12
R271	C4	8/8
R331	STM X-C5 ^b	8/8
K339	C5	16/37
R340	C5	16/33
R370	P6	8/12
K392	C6	8/8
K394	C6	75/95



^aAbreviaturas: N, región amino terminal; STM, segmento transmembranal; P, asa periplásmica; C, asa citoplásmica

^b Residuos localizados en las interfases señaladas

Finalmente, el tercer criterio que se tomó en consideración fue el contar con información previa de algún residuo básico. La Arg-98, localizada en el asa citoplásmica 1, fue identificada previamente como esencial por mutagénesis al azar (Aguilera y col., 2004) en donde se obtuvo una mutante por Glutamina, la cual presentó una susceptibilidad y transporte de cromato similar al de la cepa sensible. Además, la Arg-98 se encuentra en un motivo identificado como importante en un grupo de proteínas cercano a la familia CHR, la superfamilia de facilitadores mayores (MFS, por sus siglas en inglés).

Con estos tres criterios se seleccionaron inicialmente seis residuos básicos con el fin de analizarlos por mutagénesis dirigida (**Figura 12**): la Lisina 37, ubicada en el STM I con una conservación del 95%; la Arginina 55 en el asa periplásmica 1, conservada en el 95%; la Arginina 98 en el asa citoplásmica 1, la cual tiene menos del 20% de conservación pero cumple los criterios de posición e información previa; la Arginina 154, en la interfase del STM IV y el asa citoplásmica 2, con un 95% de conservación; la Lisina 248, en el STM VIII, con un 87% de conservación, y la Lisina 394 en el asa citoplásmica 6 conservada en un 95%. Como se señala más adelante, los residuos R34 y R201 también se mutagenizaron (**Figura 12**).

2. Selección de cambios en los aminoácidos elegidos para la mutagénesis dirigida

Con el fin de evaluar el posible papel de los aminoácidos básicos elegidos en la función de la proteína ChrA, se decidió intentar hacer tres reemplazos para cada aminoácido. Así los cambios planteados fueron los

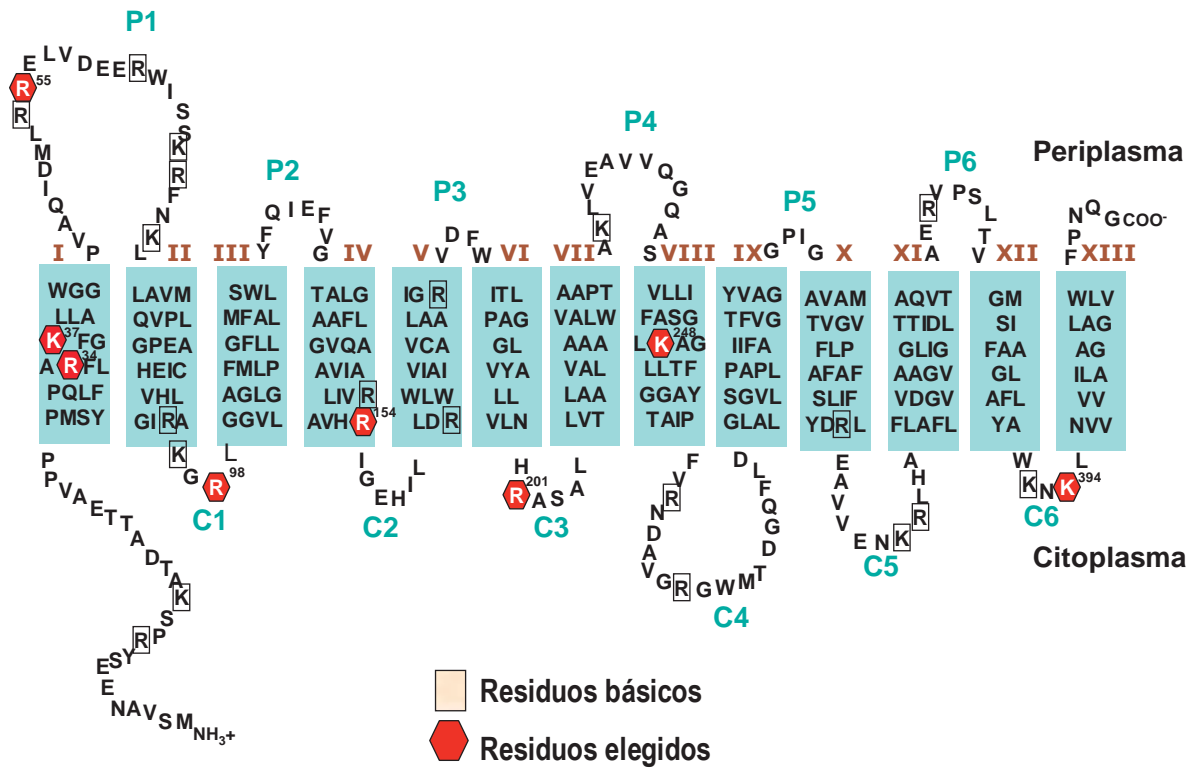


Figura 12. Aminoácidos básicos de la proteína ChrA. Esquema de la topología de la proteína ChrA donde se indican con un recuadro los residuos básicos, Arginina (R) y Lisina (K). En el hexágono rojo los ocho aminoácidos seleccionados en este trabajo para mutagénesis dirigida.

siguientes: 1) cambio conservativo, en el cual la Lisina se cambió por Arginina y viceversa, donde se mantuvo la característica de la carga positiva; 2) Treonina, un cambio moderado en el cual se eliminó la carga pero se mantuvo el carácter hidrofílico y 3) Leucina, el cambio más drástico dado que además de eliminar la carga se cambió el carácter colocando un residuo hidrofóbico aunque se mantiene un volumen similar al residuo original [168.6 (Lys) y 173.4 (Arg) Å³ vs 166.7 Å³ (Leu)] (**Figura 13**).

3. Obtención y caracterización de las mutantes en ChrA

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

Se diseñaron inicialmente 16 juegos de oligonucleótidos (**Tabla 3**), los cuales cumplieron con las características requeridas por el método como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos. Se usó como molde el plásmido pGEMT-ChrAHis (Aguilar, 2005), el cual cuenta con el gen codificante de la proteína ChrA bajo la regulación del promotor *P_{trc}*, fusionado a una etiqueta que codifica para seis histidinas, la cual podrá ser utilizada para la futura inmunodetección de las proteínas mutantes, y cuenta con 29 sitios de restricción para la enzima *DpnI*.

Se llevó a cabo el procedimiento de PCR para las mutaciones propuestas, usando las condiciones descritas por Aguilar (2005) y que se describen en Materiales y Métodos. Estas condiciones permitieron obtener la mayoría de las mutantes buscadas. Para obtener las mutantes K37R, R55T,

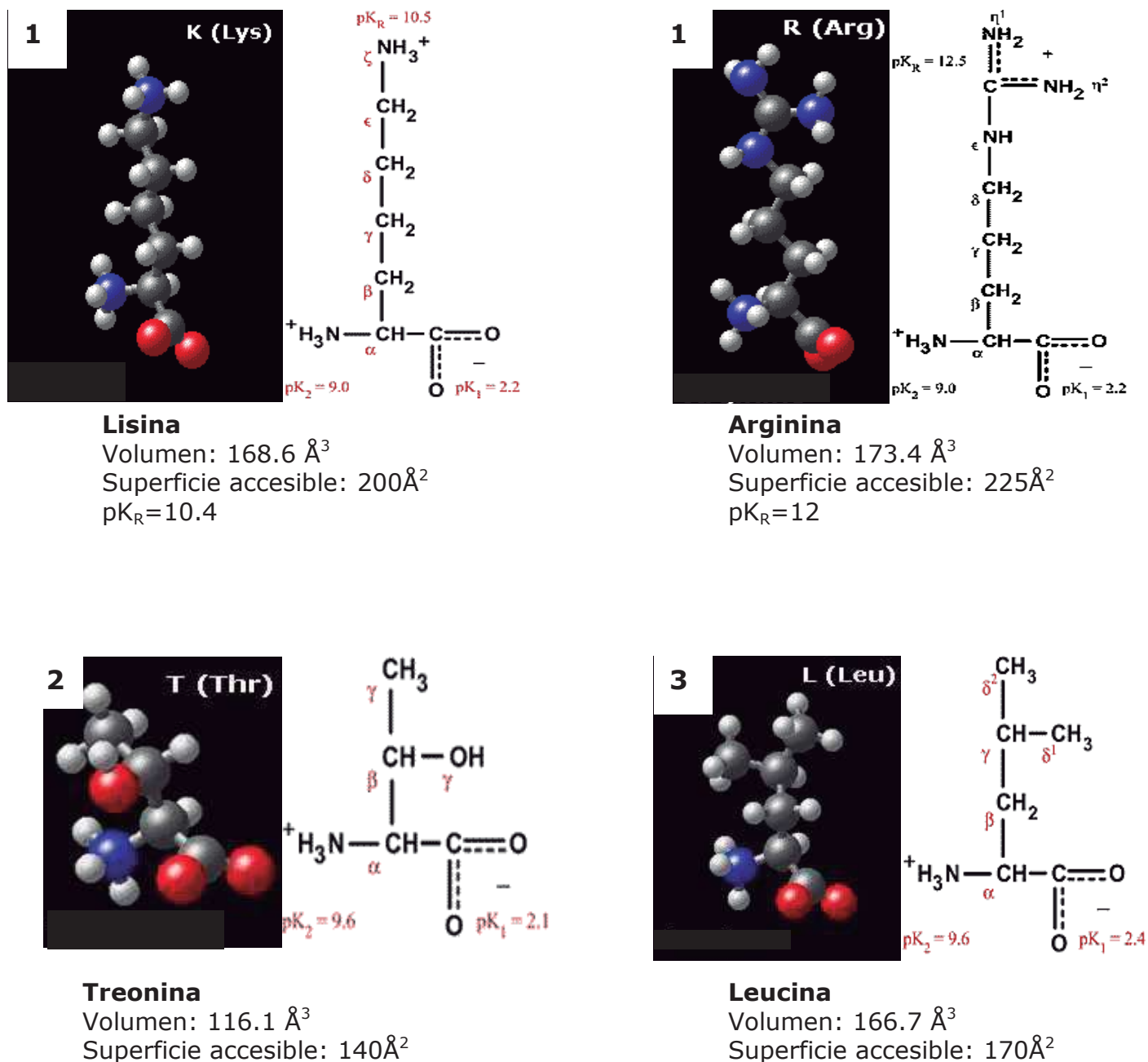


Figura 13. Cambios propuestos para la evaluación de los residuos básicos seleccionados. Se presentan las características principales de los aminoácidos. Los cambios se hicieron de acuerdo a los siguientes razonamientos: (1) por el aminoácido que conserve el carácter básico; (2) por un aminoácido que conserve el carácter hidrofílico pero no la carga; y (3) por un aminoácido de igual tamaño pero con diferente polaridad al aminoácido original.

K248R, K248T y R394T se realizó una modificación del método, aumentando la concentración de los oligos a 250 ng por reacción y/o aumentando la temperatura de alineamiento de 62 a 64°C. La mutante R154T no se logró obtener bajo ninguna de las condiciones probadas.

Después de llevar a cabo el PCR, la mezcla de reacción se sometió a digestión con la enzima *DpnI*, tras lo cual se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Se obtuvo un número de colonias variable para cada prueba de mutagénesis, desde 1 hasta más de 50 colonias por caja. Se seleccionaron de 1 a 20 colonias de cada mutante en función del número obtenido, y al menos a una de las cuales se les extrajo el DNA plasmídico, del cual se procedió a analizar su tamaño molecular en geles de agarosa. Los plásmidos que presentaron el mismo patrón de corrimiento del plásmido pGEMT-ChrAHis silvestre se digirieron con la enzima *BglII*, la cual libera un fragmento de 1.3 kb que contiene el gen *chrA* (**Figura 14**).

Para cada mutante se seleccionaron hasta de uno a tres plásmidos que mostraron el patrón de corrimiento y restricción esperado y se obtuvo la secuencia de la región correspondiente al gen *chrA* para comprobar que tuvieran la mutación en el codón establecido. En la **Figura 15** se muestran dos ejemplos de las secuencias de los plásmidos con los genes mutantes, donde se observa la mutación esperada. Es importante mencionar que para todas las mutantes sobre los seis residuos seleccionados se obtuvo la secuencia completa del gen *chrA*; esto con el fin de verificar que solamente presentaran la mutación deseada. Con esta información se decidió descartar la mutante

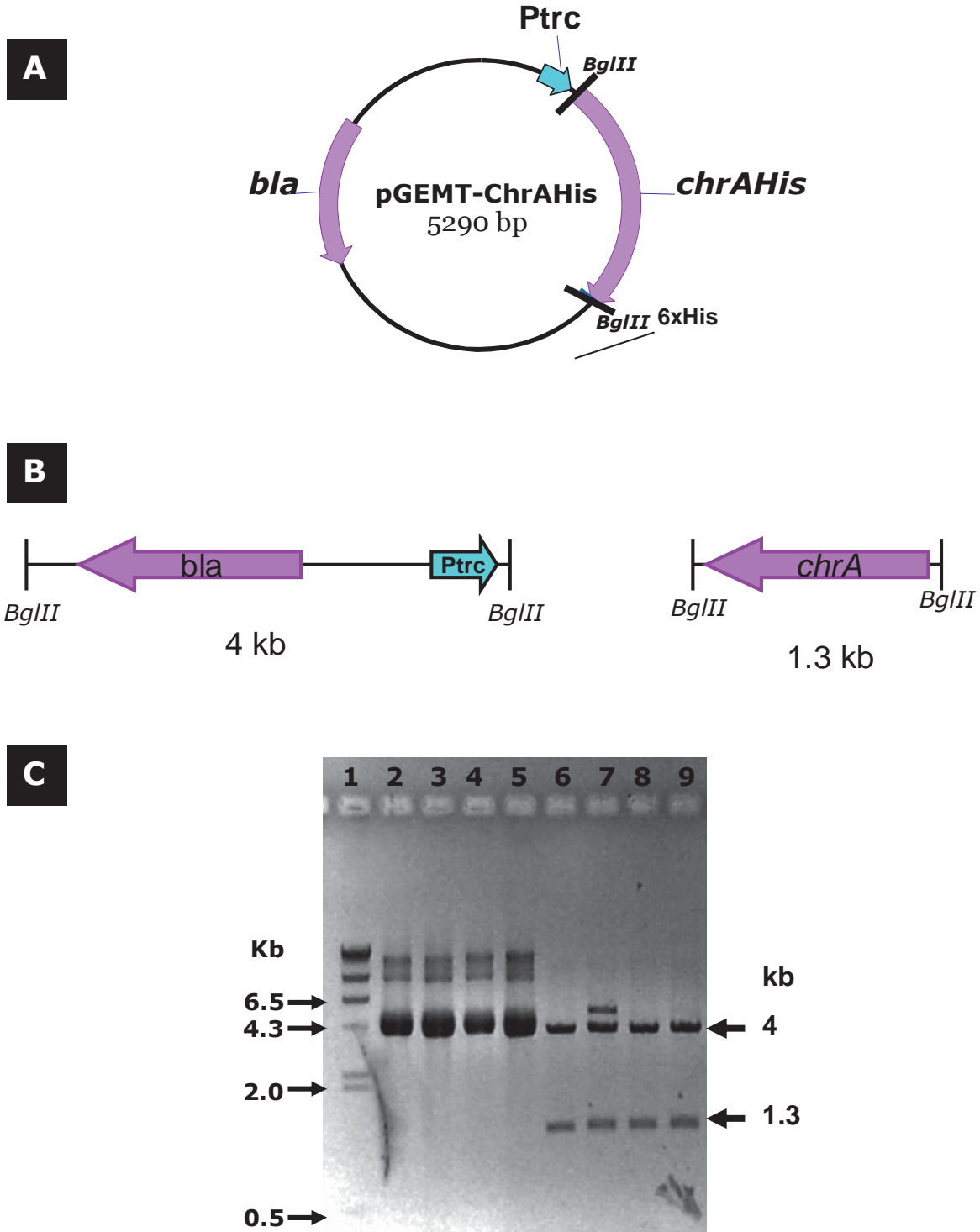


Figura 14. Caracterización de plásmidos mutagenizados pGEMT-ChrAHis
A) Esquema del plásmido pGEMT-ChrAHis. **B)** Fragmento obtenidos por digestión don BglII. **C)** Fotografía de un gel de agarosa de plásmidos pGEMT-ChrAHis. Carriles: 1. Marcador de Peso Molecular, 2-4) DNA circular de las mutantes 2. K37L1, 3. K37L2, 4. K394R1, 5. K394R2; Carriles 6 a9: DNA digerido con BglII de las mutantes 6. K37L1, 7. K37L2, 8. K394R1 y 9. K394R2.

A

chrA ATGAAGAGTCGTATCGCCCGAGCAAGGCGACGGATGCCACGACTGAAGCCGTCCCTCCAC
K37T ATGAAGAGTCGTATCGCCCGAGCAAGGCGACGGATGCCACGACTGAAGCCGTCCCTCCAC

P M S Y P Q L F A R F L **K** F G L L A W G
chrA CCATGAGCTACCCACAGCTCTTCGCGCGCTTCCTC**AAG**TTTCGGCTTGCTCGCATGGGGCG
K37T CCATGAGCTACCCACAGCTCTTCGCGCGCTTCCTC**ACG**TTTCGGCTTGCTCGCATGGGGCG

 P M S Y P Q L F A R F L **T** F G L L A W G

chrA GGCCTGTGGCTCAGATCGACATGTTGCGCCGCGAGCTCGTGGACGAGGAACGCTGGATCT
K37T GGCCTGTGGCTCAGATCGACATGTTGCGCCGCGAGCTCGTGGACGAGGAACGCTGGATCT

B

chrA GGATCTCCAGCAAACGCTTCAACAAGCTGCTTGCGGTGATGCAGGTGCTGCCCGGACCCG
R98K GGATCTCCAGCAAACGCTTCAACAAGCTGCTTGCGGTGATGCAGGTGCTGCCCGGACCCG

E A H E I C V H L G I R A K G **R** L G G V
chrA GAAGCGCATGAAATATGCGTTCATTTGGGCATCCGAGCAAAGGGG**CGG**CTGGGGGGCGTG
R98K GAAGCGCATGAAATATGCGTTCATTTGGGCATCCGAGCAAAGGGG**AAG**CTGGGGGGCGTG

 E A H E I C V H L G I R A K G **K** L G G V

chrA TGGCGGGACTCGGTTTCATGCTTCCCGGATTCTTGCTGATGTTTCGCGCTGTCCTGGTTGT
R98K TGGCGGGACTCGGTTTCATGCTTCCCGGATTCTTGCTGATGTTTCGCGCTGTCCTGGTTGT

Figura 15. Verificación de la mutación. A) Alineamiento de la secuencia del gen *chrA* silvestre (superior) y la mutante Lys37→Thr (K37T, inferior) B) Alineamiento de la secuencia del gen *chrA* silvestre (superior) y la mutante Arg98→Lys (R98K, inferior). Se indica el codón correspondiente al aminoácido original (negrita y cursiva) y el codón para el nuevo aminoácido (negrita y subrayado). Se indica también parte de la secuencia de aminoácidos.

K394L, la cual presentó la mutación adicional L319F. El resto de los genes mutados no presentó ninguna mutación adicional a la deseada.

En promedio, el método de mutagénesis empleado presentó una eficiencia de alrededor del 50%, lo que nos permite concluir que es un método eficiente aunque algunas mutantes presentaron dificultades para su obtención. Esta eficiencia fue similar a lo reportado por Díaz-Pérez (2006) en un estudio de mutagénesis dirigida a aminoácidos estructurales neutros.

4. Subclonación de los genes mutantes en pUCP20

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

El gen *chrA* mutante se recuperó digiriendo el plásmido pGEMT-ChrAHis con las enzimas *XbaI* y *SphI*, las cuales liberan un fragmento de 2.3 kb que contiene la región promotora P_{trc} y el gen *chrAHis*. Este fragmento se purificó y se sometió a ligación con el vector pUCP20 (3.8 kb) digerido con las mismas enzimas. La reacción de ligación se usó para transformar células de *E. coli* JM101. Se seleccionaron 10 colonias por cada subclonación de las cuales a tres se les extrajo el DNA plasmídico para determinar su tamaño molecular en geles

de agarosa. A los plásmidos obtenidos se les denominó pUChrA-mutación, donde "mutación" se refiere al cambio de aminoácido en una posición, por ejemplo, pUChrA-K37R, el cual lleva la mutación Lisina-37 por Arginina.

De los plásmidos que presentaron un tamaño molecular mayor al del vector, de alrededor de 6 kb, se seleccionaron dos por cada mutante para realizar un análisis de restricción. Para esto se emplearon tres enzimas: *Xba*I, la cual lineariza el plásmido dando una banda de 6.1 kb, 2.3 del inserto y 3.8 del vector; *Bgl*II, la cual, como ya se mencionó, libera un fragmento de 1.3 kb correspondiente al gen *chrA* y una de 4.8 kb del resto del inserto y vector; y con la enzima *Hind*III, libera 2 fragmentos de alrededor de 400 y 600 pb y un fragmento de 5.1 kb. En la **Figura 16** se muestra un ejemplo de los análisis de restricción realizados.

Se empleó el DNA de una de las colonias que mostró el patrón de restricción esperado para transformar células de la cepa estándar *P. aeruginosa* PAO1. De cada transformación se eligieron dos colonias de las cuales se extrajo el DNA plasmídico, el cual se digirió con la enzima *Bgl*II para confirmar la presencia del gen *chrA*. Se escogió una colonia por cada plásmido para realizar las pruebas de susceptibilidad a cromato.

5. Pruebas de susceptibilidad a cromato

Con el fin de evaluar el posible papel de los aminoácidos básicos mutados en la función de la proteína ChrA, se efectuaron pruebas de susceptibilidad a cromato a las mutantes obtenidas anteriormente. En cada prueba se usó como control resistente la cepa de *P. aeruginosa* PAO1(pUChrA),

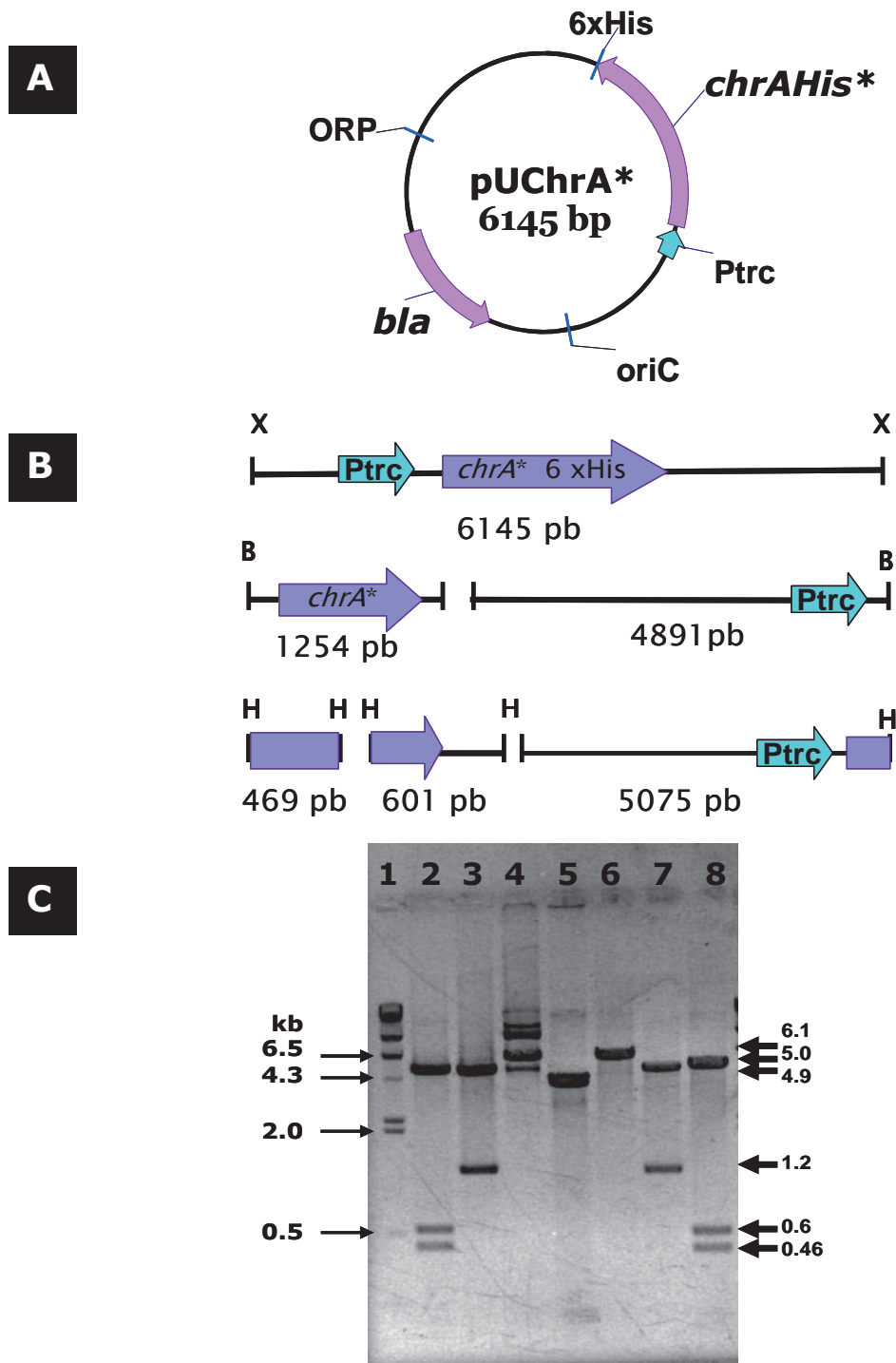


Figura 16. Caracterización de los plásmidos pUChrA-mutación. **A)** Esquema del plásmido pUChrA-mutación. **B)** Se muestran los fragmentos generados por las enzimas de restricción *Xba*I (X), *Bgl*II (B) y *Hind*III (H). **C)** Fotografía de un gel de agarosa de los plásmidos pUChrA-K37T (Carriles 2-4) y pUChrA-R55L (Carriles 6-8). Carriles: 1. Marcadores de tamaño molecular, 2 y 8. Digestión con *Hind*III; 3 y 7. Digestión con *Bgl*II; 4 y 6. Digestión con *Xba*I; 5. vector pUCP20 linealizado con *Xba*I.

la cual lleva el vector con el gen *chrA* silvestre; y como control sensible, la cepa de *P. aeruginosa* PAO1(pUCP20), la cual lleva el vector sin inserto.

5.1.a. Lisina 37

Para este residuo se obtuvieron los tres cambios propuestos (K, T, y L). En las pruebas de susceptibilidad en CN se observó que las tres mutantes presentaron un nivel de resistencia ligeramente menor al del control resistente, con alrededor de 78% de resistencia (**Figura 17A**). Se decidió realizar las pruebas de susceptibilidad en medio mínimo M9 buscando detectar diferencias entre las mutantes que fueran enmascaradas en el medio rico. Además, con el fin de evaluar si existía algún efecto del cambio realizado sobre la función de la proteína ChrA bajo condiciones diferentes a las normalmente usadas, se realizaron pruebas de susceptibilidad aumentando la temperatura de incubación a 42°C. Sin embargo, el comportamiento de las mutantes K37T y K37L fue idéntico al control resistente (100%) y el de la mutante K37R fue muy cercano (82%) (**Figura 17B**).

Debido a estos resultados, se decidió obtener una mutante adicional de la Lys-37 por Glutamato (Glu, E), colocando una carga negativa, opuesta a la del grupo R del residuo original. La mutación K37E mostró una reducción del 70% en el nivel de resistencia conferido por ChrA en las pruebas en CN (**Figura 18A**) y de 41% en las pruebas de susceptibilidad a cromato en medio M9 a 37°C (datos no mostrados). El nivel de resistencia de K37E disminuyó hasta el 34% del conferido por ChrA cuando la temperatura de incubación se elevó a 42°C (**Figura 18B**). Este resultado nos permite concluir que la Lys-37

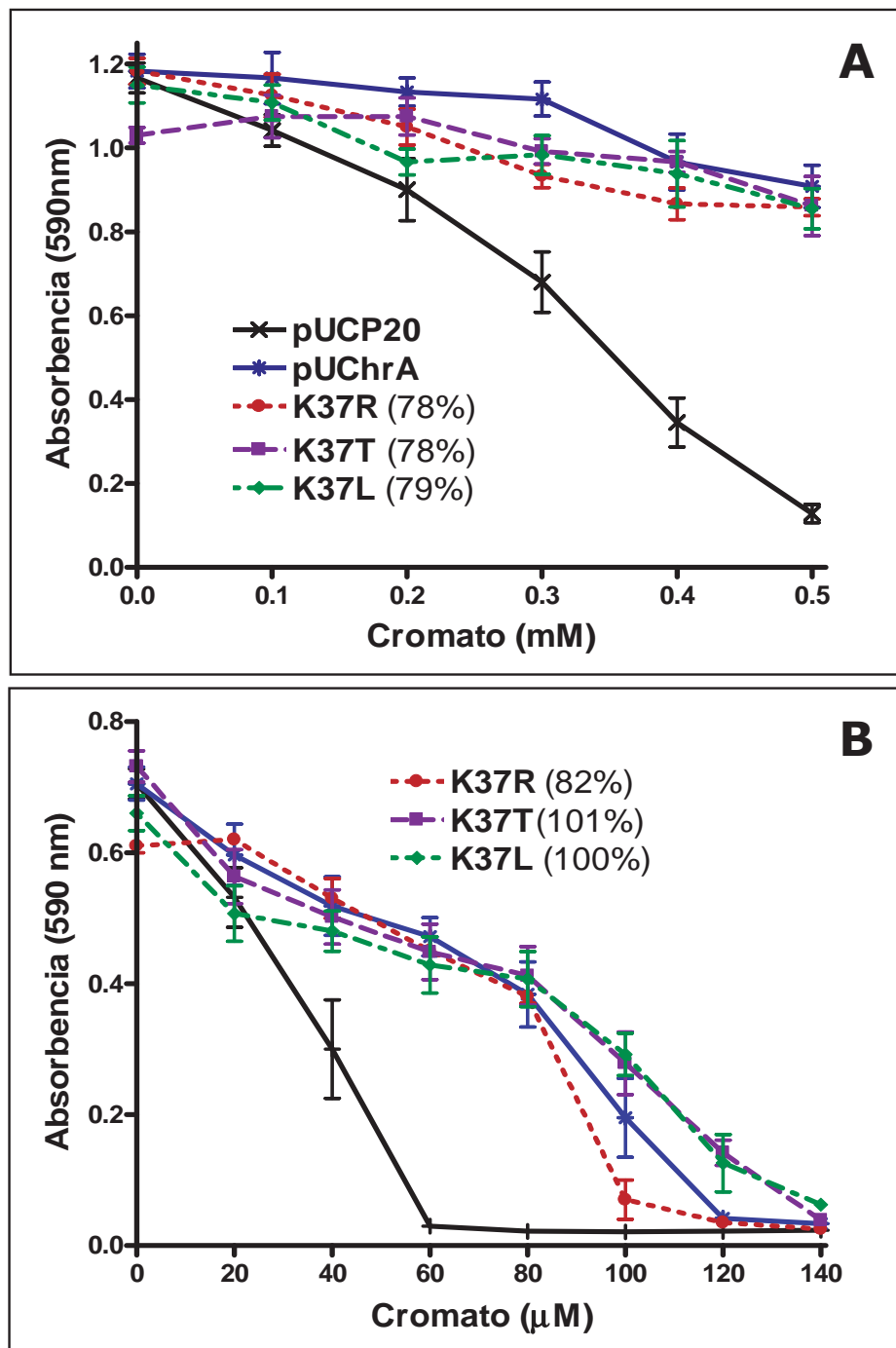


Figura 17. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 37 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron con agitación constante de 18-20 h a A) 37°C en CN y B) a 42°C en medio M9, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas de *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media, A) n=6 y B) n=4.

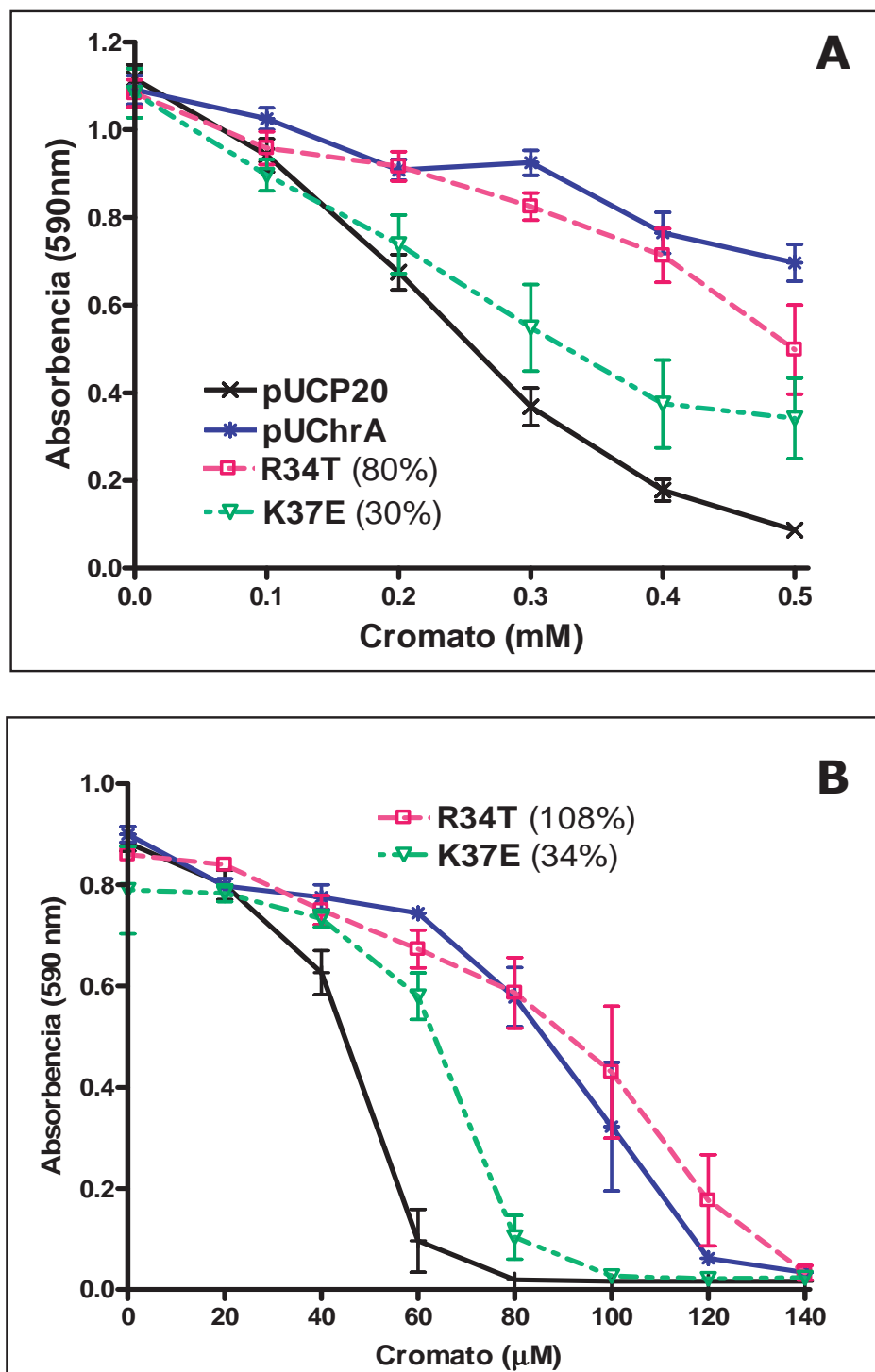


Figura 18. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes K37E y R34T. Los cultivos se crecieron de 18-20 h con agitación constante en A) CN a 37°C (n=6) y B) M9 a 42°C (n=4), utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas de *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media.

no es esencial para el transporte del cromato pues la proteína puede aceptar diferentes tipos de aminoácidos en esta posición sin afectar el nivel de resistencia. Sin embargo, es probable que la Lys-37 tenga un papel importante en la estructura de la proteína ChrA puesto que el cambio por un aminoácido de carga opuesta al original (Glu) afectó considerablemente la función indicandola importancia de este residuo.

5.1.b. Arginina 34

Por otra parte, se incluyó como blanco adicional de la mutagénesis al aminoácido Arginina 34, ubicada en el mismo segmento transmembranal que la Lys-37 (**Figura 13**) y del cual se obtuvo la mutante por Treonina (R34T). La mutante R34T casi no se vió afectada en el nivel de resistencia en ninguna de las pruebas tanto en CN (80%) (**Figura 18A**) como en medio M9 a 37°C (86%) (datos no mostrados) y a 42°C (**Figura 18B**). Este resultado indica que la Arginina 34 no es esencial para la función de la proteína ChrA.

5.2. Arginina 55

De las tres mutantes obtenidas para este residuo, los cambios por lisina y leucina mostraron un nivel de resistencia de alrededor del 50% en las pruebas de susceptibilidad a cromato en CN, mientras que el cambio por treonina se vió afectado en menor proporción (**Figura 19A**). En medio M9 a 37°C se mantuvo el mismo comportamiento de las tres mutantes (datos no mostrados), pero al cambiar a 42°C la mutante R55T presentó un nivel de resistencia casi 40% mayor al del control resistente que lleva el gen *chrA*

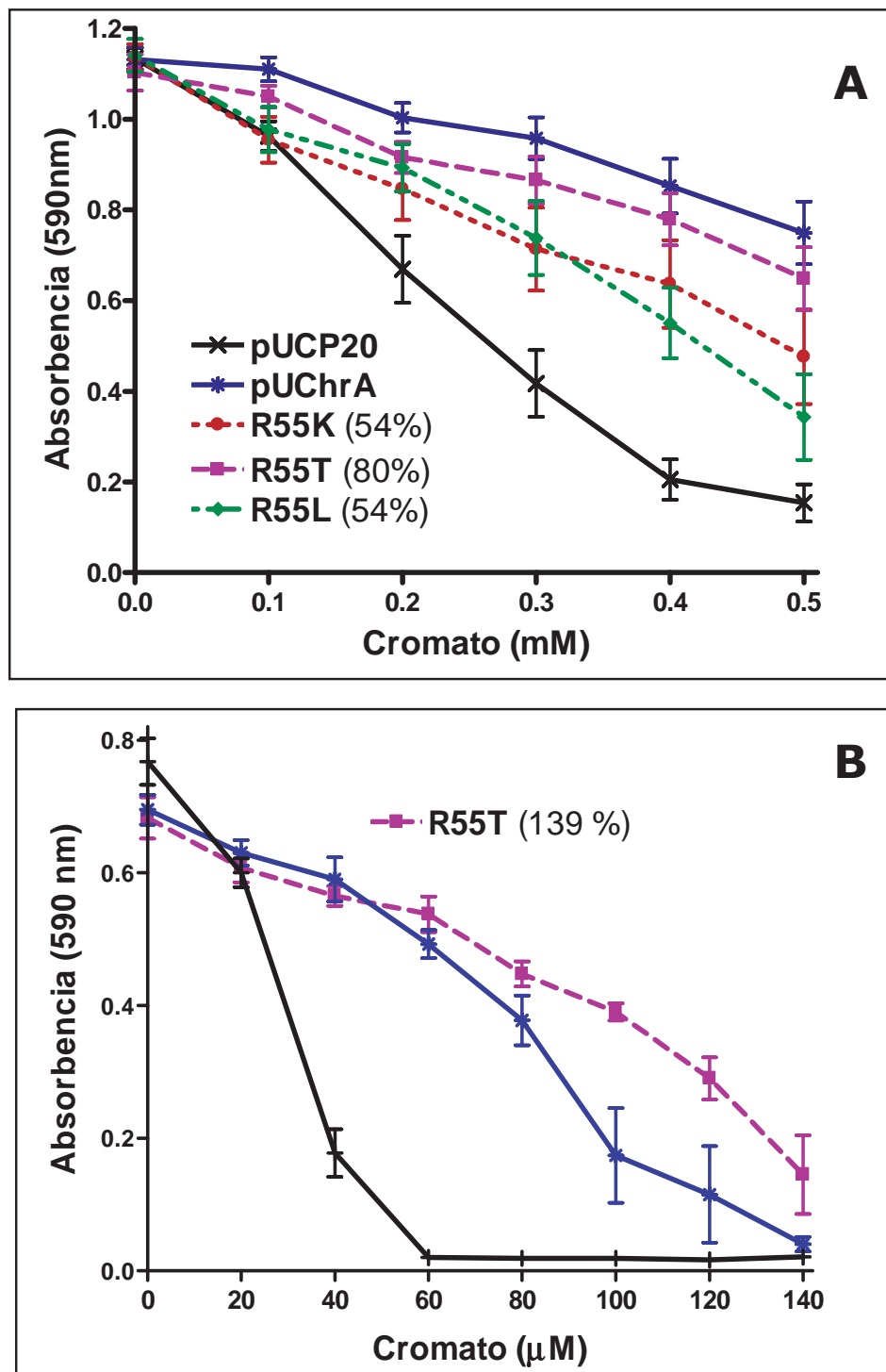


Figura 19. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Arginina 55 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h con agitación constante a **A)** 37°C en CN y **B)** 42°C en M9, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas de *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=6.

silvestre (**Figura 19B**). Este resultado señala la importancia de este residuo y de la región donde se encuentra, además de establecer que la carga positiva no es esencial en esta posición para la función de la proteína ChrA.

5.3. Arginina 98

Para este residuo sólo se obtuvo el cambio conservativo por Lisina, ya que se cuenta con la mutante por glutamina, previamente obtenida por mutagénesis al azar (Aguilera y col., 2004).

Al contrario de la mutación por glutamina, que se comportó como el control sensible, el cambio por Lisina mantuvo un nivel de resistencia cercano al del control resistente (**Figura 20A**). Este comportamiento se observó también en medio M9 (datos no mostrados) y cuando la temperatura se elevó a 42°C (**Figura 20B**), lo cual nos indica la esencialidad de una carga positiva en esta posición para la actividad de la proteína ChrA.

5.4. Lisina 394

Se lograron obtener los tres cambios propuestos para este residuo (K,T y L), pero debido a la presencia de una mutación adicional (L319F), la mutante por Leucina no se consideró en el análisis. En CN, sólo la mutación por treonina mostró un comportamiento diferente al de la proteína silvestre, con sólo un 58% del nivel de resistencia, mientras que la mutación conservativa por Arginina mantuvo un comportamiento ligeramente menor al control resistente (**Figura 21**). Cuando las pruebas de susceptibilidad se hicieron en medio mínimo M9, la mutante K394T presentó un abatimiento casi total en el nivel de

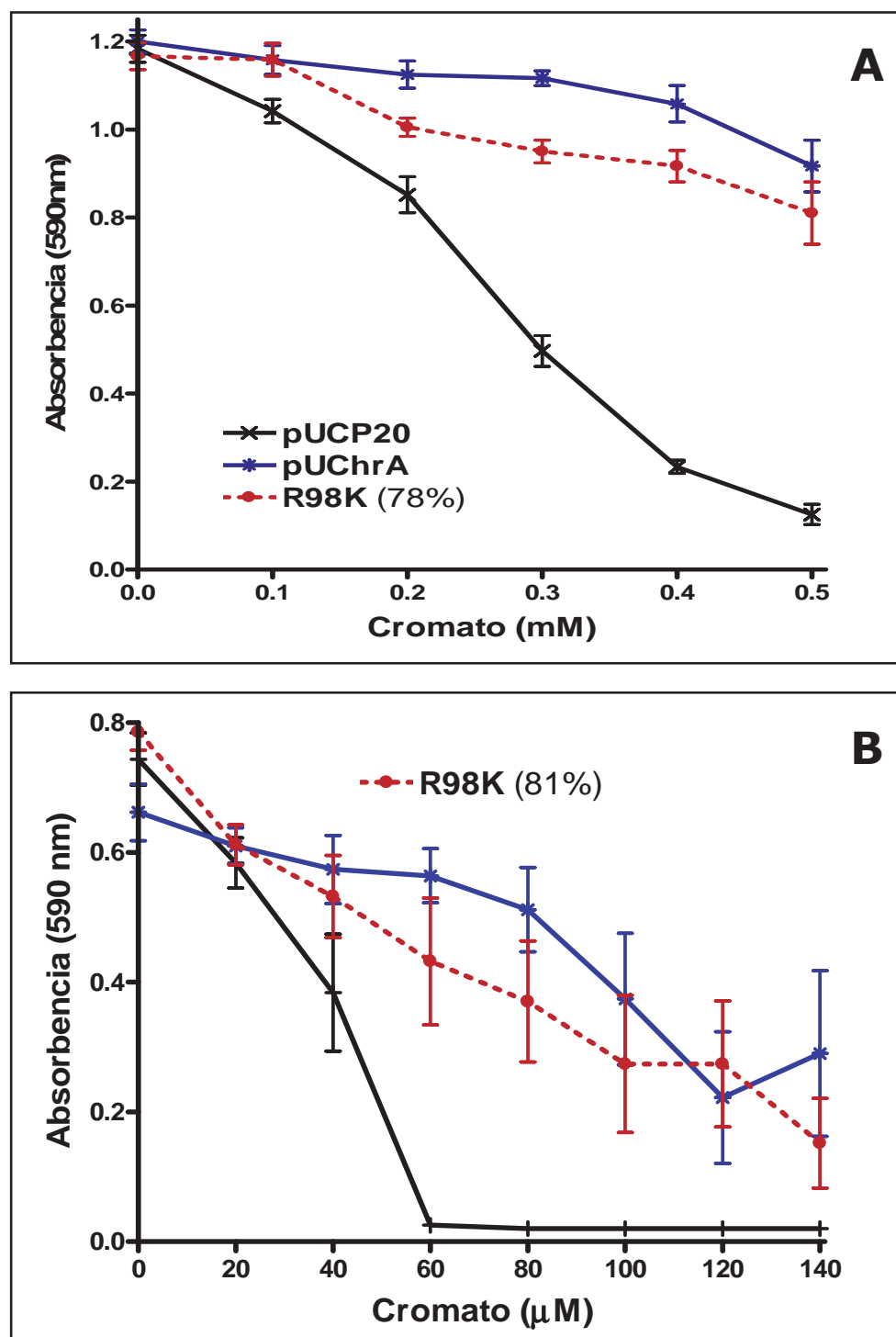


Figura 20. Pruebas de susceptibilidad a cromato de la mutante de la Arginina 98 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h a 37°C con agitación constante en **A**) CN a 37°C (n=6) y **B**) M9 a 42°C (n=3) utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas de *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y la mutante R98K. Se muestran las barras de error estándar de la media.

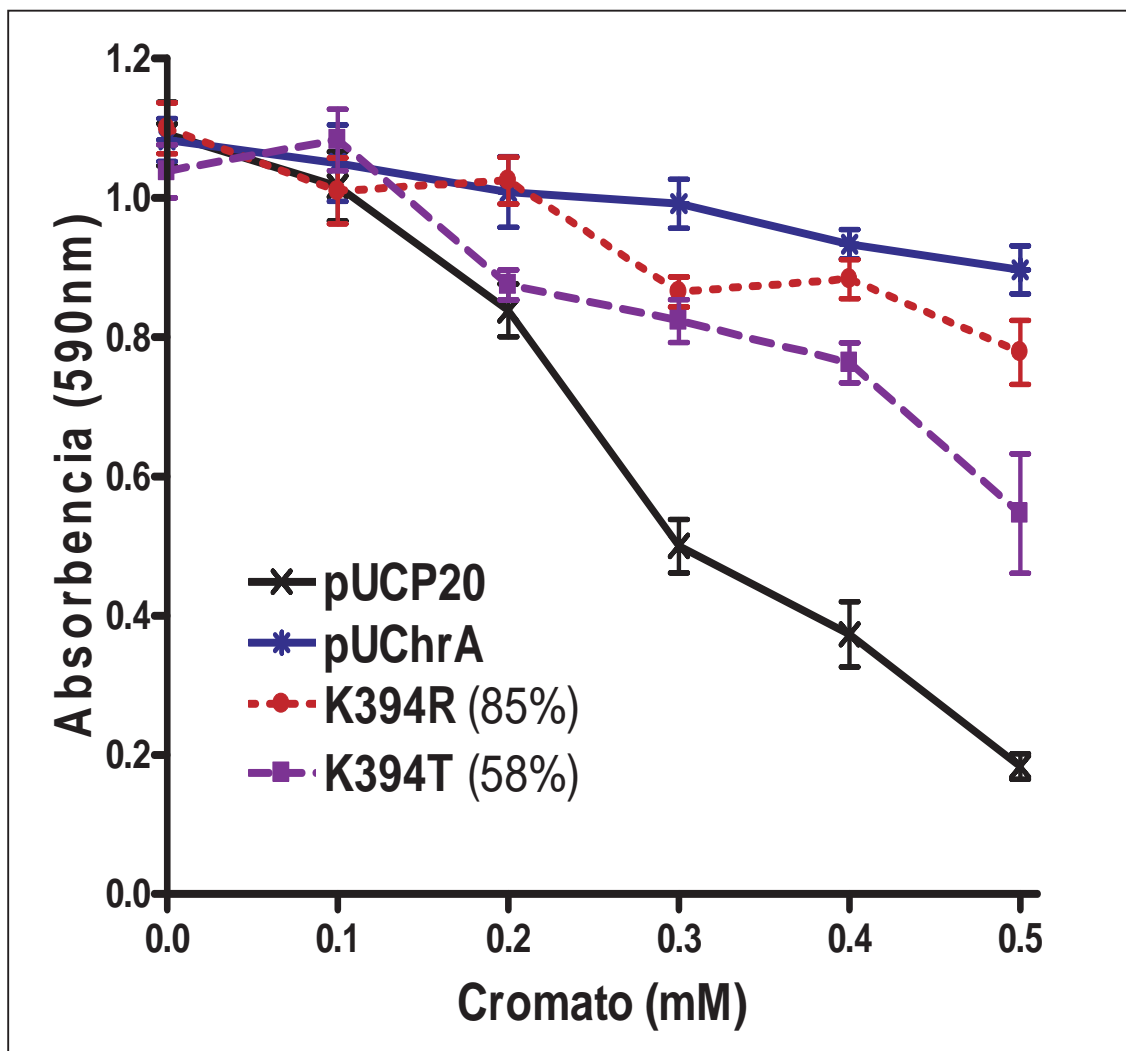


Figura 21. Pruebas de susceptibilidad a cromato de la mutante de la Lisina 394 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h a 37°C en CN con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas de *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y la mutantes R98K. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=6.

resistencia (5%) lo que indica la importancia de la carga positiva en esta posición (**Figura 22A**), mientras que cuando las pruebas se hicieron a 42°C se observó una disminución en el nivel de resistencia de la mutante K394R, aproximadamente a la mitad del conferido por la proteína ChrA silvestre(**Figura 22B**). Estos resultados apuntan al requerimiento esencial de la Lisina 248, además de la carga positiva, para el funcionamiento adecuado de la proteína ChrA.

5.5. Arginina 201

Como se mencionó en la Introducción, se ha propuesto que la proteína ChrA se originó de una duplicación génica. En vista del resultado obtenido con las mutantes de la Lisina 394, se consideró de interés analizar el papel del aminoácido homólogo localizado en la mitad amino de la proteína: la Arginina 201, ubicada en el asa citoplásmica 3 (**Figura 12**). De este residuo se lograron obtener los cambios por Lisina, Treonina y Leucina. En las pruebas de susceptibilidad en CN, las mutantes por Treonina y Leucina se vieron considerablemente afectadas en el nivel de resistencia conferido, mientras que el nivel de resistencia del cambio conservativo por lisina casi no se vió afectado (**Figura 23A**). En las pruebas en medio mínimo a 37°C las mutantes R201T y R201L mostraron un comportamiento casi totalmente sensible (14 y 0%, respectivamente), mientras que la mutante R201K mantuvo un nivel de resistencia cercano al control resistente (75%) (**Figura 23B**). Estos comportamientos se mantuvieron cuando la temperatura de incubación fue de 42°C (datos no mostrados), lo que señala que en esta posición se requiere una

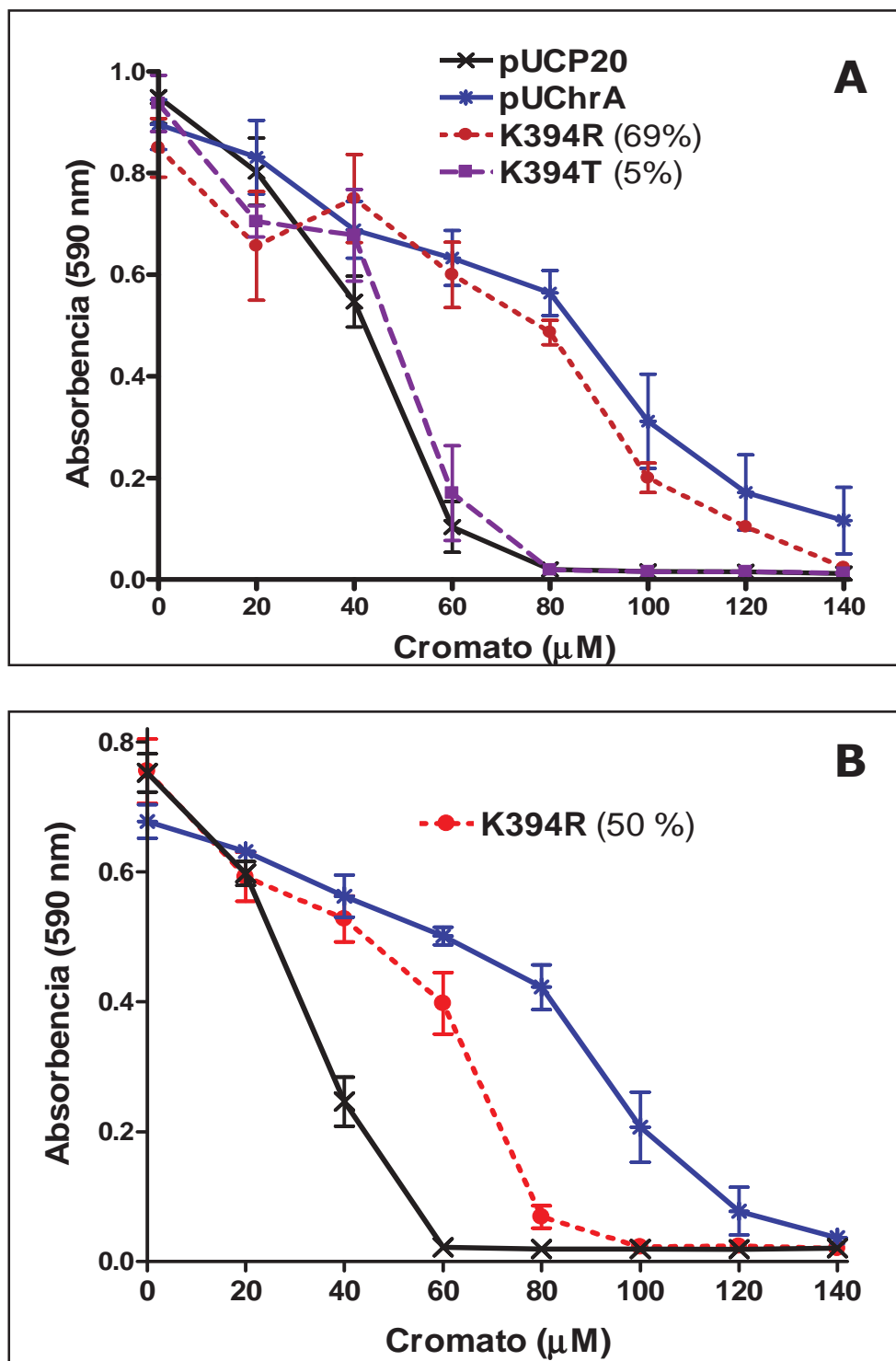


Figura 22. Pruebas de susceptibilidad a cromo de las mutantes de la Lisina 394 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron en medio M9 de 18-20 h con agitación constante a **A)** 37°C y **B)** 42°C utilizando las concentraciones de cromo indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=4.

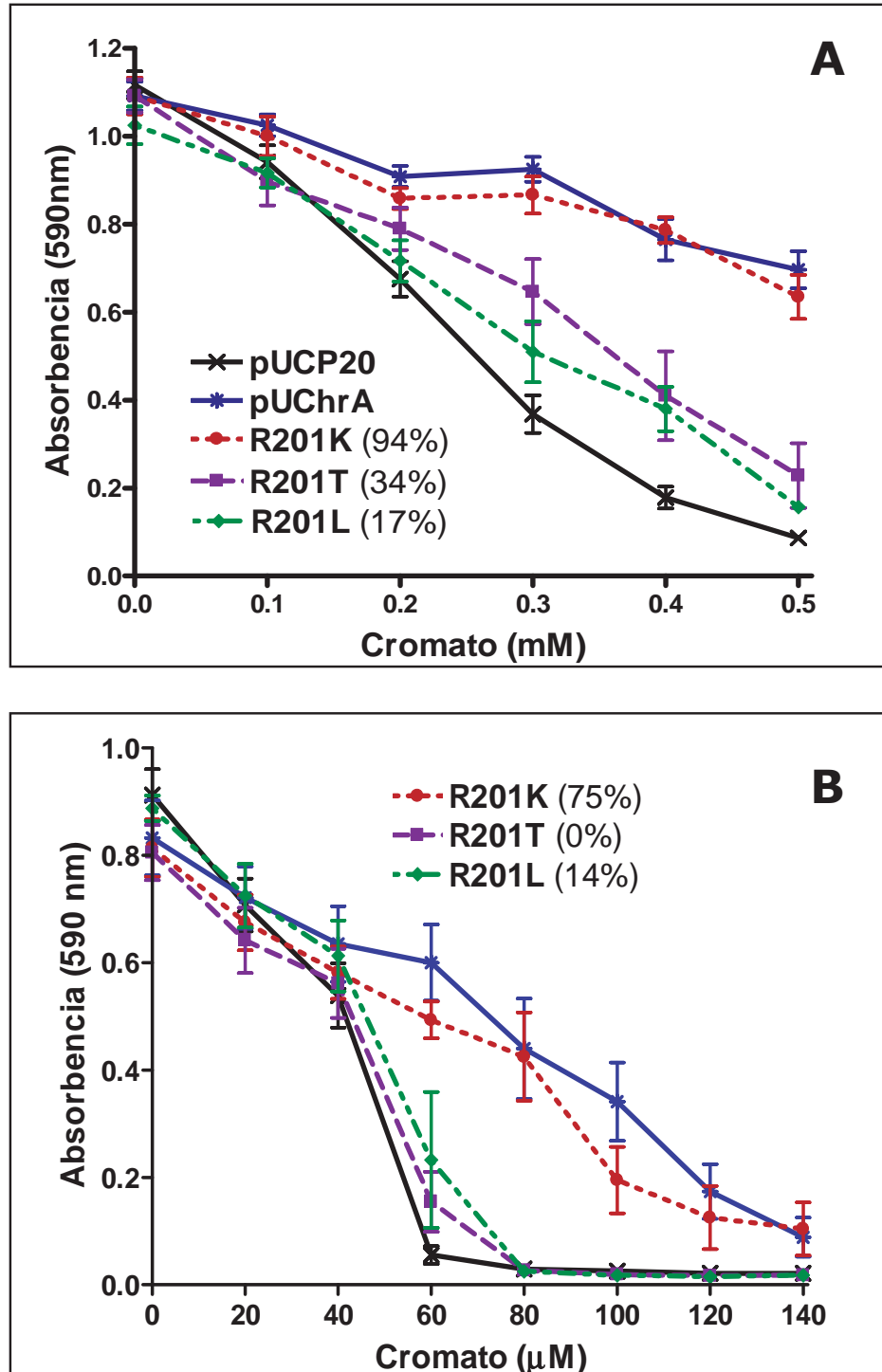


Figura 23. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 201 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h con agitación constante en **A)** CN a 37°C (n=6) y **B)** M9 a 37°C (n=3), utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media.

carga positiva que puede ser proporcionada por la presencia de Arginina o Lisina sin que se afecte el funcionamiento de la proteína ChrA.

5.6. Lisina 248

En el caso de este residuo se lograron los tres cambios propuestos. En las pruebas en CN se observó que las mutaciones K248T y K248L abatieron casi por completo la resistencia a cromato, mientras que el cambio por Arginina, K248R, mantuvo un fenotipo de resistencia a cromato (**Figura 24A**). En las pruebas en medio mínimo a 37°C no se observó ningún cambio en los comportamientos de las tres mutantes (datos no mostrados), pero cuando la temperatura se elevó a 42°C la mutante K248R mostró un decremento significativo en la resistencia a cromato (**Figura 24B**). Estos resultados revelan que la presencia de una carga positiva permite el funcionamiento de la proteína, pero que aún una Arginina no puede sustituir completamente a la Lisina bajo condiciones no óptimas. Por tanto, se concluye que la Lisina 248 es esencial para la función de la proteína ChrA.

5.7. Arginina 154

En las pruebas de susceptibilidad a cromato en CN de las dos mutantes obtenidas de este residuo se observó que los cambios por Lisina y Leucina afectaron de manera moderada y considerable, respectivamente, el nivel de resistencia, comparado con la proteína silvestre (**Figura 25A**). En medio mínimo fue más evidente el efecto, pues la mutación R154L abatió completamente la resistencia a cromato, mientras que la mutación R154K

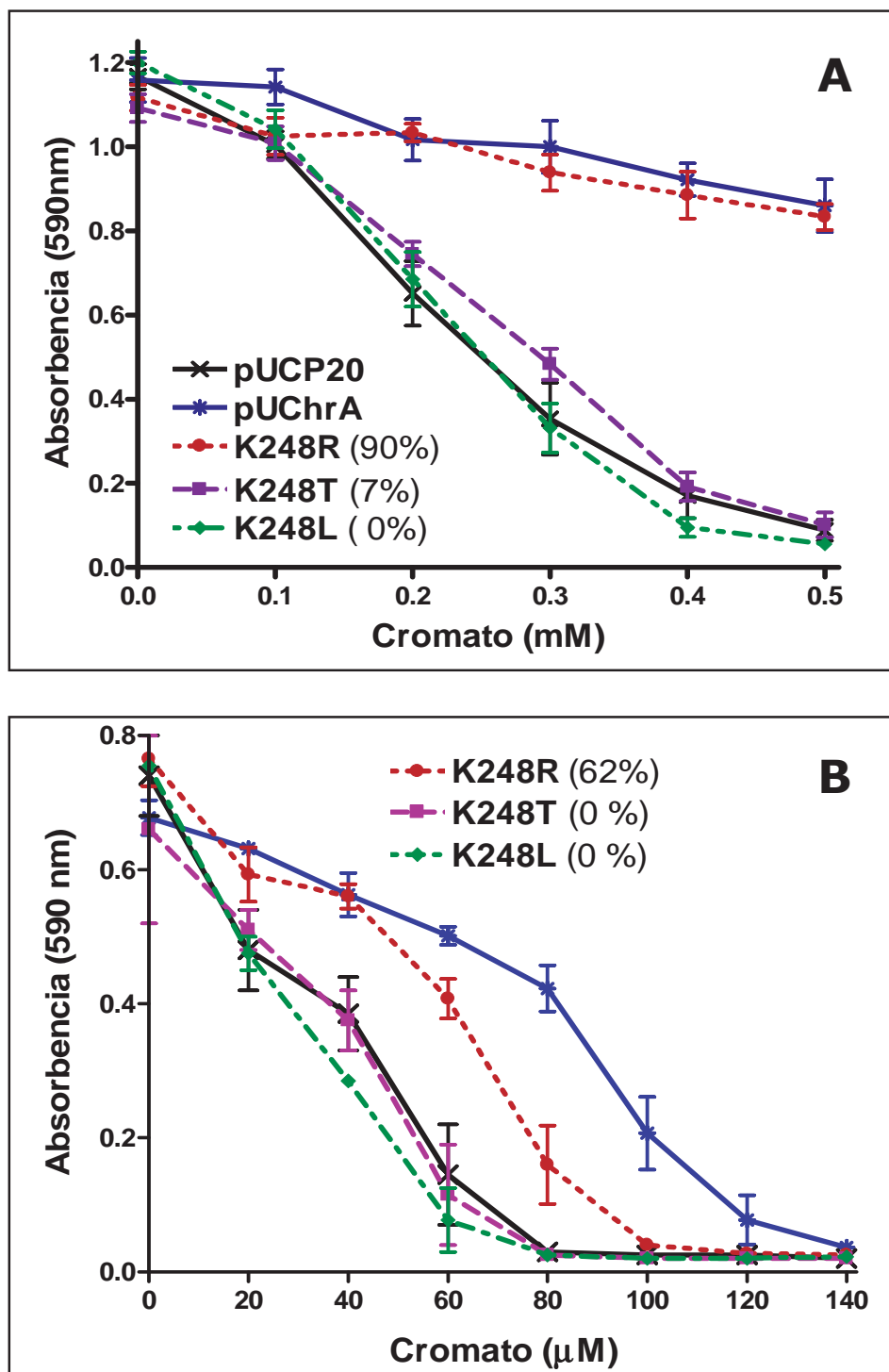


Figura 24. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Lisina 248 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h con agitación constante en **A)** CN a 37°C (n=6) y **B)** M9 a 42°C (n=4), utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbancia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; *P. aeruginosa* PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media.

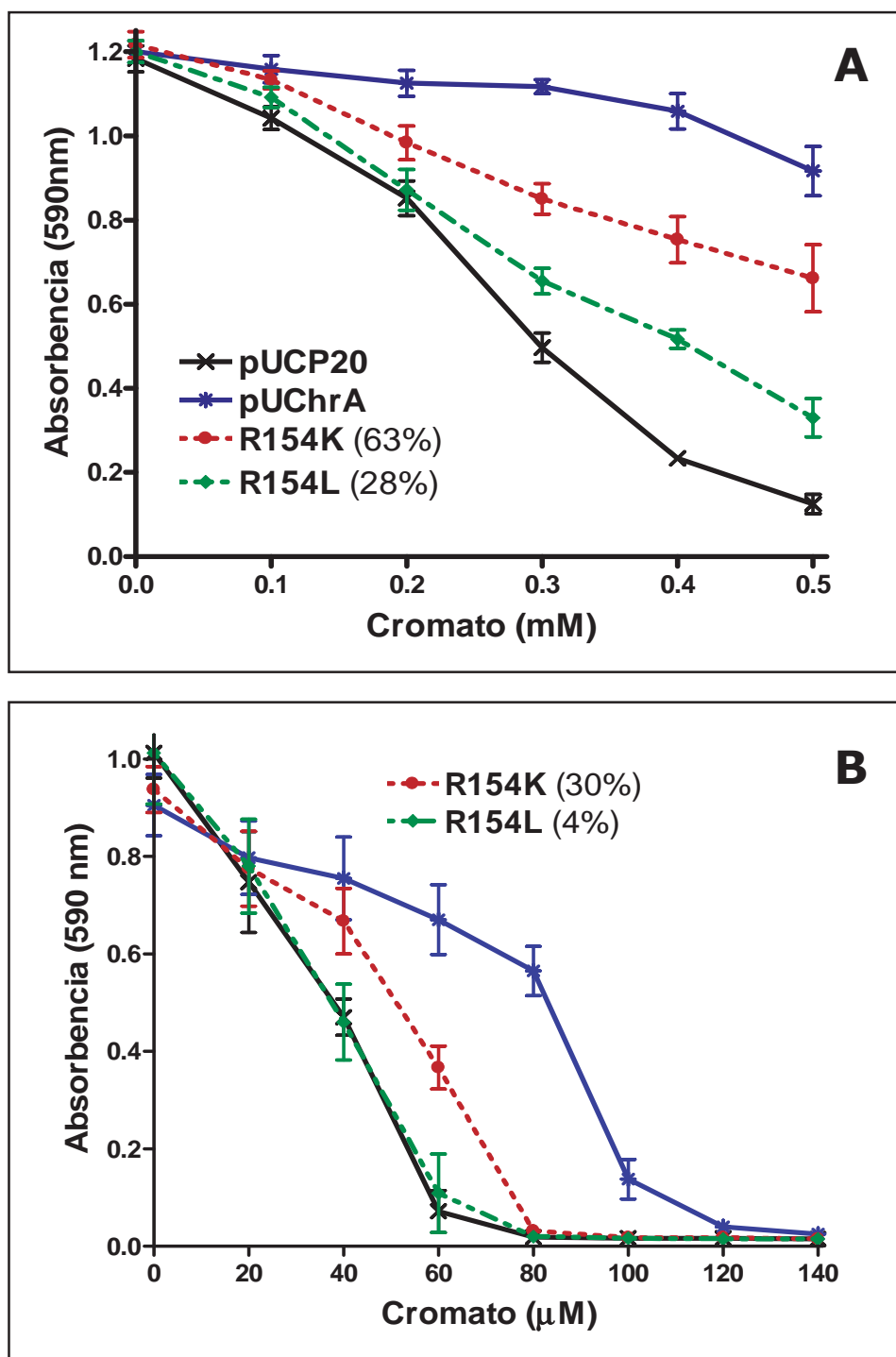


Figura 25. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de la Arginina 154 de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron de 18-20 h con agitación constante a 37°C en **A)** CN (n=6) y **B)** M9 (n=4), utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se determinó el crecimiento bacteriano por la absorbencia del cultivo a 590 nm. Se emplearon las cepas *P. aeruginosa*: PAO1 (pUCP20) como control sensible; PAO1 (pUChrA) como control resistente con el gen *chrA* silvestre y las mutantes señaladas. Se muestran las barras de error estándar de la media.

presentó un fenotipo de resistencia intermedia apenas ligeramente mayor al de la cepa sensible (**Figura 25B**). A 42°C ambas mutantes fueron completamente sensibles (datos no mostrados). El efecto tan drástico de los cambios de este residuo sobre la función de la proteína ChrA, incluso al conservar la carga positiva una lisina, nos permite afirmar que la Arg-154 es completamente esencial para el funcionamiento de la proteína ChrA.

VII) DISCUSION

ChrA es una proteína transmembranal que confiere resistencia a cromato en *P. aeruginosa* por medio de un mecanismo de expulsión del oxianión tóxico del citoplasma, empleando para ello el potencial de membrana generado durante el bombeo de protones de la cadena respiratoria (Pimentel y col., 2002).

La proteína ChrA pertenece a la familia CHR de antiportadores de cromato/sulfato, en donde se han localizado proteínas de cadena corta (SCHR) y proteínas de cadena larga (LCHR) (Nies, 1998). Recientemente, Díaz-Pérez (2006) realizó una búsqueda de secuencias similares a ChrA encontrando 135 proteínas homólogas distribuidas en los tres dominios *Archea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Un análisis filogenético de la proteína ChrA, le permitió establecer la posible historia evolutiva de la familia CHR.

Por otro lado, para tratar de conocer la relación estructura función de la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, el análisis de mutagénesis al azar llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo condujo a la identificación de 12 residuos cuyo cambio provocaba sensibilidad a cromato (Aguilera y col., 2004). Al localizar las mutaciones en ChrA se encontró que la mayoría se ubicaron en la mitad amino de la proteína, por lo que se sugirió que esta región es importante en el mecanismo de resistencia a cromato. El análisis filogenético apoyó esta observación pues se observó que el dominio amino de ChrA se encuentra más conservado que el dominio carboxilo (Díaz-Pérez, 2006). Recientemente, Jiménez-Mejía y col. (2006) propusieron que cada dominio de ChrA lleva a

cabo una función distinta, sustentado por el hecho de que las mitades amino y carboxilo tienen una orientación opuesta en la membrana.

Como un segundo abordaje en el análisis de la relación estructura función en la proteína ChrA, residuos con una alta conservación en la familia CHR, incluidos algunos identificados previamente por mutagénesis al azar, fueron elegidos para analizar su importancia mediante mutagénesis dirigida (Aguilar, 2005; Cortés, 2005; Díaz-Pérez, 2006). Este análisis permitió comprobar que existe una correlación entre el grado de conservación y la importancia funcional puesto que la mayoría de los residuos analizados fueron completamente esenciales para la actividad de la proteína. Debido al carácter neutro de la mayoría de los aminoácidos estudiados, por ejemplo las Prolinas 80 y 82 o el Triptofano 63, se les asignó un papel fundamentalmente estructural, auxiliando en mantener la conformación que permite el funcionamiento de la proteína (Cortés, 2005; Díaz-Pérez, 2006).

En este estudio, nos enfocamos en la identificación y el análisis de residuos básicos conservados, Argininas y Lisinas, cuya cadena lateral tiene una carga positiva, con el fin de identificar aminoácidos que participan en la interacción (reconocimiento y unión) entre el oxianión cromato y la proteína ChrA.

1. Identificación y selección de residuos

El primer paso fue la selección de los residuos básicos conservados, para lo cual se analizaron los alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la familia CHR, primero con las 135 proteínas,

donde se alinean los dominios de las proteínas de cadena larga (LCHR) y el dominio de las proteínas de cadena corta (SCHR) y después los alineamientos únicamente de las 77 proteínas LCHR. En ninguno de estos alineamientos fue posible identificar aminoácidos con carga positiva que tuvieran una alta conservación. Hasta la fecha se ha demostrado la funcionalidad (expulsión de cromato) sólo de dos proteínas ChrA: de *P. aeruginosa* y de *C. metallidurans*, y es probable que no todas las proteínas de la familia CHR transporten cromato sino algún otro oxianión, como sulfato o fosfato, e incluso que algunas de ellas tengan como sustrato otro tipo de moléculas. Esto daría como consecuencia que no exista conservación de los residuos involucrados en la interacción con el cromato pero que se conserven aquellos involucrados en la estructura. Por ejemplo, en la superfamilia de facilitadores mayores (MFS) se agrupan proteínas con una gran diversidad de sustratos, incluyendo la lactosa permeasa LacY de *E. coli*, el transportador de oxalato-formato OxIT de *O. formigenes* o la proteína que expulsa tetraciclina TetA(B) también de *E. coli*. Entre miembros de la familia MFS se encuentran uniportadores, simportadores y antiportadores que presentan una topología similar de 12 segmentos transmembranales y motivos altamente conservados (Pao y col., 1998). Sin embargo, los residuos involucrados en la unión del (o los) sustrato(s) varían ampliamente, manteniendo una conservación sólo en los subgrupos que transportan el mismo o un tipo similar de moléculas; por ejemplo, UhpT y GlpT de *E. coli*, transportadores de hexosas-fosfato y glicerol-3-fosfato, respectivamente, comparten la localización de dos Argininas ubicadas en los segmentos

transmembranales I y VII involucradas en la interacción con el grupo fosfato (Huang y col., 2003).

Otro ejemplo lo encontramos en la familia SLC4 de transportadores de bicarbonato, donde la proteína EA1 que intercambia Cl^- y HCO_3^- y el cotransportador renal de Na^+ y HCO_3^- , kNBC1, comparten residuos conservados involucrados en la interacción con el bicarbonato, mientras que kNBC1 presenta residuos esenciales no conservados en AE1 y que se propone participan en la interacción con el sodio (Abuladze y col., 2005).

Así pues, decidimos realizar la búsqueda de residuos básicos conservados tomando para el análisis sólo a las proteínas de la familia CHR que integran los subgrupos CHR2 y CHR5 (**Figura 11** y **Tabla 4**) donde se agrupan las proteínas funcionales de *C. metallidurans* y de *P. aeruginosa*, respectivamente. Esto nos dio un grupo de trabajo de 24 secuencias de proteínas, con las cuales realizamos alineamientos múltiples que ahora sí nos permitieron identificar residuos básicos conservados (**Figura 12** y **Tabla 5**). Para seleccionar cuáles residuos se analizarían en este estudio se tomaron en cuenta tres criterios: el grado de conservación del residuo, la región topológica donde se localizaba y si existía información previa sobre el residuo o la región. Sólo seis residuos básicos presentaron una conservación mayor del 80%: las Argininas 55, 62 y 154 y las Lisinas 37, 248 y 394; el resto de los aminoácidos básicos de ChrA tiene una conservación menor del 60% (**Tabla 5**). Esta discontinuidad en el grado de conservación (no residuos entre 60 y 80%) apuntó a la esencialidad de los residuos más conservados, por lo cual se

tomaron en cuenta inicialmente solamente los seis aminoácidos con más del 80% de conservación.

El segundo criterio de selección para determinar cuáles aminoácidos se analizarían fue la región topológica donde se localizaban, asas hidrofílicas o segmentos transmembranales, con la intención de seleccionar solamente un aminoácido en cada región para que el estudio no se centrara en el extremo amino de la proteína, el cual presenta una elevada conservación; por tal razón, la mayoría de los aminoácidos identificados como esenciales en análisis previos se localizan en el STM I, el asa periplásmica 1 y el STM II (Aguilar, 2005; Cortés, 2005; Díaz-Pérez, 2006). Dentro de los residuos con mayor conservación se encuentran la Arg-55 y la Arg-62, ambas ubicadas en el asa periplásmica 1, así que se decidió incluir en el estudio de mutagénesis sólo a la Arg-55 que presentó un grado de conservación mayor al de la Arg-62 (95% vs 85%). El resto de los residuos que cumplieron el primer criterio se ubican en diferentes regiones topológicas (**Figura 12**).

El tercer criterio de selección que se tomó en cuenta fue si existía información previa sobre un residuo o región de ChrA o alguna otra familia cercana a la familia CHR. Este criterio de selección lo cumplieron dos residuos básicos: la Lys-96 y la Arg-98, ambas identificadas como esenciales mediante mutagénesis al azar por Aguilera y col. (2004). En el caso de la Lys-96, se obtuvo una mutante por Glutamina (Gln) pero además se localizó una mutación adicional (Ala-390→Asp); la mutante es sensible a cromato pero debido a la presencia de otra mutación no fue posible determinar si el efecto observado es consecuencia de la mutación sobre la Lys-96 o sobre la Ala-390.

Por otro lado, la mutante Arg-98→Gln tuvo una sensibilidad y transporte de cromato igual al de la cepa silvestre, lo que indicó la esencialidad de la carga positiva en esta posición (Aguilera y col., 2004). Además, en la región donde se localiza este residuo, el asa citoplásmica 1, se ha identificado un motivo altamente conservado en la familia MFS, caracterizado por la presencia de dos a tres residuos básicos (Pao y col., 1998). Con la información anterior, se decidió incluir en el análisis mutacional a la Arg-98, la cual cumple con los criterios de selección de posición e información previa aunque no con el criterio de conservación, puesto que tiene menos del 20% de conservación.

Así pues, se eligieron finalmente seis residuos para analizar por mutagénesis dirigida (**Figura 12**): la Lys-37, con 95% de conservación y ubicada en el STM I; la Arg-55, con 95% de conservación ubicada en el asa periplásmica 1; la Arg-98, ubicada en el asa citoplásmica 2, con menos del 20% de conservación; la Arg-154, con 95% de conservación y ubicada en la interfase del STM IV y el asa citoplásmica 3; la Lys-248, con 87% de conservación y ubicada en el STM VIII; y la Lys-394, con 95% de conservación y ubicada en el asa citoplásmica 6.

2. Selección de cambios para evaluar el papel del aminoácido

Una vez seleccionados los residuos a analizar, se procedió a seleccionar los cambios que nos permitieran inferir el papel de cada uno de los aminoácidos mutados en la función de la proteína ChrA. Se decidió realizar tres cambios (**Figura 13**): 1) conservativo, donde se intercambiaron las lisinas por argininas y viceversa; en este cambio se mantiene la propiedad más

característica de los residuos mutados: la carga positiva; además, el volumen y la superficie de ambos residuos es similar. Por tanto, con este cambio evaluamos la importancia del residuo *per se* para la función de la proteína. 2) este cambio lo podemos llamar semi-conservativo, debido a que se introdujo un residuo de la misma polaridad (hidrofílico), Treonina, pero se eliminó la carga positiva; este cambio nos permitió evaluar la importancia de la carga positiva en la posición del residuo mutado para la actividad de ChrA. 3) Finalmente, en el tercer cambio, por Leucina, se introdujo un residuo de polaridad opuesta (hidrofóbico) además de eliminar la carga positiva, aunque el volumen es similar al del residuo original; este cambio nos permite evaluar la importancia del carácter hidrofílico del residuo original.

3 Evaluación del posible papel de los aminoácidos mutados

La Lisina 37 se encuentra en el STM I y tiene un 95% de conservación (37% de identidad) en el alineamiento de las 24 proteínas ChrA (**Tabla 5**). De este residuo se obtuvieron los tres cambios propuestos, por Arginina, Treonina y Leucina, ninguno de los cuales afectaron notoriamente el nivel de resistencia de conferido (**Figura 17A**). Este resultado fue contrario a lo esperado con base a su conservación y posición, debido a la existencia de numerosos reportes respecto a la esencialidad de residuos básicos ubicados en segmentos transmembranales. Por ejemplo, en el transportador de hexosas-fosfato UhpT de *E. coli*, las argininas 46 y 275 ubicadas en los STM I y VII (Fann y col., 1998), y las Argininas 87 y 287 ubicadas en los STM II y VIII en el transportador de nitrato, NtrA, de *Aspergillus nidulans* (Unkles y col., 2004)

son esenciales para el transporte. Por este motivo se decidió realizar dos variantes en las pruebas de susceptibilidad:

1) Cambiar el medio de crecimiento de CN (medio rico) al medio mínimo M9, el cual se caracteriza por una composición definida que consiste de una fuente de carbono, en este caso glucosa, y nutrientes inorgánicos: nitrógeno (amonio), fósforo (fosfato) y azufre (sulfato) en la forma de sales minerales. El objetivo de este cambio fue proveer un medio de crecimiento simple similar al ambiente del suelo, que se caracteriza por una baja disponibilidad de nutrientes orgánicos principalmente pero que puede extenderse a nutrientes inorgánicos como fosfato y nitrato (Syn y col., 2004). Además, los componentes del medio rico (aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, etc.) pueden atrapar al cromato de forma que la concentración real a la que está expuesta la célula es menor a la adicionada. Por otro lado, las células creciendo en medio mínimo encaran la necesidad de sintetizar todos sus bloques de construcción a partir de una única fuente de carbono y energía, glucosa; esto se ve reflejado en el encendido de las vías biosintéticas así como también en la elevada expresión de reguladores de procesos celulares (Tao y col., 1999). Esta situación genera un aumento en los efectos tóxicos del cromato puesto que la célula requiere que toda su maquinaria sintética funcione eficientemente mientras que en un medio rico puede sobreponerse al daño sobre algunas de las vías al poder tomar del medio la mayoría de sus nutrientes; por estas razones el medio mínimo podría acentuar un posible efecto de la mutación sobre el nivel de resistencia conferido que no pudiera ser detectado en un medio rico. Por ejemplo, Landgraf y col. (1996) determinaron

la expresión de la proteína reguladora de respuesta a leucina Lpr de *E. coli* en medio mínimo, concluyendo que participa en la activación de operones biosintéticos y en la inhibición de operones catabólicos. Por otro lado, el empleo de un medio mínimo permitió detectar cambios pequeños en los niveles de expresión de los genes *acrAB*, *marA* y *soxS* involucrados en la resistencia a ciprofloxacina en *E. coli*, en los cuales no se había observado cambio en el análisis de microarreglos (Bailey y col., 2006),.

2) Aumento de la temperatura de incubación de 37°C a 42°C. Con esta variación buscamos provocar pequeños cambios estructurales en la proteína ChrA generados por el aumento de entropía del sistema, pero a una temperatura permisible para el crecimiento de *P. aeruginosa*, de forma que se puedan observar efectos del cambio introducido por la mutación que no fueran evidentes en las condiciones usadas. Esta herramienta metodológica ha permitido el análisis funcional de diversas proteínas, como la DNA girasa de *E. coli* (Oram y col., 1992), de la cual dos mutantes termosensibles, una del gen *gyrA* (Gly751→Asp) y otra del gen *gyrB* (Pro171→Ser), son activas a 30°C pero no a 42°C, concluyendo que en el caso de la mutante GyrA el cambio desestabiliza a la proteína, mientras que la mutación en GyrB puede cambiar la interacción del ATP con la proteína a la temperatura no permisible abatiendo la actividad de la girasa.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad en medio mínimo M9 de las mutantes en la Lys-37, tanto a 37°C como a 42°C (**Figura 17B**), pero el comportamiento de las tres mutantes fue idéntico al control resistente. Estos resultados indicaron que la Lisina 37 no es esencial para la actividad de la

proteína ChrA. Un resultado similar fue obtenido por Situ y col. (2004), donde el residuo conservado Arg 1046, ubicado en el STM XIII de la proteína humana de resistencia a multidroga, MPR1, permite el cambio incluso por aspartato con muy poca afectación en su función. Con el objeto de explorar el posible papel de la Lisina 37 se analizó la región donde se encuentra: el STM I. Debido a que las estructuras tridimensionales de las proteínas de membrana cristalizadas, LacY y GlpT, muestran que los segmentos transmembranales adquieren una forma de hélice-alfa (Abramson y col., 2003; Huang y col., 2003), se obtuvo un modelo helicoidal del STM I (**Figura 26**). En este modelo se localizó a la Lisina 37 flanqueada por la Glicina 44, identificada previamente como esencial (Díaz-Pérez, 2006), lo que indica la importancia de este segmento en la función de ChrA. Se decidió entonces obtener otra mutante de la Lisina 37, ahora por glutamato (Glu, E), donde se introdujo una carga opuesta a la del residuo original, con el fin de determinar la posible importancia de este residuo para la función de ChrA.

La mutante K37E presentó una afectación considerable en el nivel de resistencia conferido por ChrA (**Figura 18**) lo que nos permitió concluir que la Lisina 37 sí es importante para la función de la proteína ChrA y probablemente esté desempeñando un papel estructural, por ejemplo, auxiliando en el anclaje de la proteína en la membrana por medio de interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de los lípidos membranales. Granseth y col. (2005) en un análisis de la composición de aminoácidos de la región de interfase membrana-agua, propusieron que residuos básicos en segmentos transmembranales pueden participar en la estructura y anclaje de la proteína en la membrana por

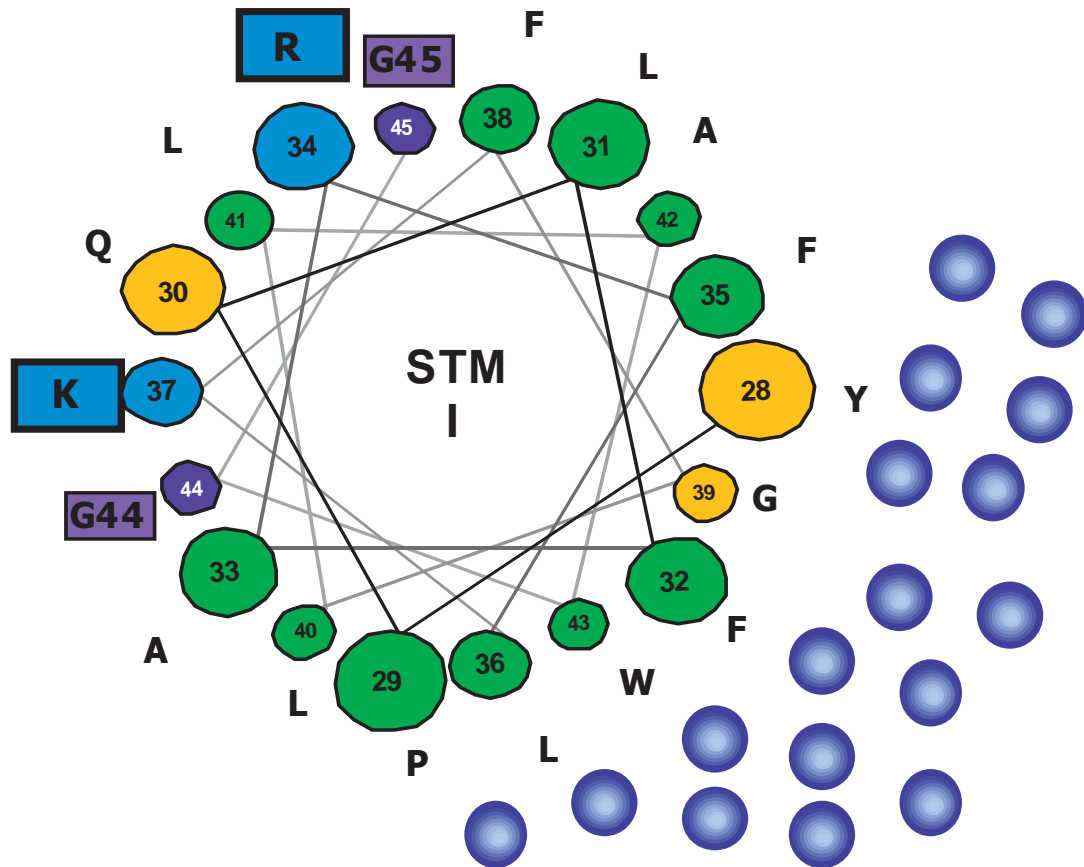


Figura 26. Modelo helicoidal del segmento transmembranal I de la proteína ChrA visto desde el citoplasma. Los círculos numerados representan los residuos de la proteína. Se enmarcan los residuos básicos Lys-37 y Arg-34, y las glicinas esenciales 44 y 45. Los esferas oscuras esquematizan los lípidos de membrana. Diagrama generado por el programa *helicawheel* del servidor Swiss-prot.

medio de interacciones con el grupo fosfato, cargado negativamente, con la cadena lateral de la Arginina o la Lisina, cargada positivamente.

En el modelo helicoidal del STM I se observó que, en la misma cara de la hélice donde se ubica la Lisina 37, se localiza otro residuo básico: la Arginina 34 (**Figura 26**). Aunque este residuo tiene menos del 20% de conservación (**Tabla 5**), fue de nuestro interés investigar si jugaba algún papel en la función de la proteína ChrA, especialmente porque, de manera similar a la Lisina 37, se encuentra al lado de otro residuo esencial para ChrA, la glicina 45 (Díaz-Pérez, 2006). Residuos esenciales no conservados se han identificado en otros transportadores; por ejemplo, la Arg-272 del STM VIII del transportador de oxalato-formato de *O. formigenes*, OxIT, fue seleccionada únicamente por su posición y el análisis mutacional señaló que es esencial para la función de la proteína (Yang y col., 2005).

Del residuo Arg-34 se logró obtener la mutante por Treonina (R34T) la cual presentó un nivel de resistencia muy cercano al control resistente (**Figura 18**) indicación de que no participa en la interacción con el cromato, aunque se requieren más cambios para evaluar con certeza el posible papel. Cabe la posibilidad de que en el STM I se requiera una carga positiva de forma que la Lys-37 y la Arg-34 puedan ser reemplazadas entre sí. Por ejemplo, en el motivo A de la lactosa permeasa LacY de *E. coli*, se localizan tres residuos básicos altamente conservados, ninguno de los cuales es esencial de manera individual para el transporte de lactosa; sólo cuando las tres cargas positivas fueron cambiadas por glutaminas se observó un efecto drástico sobre el

ensamblaje de la proteína (Jessen-Marshall y col., 1995; Pazdernik y col., 2000).

El tercer residuo analizado en este estudio fue la Arg-55, conservada en un 95% y ubicada en el asa periplásmica 1. De este residuo se lograron obtener las tres mutaciones propuestas: Lisina, Treonina y Leucina. Inesperadamente, las pruebas de susceptibilidad en CN mostraron que los cambios por Lisina y Leucina fueron moderadamente afectados y sólo el cambio por treonina mantuvo un comportamiento casi igual al control resistente (**Figura 19A**). Las pruebas en medio mínimo a 37 y 42°C de las mutantes R55K y R55L no mostraron cambio en el comportamiento; interesantemente, las pruebas a 42°C mostraron un aumento en el nivel de resistencia conferido por la mutante R55T, casi 40% por arriba del control resistente (**Figura 19B**). El hecho de que el cambio conservativo por Lisina se vea más afectado que el cambio por Treonina sugiere que en esta posición no se requiere de una carga positiva, sino que es otra propiedad de la Arginina la que es importante para su papel en la función de la proteína ChrA.

De acuerdo al análisis de predicción de estructura secundaria realizado por el programa jpred (Cuff y col., 1998), es probable que el asa periplásmica 1 se encuentre formando una hélice alfa que une los segmentos transmembranales I y II, por lo cual analizamos un modelo helicoidal de esta región con el fin de inferir el posible papel de la Arginina 55 (**Figura 27**). El asa P1 es una región muy cargada, con cinco residuos ácidos y tres residuos básicos; además, también en ella se localiza el Triptófano 63, el cual fue

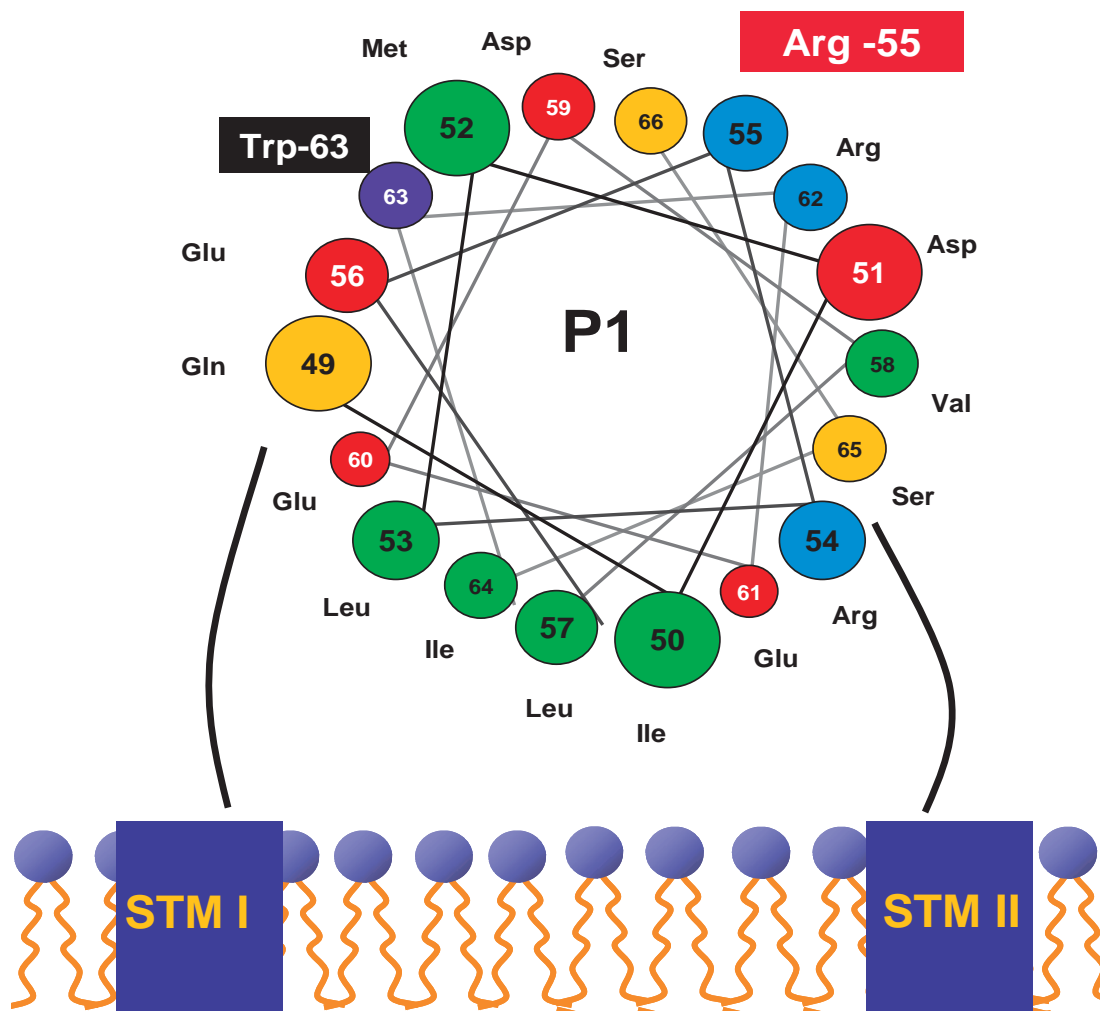


Figura 27. Modelo helicoidal del asa periplásmica 1 de la proteína ChrA. Los círculos numerados representan los residuos de la proteína. Se señala la posición de la Arg-55 y el Trp-63, y en la parte inferior se esquematiza la membrana (fosfolípidos) y los segmentos transmembranales I y II. Diagrama generado por el programa *helicawheel* del servidor Swiss-prot.

identificado como esencial para la función de la proteína ChrA por Díaz-Pérez (2006). En dicho trabajo, se propuso que el asa periplásmica 1 participa en el proceso de translocación del cromato como un mecanismo que controla la apertura y cierre del canal, de manera similar a lo reportado para canales iónicos (Guo y col., 1995; Bezanilla, 2000; Chahine y col., 2004). La asignación del asa P1 a la regulación del transporte del cromato es apoyada también por el aumento en el nivel de resistencia conferido por la mutante R55T a 42°C (**Figura 19B**). Para los transportadores LacY y GlpT de *E. coli* y OxlT de *O. formigenes* se ha propuesto un modelo del mecanismo del transporte denominado de acceso alternativo. En este modelo, las proteínas contienen un solo sitio de unión para el sustrato (y sus co-iones) que es alternativamente expuesto a los dos lados de la membrana durante el ciclo catalítico (Abramson y col., 2003; Huang y col., 2003; Yang y col., 2005). De acuerdo a este modelo, es probable que el asa P1 forme una hélice interfacial que participe en la regulación de la translocación por medio de cambios conformacionales generados por la unión del sustrato en el lado citoplásmico. Dichos cambios promoverían el cambio conformacional requerido para que el cromato pueda ser liberado en el periplasma.

El cambio de la Arginina 55 por Treonina podría favorecer la transición entre los estados conformacionales del transportador al disminuir la afinidad por el cromato y aumentando la velocidad de liberación en el lado periplásmico de la membrana. Un fenómeno similar fue propuesto para el transportador renal de Na⁺-dicarboxilato, NaDC-1, donde se encontró que el asa extracelular

5 sufre cambios conformacionales asociados con la unión del sodio y del sustrato (Pajor y Randolph, 2005). Por otro lado, en el transportador Na⁺-citrate de *Klebsiella pneumoniae*, se propone que el asa citoplásmica X-XI forma una estructura de asa-poro que participa en el cambio de conformación durante la translocación de los sustratos (Sobczak y Lolkema, 2004). Otra posibilidad es que la carga positiva de la Arg-55 sea un factor desestabilizante a 42°C de tal forma que al quitarla, pero conservando un grupo que pueda formar puentes de hidrógeno (el oxhidrilo de la Treonina), se aumente la termoestabilidad de la proteína, aún cuando el residuo tenga un volumen un poco menor. Este fenómeno se ha observado en las proteínas de bacterias termófilas donde se observa una preferencia hacia residuos que provean puentes de hidrógeno en las áreas expuestas a la superficie y hacia residuos que favorezcan el efecto hidrofóbico en las áreas ocultas (White y col., 1996; Berezovzky y col., 2005).

En el caso de los residuos Arg-98 y Arg-201, además de tener ambos un grado de conservación menor del 20%, los cambios realizados mostraron un efecto similar sobre la función de ChrA. La Arginina 98 fue identificada como esencial por Aguilera y col. (2004) y fue de nuestro interés analizar con más detalle el posible papel de este residuo para la función de ChrA. Puesto que se contaba con la mutante sensible R98Q, un cambio que eliminó la carga del residuo, obtuvimos el cambio conservativo por Lisina, R98K. Esta mutante tuvo un comportamiento casi idéntico al control resistente (**Figura 20**). Por su parte, la Arg-201 fue seleccionada por encontrarse en una región homóloga en la mitad amino (asa C3) a la posición de la Lys-394 (asa C6) en la mitad

carboxilo. Mientras que los cambios por Treonina y Leucina de la Arg-201 abatieron casi completamente el nivel de resistencia, el cambio conservativo por Lisina mantuvo casi el mismo nivel de que el control resistente (**Figura 23**). En ambos residuos, Arg-98 y Arg-201, se demostró por tanto la esencialidad de una carga positiva en esta posición pero con la flexibilidad de que puede ser proporcionada también por Lisina. El requerimiento absoluto de una carga positiva puede ser considerado como un indicativo de que la Arg-98 y la Arg-201 participan en la interacción con el cromato, señalando la importancia de estos residuos en la función de ChrA. Debido a su posición en asas citoplásmicas, la Arg-98 en C1 y la Arg-201 en C3 (**Figura 12**), estos aminoácidos podrían formar parte de la región involucrada en el reconocimiento selectivo del cromato (filtro de selección). Un papel similar se propone para la Lys-559 y la Lys-924, localizadas en las asas extracelulares 2 y 5, respectivamente, del transportador renal de Na⁺-bicarbonato kNBC-1 (Abuladze y col., 2005), y para la Arg-425, localizada en la interfase del STM XI y el citoplasma, del transportador de citrato-lactato CimP de *Leuconostoc mesenteroides* (Bandell y Lolkema, 2000).

Por otro lado, como ya se mencionó, la Arg-98 se encuentra en una región similar al motivo A, altamente conservado en la familia MFS, caracterizado por dos glicinas esenciales y de dos a tres residuos básicos [(GXXX(D/E)(R/K)XG(R/K)]. Se ha propuesto que este motivo tiene un papel general en el transporte por encontrarse en proteínas que transportan diversos sustratos (Pao y col., 1998; Bannam y col., 2004) y que probablemente participa en mantener la conformación requerida para la estabilidad en la

membrana o en proveer un papel funcional común tal como la transducción de energía de la fuerza protónmotriz a la translocación del sustrato (Sato y Mueckler, 1999; Cain y col., 2000; Bannam y col., 2004). Así pues, no podemos descartar la posibilidad de que el residuo Arg-98 tenga más bien un papel estructural en la función de la proteína ChrA.

Por su parte, el residuo Arg-201, al tener una localización citoplásmica, podría participar en la adecuada inserción de la proteína en la membrana de acuerdo a la regla de positivos adentro que señala una mayor proporción de residuos con carga positiva en las asas citoplásmicas de las proteínas de membrana; dicha distribución actúa como un indicativo de que tal región no se debe translocar (von Heijne, 1992). Por tanto, debido a que en la posición 201 se requiere sólo una carga positiva, ya sea proporcionada por Lisina o Arginina, cabe también la posibilidad de que la Arg-201 tenga un papel diferente a la interacción con el cromato.

Finalmente, los cambios obtenidos para los residuos Arg-154, Lys-248 y Lys-394 produjeron efectos similares sobre la función de ChrA, aunque a diferentes niveles. Para la Lys-394, el cambio por Treonina afectó considerablemente el nivel de susceptibilidad a cromato, mientras que el cambio por Arginina presentó una disminución de la mitad del nivel de resistencia conferido por la proteína ChrA cuando la temperatura se elevó a 42°C (**Figuras 21 y 22**). Por su parte, las mutantes por Treonina y Leucina de la Lisina 248 fueron casi completamente sensibles y el cambio por Arginina sólo se vio moderadamente afectado a 42°C (**Figura 24**). El mayor efecto observado fue en las mutantes de la Arginina 154, donde aún el cambio

conservativo por Lisina afectó drásticamente el nivel de resistencia conferido, mientras que el cambio por leucina fue casi completamente sensible (**Figura 25**).

Estos tres residuos, Arg-154, Lys-248 y Lys -394, comparten por tanto la esencialidad de la carga positiva en la posición donde se encuentran, ya que la neutralización de la misma genera un efecto moderado e incluso abate la resistencia a cromato conferida por ChrA. Además, y a diferencia de los residuos Arg-98 y Arg-201, los resultados muestran que cada residuo es esencial *per se*, pues incluso los cambios conservativos afectan considerable o drásticamente la función de la proteína ChrA. Así pues, los resultados obtenidos señalan a la participación de estos tres residuos en la unión de cromato, probablemente a diferente nivel.

La Lys-394, debido a su posición citoplásmica en ChrA (**Figura 12**), probablemente forma parte del sitio de reconocimiento del cromato, como la región que puede sentir la unión del mismo y transmitirlo a lo largo de la proteína para generar los cambios de conformación requeridos para el proceso de translocación del cromato.

Puesto que el cromato posee dos cargas negativas, podemos esperar que el sitio de unión transmembranal del cromato esté integrado por dos residuos con carga positiva. Con base a su posición cabe suponer que la Arg-154 y la Lys-248 constituyan los ligandos transmembranales del sustrato, quizá con la Arg-154 más al interior del STM IV y no en la interfase con el asa C2 como se localiza en el modelo topológico actual(**Figuras 12 y 28**). Por

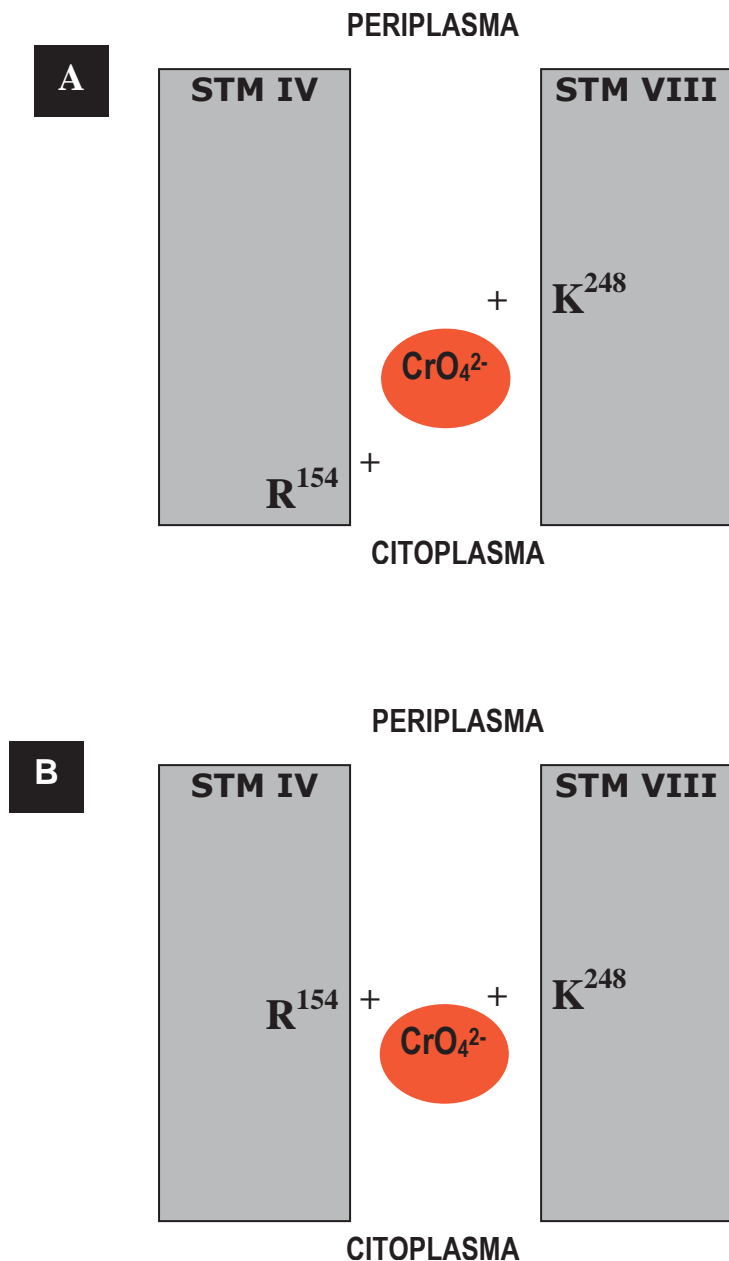


Figura 28. Esquema del probable sitio de unión del cromato en la proteína ChrA. Se muestran los segmentos transmembranales (STM) IV y VIII (rectángulos), resaltando los residuos Arg-154 y Lys-248 que probablemente constituyen los ligandos del cromato. A) Esquema de acuerdo al modelo topológico actual, con la Arg-154 en la interfase con el citoplasma B) Esquema donde la Arg-154 se encuentra dentro del STM IV.

ejemplo, la Arg-272 del transportador de oxalato-formato OxIT, propuesta como parte del sitio de unión de los sustratos, fue localizada en un asa citoplásmica en el modelo topológico basado en el perfil hidropático, pero un modelo construido por homología con el transportador de glicerol-3-fosfato GlpT, la colocó dentro del STM VIII ((Yang y col., 2005). Sin embargo, es posible también que la posición de la Arg-154 sea efectivamente la interfase membrana-agua, como la Arg-248 del transportador de citrato-malato CimH de *B. subtilis*, localizada en la interfase del STM XI y el citoplasma, y para la cual se propone que participa en la interacción con el citrato (Bandell y Lolkema, 2000; Krom y Lolkema, 2003).

La Lisina 248 se localiza en el centro del STM VIII de ChrA (**Figura 12**), posición que suele ser característica de residuos cargados que están involucrados en el reconocimiento del ión, sustrato del transportador. Podemos citar como ejemplo a las Arg-46 y 275 del transportador de azúcar-fosfato UhpT de *E. coli*, ubicadas en la parte central de los STM I y VII, respectivamente, y que participan en la unión del grupo fosfato (Fann y col., 1998). Otro ejemplo son las Arg-87 y 368 localizadas en el centro de los STM II y VIII, respectivamente, del transportador de nitrato NtrA de *A. nidulans*, las cuales son requeridas para la unión del sustrato (Unkles y col., 2004). Existen otros ejemplos reportados de este tipo de residuos (Ditty y Harwood, 2002; Huang y col., 2003; Yang y col., 2005).

La familia CHR es cercana a la familia de transportadores MFS, de la cual se conoce la estructura tridimensional de dos de sus miembros (Abramson y col., 2003; Huang y col., 2003), permitiendo confirmar los estudios

bioquímicos previos donde se propuso que estas proteínas están formadas por 12 STM. En el caso de ChrA de *P. aeruginosa*, los análisis recientemente dirigidos para conocer la topología de la proteína han permitido establecer que consta de 13 STM (Jiménez-Mejía y col., 2006). A nivel estructural, ésto marca una clara diferencia entre las dos familias; sin embargo, la mitad amino de las proteínas es muy similar en ambos grupos ya que consta de seis segmentos transmembranales, tiene la misma orientación y arreglo topológico y comparten el motivo esencial A.

Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos un modelo estructural y funcional de ChrA basado a su vez en un modelo general propuesto a partir de las características de las proteínas de la familia MFS cuya estructura ya ha sido resuelta: la permeasa de lactosa LacY y el transportador de glicerol-3-fosfato GlpT, ambas de *E. coli*. Como se muestra en la **Figura 29**, el modelo propone que los STM de la proteína ChrA tienen una distribución simétrica donde el STM VII actúa como el centro de simetría; los STM II, IV y V de la mitad amino, y los STM VIII, XII y XIII de la mitad carboxilo forman parte del canal de translocación de cromato, mientras que el resto de los STM interacciona con la membrana y con otros STM.

La región conformada por el STM I, donde se localizan los residuos Arg-34 y Lys-37, y el asa periplásmica P1, donde se ubica la Arg-55, de acuerdo al modelo, no forman parte de la vía de translocación del cromato y probablemente participen en mantener una conformación estructural adecuada de ChrA para el proceso de expulsión (**Figura 29**). Las asas citoplásmicas C1 y

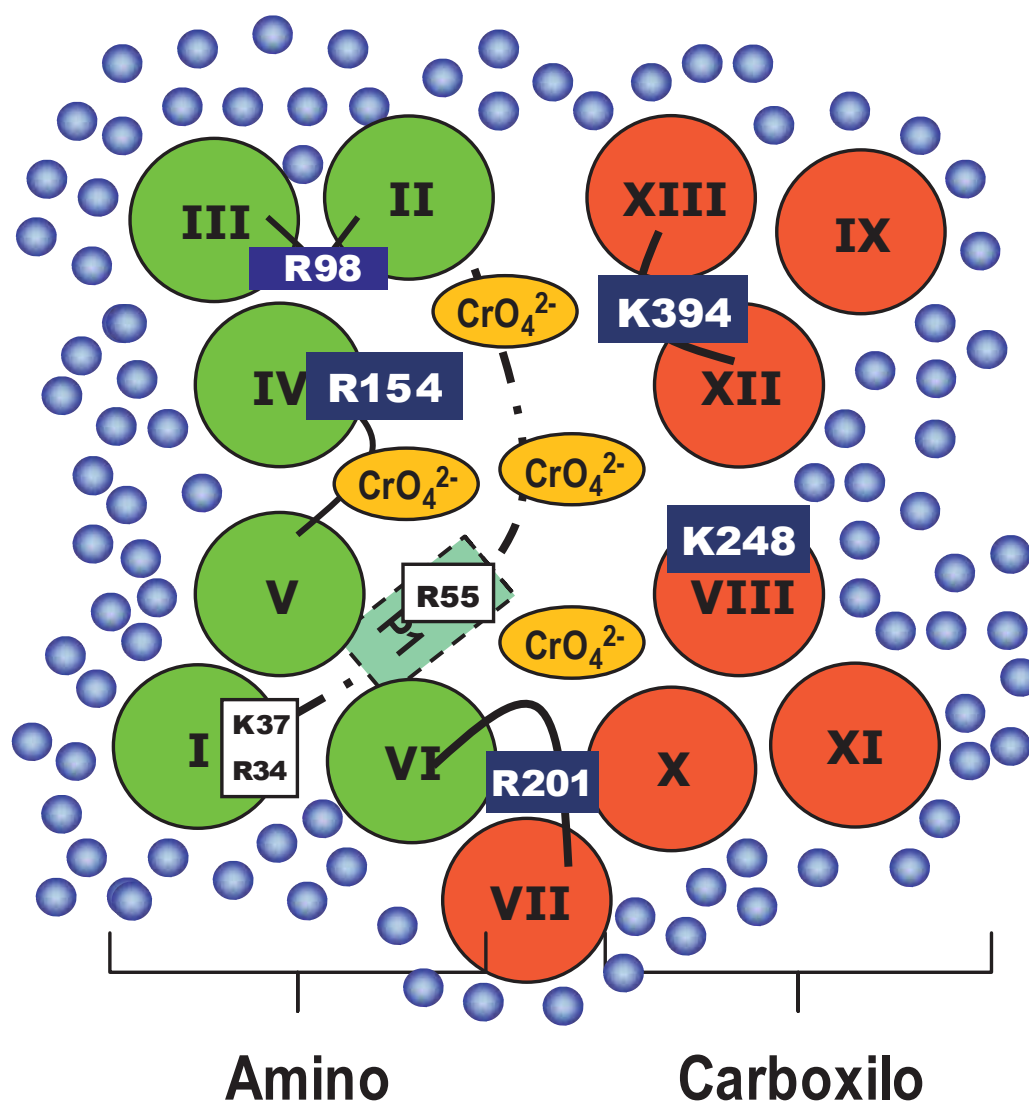


Figura 29. Modelo hipotético del arreglo de la proteína ChrA en la membrana. Los círculos grandes representan los 13 segmentos transmembranales (I-XIII) en un arreglo simétrico, vistos en un corte transversal desde el citoplasma. Las esferas pequeñas esquematizan los lípidos de la membrana. El dominio amino de la proteína se localiza a la izquierda y el dominio carboxilo a la derecha. Las líneas continuas representan asas citoplásmicas. Se muestra el asa P1 como un cilindro representando la estructura de hélice y una línea discontinua. Se indica la posición de los residuos básicos analizados en este trabajo.

C3, donde se ubican los residuos Arg-98 y Arg-201, respectivamente, se encuentran cercanas a la cavidad central (posiblemente el canal de translocación) de tal forma que es posible que participen en la interacción directa con el cromato, aunque cabe la posibilidad de que sólo tengan un papel estructural. Los STM IV y VIII, donde se localizan los residuos Arg-154 y Lys-248, respectivamente, así como el asa citoplásmica C6, donde se encuentra la Lys-394 (**Fig. 29**), forman parte de la cavidad central que constituye la vía de translocación de cromato y que incluye el sitio de unión del mismo en el proceso de expulsión.

4 Evaluación de los dominios amino y carboxilo de la proteína ChrA

De forma similar a lo que se ha reportado para la familia MFS, Nies y col. (1998) propusieron que los miembros de la familia CHR se originaron de un evento de duplicación intragénica. Esto fue apoyado por la localización de motivos repetidos en ambas mitades de las proteínas (Nies y col., 1998); además, la región de los residuos 25 a 203 del dominio amino de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* tiene 26/43% de identidad/similitud con la región de los residuos 236-411 en el dominio carboxilo (Jiménez-Mejía y col., 2006).

Análisis de la relación estructura-función de la proteína ChrA de *P. aeruginosa* realizados por Aguilera y col. (2004) permitieron la identificación, por mutagénesis al azar, de residuos esenciales para la función de ChrA. La mayoría de éstos residuos se localizaron en la mitad amino de la proteína, pero eran residuos neutros, con poca probabilidad de interaccionar con las cargas

negativas del cromato. Además, el análisis filogenético de la familia CHR indicó que el dominio amino de la proteína, el cual conforma un solo grupo, se encuentra más conservado que el dominio carboxilo, integrado por dos grupos (Díaz-Pérez, 2006). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó la topología de la proteína ChrA (Jiménez-Mejía y col., 2006), la cual consta de 13 STM, con la característica de que los dominios amino y carboxilo poseen orientaciones opuestas con respecto a la membrana, fenómeno denominado como topología dual e identificada en numerosos transportadores (Rapp y col., 2006). La topología invertida de los dominios amino y carboxilo de ChrA sugiere un papel distinto en la función de la proteína ChrA para cada dominio (Jiménez-Mejía y col., 2006), hipótesis apoyada por la mutagénesis al azar y por el análisis filogenético. En concordancia con esta hipótesis, miembros de la familia MFS muestran una mayor similitud de secuencia en la mitad amino que en la parte carboxilo, por lo que se ha postulado que la mitad amino es esencial para la energización del transporte, mientras que la mitad carboxilo está involucrada en la especificidad del sustrato (Paulsen y col., 1996). Apoyando esta hipótesis, en el presente trabajo se identificaron los residuos esenciales Lys-248 y Lys-394, ambos ubicados en la mitad carboxilo de la proteína ChrA, como parte del probable sitio de unión del cromato (**Figura 29**).

En este trabajo, analizamos un par de residuos básicos homólogos (generados por la duplicación intragénica) en los dominios amino y carboxilo: Lys-37 (STM I) y Lys-248 (STM VIII). Contrario a la conservación general de los dominios, el residuo Lys-248 con un 70/87% de identidad/similitud, está

más conservado que su homólogo Lys-37 (37/95). El análisis mutacional indicó que efectivamente el residuo más conservado del dominio carboxilo, la Lys-248, es esencial para la función de ChrA, mientras que el residuo Lys-37 es importante, pero la proteína ChrA permite cierta flexibilidad del tipo de residuo que puede ocupar dicha posición. Por otra parte, los residuos Arg-201, en el asa C3 del dominio amino, y Lys-394, en el asa C6 del dominio carboxilo comparten una posición similar en asas citoplásmicas, pero la Lys-394 se encuentra muy conservada (75/95% de identidad/similitud) mientras que la Arg-201 no se encuentra conservada (8/8%). Los resultados de la mutagénesis indican que la Lys-394 juega un papel esencial para la función de la proteína ChrA, mientras que en la posición de la Arg-201 se permite la flexibilidad de otro residuo positivo. Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación del dominio carboxilo en la interacción con el cromato. Sin embargo, la Arg-154, la cual es absolutamente esencial para la función de la proteína ChrA, se localiza en el STM IV del dominio amino probablemente formando parte del sitio de unión con cromato. Así pues, aunque cada dominio tenga un papel principal, es factible que residuos de un dominio participen activamente en el papel desempeñado por el otro, constituyendo una red de interacciones que permiten finalmente llevar a cabo el proceso de transporte del cromato.

5. Conclusiones

Los residuos Arg-34, Lys-37 y Arg-55 son importantes para la función de ChrA, pero no participan de manera directa en la interacción con el cromato sino en la estructura de la proteína.

Los residuos Arg-98 y Lys-201 son importantes para la función de ChrA y probablemente participan en la interacción con el cromato, como parte del filtro de selectividad, aunque es posible que su papel sea más bien estructural.

Los residuos Arg-154, Lys-248 y Arg-394 son esenciales para la función de la proteína ChrA y participan de manera directa en la interacción con el cromato probablemente formando parte del sitio de reconocimiento y unión del ión.

6. Perspectivas

Para descartar que el fenotipo observado en las mutantes analizadas sea producto de cambios en la cantidad de la proteína ChrA presente en membrana, se requiere detectar y cuantificar a las proteínas ChrA mutantes y silvestre en la membrana de *P. aeruginosa*. Además, ensayos del transporte de cromato para la obtención de los parámetros cinéticos de este proceso, permitirán confirmar la participación de la Arg-154, Lys-248 y Lys-394 en la unión con el cromato.

Finalmente, ampliar los análisis de mutagénesis dirigida sobre la Arg-55 y otros residuos del asa periplásmica P1 son necesarios para deducir el papel de esta región en el proceso del transporte de cromato.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H.R. Kaback y S. Iwata (2003) *Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli*. Science, **301**(5633): p. 610-615.
2. Abuladze, N., R. Azimov, D. Newman, P. Sassani, W. Liu, S. Tatishchev, A. Pushkin y I. Kurtz (2005) *Critical amino acid residues involved in the electrogenic sodium-bicarbonate cotransporter kNBC1-mediated transport*. J Physiol, **565**(Pt 3): p. 717-730.
3. Aguilar, M.E. (2003) *Análisis de la función de residuos esenciales de la proteína ChrA de Pseudomonas aeruginosa*, Tesis de Maestría. IIQB. UMSNH Morelia, Mich.
4. Aguilera, S., M.E. Aguilar, M.P. Chavez, J.E. Lopez-Meza, M. Pedraza-Reyes, J. Campos-Garcia y C. Cervantes (2004) *Essential residues in the chromate transporter ChrA of Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, **232**(1): p. 107-112.
5. Aller, S.G., E.T. Eng, C.J. De Feo y V.M. Unger (2004) *Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function*. J Biol Chem, **279**(51): p. 53435-53441.
6. Alvarez, A.H., R. Moreno-Sanchez y C. Cervantes (1999) *Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, **181**(23): p. 7398-7400.

7. Bailey, A.M., M.A. Webber y L.J. Piddock (2006) *Medium plays a role in determining expression of *acrB*, *marA*, and *soxS* in *Escherichia coli**. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**(3): p. 1071-1074.
8. Bannam, T.L., P.A. Johanesen, C.L. Salvado, S.J. Pidot, K.A. Farrow y J.I. Rood (2004) *The *Clostridium perfringens* TetA(P) efflux protein contains a functional variant of the Motif A region found in major facilitator superfamily transport proteins*. *Microbiology*, **150**(Pt 1): p. 127-134.
9. Berezovsky, I.N., W.W. Chen, P.J. Choi y E.I. Shakhnovich (2005) *Entropic stabilization of proteins and its proteomic consequences*. *PLoS Comput Biol*, **1**(4): p. e47.
10. Bezanilla, F. (2000) *The voltage sensor in voltage-dependent ion channels*. *Physiol Rev*, **80**(2): p. 555-592.
11. Birnboim, H.C. y J. Doly (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Res*, **7**(6): p. 1513-1523.
12. Bopp, L.H., A.M. Chakrabarty y H.L. Ehrlich (1983) *Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens**. *J Bacteriol*, **155**(3): p. 1105-1109.
13. Brandl, C.J. y C.M. Deber (1986) *Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(4): p. 917-921.
14. Cain, S.M., E.A. Matzke y R.J. Brooker (2000) *The conserved motif in hydrophilic loop 2/3 and loop 8/9 of the lactose permease of *Escherichia coli*. Analysis of suppressor mutations*. *J Membr Biol*, **176**(2): p. 159-168.

15. Campos, J., M. Martinez-Pacheco y C. Cervantes (1995) *Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant Bacillus sp. strain*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **68**(3): p. 203-208.
16. Campos-Garcia, J., G. Martinez-Cadena, R. Alvarez-Gonzalez y C. Cervantes (1997) *Purification and partial characterization of a chromate reductase from Bacillus*. *Rev Latinoam Microbiol*, **39**(1-2): p. 73-81.
17. Cervantes, C. (1991) *Bacterial interactions with chromate*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **59**(4): p. 229-233.
18. Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R., Cañizares-Villanueva, O., Gutiérrez-Corona, F., González-Moreno, S., Devars, S., Sosa-Luna, L., *Biorremediación de los desechos contaminados por metales pesados*, en *Contaminación Ambiental por metales pesados*, Cervantes C. y Moreno-Sánchez, R., Editores. 1999, A.G.T. Editor S.A.: México. p. 119-125.
19. Cervantes, C., J. Campos-Garcia, S. Devars, F. Gutierrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzman y R. Moreno-Sanchez (2001) *Interactions of chromium with microorganisms and plants*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**(3): p. 335-347.
20. Cervantes, C., K. Chavez y S. Vaca (1991) *Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados*. *Rev Latinoam Microbiol*, **33**(1): p. 61-70.
21. Cervantes, C. y H. Ohtake (1988) *Plasmid-determined resistance to chromate in Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiology Letters*, **56**(2): p. 173-176.

22. 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**(1): p. 287-291.
23. Cervantes, C. y S. Silver (1992) *Plasmid chromate resistance and chromate reduction*. Plasmid, **27**(1): p. 65-71.
24. Cervantes, C. y S. Silver (1996) *Sistemas de resistencia a metales en Pseudomonas*. Rev Latinoam Microbiol, **38**(1): p. 45-64.
25. Cervantes, C. y S. Vaca (1991) *Cromatos: resistencia y destoxificación en bacterias*. Rev Latinoam Microbiol, **33**(1): p. 71-76.
26. Cervantes-Vega, C., J. Chavez, N.A. Cordova, P. de la Mora y J. Amador Velasco (1986) *Resistance to metals by Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. Microbios, **48**(196-197): p. 159-163.
27. Chahine, M., S. Pilote, V. Pouliot, H. Takami y C. Sato (2004) *Role of arginine residues on the S4 segment of the Bacillus halodurans Na⁺ channel in voltage-sensing*. J Membr Biol, **201**(1): p. 9-24.
28. Cortés, V.R. (2005) *Análisis de las prolinas del segmento transmembranal II de la proteína ChrA*, Tesis de Licenciatura. Escuela de QFB. UMSNH. Morelia, Mich.
29. Cuff, J.A., M.E. Clamp, A.S. Siddiqui, M. Finlay y G.J. Barton (1998) *JPred: a consensus secondary structure prediction server*. Bioinformatics, **14**(10): p. 892-893.
30. Díaz-Pérez, C. (2006) *Filogenia y evaluación de aminoácidos conservados en la función de la proteína transportadora de cromato ChrA*, Tesis de Maestría. IIQB. UMSNH. Morelia, Mich.

31. Ditty, J.L. y C.S. Harwood (2002) *Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H⁺ symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from Pseudomonas putida.* J Bacteriol, **184**(5): p. 1444-1448.
32. Dreyfuss, J. (1964) *Characterization of a sulfate- and thiosulfate-transporting system in Salmonella typhimurium.* J Biol Chem, **239**: p. 2292-2297.
33. Efstathiou, J.D. y L.L. McKay (1977) *Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in Streptococcus lactis.* J Bacteriol, **130**(1): p. 257-265.
34. Enderle, P.J. y M.A. Farwell (1998) *Electroporation of freshly plated Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa cells.* Biotechniques, **25**(6): p. 954-956, 958.
35. Fann, M., A.H. Davies, A. Varadhachary, T. Kuroda, C. Sevier, T. Tsuchiya y P.C. Maloney (1998) *Identification of two essential arginine residues in UhpT, the sugar phosphate antiporter of Escherichia coli.* J Membr Biol, **164**(2): p. 187-195.
36. Fisher, C.L. y G.K. Pei (1997) *Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method.* Biotechniques, **23**(4): p. 570-571, 574.
37. Fu, D., R.I. Sarker, K. Abe, E. Bolton y P.C. Maloney (2001) *Structure/function relationships in OxIT, the oxalate-formate transporter of oxalobacter formigenes. Assignment of transmembrane helix 11 to the translocation pathway.* J Biol Chem, **276**(12): p. 8753-8760.

38. Glick, B.R., Partenak, J.J. (1994) *Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*. 1994, Washington D.C.: ASM Press. 133-151.
39. Granseth, E., G. von Heijne y A. Elofsson (2005) *A study of the membrane-water interface region of membrane proteins*. J Mol Biol, **346**(1): p. 377-385.
40. Green, A.L., E.J. Anderson y R.J. Brooker (2000) *A revised model for the structure and function of the lactose permease. Evidence that a face on transmembrane segment 2 is important for conformational changes*. J Biol Chem, **275**(30): p. 23240-23246.
41. Greener, A., M. Callahan y B. Jerpseth (1996) *An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain*. Methods Mol Biol, **57**: p. 375-385.
42. Guo, X.W., P.R. Smith, B. Cognon, D. D'Arcangelis, E. Dolginova y C.A. Mannella (1995) *Molecular design of the voltage-dependent, anion-selective channel in the mitochondrial outer membrane*. J Struct Biol, **114**(1): p. 41-59.
43. Holloway, B.W. (1969) *Genetics of Pseudomonas*. Bacteriol Rev, **33**(3): p. 419-443.
44. Huang, Y., M.J. Lemieux, J. Song, M. Auer y D.N. Wang (2003) *Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli*. Science, **301**(5633): p. 616-620.
45. Ish-Horowicz, D. y J.F. Burke (1981) *Rapid and efficient cosmid cloning*. Nucleic Acids Res, **9**(13): p. 2989-2998.

46. Ishibashi, Y., C. Cervantes y S. Silver (1990) *Chromium reduction in Pseudomonas putida*. Appl Environ Microbiol, **56**(7): p. 2268-2270.
47. Jessen-Marshall, A.E., N.J. Paul y R.J. Brooker (1995) *The conserved motif, GXXX(D/E)(R/K)XG[X](R/K)(R/K), in hydrophilic loop 2/3 of the lactose permease*. J Biol Chem, **270**(27): p. 16251-16257.
48. Jimenez-Mejia, R., J. Campos-Garcia y C. Cervantes (2006) *Membrane topology of the chromate transporter ChrA of Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters,
49. Juhnke, S., N. Peitzsch, N. Hubener, C. Grosse y D.H. Nies (2002) *New genes involved in chromate resistance in Ralstonia metallidurans strain CH34*. Arch Microbiol, **179**(1): p. 15-25.
50. Kamaludeen, S.P., K.R. Arunkumar, S. Avudainayagam y K. Ramasamy (2003) *Bioremediation of chromium contaminated environments*. Indian J Exp Biol, **41**(9): p. 972-985.
51. Kamaludeen, S.P., M. Megharaj, A.L. Juhasz, N. Sethunathan y R. Naidu (2003) *Chromium-microorganism interactions in soils: remediation implications*. Rev Environ Contam Toxicol, **178**: p. 93-164.
52. Karbonowska, H., A. Wiater y D. Hulanicka (1977) *Sulphate permease of Escherichia coli K12*. Acta Biochim Pol, **24**(4): p. 329-334.
53. Kawanishi, S., S. Inoue y S. Sano (1986) *Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide*. J Biol Chem, **261**(13): p. 5952-5958.
54. Krom, B.P. y J.S. Lolkema (2003) *Conserved residues R420 and Q428 in a cytoplasmic loop of the citrate/malate transporter CimH of Bacillus subtilis*

are accessible from the external face of the membrane. *Biochemistry*, **42**(2): p. 467-474.

55. Krom, B.P., J.B. Warner, W.N. Konings y J.S. Lolkema (2003) *Transporters involved in uptake of di- and tricarboxylates in Bacillus subtilis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **84**(1): p. 69-80.

56. Labro, A.J., A.L. Raes, I. Bellens, N. Ottschytsch y D.J. Snyders (2003) *Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines*. *J Biol Chem*, **278**(50): p. 50724-50731.

57. Landgraf, J.R., J. Wu y J.M. Calvo (1996) *Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **178**(23): p. 6930-6936.

58. Landolt-Marticorena, C., K.A. Williams, C.M. Deber y R.A. Reithmeier (1993) *Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins*. *J Mol Biol*, **229**(3): p. 602-608.

59. Lemieux, M.J., J. Song, M.J. Kim, Y. Huang, A. Villa, M. Auer, X.D. Li y D.N. Wang (2003) *Three-dimensional crystallization of the Escherichia coli glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily*. *Protein Sci*, **12**(12): p. 2748-2756.

60. Lemmon, M.A. y D.M. Engelman (1994) *Specificity and promiscuity in membrane helix interactions*. *FEBS Lett*, **346**(1): p. 17-20.

61. Liu, Y., D.M. Engelman y M. Gerstein (2002) *Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs*. *Genome Biol*, **3**(10): p. research0054.

62. Losi, M.E., C. Amrhein y W.T. Frankenberger, Jr. (1994) *Environmental biochemistry of chromium*. Rev Environ Contam Toxicol, **136**: p. 91-121.
63. McGrath, S.P., Smith, S, *Chromium and nickel*, in *Heavy metals in soils*, B.J. Alloway, Editor. 1990, Wiley: Nueva York. p. 125-150.
64. Miranda, A.T., M.V. Gonzalez, G. Gonzalez, E. Vargas, J. Campos-Garcia y C. Cervantes (2005) *Involvement of DNA helicases in chromate resistance by Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Mutat Res, **578**(1-2): p. 202-209.
65. Mondaca, Gonzalez y Zaror (1998) *Isolation, characterization and expression of a plasmid encoding chromate resistance in Pseudomonas putida KT2441* Letters in Applied Microbiology, **26**(5): p. 367-371.
66. Nies, A., D.H. Nies y S. Silver (1989) *Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol, **171**(9): p. 5065-5070.
67. 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**(10): p. 5648-5653.
68. Nies, D.H. (1999) *Microbial heavy-metal resistance*. Appl Microbiol Biotechnol, **51**(6): p. 730-750.
69. Nies, D.H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch y M.H. Saier, Jr. (1998) *CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters*. J Bacteriol, **180**(21): p. 5799-5802.
70. Nies, D.H. y S. Silver (1989) *Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive Alcaligenes eutrophus strain*. J Bacteriol, **171**(7): p. 4073-4075.

71. Nies, D.H. y S. Silver (1989) *Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol, **171**(2): p. 896-900.
72. Ohtake, H., C. Cervantes y S. Silver (1987) *Decreased chromate uptake in Pseudomonas fluorescens carrying a chromate resistance plasmid*. J Bacteriol, **169**(8): p. 3853-3856.
73. Ohtake, H., K. Komori, C. Cervantes y K. Toda (1990) *Chromate-resistance in a chromate-reducing strain of Enterobacter cloacae*. FEMS Microbiol Lett, **55**(1-2): p. 85-88.
74. Oram, M., R. Kuroda y L.M. Fisher (1992) *Escherichia coli DNA gyrase: genetic analysis of gyrA and gyrB mutations responsible for thermosensitive enzyme activity*. FEBS Lett, **312**(1): p. 61-65.
75. Pajor, A.M. y K.M. Randolph (2005) *Conformationally sensitive residues in extracellular loop 5 of the Na⁺/dicarboxylate co-transporter*. J Biol Chem, **280**(19): p. 18728-18735.
76. Pao, S.S., I.T. Paulsen y M.H. Saier, Jr. (1998) *Major facilitator superfamily*. Microbiol Mol Biol Rev, **62**(1): p. 1-34.
77. 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**(17): p. 3962-3969.
78. Paulsen, I.T., M.H. Brown y R.A. Skurray (1996) *Proton-dependent multidrug efflux systems*. Microbiol Rev, **60**(4): p. 575-608.
79. Pazdernik, N.J., E.A. Matzke, A.E. Jessen-Marshall y R.J. Brooker (2000) *Roles of charged residues in the conserved motif, G-X-X-X-D/E-R/K-X-G-[X]-*

R/K-R/K, of the lactose permease of *Escherichia coli*. *J Membr Biol*, **174**(1): p. 31-40.

80. Pimentel, B.E., R. Moreno-Sanchez y C. Cervantes (2002) *Efflux of chromate by Pseudomonas aeruginosa cells expressing the ChrA protein*. *FEMS Microbiol Lett*, **212**(2): p. 249-254.

81. Quievryn, G., E. Peterson, J. Messer y A. Zhitkovich (2003) *Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells*. *Biochemistry*, **42**(4): p. 1062-1070.

82. Rapp, M., E. Granseth, S. Seppala y G. von Heijne (2006) *Identification and evolution of dual-topology membrane proteins*. *Nat Struct Mol Biol*, **13**(2): p. 112-116.

83. Rubin, R.A., S.B. Levy, R.L. Heinrichson y F.J. Kezdy (1990) *Gene duplication in the evolution of the two complementing domains of gram-negative bacterial tetracycline efflux proteins*. *Gene*, **87**(1): p. 7-13.

84. Russ, W.P. y D.M. Engelman (2000) *The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association*. *J Mol Biol*, **296**(3): p. 911-919.

85. Sato, M. y M. Mueckler (1999) *A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology*. *J Biol Chem*, **274**(35): p. 24721-24725.

86. Shelden, M.C., P. Loughlin, M.L. Tierney y S.M. Howitt (2001) *Proline residues in two tightly coupled helices of the sulphate transporter, SHST1, are important for sulphate transport*. *Biochem J*, **356**(Pt 2): p. 589-594.

87. Shi, X.L. y N.S. Dalal (1990) *Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of .OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media*. Arch Biochem Biophys, **281**(1): p. 90-95.
88. Sirko, A., M. Hryniewicz, D. Hulanicka y A. Bock (1990) *Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12: nucleotide sequence and expression of the cystWAM gene cluster*. J Bacteriol, **172**(6): p. 3351-3357.
89. Situ, D., A. Haimeur, G. Conseil, K.E. Sparks, D. Zhang, R.G. Deeley y S.P. Cole (2004) *Mutational analysis of ionizable residues proximal to the cytoplasmic interface of membrane spanning domain 3 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1): glutamate 1204 is important for both the expression and catalytic activity of the transporter*. J Biol Chem, **279**(37): p. 38871-38880.
90. Snow, E.T. (1994) *Effects of chromium on DNA replication in vitro*. Environ Health Perspect, **102 Suppl 3**: p. 41-44.
91. Sobczak, I. y J.S. Lolkema (2004) *Alternating access and a pore-loop structure in the Na⁺-citrate transporter CitS of Klebsiella pneumoniae*. J Biol Chem, **279**(30): p. 31113-31120.
92. Sugden, K.D. y B.D. Martin (2002) *Guanine and 7,8-dihydro-8-oxo-guanine-specific oxidation in DNA by chromium(V)*. Environ Health Perspect, **110 Suppl 5**: p. 725-728.
93. Summers, A.O. y G.A. Jacoby (1978) *Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, **13**(4): p. 637-640.

94. Suzuki, T., N. Miyata, H. Horitsu, K. Kawai, K. Takamizawa, Y. Tai y M. Okazaki (1992) *NAD(P)H-dependent chromium (VI) reductase of Pseudomonas ambigua G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III)*. J Bacteriol, **174**(16): p. 5340-5345.
95. Syn, C.K., J.K. Magnuson, M.T. Kingsley y S. Swarup (2004) *Characterization of Pseudomonas putida genes responsive to nutrient limitation*. Microbiology, **150**(Pt 6): p. 1661-1669.
96. Tinajero, T.M. (2003) *Expresión de la proteína ChrA de Pseudomonas aeruginosa en Escherichia coli*. Tesis de Maestría. IIQB. UMSNH. Morelia, Mich.
97. Trentmann, O., C. Decker, H.H. Winkler y H.E. Neuhaus (2000) *Charged amino-acid residues in transmembrane domains of the plastidic ATP/ADP transporter from arabidopsis are important for transport efficiency, substrate specificity, and counter exchange properties*. Eur J Biochem, **267**(13): p. 4098-4105.
98. Unkles, S.E., D.A. Rouch, Y. Wang, M.Y. Siddiqi, A.D. Glass y J.R. Kinghorn (2004) *Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, **101**(50): p. 17549-17554.
99. Verma, T., P.W. Ramteke y S.K. Garg (2002) *Effect of ecological factors on conjugal transfer of chromium-resistant plasmid in Escherichia coli isolated from tannery effluent*. Appl Biochem Biotechnol, **102-103**(1-6): p. 5-20.
100. Voitkun, V., A. Zhitkovich y M. Costa (1998) *Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells*. Nucleic Acids Res, **26**(8): p. 2024-2030.

101. von Heijne, G. (1991) *Proline kinks in transmembrane alpha-helices*. J Mol Biol, **218**(3): p. 499-503.
102. Wakabayashi, S., T. Hisamitsu, T. Pang y M. Shigekawa (2003) *Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na⁺/H⁺ exchangers by measurement of reverse mode reaction*. J Biol Chem, **278**(44): p. 43580-43585.
103. Wallin, E. y G. von Heijne (1998) *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*. Protein Sci, **7**(4): p. 1029-1038.
104. Wang, P.C., T. Mori, K. Komori, M. Sasatsu, K. Toda y H. Ohtake (1989) *Isolation and characterization of an Enterobacter cloacae strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions*. Appl Environ Microbiol, **55**(7): p. 1665-1669.
105. Webb, D.C., H. Rosenberg y G.B. Cox (1992) *Mutational analysis of the Escherichia coli phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices*. J Biol Chem, **267**(34): p. 24661-24668.
106. West, S.E., H.P. Schweizer, C. Dall, A.K. Sample y L.J. Runyen-Janecky (1994) *Construction of improved Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in Pseudomonas aeruginosa*. Gene, **148**(1): p. 81-86.
107. White, P.J., D.J. Squirrell, P. Arnaud, C.R. Lowe y J.A. Murray (1996) *Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354*. Biochem J, **319** (Pt 2): p. 343-350.

108. Williams, K.A. y C.M. Deber (1991) *Proline residues in transmembrane helices: structural or dynamic role?* *Biochemistry*, **30**(37): p. 8919-8923.
109. Yang, Q., X. Wang, L. Ye, M. Mentrikoski, E. Mohammadi, Y.M. Kim y P.C. Maloney (2005) *Experimental tests of a homology model for OxIT, the oxalate transporter of Oxalobacter formigenes.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(24): p. 8513-8518.
110. Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing (1985) *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.* *Gene*, **33**(1): p. 103-119.