



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Análisis de la Expresión del Gen *srpC* de
Synechococcus elongatus PCC 7942”**

TESIS

**PARA OBENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**Presenta:
pQ.F.B . PAULINA JERÓNIMO RODRÍGUEZ**

**Asesor:
D. C. Carlos Cervantes Vega**

MORELIA, MICH., NOVIEMBRE DEL 2010.

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

EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y DE LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA U.M.S.N.H.

Un enorme agradecimiento a mi asesor porque me haya abiertos las puertas de su laboratorio, además del apoyo moral y académico brindado, a su orientación y conocimientos proporcionados ya que fueron muy importantes para el desarrollo y culminación de esta tesis... gracias **D.C. Carlos Cervantes Vega**.

A mis sinodales: el **D.C. Carlos Rubén Sosa Aguirre**, la **D.C. Consuelo de Jesús Cortes Penagos** y el **D.C. Rosalio Mercado Camargo** por su ayuda

La **M.C. Eréndira** y la **D.C. Martha Isela Ramírez Díaz**, por el apoyo brindado dentro de mi estancia en el laboratorio y de sus consejos para el desarrollo de mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio:

Esther y **Amada**, por la orientación y sugerencias para mi trabajo.

Luis gracias porque además de darme muchos consejos también fuiste mi amigo en toda la extensión de la palabra, a pesar que eras bien pelionero conmigo jaja.

Karina te agradezco por haberme brindado tu amistad además de tu compañerismo y ayuda dentro del laboratorio, aunque siempre en tu mundo.

Yhoana muchas gracias por haberme enseñado todo lo que sé y que me sirvió para la realización de mi trabajo, además darme tu amistad, comprensión y sobre todo regaños, créeme q no los olvidare...

A **Maurino, Selene, Gustavo, Mily** y **Lupita**, por todo el apoyo y consejos que siempre me brindo, además de la experiencia compartida.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Azariel y Susana Jerónimo por brindarme la dicha de la vida, además de todo su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos:

Rosina, Indira y Azariel Jerónimo, por escuchar mis locuras de laboratorio aunque se que no entendían de que les hablaba.

A toda mi **familia Jerónimo** que a pesar de que no se encontraban conmigo siempre me demostraron su apoyo y cariño en todo lo que realizaba

**D
E
D
I
C
A
T
O
R
I
A**

A mis Amigos:

Rebe y Alex

Mayra

Paola

Bere

Fernando

Diego

Felipe

Lucero

Rosalinada

Diana

Gris

Christian

Viri

Iris

Briza

Juan Pablo

Gracias a todos ustedes por brindarme a lo largo de mi carrera profesional todo su apoyo y cariño, sin importar las diferencias habidas con cada uno de ustedes. Los quiere mucho.

**D
E
D
I
C
A
T
O
R
I
A**

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.- Generalidades del cromato.....	2
2.- Transporte del cromato.....	3
3.- Mecanismos de toxicidad del cromato.....	3
4.- Mecanismos de resistencia a cromato en bacterias.....	5
5.- Expulsión del cromato.....	7
6.- Superfamilia CHR de transportadores de cromato.....	8
6.1.- Homólogos de ChrA caracterizados.....	11
7.- Género <i>Synechococcus</i>	13
7.1.- <i>Synechococcus elongatus</i>	15
II. ANTECEDENTES.....	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	22
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	22
1.- Objetivo General.....	22
1.1.- Objetivos específicos.....	22
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1.- Reactivos y medios de cultivo.....	24
2.- Cepas.....	24
3.- Vectores.....	25
4.- Métodos.....	25

4.1.- Electroforesis en geles de agarosa.....	25
4.2.- Purificación de plásmidos.....	26
4.3.- Tratamiento enzimático de las moléculas de DNA.....	26
4.3.1.- Restricción con endonucleasas.....	26
4.3.2.- Ligación.....	26
4.4.- Recuperación o purificación de DNA por geles de bajo punto de fusión.....	26
4.5.- Transformación por electroporación.....	27
4.5.1.- Preparación de células competentes.....	27
4.5.2.- Transformación.....	27
4.6.- Pruebas de susceptibilidad a cromato.....	28
4.7.- Extracción de RNA total.....	28
4.8.- Reacción RT-PCR.....	29
4.8.1.- Diseño de oligonucleótidos.....	29
VIII. RESULTADOS.....	30
1.- Región codificante de gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i>	30
2.- Análisis de la secuencia de la proteína de SrpC de <i>S. elongatus</i>	30
3.- Subclonación del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en el vector pUCP20.....	33
4.- Pruebas de susceptibilidad a cromato.....	35
4.1.- Gen <i>srpC</i> expresado en <i>P. aeruginosa</i>	35
4.2.- Gen <i>srpC</i> expresado en <i>E. coli</i>	38
4.2.1.- Plásmido pUCSrpC.....	38
4.2.2.- Cósmido 2F10.....	40
4.2.3.- Plásmido pACYC-SrpC.....	40
5.- Análisis de la expresión del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> mediante RT-PCR.....	41
5.1.- Expresión del gen <i>srpC</i> en la cepa W3110(pACYC-SrpC).....	43
5.2.- Expresión del gen <i>srpC</i> en la cepa W3110(2F10).....	47
5.3.- Expresión del gen <i>srpC</i> en la cepa W3110(pACYC-SrpC) en presencia de cromato.....	48

5.4.- Expresión del gen <i>srpC</i> en la cepa W3110(2F10) en presencia de cromato.....	53
IX. DISCUSIÓN.....	57
X. CONCLUSIONES.....	63
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte del cromato al citoplasma bacteriano.....	4
Figura 2. Mecanismos de toxicidad y resistencia cromato en bacterias.....	6
Figura 3. Árbol filogenético de la superfamilia CHR.....	9
Figura 4. Contexto genómico de los genes que codifican a proteínas de las subfamilias LCHR5, LCHR2 y LCHR3.....	10
Figura 5. Plásmido pANL de <i>S. elongatus</i> PCC 7942.....	17
Figura 6. Efecto del cromato en cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942.....	18
Figura 7. Transporte de sulfato en cepas de <i>Escherichia coli</i>	20
Figura 8. Resistencia y captación de cromato de células de <i>E. coli</i> expresando el gen <i>srpC</i>	21
Figura 9. Estrategia experimental.....	23
Figura 10. Secuencia del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i>	31
Figura 11. Subclonación del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en el vector pUCP20.....	34
Figura 12. Transferencia del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> a <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	36
Figura 13. Susceptibilidad a cromato de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con el plásmido pUCSrpC.....	37
Figura 14. Susceptibilidad a cromato de <i>E. coli</i> con el plásmido pUCSrpC y el cósmido 2F10.....	39
Figura 15. Susceptibilidad a cromato de <i>E. coli</i> con el plásmido pACYC-SrpC y el	42

cósmido 2F10.....	
Figura 16. RNA total de las cepas que contienen al gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en cultivos de <i>E. coli</i>	44
Figura 17. Expresión transcripcional del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> clonado en <i>E. coli</i>	45
Figura 18. Expresión transcripcional del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en la cepa W3110(pACYC-SrpC) y W3110(2F10).....	46
Figura 19. Cinéticas de crecimiento de la cepa W3110(pACYC-SrpC) con cromato...	49
Figura 20. RNA total de las cepas que contienen al gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en cultivos de <i>E. coli</i> con cromato.....	50
Figura 21. Expresión transcripcional del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> clonado en <i>E. coli</i> en presencia de cromato.....	51
Figura 22. Expresión transcripcional del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en la cepa W3110(pACYC-SrpC) con y sin cromato.....	52
Figura 23. Cinéticas de crecimiento de la cepa W3110 (2F10) con cromato.....	55
Figura 24. Expresión transcripcional del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i> en la cepa W3110(2F10) con y sin cromato.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos de la región interna del gen <i>srpC</i> de <i>S. elongatus</i>	29
Tabla 2. Comparación de la identidad y similitud de la proteína LCHR2 SrpC de <i>S. elongatus</i>	32

RESUMEN

Un determinante de la resistencia a cromato muy bien estudiado es la proteína de membrana ChrA presente en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*. La función de ChrA consiste en transportar el cromato hacia el exterior celular en forma dependiente del potencial de membrana. Se han encontrado numerosos homólogos de esta proteína. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 es una cianobacteria unicelular que posee el plásmido pANL (~46 kilobases) en el cual se han identificado genes cuya expresión es regulada por los niveles de sulfato, entre ellos el gen *srpC*. *srpC* codifica la proteína SrpC, un homólogo de las proteínas ChrA de la superfamilia CHR. Una mutación en *srpC* ocasionó mayor resistencia a cromato comparada con la cepa silvestre, sugiriendo que SrpC probablemente participe en la captación de cromato. Posteriormente se demostró que SrpC confiere resistencia a cromato por medio de la expulsión del cromato del citoplasma. El objetivo de este trabajo es determinar la función del gen *srpC* y evaluar su expresión en relación con cromato y sulfato. En la cepa W3110 de *Escherichia coli* con el gen clonado en el vector pACYC184 se vio un fenotipo de resistencia a cromato de la cepa respecto a la cepa W3110 que contiene el cósmido 2F10 (que contiene genes del metabolismo de azufre) y el control sensible en caldo nutritivo, opuesto a lo que se vio en ensayos en medio mínimo M9 con 0.2 mM sulfato, donde se comportó de manera similar que a W3110(2F10) y al control sensible. El gen *srpC* fue clonado en el vector pUCP20 y el plásmido recombinante fue transferido a *E. coli* W3110 y *P. aeruginosa* PAO1. Se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en medios de cultivos con diferente concentración de sulfato, en los cuales las transformantes tuvieron un comportamiento similar respecto al control sensible, indicando que en el vector pUCP20 el gen *srpC* no se expresa. Mediante ensayos de RT-PCR, se observó que *srpC* se expresa de forma constitutiva, aunque la expresión fue variable dependiendo del medio de crecimiento, además de que la expresión del gen se vio ligeramente afectada ante la presencia de cromato. La expresión observada en W3110(pACYC-SrpC) probablemente la suficiente para que presente el fenotipo de resistencia a cromato, observada en las pruebas de susceptibilidad. Sin embargo, aunque en W3110(2F10) se vio expresión, ésta no se reflejó en los ensayos de susceptibilidad a cromato, lo que indica que probablemente alguno de los genes aledaños a *srpC* afecta la expresión de este gen.

I. INTRODUCCIÓN

1.- Generalidades del cromo

El cromo es el séptimo elemento más abundante sobre la corteza terrestre, su nombre proviene del griego *chroma*, que significa color, el cual se le dio por la diversidad de colores de sus compuestos, como son: el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) es rojo, el cromato de potasio (K_2CrO_4) es amarillo y el tricloruro de cromo ($CrCl_3$) es verde (Shupak, 1991). El cromo (Cr) es un metal de transición que se encuentra agrupado dentro de los elementos denominados metales pesados, término que se ha utilizado para referirse al grupo de metales y metaloides asociados con la toxicidad en los seres vivos (Alloway, 1990).

El Cr se encuentra ubicado en el grupo VIB de la tabla periódica, tiene un número atómico de 24 y peso atómico de 51.996 g/mol; siendo el vigésimo primero en orden de abundancia en rocas minerales (McGrath y Smith, 1990). El Cr se encuentra de forma natural en rocas, animales, plantas, suelos y en las cenizas y gases volcánicos. El Cr no se degrada o destruye por combustión, sino que éste recircula entre el suelo, la atmósfera y aguas de la superficie y subsuelo (Ohio EPA, 2002).

Debido a la gran variedad de compuestos que el Cr tiene, se encuentra en estados de oxidación que van desde -2 hasta +6, encontrándose en el ambiente sus especies más estables y abundantes, la +3 y +6 (McGrath y Smith, 1990).

El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante, comúnmente presente en solución como hidrocromato ($HCrO_4^-$), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$). El cromato es la principal forma aniónica a pH neutro, y al bajar el pH a 6 lleva a la forma predominante del $HCrO_4^-$. Puede ser reducido en el suelo y en ambientes acuáticos por la materia orgánica y otros agentes reductores para producir Cr (III) (McGrath y Smith, 1990). Por su parte, el Cr (VI)

es considerado la forma más tóxica del cromo en bacterias.

El Cr tiene una gran variedad de usos en la industria, ya que es un componente importante en la aleación del acero inoxidable pues lo hace más fuerte y resistente a la corrosión. Fuertemente usado en la producción de los pigmentos de pinturas como tratamiento antioxidante, siendo esto lo que constituye más de la tercera parte del uso del Cr cada año. Otros usos son el curtido de pieles, preparación de reactivos químicos textiles, rubies sintéticos para láser, esmeraldas sintéticas, en la preservación de la madera, como catalizador, en cintas magnéticas de dióxido de cromo, en el etiquetado de glóbulos rojos y como fungicida (Shupak, 1991).

2.- Transporte del cromato

Se ha demostrado que una gran variedad de especies bacterianas llevan a cabo el transporte de cromato a través de las membranas por medio de la vía de captación de sulfato (Cervantes *et al.*, 2001). El arreglo tetraédrico de los oxígenos del cromato lo hace estructuralmente similar al sulfato, con radios atómicos y distancia de enlaces semejantes, convirtiendo al cromato en un inhibidor competitivo del transporte de este oxianión; esto permite al cromato entrar fácilmente a las células vía los transportadores activos de sulfato (Ballatori, 2002) (**Fig.1**).

3.- Mecanismos de toxicidad del cromato

Los efectos biológicos del Cr dependen fuertemente del estado de oxidación y su localización celular (Ramírez-Díaz *et al.*, 2007). El Cr(III) se considera un elemento traza esencial para mamíferos pues participa en el metabolismo de glucosa y lípidos (Anderson 1997; Vincent, 2004); en microorganismos no parece ser requerido. A nivel extracelular el

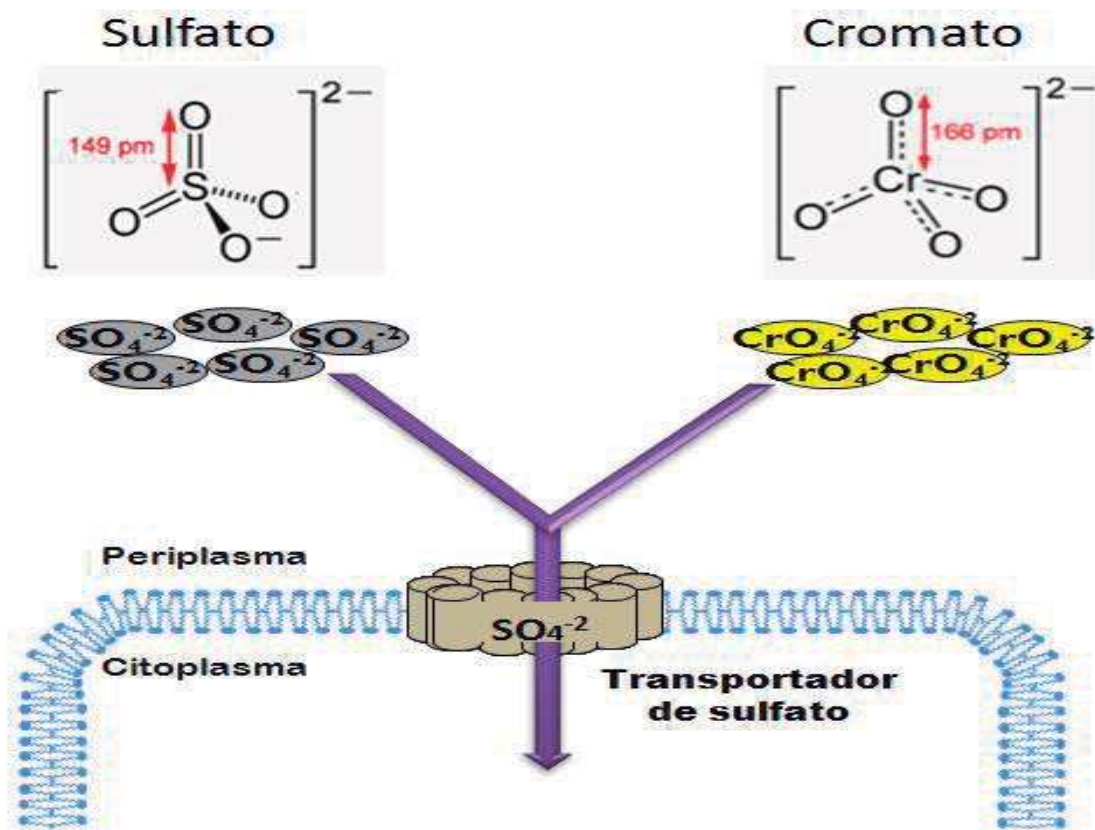


Figura 1. Transporte del cromato al citoplasma bacteriano. La figura muestra las estructuras tetraédricas de cada uno de los oxianiones al igual que los diámetros de enlace de cada uno de ellos (dados en picómetros). Debido a la analogía química del sulfato y cromato, éste se comporta como un inhibidor competitivo del transporte de sulfato, por lo que ingresa fácilmente al citoplasma celular.

Cr(III) es mucho menos tóxico por su incapacidad de atravesar las membranas (Wong and Trevors, 1988), esto por la baja solubilidad de sus compuestos en medio acuoso (Pardee *et al.*, 1966). Por otro lado, el Cr (VI) es considerado como la forma más tóxica de Cr para la mayoría de organismos, siendo mutagénico en bacterias y hongos (Cervantes *et al.*, 2001). El Cr(VI) o cromato ejerce distintos efectos tóxicos entre los cuales están la inhibición competitiva del transporte de sulfato (Ohtake *et al.*, 1987, Nies y Silver, 1989) (**Fig. 2**) figura en la siguiente página. La toxicidad también se relaciona con el proceso de reducción intracelular ya que el Cr(VI) se reduce a Cr(III), la forma final y más estable (Zhitkovich *et al.*, 2002) (**Fig. 2**); durante este proceso se forman radicales libres, siendo el daño oxidativo al DNA el responsable de los efectos genotóxicos causados por el Cr, debido a que el Cr(III) tiene la capacidad de unirse a los grupos fosfatos del DNA, formando aductos Cr-DNA de complejos ternarios principalmente. El Cr(III) también puede unirse a los grupos carboxilos y sulfhidrilos de las proteínas (**Fig. 2**).

4.- Mecanismos de resistencia a cromato en bacterias

Debido a la toxicidad que tiene el Cr sobre las bacterias, algunas de ellas han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de este elemento (Silver y Phung, 2005). Esta resistencia puede estar codificada ya sea en plásmidos o en el cromosoma (Cervantes y Silver, 1996); por lo regular los genes que se encuentran en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales median directamente la expulsión de iones cromato del citoplasma celular. Por otra parte, los sistemas codificados en el cromosoma tienen que ver con la reducción específica e inespecífica del Cr(VI), actividades de destoxificación de radicales libres, reparación del daño del DNA y sistemas asociados con la homeóstasis del azufre y el hierro (Cervantes y Campos-García, 2007)

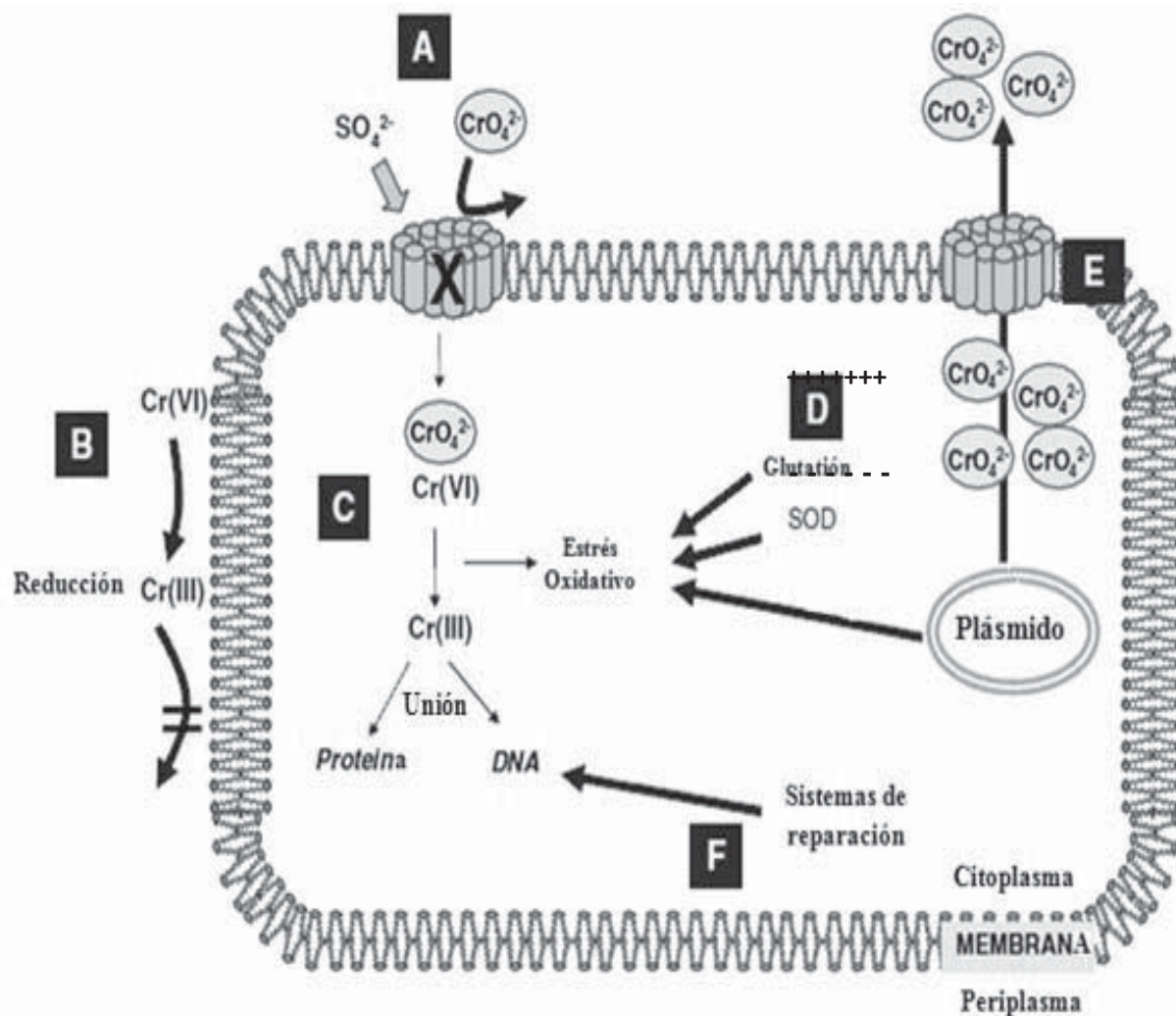


Figura 2. Mecanismos de toxicidad y resistencia cromato en bacterias. Los mecanismos de daño se indican con líneas delgadas y los mecanismos de resistencia se indican con líneas gruesas. (A) Cuando hay mutaciones en el transportador de sulfato (X) la entrada de cromato a la célula se ve disminuida. (B) La reducción extracelular del Cr(VI) a Cr(III), hace que este ión tóxico no ingrese a la membrana. (C) La reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) produce estrés oxidativo, además de daño a proteínas y al DNA. (D, F) Enzimas detoxificadoras involucradas en la protección contra el estrés oxidativo así como también sistemas de reparación al DNA participan en su protección, minimizando los efectos tóxicos generados por los derivados del Cr. (E) Los transportadores codificados en plásmidos expulsan al cromato fuera del citoplasma (Tomada de Ramírez-Díaz *et al.*, 2007).

(Fig. 2). La expulsión del cromato es uno de los mecanismos de resistencia más ampliamente caracterizados.

5.- Expulsión del cromato

La expulsión de cromato por la proteína ChrA es uno de los mecanismos de resistencia mejor caracterizado en bacterias (Cervantes *et al.*, 1990). ChrA es una proteína de membrana de 416 aminoácidos codificada por el gen *chrA*, la cual se identificó en el plásmido pUM505 (120 kb) de la γ -proteobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes *et al.*, 1990) y en el plásmido pMOL28 de la β -proteobacteria *Cupriavidus metallidurans* (Nies *et al.*, 1990).

ChrA de *P. aeruginosa* muestra una topología de 13 segmentos transmembranales (STM), con el extremo amino orientado al citoplasma y el extremo carboxilo hacia el periplasma (Jiménez-Mejía *et al.*, 2006). ChrA funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa cromato del citoplasma de forma dependiente del potencial de membrana como fuente de energía (Álvarez *et al.*, 1999, Pimentel *et al.*, 2002) (Fig. 2E). La expulsión de cromato es inhibida por sulfato en un 80% en vesículas invertidas de membrana (Álvarez *et al.*, 1999) y en células completas (Pimentel *et al.*, 2002), lo que sugiere que este análogo podría unirse y/o ser transportado también por la proteína ChrA (Pimentel *et al.*, 2002). Por ello, se ha propuesto que ChrA podría funcionar como un antiportador cromato/sulfato (Nies *et al.*, 1998), aunque no se ha demostrado el transporte de sulfato por ChrA. Un mecanismo similar de expulsión a cromato se localizó en la bacteria *C. metallidurans*, de 401 aa, que presenta una topología diferente de 10 STM y muestra un porcentaje de identidad de 29% con respecto a la ChrA de *P. aeruginosa*. *C. metallidurans* posee dos genes *chrA* codifican a las proteínas ChrA₁, codificada por el plásmido pMOL28, y ChrA₂, codificada por un

gen cromosómico (Nies *et al.*, 1990, Juhnke *et al.*, 2002).

6.- Superfamilia CHR de transportadores de cromato

La proteína ChrA pertenece a la superfamilia de transportadores CHR (Nies *et al.*, 1998), la cual fue clasificada como TC # 2.A.51 (Saier, 2003). Debido a la gran cantidad de genomas completos secuenciados, se han identificado numerosos homólogos putativos de ChrA. Por medio de un análisis filogenético se identificaron 135 secuencias no redundantes homólogas de ChrA, probablemente involucrados en el transporte de cromato o sulfato, de las cuales 128 fueron bacterianas, seis de hongos y una de arqueas. Estas proteínas fueron agrupadas formando la superfamilia de transportadores CHR (**Fig. 3**).

Las proteínas de la superfamilia CHR fueron clasificadas de acuerdo a su tamaño:

- 1) Proteínas bacterianas pequeñas SCHR (123 – 234 aa) que poseen un solo dominio, y
- 2) Proteínas bacterianas grandes LCHR (345 – 495 aa) con dos dominios homólogos.

Las proteínas LCHR bacterianas fueron agrupadas en seis subfamilias (LCHR1-LCHR6). Cada subfamilia tiene un contexto genómico característico, la identidad y la similitud entre dos miembros de la misma subfamilia son mucho mayores entre ellos que cuando se compara con un homólogo de otra subfamilia. Las proteínas SCHR se agruparon en tres subfamilias (SCHR1–SCHR3) (**Fig. 3**).

La comparación del contexto genómico de las proteínas LCHR de las diferentes subfamilias, usando como referencia la ChrA de pMOL28 de *C. metallidurans*, muestra que las proteínas de la subfamilia LCHR2 generalmente se asocian con genes *chrB* (78%) y con genes *chrF* (67%) (**Fig. 4**). Las proteínas de la subfamilia LCHR5 están asociadas con genes *chrB*, *chrC* y *chrF*, pero esta es menos frecuente en el 19%, 19% y 31%, respectivamente. Las proteínas de las subfamilias LCHR1, LCHR3, LCHR5 y LCHR6 no

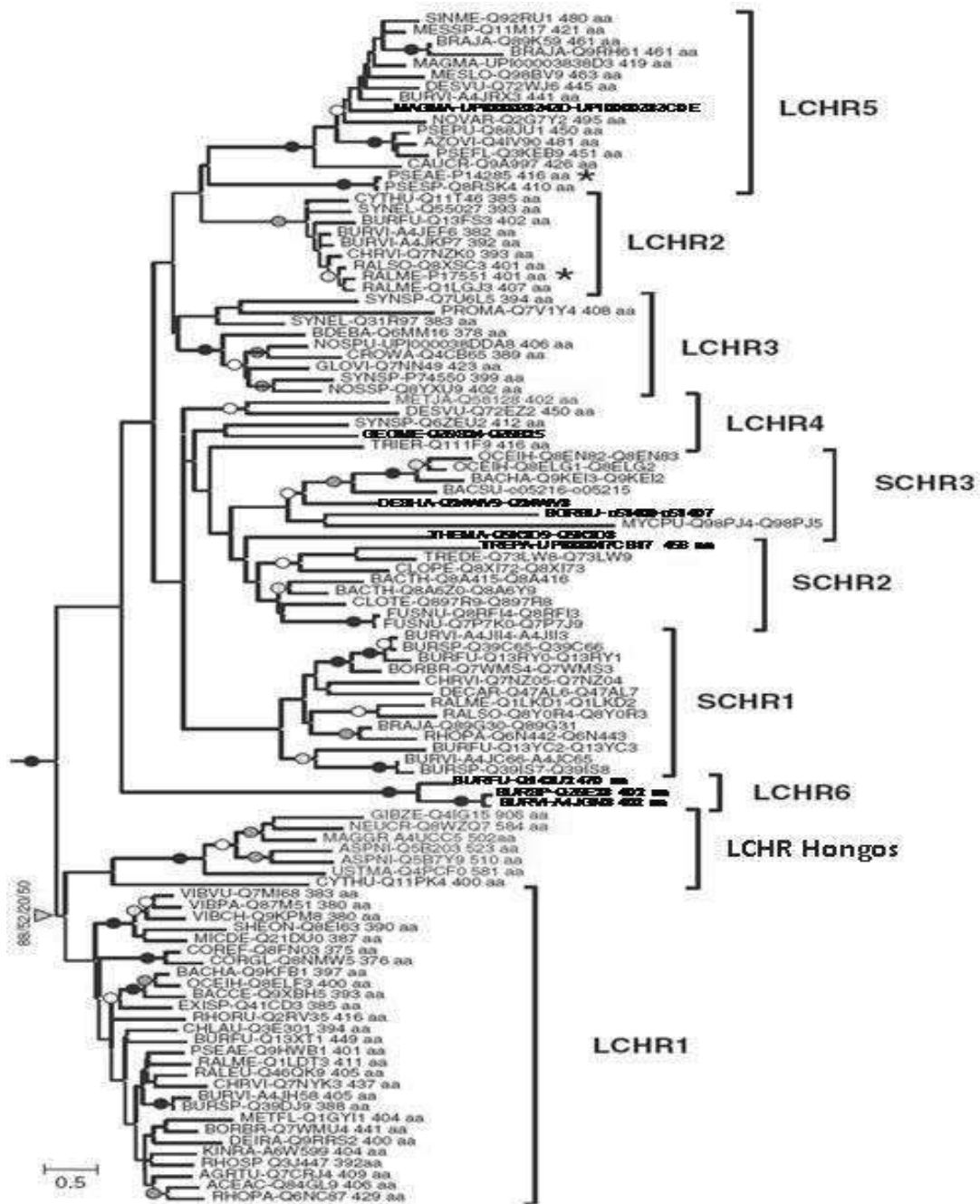


Figura 3. Árbol filogenético de la superfamilia CHR. Se muestra la distribución de las 77 proteínas LCHR y las 58 proteínas SCHR, así como también las subfamilias de cada una, respectivamente. Los nombres de las secuencias se indican por los nombre de la especie, seguido del número de acceso de la base de datos UniProt y posteriormente el tamaño de la secuencia dado en aminoácidos (aa) (Tomada de Díaz-Pérez, *et al.*, 2007).

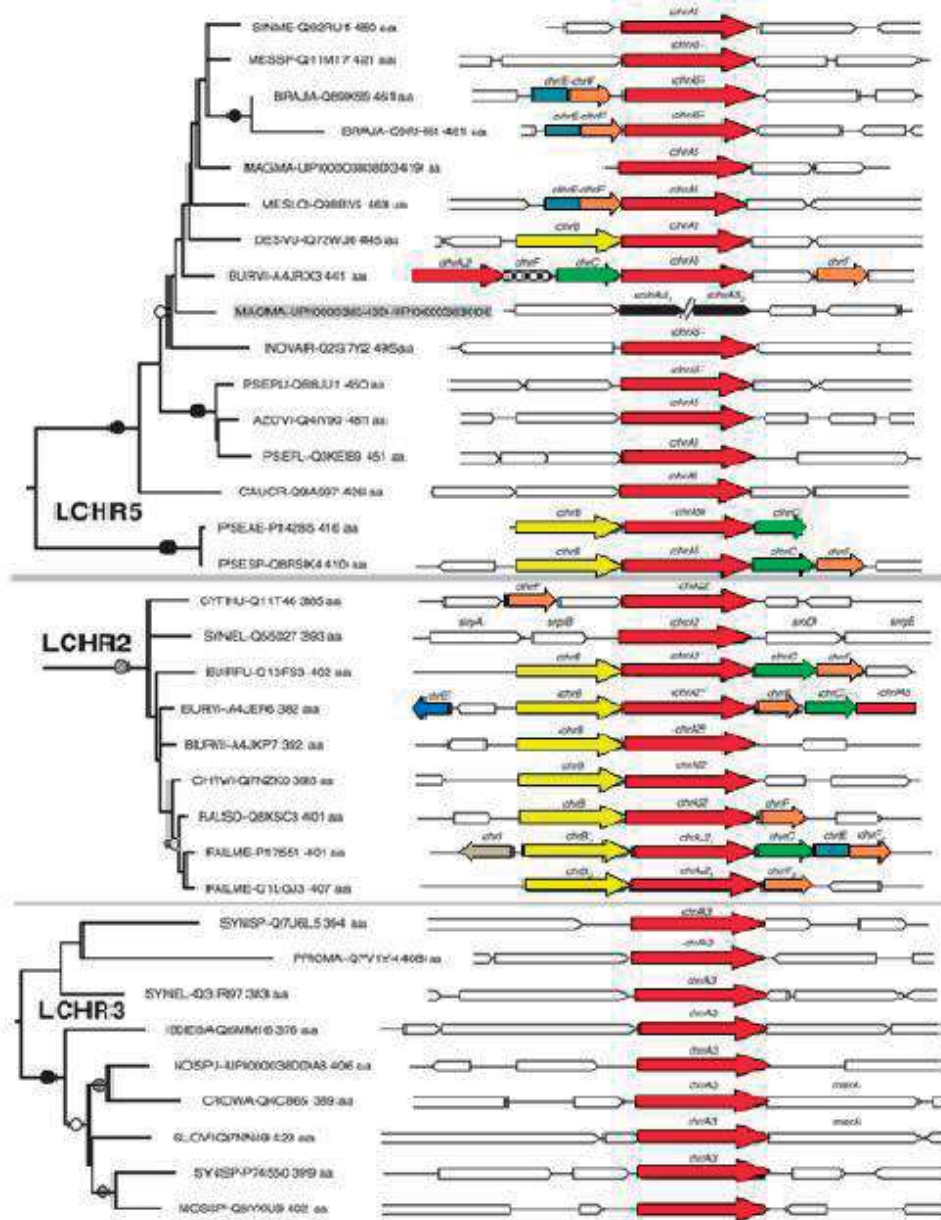


Figura 4. Contexto genómico de los genes que codifican a proteínas de las subfamilias LCHR5, LCHR2 y LCHR3. Las flechas indican dirección de la transcripción de los genes. Las flechas rojas muestran los genes *chrA*, las amarillas *chrB*, las verdes *chrC*, con naranjas *chrF*, las azules, *chrE* y finalmente las grises *chrI* (Modificado de Díaz-Pérez *et al.*, 2007).

se asocian con ningún gen que tenga relación con la resistencia a cromato (**Fig. 4**).

6.1.- Homólogos de ChrA caracterizados

La función de resistencia a cromato sólo había sido determinada en las proteínas ChrA de *P. aeruginosa* (Cervantes *et al.*, 1990) y *C. metallidurans* (Nies *et al.*, 1990); éstas sólo presentaron función cuando fueron expresados en sus propios huéspedes y no cuando fueron transferidas a *E. coli*. Sin embargo, se han reportado sistemas similares de resistencia a cromato, como es el caso del plásmido 1 de la γ -proteobacteria *Shewanella sp.* ANA-3 donde se encontraron también genes *chrBAC*, los cuales se transfirieron a *E. coli* (Aguilar-Barajas *et al.*, 2008). La expresión del gen *chrA* solo dió un aumento de resistencia a cromato en *E. coli* con un vector de alto o bajo número de copias, mientras que la expresión del operón *chrBAC* completo no dió un aumento significativo de la resistencia, aunque la expresión en un vector de bajo número de copias aumentó la resistencia a cromato 10 veces más (Aguilar-Barajas *et al.*, 2008). El gen *chrA* de *Shewanella* también confirió resistencia cuando fue expresado en *P. aeruginosa*. Al realizar ensayos de transporte de cromato en la cepa *E. coli* W3110 con los genes *chr* de *Shewanella* se vio una disminución de la entrada de este ión a la célula, lo que sugiere que igual que para las ChrAs de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans*, la resistencia a cromato dada por la ChrA de *Shewanella sp.* es debida a la expulsión del ión (Aguilar-Barajas *et al.*, 2008). Otro microorganismo que posee también el mecanismo de resistencia a cromato, es la α -proteobacteria *Ochrobactrum tritici* 5bv11 que fue aislada de un lugar contaminado y es capaz de sobrevivir a concentraciones mayores a 50 mM de cromato (Branco *et al.*, 2008). En *O. tritici* se identificó el transposón TnOtChr (7,189 pb) que agrupa a genes de resistencia a cromato *chrBACF*, localizados entre genes de una transposasa y una resolvasa.

Los genes *chrB* y *chrA* resultaron ser esenciales para la resistencia a cromato, no tanto así *chrF* y *chrC*.

Por otra parte, se encuentra también la bacteria Gram (+) *Arthrobacter sp.* FB24 reportada con la misma función de resistencia dada por genes *chr* homólogos. Se encontró en *Arthrobacter sp.* FB24 un determinante de resistencia a cromato (CRD), que consiste en un conjunto de ocho genes localizados en un plásmido de 96 kb. Dentro de este determinante se encontró a *chrA*, además de tres genes con similitud de secuencia de aminoácidos con los extremos amino y carboxilo de ChrB, posible regulador transcripcional. Mediante RT-PCR en tiempo real se observó que la expresión de los genes de CRD fue inducida en respuesta a cromato, pero no por otros elementos probados. Los niveles más altos de expresión se vieron cuando se encontraron presentes *chrA* y *chrB*, lo que sugiere un posible papel regulador. Los hallazgos indicaron que la resistencia a cromato en *Arthrobacter* se debe la expulsión de cromato a través de la proteína ChrA (Henne *et al.*, 2009).

Recientemente se ha reportado en nuestro laboratorio la función de resistencia a cromato de las proteínas pequeñas SCHR de *Bacillus subtilis* y *Bulkholderia xenovorans*, codificadas por genes adyacentes en pareja *chr3N/chr3C*, y *chr1N/chr1C*, respectivamente. Estas proteínas confirieron resistencia a cromato tanto en el vector de alto número de copias pUCP20 como en el vector de bajo número de copias pACYC184, cuando se expresaron en la cepa de *E. coli* W3110. Se ha determinado que los genes *chr3N* y *chr3C* de *B. subtilis* forman parte de un operón ya que se observó que ocurre la transcripción de gen *chr3N* clonado de manera individual mientras que el gen *chr3C* no se transcribe, por lo que la transcripción de los genes se lleva a cabo bajo el posible promotor localizado río arriba del gen *chr3N*. Además se encontró que los genes se transcriben a través de un RNA mensajero bicistrónico y que cuando se expresan en *E. coli* son necesarios ambos genes para conferir

resistencia a cromato; esto se debe probablemente a que forman un heterodímero en la membrana que expulsa al cromato del interior de la célula (Díaz-Magaña *et al.*, 2009).

Existen bacterias que poseen varios homólogos CHR en su genoma. Un caso muy particular es el de *B. vietnamiensis* G4 que posee cinco homólogos LCHR y dos SCHR, y *B. xenovorans* LB400 que posee cuatro homólogos LCHR y dos homólogos SCHR (León-Márquez, 2009). Se demostró que los genes *lchr1*, *lchr2*, *lchr5* y *lchr6* de las cepas de *Bulkholderia* confieren resistencia cromato, mediante pruebas de susceptibilidad a cromato, aunque sólo en condiciones de cepa, vector y medio de cultivo específicas (León-Márquez, 2009; Luna-Luna, 2010), con estos homólogos LCHR suman ya cuatro las subfamilias de esta familia en las que se han identificado miembros funcionales, distribuidas a lo largo del árbol filogenético de la superfamilia CHR.

7.- Género *Synechococcus*

El género *Synechococcus* (del griego *synechos*: sucesivamente, y *kokkos*: baya) fue descrito por primera vez en 1979 (Johnson y Sieburth, 1979; Waterbury *et al.*, 1979), donde se incluían cianobacterias unicelulares ovoides, cilíndricas que se reproducen por fisión binaria transversal en un solo plano (Rippka *et al.*, 1979). En este género figuran organismos de considerable diversidad genética, aunque posteriormente se subdividió basado en la presencia del pigmento accesorio ficoeritrina. El principal pigmento fotosintético de *Synechococcus* es la clorofila, mientras que sus pigmentos accesorios importantes son ficobiliproteínas o ficobilinas que dan la coloración verde-azul que distingue a *S. elongatus* así como también a otras cianobacterias (Waterbury, *et al.*, 1979). Las cuatro ficobilinas comúnmente reconocidas son ficocianina, aloficocianina, ficobilinas B y aloficocianina.

A este género pertenece el grupo de cianobacterias unicelulares marinas o de agua dulce, cuyo tamaño varía de 0.8 a 1.5 μm . Son bacterias Gram negativas con paredes celulares altamente estructuradas que pueden contener proyecciones en su superficie (Perkins *et al.*, 1981). La microscopía electrónica reveló la presencia de inclusiones de fosfato, gránulos de glucógeno y más importante aún, que está muy estructurado de carboxisomas, que son corpúsculos que contienen la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco), que realiza la fijación el CO_2 en el citoplasma (Perkins *et al.*, 1981).

Synechococcus ocupa una posición importante en la cadena alimentaria marina, ya que sus especies son abundantes en océanos del mundo y principales productores primarios, siendo uno de los genomas más numerosos en la tierra. Los miembros de este género se han adaptado a la vida del océano, las células cocoides fotosintéticas son preferentemente las más abundantes en las aguas superficiales y bien iluminadas (entre 1,000 y 200,000 células por mililitro), son obligatoriamente marinas, con requerimientos elevados para su crecimiento, de Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} y Ca^{2+} . Los *Synechococcus* tienen la capacidad de adquirir nutrientes mayores y trazas de metales de las concentraciones submicromolares que se encuentran en el mar abierto oligotrófico, y su aparato de captación de luz es el único adaptado a la calidad espectral de la luz en el océano. Mientras que algunas bacterias son capaces de ser fotoheterótroficas, o incluso su crecimiento puede ser quimioheterótrofico, todas las cepas de *Synechococcus* marinas parecen ser fotosintetizadores obligados (Waterbury *et al.*, 1986), capaces de cubrir sus necesidades de nitrógeno utilizando nitrato de amonio o en algunos casos urea como única fuente de nitrógeno; aun no se sabe si *Synechococcus* es capaz de fijar el nitrógeno.

Las cepas de *Synechococcus* aisladas de los mares del mundo poseen un tipo único de motilidad de natación hasta ahora no visto en ningún otro tipo de microorganismo, por ser

móviles mediante un método de tipo deslizante (Castenholz, 1982). El método es la natación no fototáctica, donde se impulsan a través del agua de mar en ausencia de un orgánulo demostrable (flagelo) (Waterbury *et al.*, 1985).

7.1.- *Synechococcus elongatus*

Synechococcus elongatus PCC 7942 es una cianobacteria unicelular de agua dulce, a veces denominada verde-azul debido al color que presenta; está caracterizada por llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica para la obtención de energía y por su diversidad morfológica (Chen *et al.*, 2008). *S. elongatus* tiene una apariencia en forma de vara y es oligotrófico, esto es con la capacidad de sobrevivir en ambientes de agua dulce con bajos nutrientes. Sus hábitats de vida incluyen aguas termales y otros hábitats de agua dulce preferentemente con un rango de temperatura de mesófilas o moderada (20 a 45 °C) (Waterbury *et al.*, 1986).

Geitler identificó por primera vez a *S. elongatus* en 1925 en Alemania; posteriormente Frenkel y su equipo descubrieron a *S. elongatus* en charcos de agua de lluvia en Massachusetts, EEUU (Frenkel, *et al.*, 1950).

S. elongatus PCC 7942 (anteriormente conocida como *Anacystis nidulans* R2), posee un cromosoma de ~2,7 Mb, con un contenido de G+C del 55.5%, además de contener ~2600 genes para proteínas y 53 RNAs. También posee dos plásmidos endógenos, pANS (~8 kb) y pANL (~46 kb); en este último plásmido se han identificado varios genes cuya función es regulada por los niveles de azufre (Nicholson y Laudenbach, 1995; Chen *et al.*, 2008) (**Fig. 5**).

II. ANTECEDENTES

Dentro del plásmido pANL de *S. elongatus* se encuentra el homólogo SrpC (Nicholson y Laudenbach, 1995), localizado en la subfamilia LCHR2 de la superfamilia CHR (**Fig. 5**). SrpC es una proteína de 393 aa que muestra una identidad del 61% de los aminoácidos con la proteína de *C. metallidurans* y 23% de los aminoácidos con la ChrA de *P. aeruginosa* (Nicholson y Laudenbach, 1995).

Nicholson y Laudenbach (1995) realizaron un experimento en el cual crecieron tanto la cepa silvestre como una mutante del gen *srpC* de *S. elongatus* PCC 7942 en medio de cultivo hasta un tiempo de duplicación constante de 32 h. Posteriormente se le agregó el cromato de forma gradual y de inmediato la cepa silvestre mostró un incremento del tiempo de duplicación (esto es, una disminución en la velocidad de crecimiento) y no así en la mutante por lo que ésta mostró una mayor resistencia a cromato. Esto indica que posiblemente SrpC participe en la captación de cromato al interior celular (**Fig. 6**). El gen *srpC* se localiza en una región del plásmido pANL en el que se encuentran genes relacionados con el metabolismo o transporte de azufre (**Fig. 5**), en comparación con los genes *chr* homólogos (**Fig. 4**) los cuales se encuentran solos o tienen aledaños genes relacionados con la resistencia a cromato (Juhnke *et al.*, 2002; Díaz-Pérez *et al.*, 2007; Aguilar-Barajas *et al.*, 2008; Branco *et al.*, 2008).

Hasta la fecha no ha sido analizada con detalle la función de SrpC; sin embargo; Aguilar-Barajas (2010) determinó que SrpC confiere resistencia a cromato, probablemente funcionando como un transportador de cromato. Debido a que el gen *srpC* está en una región con genes involucrados en el metabolismo de azufre (Chen *et al.*, 2008), y aparentemente participa en la captación de cromato (Nicholson y Laudenbach, 1995), se

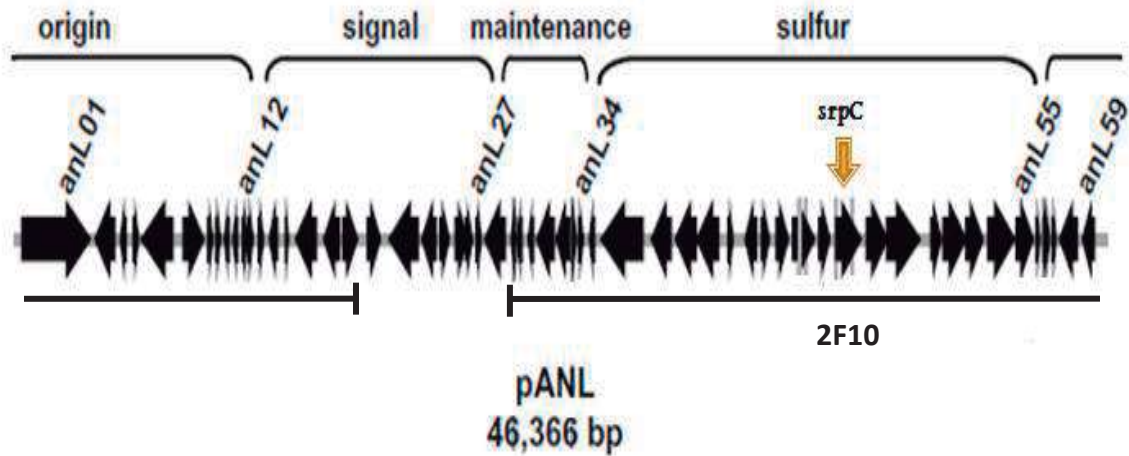


Figura 5. Plásmido pANL de *S. elongatus* PCC 7942. El plásmido de forma lineal muestra las cuatro regiones funcionales: origen de replicación, transducción de señales, región de mantenimiento y región relacionada con el metabolismo de azufre. Las flechas negras muestran los posibles ORF's, indicando con letras arriba de ellas el primer y último ORF's de cada región. Con una flecha amarilla se indica la localización del gen *srpC* el cual codifica la proteína SrpC homólogo de ChrA. En la parte inferior, indicada con una línea negra, se muestra la región contenida en el cósmido 2F10 (Tomada de Chen *et al.*, 2008).

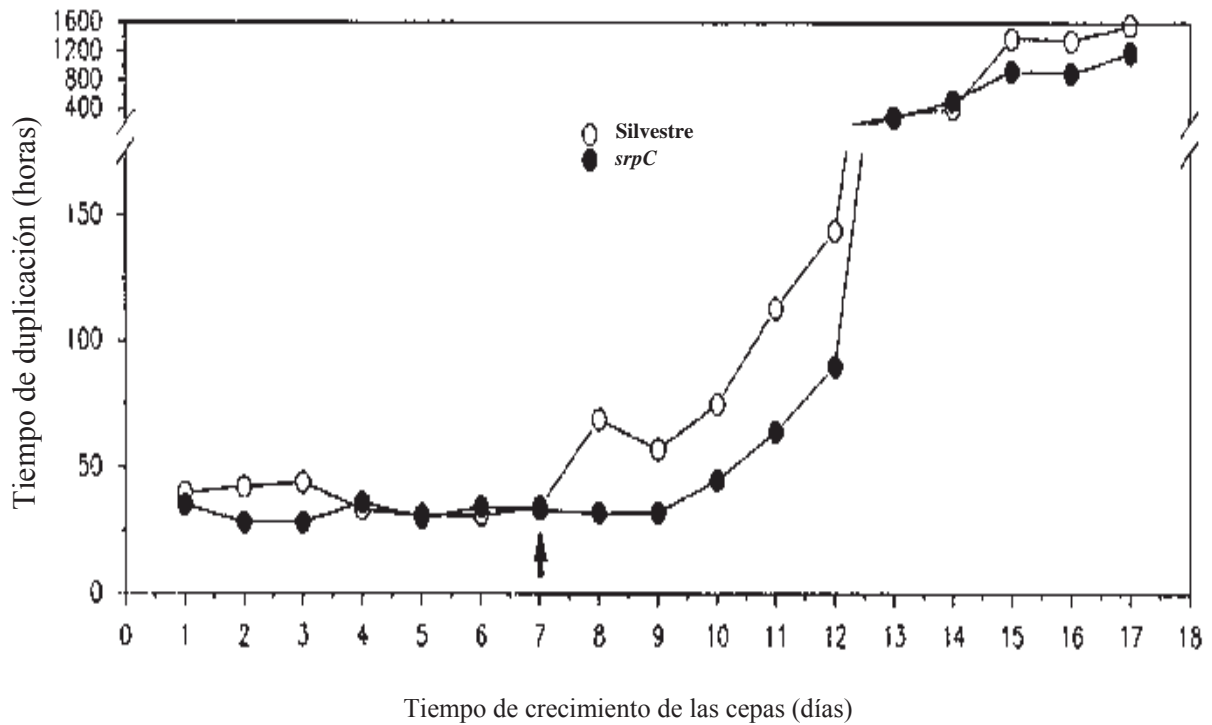


Figura 6. Efecto del cromato en cepas de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Se crecieron en medio BG-11 la cepa silvestre (puntos blancos) y la cepa mutante afectada en el gen *srpC* (puntos negros). Se midió tiempo de duplicación (horas) contra tiempo de crecimiento de la cepas (días). Se crecieron por 7 días hasta alcanzar un tiempo de duplicación constante de 32 h. La flecha (negra) indica la adición del cromato hasta una concentración final de 100 μM (Nicholson y Laudenbach, 1995).

evaluó la posibilidad de que la proteína SrpC participe en el transporte de sulfato al interior de la célula. A partir del cósmido 2F10, que forma parte de una biblioteca genómica del plásmido pANL de *S. elongatus* (Chen *et al.*, 2008), se amplificó el gen *srpC*, posteriormente se clonó en el vector pGEM-T Easy dando lugar al plásmido recombinante pGEMT-SrpC y finalmente se subclonó al vector de expresión pACYC184, resultando el plásmido recombinante pACYC-SrpC.

El plásmido pGEMT-SrpC se transfirió a la cepa *E. coli* auxótrofa a cisteína JW2415-1, la cual es incapaz de emplear sulfato como fuente de azufre. El gen *srpC* en la mutante JW2415-1 fue incapaz de complementar su crecimiento en medio mínimo con sulfato como única fuente de azufre. Estos resultados indican que SrpC no transporta al sulfato al interior de la célula, contrario a lo que se sugirió anteriormente (**Fig. 7**).

Cuando el plásmido pACYC-SrpC se transfirió a la cepa de *E. coli* W3110, confirió un nivel de resistencia moderadamente mayor a cromato comparado con la cepa transformada únicamente con el vector (**Fig. 8A**). La cepa W3110(pACYC-SrpC) presentó una captación de cromato menor en comparación con la cepa control transformada únicamente con el vector (**Fig. 8B**), lo que sugiere que la proteína SrpC expulsa al ion cromato del citoplasma. Esto posiblemente se debe a que el gen *srpC* se encuentra en una región con genes relacionados con el metabolismo de azufre, lo que sugiere que la expresión de SrpC puede estar regulada por los niveles de sulfato.

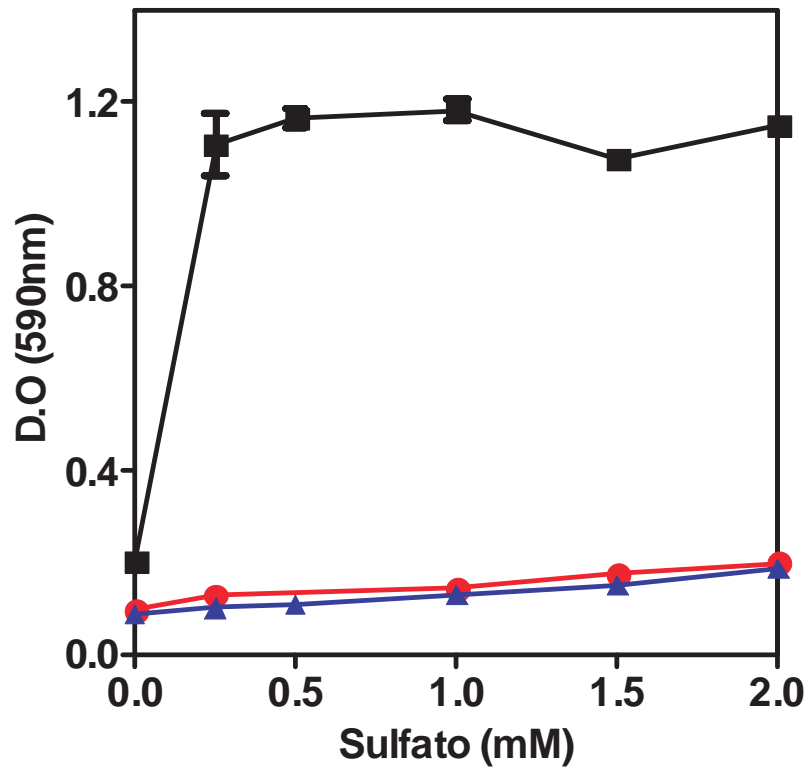


Figura 7. Transporte de sulfato en cepas de *Escherichia coli*. Los cultivos se crecieron en medio LB, se diluyeron 1:100 en medio mínimo M9 con las concentraciones indicadas de sulfato y se incubaron por 18-20 h a 37°C con agitación constante. El crecimiento se midió a una absorbencia de 590 nm. Se emplearon las cepas *E. coli* BW25113 (■), *E. coli* JW2415-1 (pGEMT) (●) y JW2415-1 (pGEMT-SrpC) (▲) (Aguilar-Barajas, 2010).

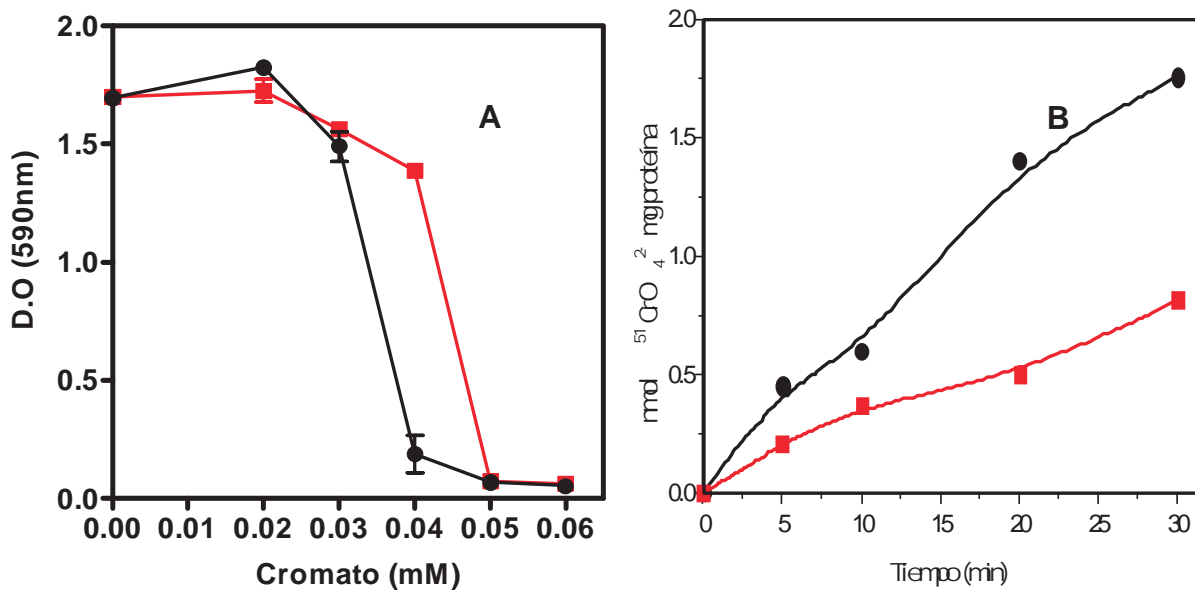


Figura 8. Resistencia y captación de cromato de células de *E. coli* expresando el gen *srpC*. (A) Los cultivos se crecieron en medio mínimo y se incubaron a 18-20 h/37°C con agitación. Cepas W3110(pACYC184) (●) y W3110(pACYC-SrpC) (■). (B) Los cultivos se crecieron toda la noche se diluyeron 1:25 en medio fresco y se incubaron hasta fase logarítmica. Se adicionó $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$, posteriormente se midió el transporte de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$. (Aguilar-Barajas, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

La cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC7942 posee un homólogo de ChrA (SrpC) de la subfamilia LCHR2 de la superfamilia de transportadores de cromato CHR, que confiere resistencia a cromato en *E. coli*. Debido a que el gen *srpC* se encuentra en una isla de genes relacionados con el metabolismo de azufre, no se conoce si la expresión de *srpC* es regulada por sulfato, por lo cual planteamos la siguiente:

IV. HIPÓTESIS

La expresión del gen *srpC* de *Synechococcus elongatus* es regulada por sulfato.

V. OBJETIVOS

1.- Objetivo General:

Determinar el papel de sulfato en la expresión del gen *srpC* de *S. elongatus*.

1.1.- Objetivos específicos:

1.1.1.- Expresar el gen *srpC* de *S. elongatus* en cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

1.1.2.- Determinar la susceptibilidad a cromato de las transformantes.

1.1.3.- Medir la expresión del gen *srpC* bajo diferentes concentraciones de sulfato.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La siguiente estrategia se diseñó con el fin de cumplir los objetivos propuestos anteriormente y se muestra en la **figura 9**.

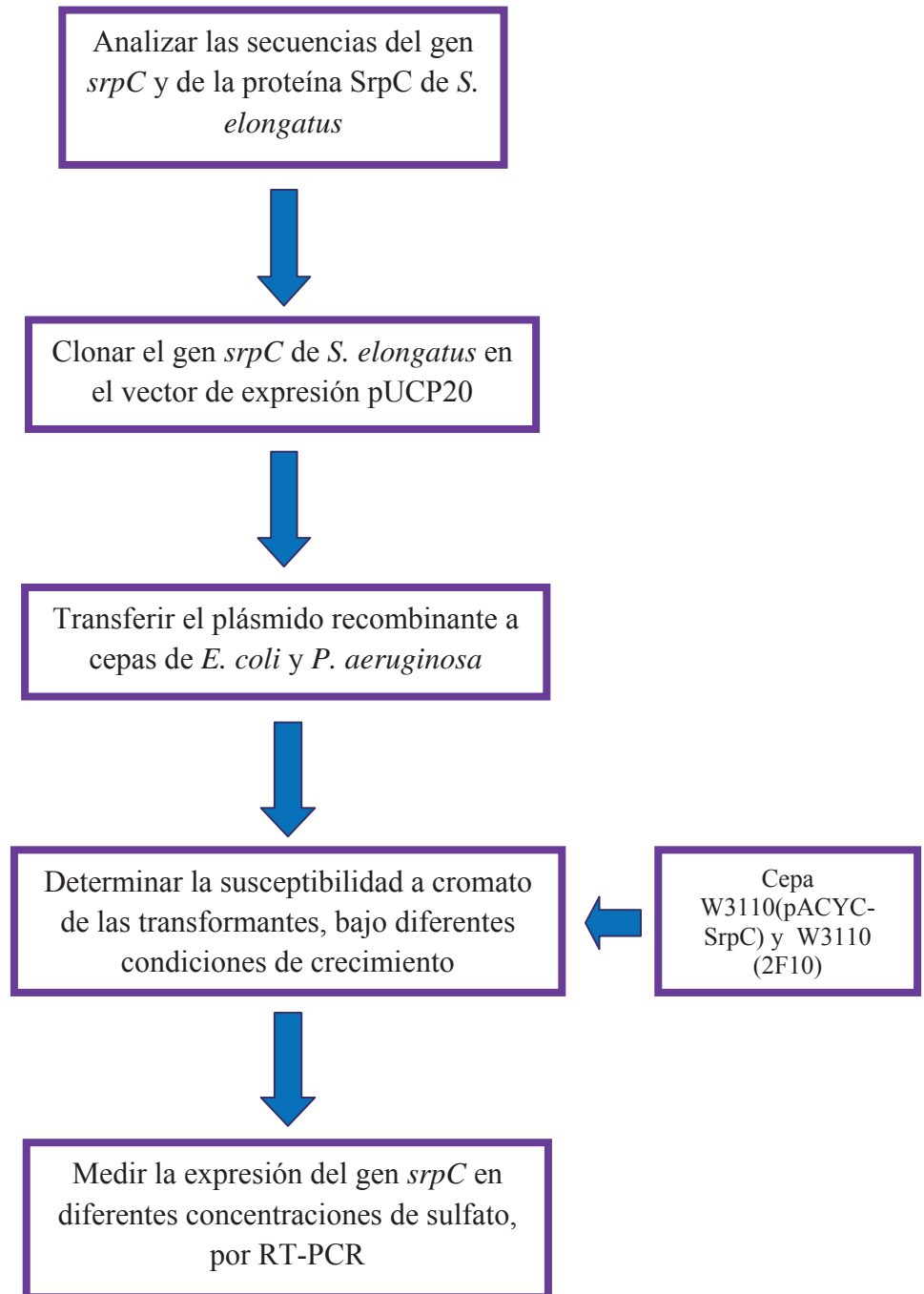


Figura 9. Estrategia experimental.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Reactivos y medios de cultivo

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

- K₂CrO₄ de los laboratorios Merck.
- Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%. Se empleó para crecimiento de bacterias, para preinóculos en las pruebas de susceptibilidad al cromo y para aislamiento de DNA.
- Agar Luria Bertani (AL): Al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico. Se utilizó para crecer las bacterias luego de la transformación y para sembrarlas.
- Caldo nutritivo (CN): Extracto de carne 3.0 g, peptona de carne 5.0 g y agua destilada cbp 1 litro. Se utilizó para crecimiento de bacterias y para realizar pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido
- Medio mínimo M9: Sales M9 (Sigma), sulfato de magnesio 2 mM, glucosa 20 mM, cloruro de calcio 0.1 mM. Se utilizó para realizar pruebas de susceptibilidad a cromato.

2.- Cepas

- *E. coli* XL1 - Blue. recA1, endA1, gyrA 96, thi-1, hsdR 17(r_K⁻, m_K⁺), supE 44, relA 1, lac, [F', proAB, lacI^qZΔM15::Tn10(tet^r)]. Cepa receptora de plásmidos recombinantes, utilizada para la selección de colonias blancas/azules.
- *E. coli* W3110. F- λ- rph-1 INV (rrnD, rrnE) (Bachman *et al.*, 1976). Esta cepa fue

receptora de los plásmidos recombinantes y se utilizó para realizar las pruebas de susceptibilidad a cromato.

- *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1969). Esta cepa fue receptora de los plásmidos recombinantes derivados de pUCP20.

3.- Vectores

Los vectores que se utilizaron son los siguientes:

- pACYC 184. Es un vector de clonación de *E. coli*, con alrededor de 15 copias por célula y genes de resistencia a cloramfenicol (Cm) y tetraciclina (Tc) (Sambrook *et al.*, 1989).
- pUCP20. Este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina (Ap) y orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas* (West *et al.*, 1994). En *E. coli* presenta un número de copias de alrededor de 500 y en *P. aeruginosa*, 20 copias.

4.- Métodos

4.1.- Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa (Sigma) 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M). Los geles se depositaron en una cámara de electroforesis horizontal, las cuales contienen el mismo amortiguador. Las muestras de DNA se mezclaron con 2 μ l de la solución colorante (azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 5%, sacarosa 40%), se descargaron en los pozos del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder y se sometió a un voltaje constante por un periodo adecuado de tiempo (~125 volts/~35 min). Posteriormente al corrimiento los geles se tiñeron con solución de bromuro

de etidio (0.01% / ~5 min). Las bandas teñidas se vieron en un transiluminador de luz UV y luego se fotografiaron.

4.2.- Purificación de plásmidos

Mediante lisis alcalina, por el método adaptado y descrito en (Birnboim y Doly, 1979; Ish-Horowics y Burke, 1982). Para hacer la extracción de megaplásmidos se utilizó el método de Kieser, 1984.

4.3.- Tratamiento enzimático de las moléculas de DNA

4.3.1.- Restricción con endonucleasas. Los DNAs purificados se digirieron utilizando 1 unidad de la enzima de restricción (promega) correspondiente por cada μg de DNA y se incubaron por 12-18 h/37°C. Posteriormente se hizo un corrimiento electroforético de la mezcla de restricción en geles de agarosa al 1% para verificar el producto de restricción por el tamaño de los fragmentos obtenidos.

4.3.2.- Ligación. Los fragmentos de DNA purificados a partir del gel de agarosa, se ligaron manteniendo una proporción 1:3 (inserto: vector). Se usaron aproximadamente 40 ng del DNA de vector y 80 ng de inserto empleando la ligasa del fago T4, incubando a 4°C/18 h.

4.4.- Recuperación o purificación de DNA por geles de bajo punto de fusión

Se preparó el gel con agarosa de bajo punto de fusión al 1% con buffer TBS, se preparó la cámara de electroforesis con el mismo buffer previamente en refrigeración. Se corrió el gel con el producto de restricción, se tiñó en bromuro de etidio (0.01%/~5 min), se cortó la banda de interés en el transiluminador y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Al tubo se le adicionó solución de TE pH 8 (Tris-HCl 25 mM, pH 8 y EDTA 10 mM) hasta 0.75 ml

del tubo y se colocó a 65°C hasta que se disolvió la banda del gen en la solución. Se homogenizó y dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se agregó 700 µl de fenol, se vortexeó 20 seg y se centrifugó 10 min. Se pasó la fase superior a otro tubo, se agregó 350 µl fenol y 350 µl de cloroformo, se mezcló y luego se centrifugó 10 min. Se pasó nuevamente la fase superior a otro tubo, se agregó 70 µl de acetato de sodio 5 M (acetato de potasio 5M y ácido acético glacial pH 4.8) y 1 ml de alcohol absoluto. Se llevó el tubo a incubar 1 h/-20°C o 20 min/-80°C. Posteriormente se centrifugó por 15 min/13000 rpm y se desechó el sobrenadante etanólico (dejando solo la pastilla). Se lavó dos veces la pastilla con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó 3 min entre cada lavado. Finalmente se secó la pastilla 10 min/65°C y se agregó 10 µl de agua HPLC.

4.5.- Transformación por electroporación

4.5.1.- Preparación de células competentes. Se creció la cepa receptora de los plásmidos en 4 ml de CL a 18 h/37°C con agitación constante. Luego se transfirió el cultivo a 250 ml de CL precalentado a 37°C, se incubó a la misma temperatura con agitación constante hasta que alcanzó una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Una vez de esto, se colocó el matraz en hielo 20 min y se centrifugó el cultivo en tubos falcon 10 min/6000 rpm. Luego, se lavaron dos veces las células en agua desionizada (~20 ml) estéril y fría, se centrifugaron 10 min/8000 rpm en cada ocasión. Por último, se resuspendieron las células en 600 ml de agua estéril desionizada con glicerol al 10%, se distribuyéndolas en alícuotas de ~100µl y se almacenaron a -80°C.

4.5.2.- Transformación. A 100 µl de células competentes se les adicionó ~5 µl de DNA y la muestra se colocó entre los electrodos de una celda en la cámara de electroporación del Electroporador 215 (Eppendorf) y se sometió a un pulso eléctrico. Inmediatamente después

se pasó la suspensión a un tubo con 2 ml de CL y se incubó por 1 h/ 37°C con agitación constante. Luego, se distribuyeron 100 µl del cultivo en placas de agar con medio selectivo para la obtención de transformantes y se incubaron de 24–48 h/37°C. Las colonias obtenidas se inocularon en 4 ml de CL con el antibiótico específico y posteriormente se les realizó aislamiento de DNA.

4.6.- Pruebas de susceptibilidad a cromato

Se crecieron los inóculos en 4 ml de CN o medio mínimo M9 toda la noche 18-20 h/37°C con agitación constante. Se prepararon tubos con 4 ml de CN o medio mínimo M9, con diferentes concentraciones de cromato. A cada tubo se le agregaron 40 µl de cultivo crecido. Para el control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo sin cromato. Los tubos inoculados se incubaron por 18–20 h/37°C con agitación constante. El crecimiento se midió en función de la absorbencia de los cultivos a 590 nm en un espectrofotómetro.

4.7.- Extracción de RNA total

El RNA total se obtuvo utilizando el reactivo TRI Reagent Solution (Applied Biosystems), de acuerdo al siguiente protocolo: Se creció el inóculo de la cepa toda la noche a 37°C con agitación constante. Se realizó una dilución 1:25 en matraz (125 ml) con medio de cultivo, posteriormente se creció a fase exponencial (absorbencia ~0.6 a ~1) a 590 nm. Se transfirió 1 ml de cultivo (aprox. 1×10^{10} células) y se centrifugó 2 min/12000 rpm/4°C. Se removió el sobrenadante y se dejó la pastilla lo más seco posible, luego se resuspendió la pastilla con 100 µl de lisozima en TE (4 mg/ml) y se incubó 5 min/37°C. Se adicionó 1 ml de TRI y se resuspendió suavemente, se centrifugó 10 min/12000 rpm/4°C y se pasó el sobrenadante a otro tubo, éste previamente colocado en hielo. Luego se adicionó 200 µl de cloroformo y

se mezcló vigorosamente 15 seg, se centrifugó 15 min/12000 rpm/4°C. Se transfirió la fase acuosa (fase superior “sin color”, ~500 µl) a un tubo, previamente colocado en hielo. Luego se adicionó 500 µl de isopropanol (frío) se mezcló suavemente y se centrifugó 10 min/12000 rpm/4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol al 75% (frío), se mezcló y se centrifugó 5 min/7500 rpm/4°C. Por último se decantó el etanol y se secó la pastilla 3 min, se resuspendió la pastilla en agua libre de nucleasas.

Tratamiento con DNasa. El RNA total fue tratado con RQ1 RNase-Free DNasa (Promega). La reacción se realizó por 10 min/37 °C. Las muestras se almacenaron a -70 °C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa por 45 min/75 volts.

4.8. Reacción RT-PCR

El protocolo que se siguió para el RT-PCR fue realizado con el RNA total y siguiendo las instrucciones del proveedor (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas).

4.8.1. Diseño de oligonucleótidos. Se diseñaron oligonucleótidos específicos de la región interna del gen *srpC* empleados para la amplificación de un fragmento de 582 pb por RT-PCR y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos de la región interna del gen *srpC* de *S. elongatus*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Orientación
SrpCfow	GATCTCGTGGGAAGAACGCCAA	Directo
SrpCRev	GCCAAAGACAAATGCACCTGC	Reverso

VIII. RESULTADOS

1.- Región codificante de gen *srpC* de *S. elongatus*

Se realizó el análisis de la secuencia del gen *srpC* para verificar que consta de todos los elementos necesarios para que éste pueda llevar a cabo su expresión y así la función específica de transportador de cromato. Debido a que en este trabajo la expresión del gen *srpC* estará bajo el control de su propio promotor, se localizaron posibles regiones consenso de promotores. Las regiones -35 y -10 se indican así como también la región espaciadora, siendo ésta de 18 nucleótidos (nt) (**Fig. 10**). Enseguida se muestra el sitio de unión al ribosoma (RBS). Posteriormente se muestra el codón de inicio ATG (codifica metionina). Se muestra también la región codificante de *srpC*, que es de 1182 nt, que incluye el codón de terminación (TAG). Por último, se muestra la región donde se encuentra el posible terminador transcripcional. Con esto se concluye que *srpC* es un gen con los elementos suficientes para llevar a cabo su expresión.

2.- Análisis de la secuencia de la proteína de *SrpC* de *S. elongatus*

Se compararon la identidad y similitud de la proteína *SrpC*, de la subfamilia LCHR2, con respecto a otras proteínas *ChrA*, como la *ChrA* del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* de la subfamilia LCHR5 y el homólogo del plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* también de la subfamilia LCHR2, proteínas cuya función está ampliamente (Cervantes *et al.*, 1990, Nies *et al.*, 1990). También se incluyó en esta comparación a los homólogos *CHR* de *B. xenovorans* (BURXL) de la subfamilia LCHR1 y de *B. vietnamiensis* (BURVI) de la subfamilia LCHR6, que recientemente se demostró su función en nuestro laboratorio (León-Márquez, 2009). Los resultados se muestran en la **Tabla 2**.

BamHI

gatcgcttgggatcctaagactttacccccgacgcagaagaggaggaagcagattaaggctcaatagccccaattaattaagctc
 -35 → 18 ← -10

tgttgatttc aagcgtgactgtatcaagaatgattgtg cgggttccttgaaattaataagctgaa t gaaaatcatca ttaaacagtt

RBS

ctctgctctgggtcttcacttctcttttaggcatgaaagattctgactcttacttca t gtc ca tccagca tattc actca agcagctga cc
cagta tttctgaa gctaggagca ctgggcttggggggccaa t c gcttagtggctaca t gca t cgggatctcgtgg aag aac gcc
aatgggtctc c gaggcag agta tca agaaggactg accctc gctca agt c gctc tggccc actggcagc gca actatca tttatt
aggttacgttca ctatgga ttttagg atc agca tt agttgga ctgctttgttcttcc atcttctgattgtt gcttggg atgggct
tataccctta tggcggctta aatggatg caggc agta tttatggcgttggc gctgctgtaattggg atca t gctat tagtgc atata
aatta acg cggaa aac agttggg ac aagctgg tttatgtgg agtattttggg taa t g c g c t a c a a c a a t t g t g a c g g a a t c a g a
a c g a g t g g a g c t a a t c t g g g g t c g g g g c t c t g t t t a c t c g t t a a g t c c c a c t a a g c a c t g g a t c a a g c a g a a c c g c t a a t
agttttatgggctgctctgatccactcttgcagcagtaccaactgcaactacaagctgcttggctcagattgccccttttacc
aagcagggtgca t t g c t t t g g c a g t g g a c t g c a t t g t c c c t t c t g t a t g g c g g t g t g c a a a g a c t t g g c t g g c t a a c t c c a
gca attttaga t g c t g a g c t g t g c g a t g a t a c g c c g g a c c c g t t g t c a t t a c a c g g g t t t a t t g g t t c c t a g t c g c t g g a t t c
cgggtgctgtgtg c g g c g a t c g c g a t g t t a t t c c t g t a t c t t c t g a c a g t g a t c c g c a c c t a t t t a a a a a g c a t g g g a a g a
a c c c t a a g a t t t c a a t t g t a a a t g g t g t a c t g t c g c a g c a a c t g g a g c g a t c g c a g g a g c t g t t g t g t t c t a g g c c g a c a a t c t
ctcatgatctaccgacat t t t g a t t g g a c t c a t c g c t t a a t t a g c t c a t g g a a g c t a g g t a a a a g c t g c c a g a g c c t t a a t t a t t
gtgattgcagc gatc g c g g g a g t c a t t t c t g g t c t a a g t a g c a g c c a a c t t a c t t c a g t t g g c t a c t c a a t a t e c a a c a t g a g t c a t

*

cccaagggcaaccattt gta acccagggggcaggctaatccaagccaaaacaggtactctcagcaaggtttaagccaagagtaatg

HindIII

ccgaaaattctcaaccgactaagcttgtggatcg

Figura 10. Secuencia del gen *srpC* de *S. elongatus*. Muestra en negritas los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR, resaltando con rojo los sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII. Las regiones consenso -35 y -10 se indican en color verde así como también se muestra la región espaciadora en color azul rey, siendo esta de 18 nucleótidos (nt). Se muestra en morado el sitio de unión al ribosoma (RBS). Posteriormente se muestra en color naranja el codón de inicio ATG (codifica metionina). Se muestra en color azul cielo la región codificante de *srpC* que es de 1182 nt, en color naranja y marcado con (*) se indica el codón de terminación (TAG). Por último, se muestra en color azul rey, la región donde se encuentra el posible terminador transcripcional.

Tabla 2. Comparación de la identidad y similitud de la proteína LCHR2 SrpC de *S. elongatus*.

Proteína (ChrA)	Especie	Subfamilia	Identidad (%)	Similitud (%)
pMOL28	<i>C. metallidurans</i>	LCHR2	60.7	75.1
pUM505	<i>P. aeruginosa</i>	LCHR5	26.0	44.0
BURXL	<i>B. xenovorans</i>	LCHR1	21.4	37.3
BURVI	<i>B. vietnamiensis</i>	LCHR6	20.0	39.6

Se muestra la comparación de identidad y similitud de la proteína SrpC con respecto a otras proteínas ChrA de función conocida. Los valores se obtuvieron alineando por parejas las secuencias de las proteínas utilizando el programa BioEdit.

La proteína SrpC mostró una identidad y similitud elevadas, del 61 y 75%, respectivamente, con respecto a la de la proteína de pMOL28, perteneciente a la misma subfamilia LCHR2. Sin embargo, con la proteína de pUM505, que pertenece a la subfamilia LCHR5, como era de esperar se mostró una identidad y similitud más baja, siendo de 26 y 44% (**Tabla 2**). De la misma forma en la comparación con las proteínas de *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis* se obtuvieron porcentajes de identidad y similitud más bajos.

Estos resultados resaltan la diferencia estructural de las proteínas de cada subfamilia de la superfamilia CHR. Sin embargo, esto no influye para que los homólogos CHR se expresen o lleven a cabo su función como transportadores de cromato.

3.- Subclonación del gen *srpC* de *S. elongatus* en el vector pUCP20

Debido a que la función del gen *srpC* de *S. elongatus* se determinó en el vector de bajo número de copias pACYC184 y en una sola condición de crecimiento (medio mínimo) (Aguilar-Barajas, 2010), se procedió a determinar la función de este gen en otro vector y bajo diferentes condiciones de crecimiento.

Ya que la función de otros genes *chr* ha sido demostrada en cepas de *E. coli* o de *P. aeruginosa*, para estudiar la función del gen *srpC* se subclonó en el vector pUCP20 que es un vector binario de alto número de copias que se replica en estos dos organismos. Se transfirió el gen *srpC* a partir del plásmido recombinante pGEMT-SrpC al vector pUCP20 (**Fig. 11**).

El gen *srpC* se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII a partir del plásmido pGEMT-SrpC (**Fig. 11**), al igual que el vector pUCP20, se obtuvieron bandas de los tamaños esperados tanto del fragmento con el gen *srpC* (~1.5 kb) como del vector pUCP20

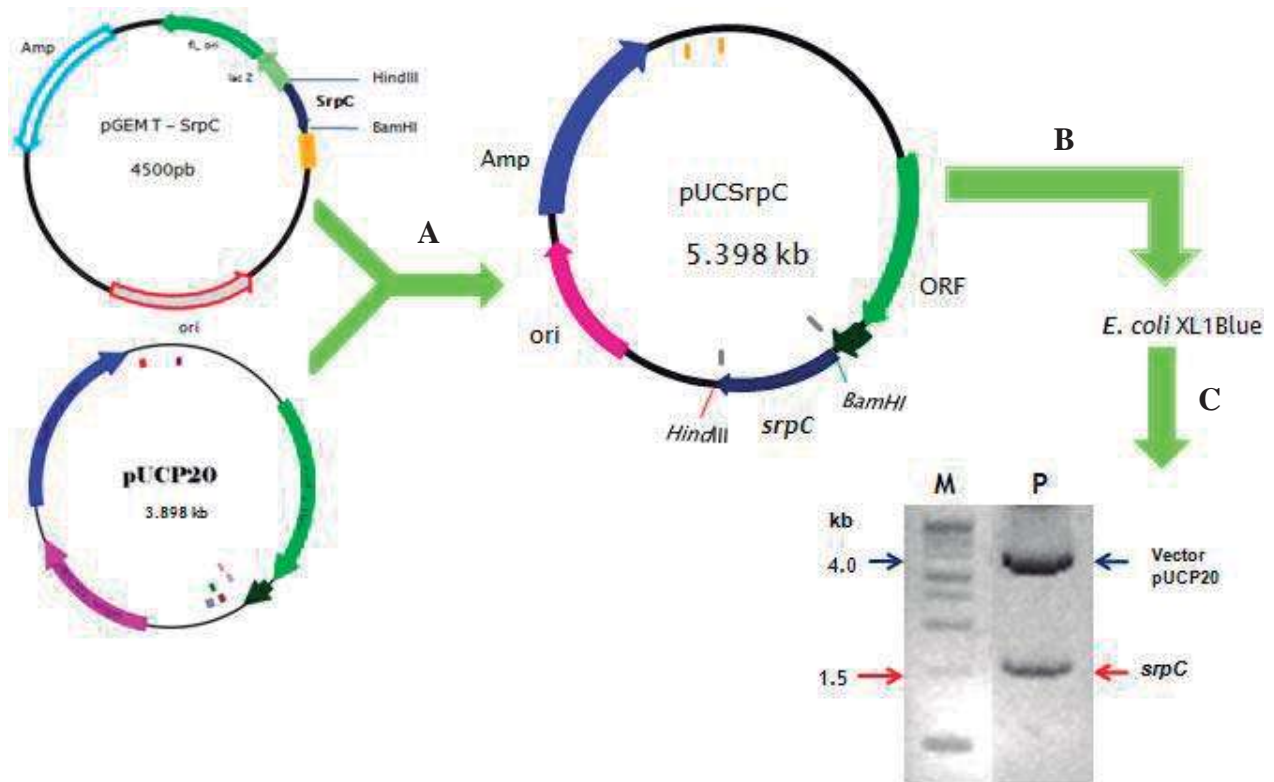


Figura 11. Subclonación del gen *srpC* de *S. elongatus* en el vector pUCP20. A. Clonación del gen *srpC* en el vector pUCP20, a partir del plásmido recombinante pGEMT-SrpC. **B.** Transferencia del plásmido pUCSrpC a *E. coli* XL1Blue. **C.** Digestión del plásmido pUCSrpC con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan las bandas de los tamaños esperados, correspondientes al del vector (~3.9 kb) y del inserto (~1.5 kb). M, marcador de peso molecular (1 kb); P, producto de restricción.

(~3.9 kb). Los fragmentos se purificaron y el gen *srpC* se clonó en pUCP20 para dar lugar al plásmido recombinante pUCSrpC. El plásmido recombinante se transfirió por electroporación a células competentes de *E. coli* XL1Blue. El DNA plasmídico se digirió con enzimas de restricción y se obtuvieron las bandas del tamaño del inserto y vector correspondientes (**Fig. 11**). Posteriormente el plásmido recombinante se transfirió por electroporación a células competentes *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* W3110. El DNA plasmídico de las transformantes se digirió con enzimas de restricción y se obtuvieron las dos bandas esperadas cuyo tamaño correspondió al del vector (~3.9 kb) y del inserto (~1.5 kb), en cada una de las cepas utilizadas (**Fig. 12**).

Estos resultados (**Figuras 11 y 12**) indican que el gen *srpC* se logró clonar en el vector pUCP20, y se encuentra en las cepas de *E. coli* XL1Blue, *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* W3110.

4.- Pruebas de susceptibilidad a cromato

4.1.- Gen *srpC* expresado en *P. aeruginosa*

El gen *srpC* proveniente de *S. elongatus* fue clonado como se indicó en el inciso anterior y transferido a *P. aeruginosa* para estudiar su función. A la cepa transformante de *P. aeruginosa* PAO1 con el plásmido pUCSrpC se le realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato. Las pruebas se realizaron tanto en un medio rico, caldo nutritivo (CN) y como en medio mínimo M9. En ambos medios de crecimiento la cepa PAO1(pUCSrpC) tuvo el mismo comportamiento respecto al control sensible (*P. aeruginosa* PAO1 transformada solamente con el vector pUCP20) (**Fig. 13**). Estos resultados indican que en las condiciones de medio de crecimiento en las que se probaron, la función del gen *srpC* no se hizo evidente en *P. aeruginosa*.

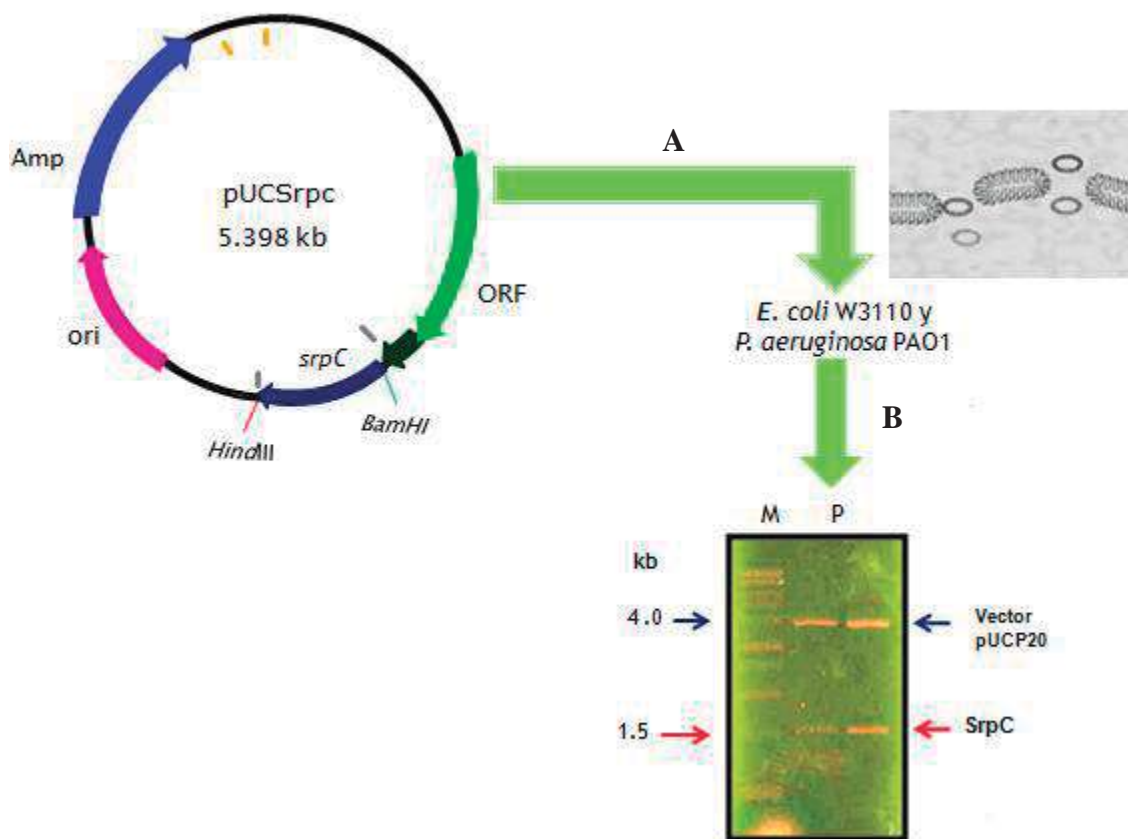


Figura 12. Transferencia del gen *srpC* de *S. elongatus* a *P. aeruginosa* y *E. coli*. **A.** Transferencia del plásmido recombinante pUCSrpc a las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* W3110. **B.** Digestión de pUCSrpc con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan las bandas de los tamaños esperados, correspondientes al del vector (~3.9 kb) y del inserto (~1.5 kb). M, marcador de peso molecular (1 kb); P, producto de restricción.

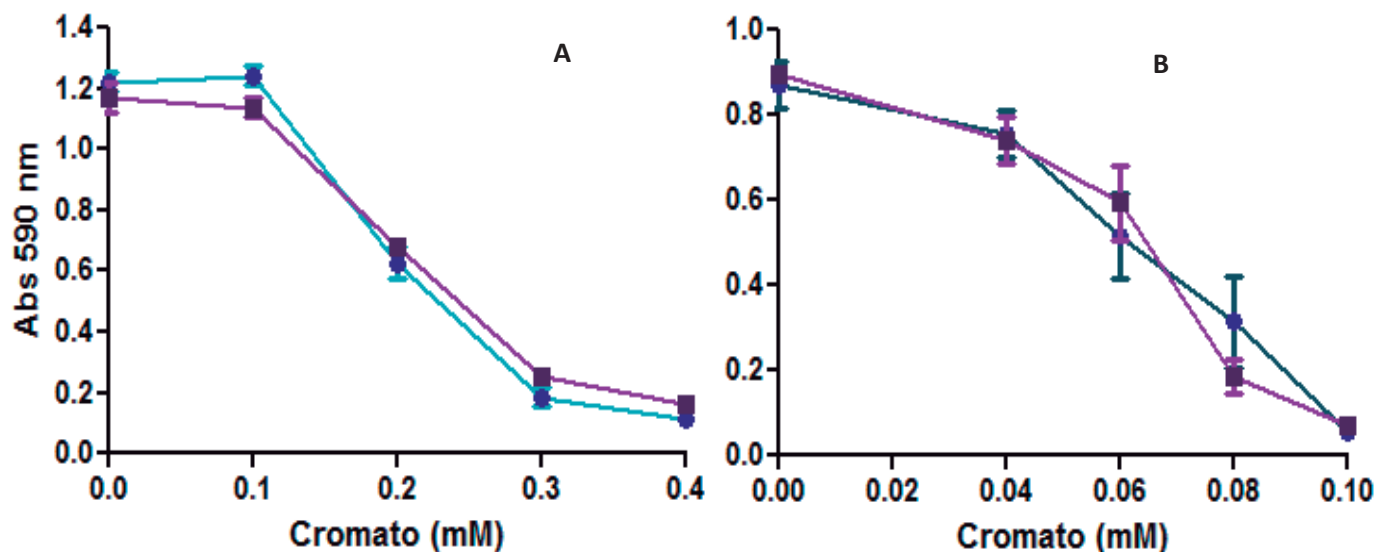


Figura 13. Susceptibilidad a cromato de *P. aeruginosa* PAO1 con el plásmido pUCSrpC. Los cultivos se crecieron a 37°C por 18 h en CN (A) o por 22 h en medio mínimo M9 (B), con agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego se midió la absorbencia a 590 nm. Cepas PAO1(pUCP20) (●; control sensible) y PAO1(pUCSrpC) (■). Los experimentos muestran el resultado de dos ensayos por duplicado en ambos medios de crecimiento y las barras indican la variación de los experimentos que se promediaron.

4.2.- Gen *srpC* expresado en *E. coli*

4.2.1.- Plásmido pUCSrpC

Debido a que el vector pUCP20 se replica tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*, se realizaron también pruebas de susceptibilidad a cromato a la cepa W3110 de *E. coli* a la cual se le transfirió el plásmido pUCSrpC. En los ensayos en CN la cepa W3110(pUCSrpC) mantuvo un comportamiento similar al control sensible, transformado únicamente con el vector (**Fig. 14A**). Debido a que no se encontró una diferencia en el ensayo anterior se hicieron pruebas en medio mínimo M9, con una concentración de 2 mM de sulfato (nivel estándar del medio M9). En estas condiciones se encontró que la cepa *E. coli* W3110(pUCSrpC) mostró una sensibilidad a cromato ligeramente mayor con respecto al control transformado únicamente con el vector (pUCP20) (**Fig. 14B**), indicando que probablemente algún componente del medio de cultivo impida que el gen *srpC* se exprese debido a la región de donde proviene *srpC*. El gen *srpC* proviene de un plásmido que posee una región involucrada con el metabolismo o transporte de azufre, por lo que se disminuyó el sulfato en medio M9 a una concentración de 0.2 mM, ya que esto pudiera influir para su expresión. Pero de igual manera no se presentó alguna diferencia de resistencia a cromato respecto al control sensible (**Fig. 14C**). Los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad a cromato en la cepa W3110(pUCSrpC) no mostraron un fenotipo de resistencia a cromato del gen *srpC* en los diferentes medios de crecimiento utilizados, como ocurrió también en el caso de *P. aeruginosa*, lo que sugiere que en el vector de alto número de copias el gen *srpC* no se expresa.

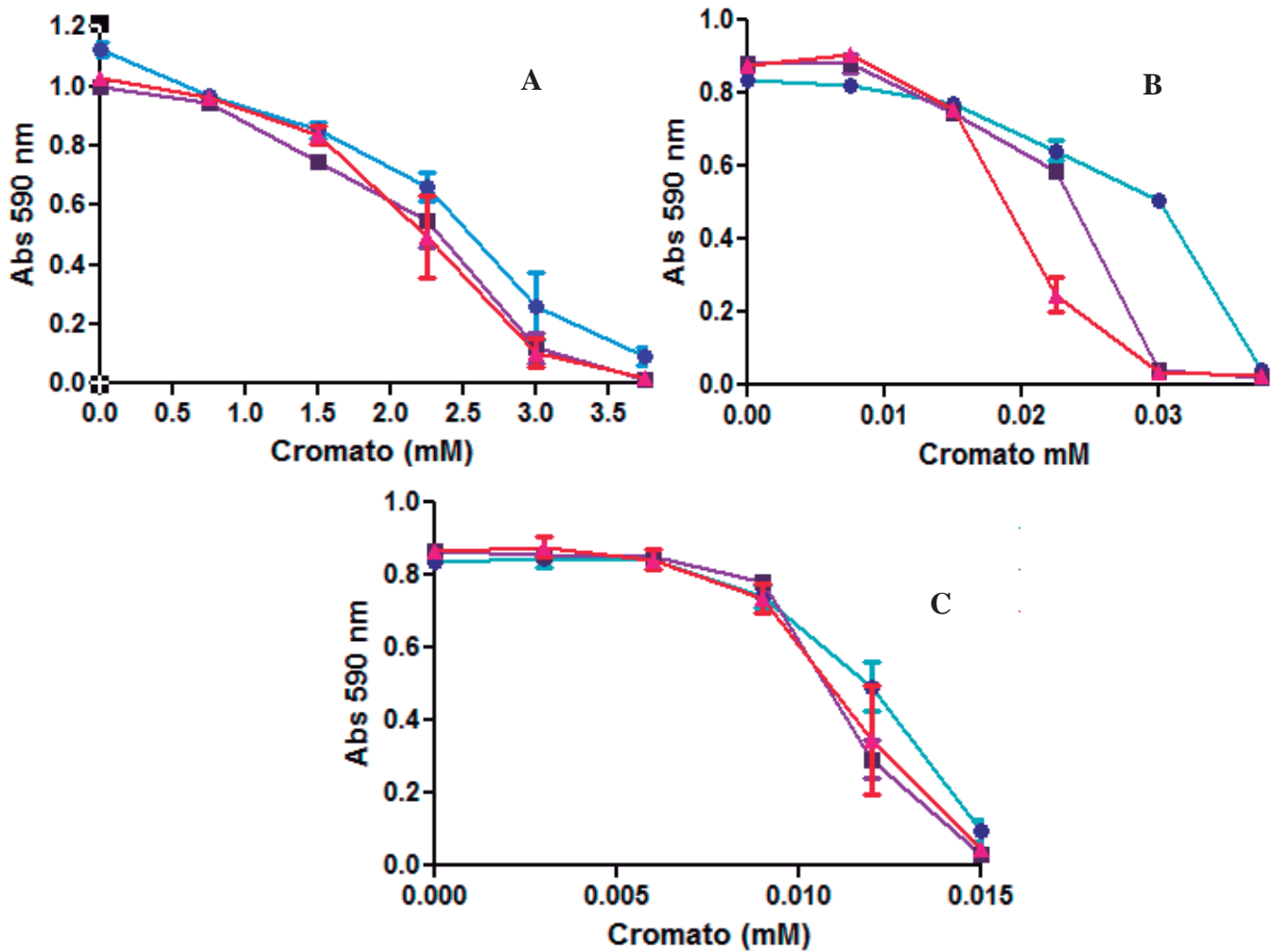


Figura 14. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* con el plásmido pUCSrC y el cósmido 2F10. Los cultivos se crecieron a 37°C por 18 h en CN (A), por 22 h en medio mínimo M9 con 2 mM sulfato (B) o en M9 con 0.2 mM sulfato por 22 h (C), con agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas. Luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. Cepas W3110 (pUCP20) (●, control sensible), W3110(pUCSrC) (■) y W3110(2F10) (▲). Los experimentos muestran el resultado de dos ensayos por duplicado en todos medios de crecimiento y las barras indican la variación de los experimentos que se promediaron.

4.2.2.- C6smido 2F10

El c6smido 2F10 forma parte de una biblioteca gen6mica del pl6smido pANL de *S. elongatus* que contiene el gen *srpC* junto con otros genes relacionados con el metabolismo de azufre (**Fig. 5**). Consideramos importante estudiar a 2F10 porque los genes aledaños relacionados con el metabolismo de azufre influyen probablemente en la expresi6n de *srpC*. Para ello se transfiri6 el c6smido a *E. coli* W3110 y se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato. En las pruebas en CN la presencia de 2F10 en W3110 se comport6 de una forma similar al control sensible y a la cepa W3110(pUCSrpC) (**Fig. 14A**). Sin embargo, al realizar los ensayos en medio m6nimo M9 con 2 mM sulfato se vio una susceptibilidad claramente mayor a cromato de W3110(2F10) respecto al control transformado 6nicamente con el vector pUCP20 (**Fig. 14B**). Esto probablemente se debe a que existe una influencia negativa de los genes aledaños a *srpC* sobre la expresi6n de SrpC dada por alg6n componente del medio de crecimiento.

Cuando las pruebas se hicieron en medio m6nimo con 0.2 mM de sulfato, los resultados mostraron un comportamiento similar de 2F10 con las otras cepas utilizadas (**Fig. 14C**). Estos resultados muestran que, al igual que con el pl6smido pUCSrpC, el gen *srpC* en 2F10 no se expresa en las condiciones probadas; esto probablemente se deba a que exista alguna influencia de las condiciones de crecimiento utilizadas o de los genes aledaños a *srpC* involucrados con el metabolismo de azufre.

4.2.3.- Pl6smido pACYC-SrpC

Debido a los resultados descritos en el inciso anterior donde no se pudo observar la funci6n de SrpC en el vector de alto n6mero de copias pUCP20. Se emple6 la cepa W3110(pACYC-SrpC) (Aguilar-Barajas, 2010), que contiene el gen *srpC* clonado en el

vector de bajo número de copias pACYC184 para ensayos de susceptibilidad a cromato, además que se incluyó a la cepa W3110(2F10).

Se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en CN y medio mínimo 0.2 mM sulfato. En CN se observó una considerable resistencia a cromato de la transformante W3110(pACYC-SrpC) con respecto a la cepa control transformada únicamente con el vector (**Fig. 15A**). Esto indica que *srpC* cuando se encuentra solo se expresa bajo las condiciones utilizadas. Sin embargo, no pasó lo mismo cuando el gen se encontró en la cepa W3110(2F10) acompañado de los genes de metabolismo de azufre (**Fig. 15**). Probablemente esté influyendo alguno de ellos sobre la expresión de SrpC. Con estos resultados se demostró que en las condiciones empleadas con el gen *srpC* clonado en el vector de bajo número de copias, SrpC lleva a cabo su función de transportador de cromato. En M9 0.2 mM sulfato ambas cepas W3110(pACYC-SrpC) y W3110(2F10) no presentaron un fenotipo de resistencia a cromato respecto al control sensible (**Fig. 15B**). Esto indica que probablemente *srpC* se ve afectado por la baja concentración de sulfato empleada y esto es lo que impida que SrpC se exprese, como se observó en CN.

5.- Análisis de la expresión del gen *srpC* de *S. elongatus* mediante RT-PCR

Para determinar si el gen *srpC* de *S. elongatus* se expresa de forma constitutiva o de forma inducible en presencia a cromato, se realizó un análisis de la expresión transcripcional en la cepa *E. coli* W3110 con el plásmido recombinante pACYC-SrpC o el cósmido 2F10 mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región interna del gen *srpC* (descrito en Materiales y métodos).

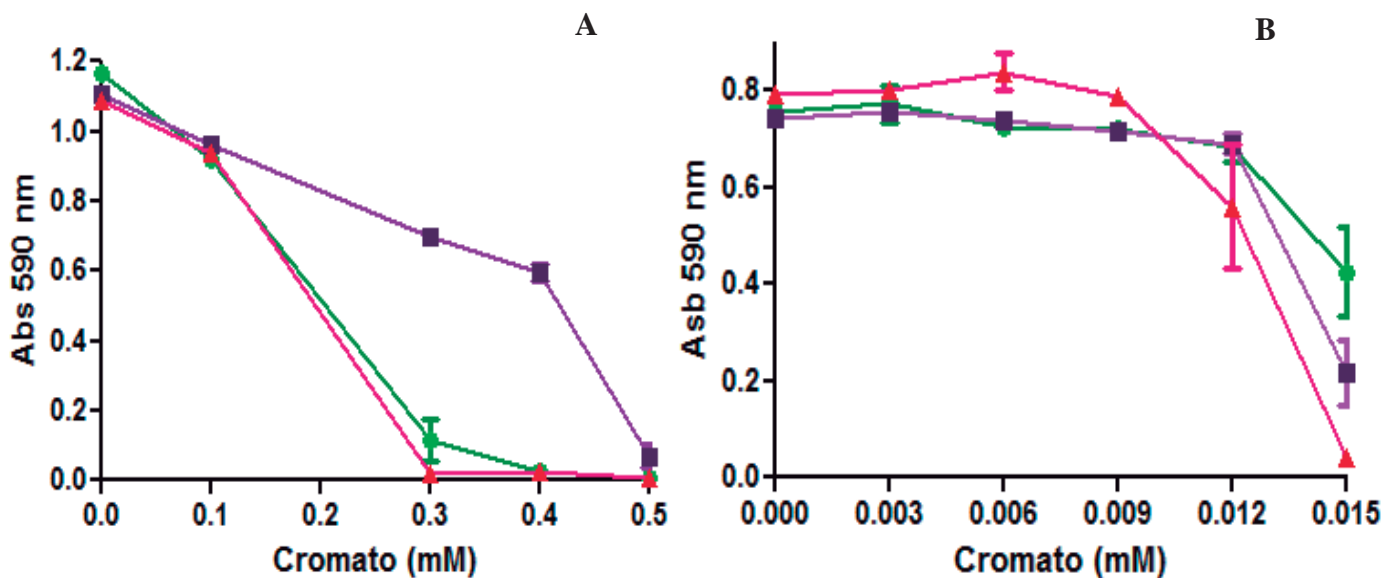


Figura 15. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* con el plásmido pACYC-SrpC y el cósmido 2F10. Los cultivos se crecieron a 37°C por 18 h en CN (A) o por 22 h en medio mínimo M9 0.2mM sulfato (B), con agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm. Cepas W3110 (pACYC 184) (● ; control sensible), W3110(pACYC-SrpC) (■) y W3110(2F10) (▲). Los experimentos muestran el resultado de dos ensayos por duplicado en ambos experimentos y las barras indican la variación de los experimentos que se promediaron.

5.1.- Expresión del gen *srpC* en la cepa W3110(pACYC-SrpC)

Para la cepa W3110(pACYC-SrpC) se hicieron los ensayos de RT-PCR en los medios en los que se vio resistencia a cromato (CN y M9 2 mM de sulfato) en las pruebas de susceptibilidad a cromato. Primero se obtuvo el RNA total de los cultivos sin cromato de la cepa en CN y M9 2 mM de sulfato. Se observaron las dos bandas que correspondieron a las subunidades ribosomales 23S y 16S (**Fig. 16A**), con lo que se pudo determinar que el RNA estaba íntegro para su utilización en los ensayos de RT-PCR. Luego se realizó el ensayo del RT-PCR, donde a partir del RNA total se obtuvo el cDNA que posteriormente fue amplificado por PCR. Los productos amplificados se sometieron a un corrimiento electroforético para determinar si había ocurrido la transcripción y verificar el tamaño de los fragmentos. Este ensayo mostró que sí hubo expresión del gen *srpC* de la cepa W3110(pACYC-SrpC) en los medios de crecimiento utilizados (**Fig. 17B**). Esto indica que el gen *srpC* del plásmido pACYC-SrpC se transcribió en las condiciones realizadas, aunque se notó una ligera mayor expresión cuando los cultivos se crecieron en medio mínimo 2 mM sulfato respecto a CN (**Fig. 17B**). Esto posiblemente se debe a que algún componente de los medios influye para que se vea esa ligera diferencia de expresión entre cada medio. Debido a que no se vio diferencia notable de expresión de forma visual en los ensayos de RT-PCR realizados para la cepa W3110(pACYC-SrpC), se hizo un análisis densitométrico de las bandas para las diferentes condiciones utilizadas en cada cepa. Este análisis corroboró que no hubo una diferencia notable de expresión en la cepa W3110(pACYC-SrpC) en las condiciones de crecimiento utilizadas (**Fig. 18A**), lo que indica que hay expresión en los medios de CN y M9 2 mM de sulfato y sugiere que el gen *srpC* se transcribe de forma constitutiva.

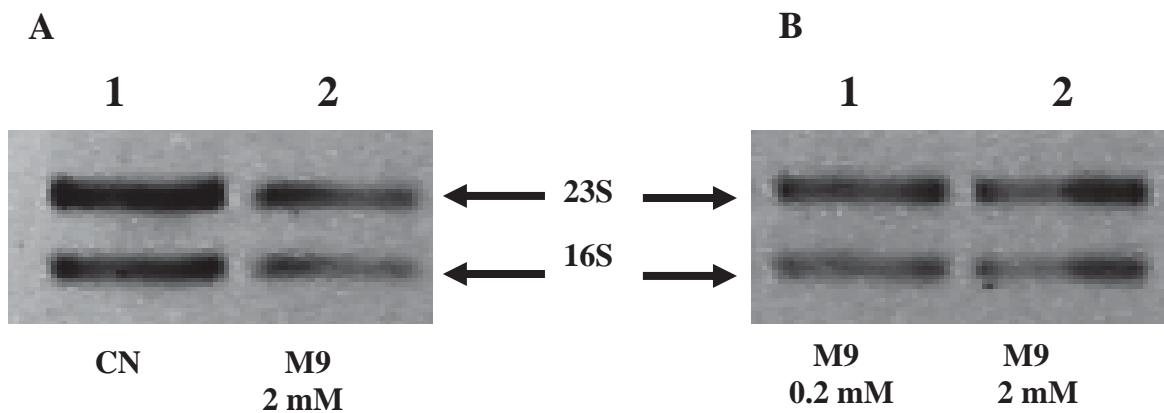


Figura 16. RNA total de las cepas que contienen al gen *srpC* de *S. elongatus* en cultivos de *E. coli*. El RNA se aisló como se describe en Materiales y Métodos. Corrimiento electroforético en un gel de agarosa. **(A)** RNA total de la cepa W3110(pACYC-SrpC). **(B)** RNA total de la cepa W3110 (2F10). Al centro se indica la posición de los RNA ribosomales.

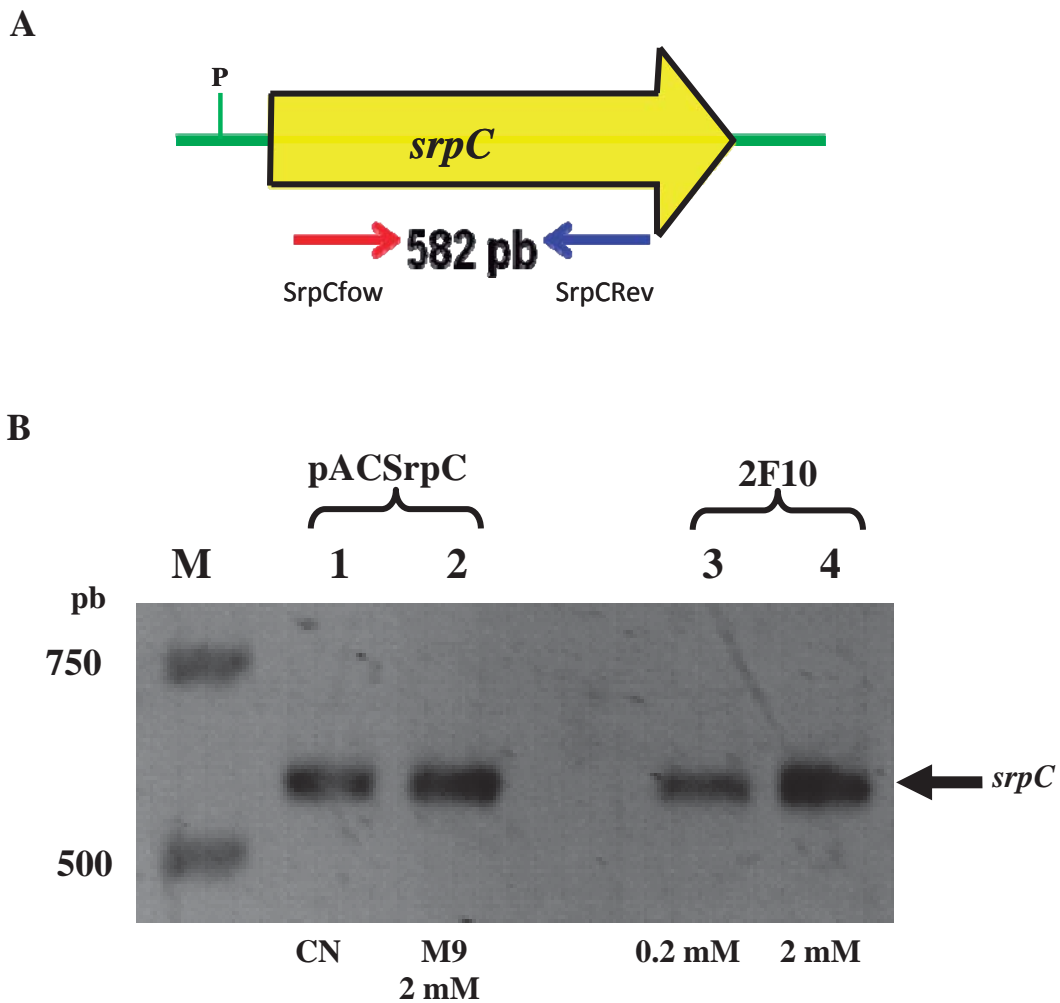


Figura 17. Expresión transcripcional del gen *srpC* de *S. elongatus* clonado en *E.coli*.

(A) Esquema del gen *srpC*, indicando con flechas la dirección y posición de los oligonucleótidos, empleados para el RT-PCR. (B) Electroforesis del gel de agarosa del producto de PCR correspondiente al gen *srpC*. M, marcador de peso molecular (1kb). Se muestra un gel representativo de dos repeticiones con resultados similares.

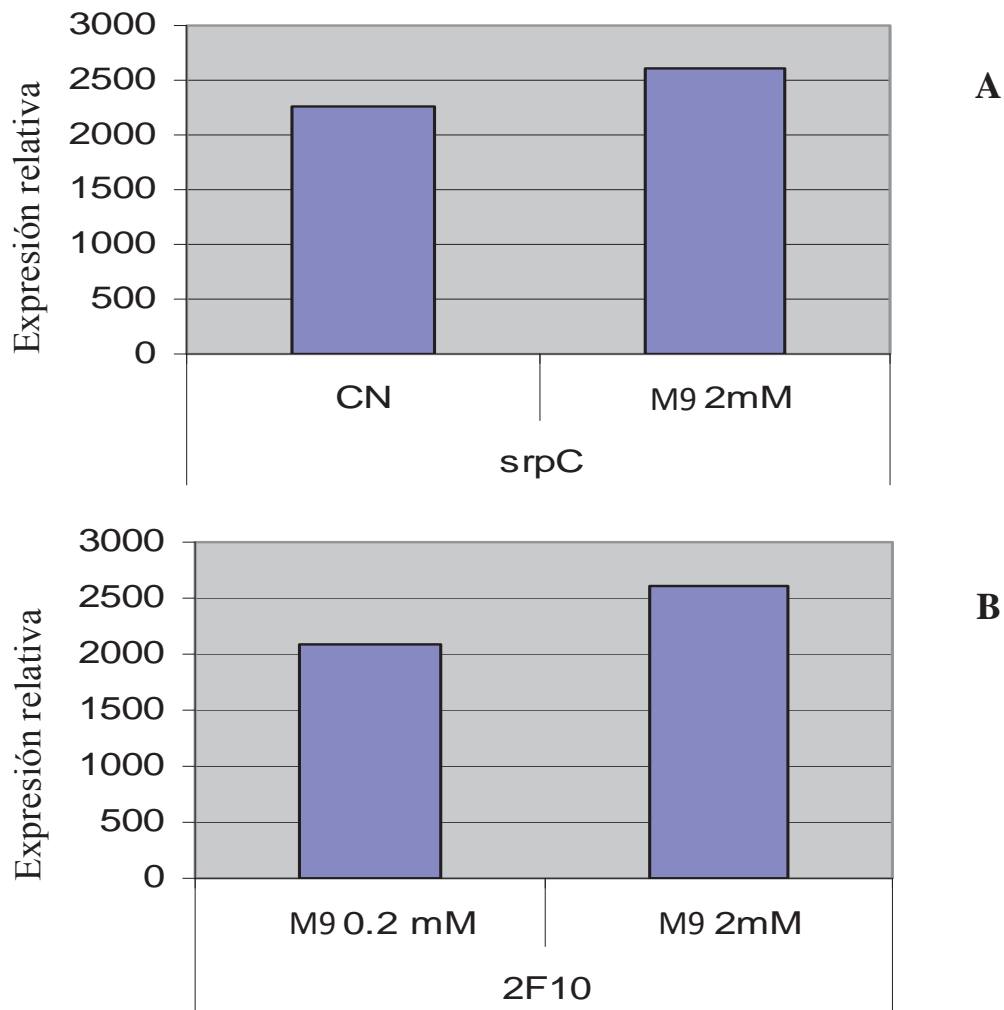


Figura 18. Expresión transcripcional del gen *srpC* de *S. elongatus* en la cepa W3110(pACYC-SrpC) y W3110(2F10). Se tomaron las fotografías de los corrimientos electroforéticos de los geles con los productos de RT-PCR y se hizo el análisis con el programa ImageJ. El análisis densitométrico muestra las unidades relativas de expresión de *srpC* en el medio de crecimiento. Los datos son el promedio de dos ensayos.

5.2.- Expresión del gen *srpC* en la cepa W3110(2F10)

Debido a que en la cepa W3110(2F10) el gen *srpC* se encuentra en el cósmido se probó la expresión de *srpC* en M9 aunque variando la concentración de sulfato (0.2 mM y 2 mM), ya que *srpC* está en una región que contiene genes relacionados con el metabolismo de azufre. De igual forma que para pACYC-SrpC, obtuvo el RNA total de los cultivos sin cromato de las cepas *E. coli* W3110(2F10), en M9 0.2 mM y 2 mM de sulfato. Se obtuvieron las dos bandas que correspondieron a las subunidades ribosomales 23S y 16S (**Fig. 16B**), con lo que se pudo determinar que el RNA estaba íntegro para su utilización en los ensayos de RT-PCR. Se realizó el ensayo del RT-PCR, a partir del RNA total y se obtuvo el cDNA que fue amplificado por PCR. Los productos amplificados se sometieron a un corrimiento electroforético para determinar si había ocurrido la transcripción y verificar el tamaño de los fragmentos. Este ensayo mostró que también hubo expresión del gen *srpC* de la cepa W3110(2F10), en los diferentes medios de crecimiento utilizados (**Fig. 17B**). Esto indica que el gen *srpC* se transcribió en las condiciones realizadas y la diferente expresión mostrada en W3110(2F10) se debe posiblemente a las concentraciones de sulfato empleadas en el medio.

Debido a que no se vio diferencia notable de expresión de forma visual en los diferentes ensayos de RT-PCR realizados para W3110(2F10), se hizo un análisis densitométrico para las diferentes condiciones utilizadas. Este análisis corroboró que no hubo una diferencia notable de expresión en la cepa W3110(2F10) en las condiciones de crecimiento utilizadas (**Fig. 18B**), lo que indica que hay expresión de *srpC* de 2F10 en los medios M9 0.2 mM y 2 mM de sulfato y sugiere que el gen *srpC* se transcribe de forma constitutiva.

5.3.- Expresión del gen *srpC* en la cepa W3110(pACYC-SrpC) en presencia de cromato

Para determinar si el cromato afecta la expresión del gen *srpC* se hicieron los ensayos de RT-PCR añadiendo una concentración de cromato que no afectara el crecimiento de las cepas. Las concentraciones se determinaron y eligieron mediante cinéticas de crecimiento probando diferentes concentraciones de cromato (**Fig. 19**). Para la cepa W3110(pACYC-SrpC) crecida en CN se utilizó 0.06 mM de cromato y en M9 2 mM de sulfato se utilizó 0.0025 mM de cromato. De igual forma que en los ensayos de RT-PCR sin cromato, se obtuvo primero el RNA total de cada cepa en las condiciones de crecimiento específicas utilizadas y se observó que el RNA estaba íntegro (**Fig. 20A**).

Los resultados del RT-PCR mostraron que hubo expresión del gen *srpC* en la cepa W3110(pACYC-SrpC) aunque disminuyó visiblemente en presencia de cromato (**Fig. 21B**). Esto indica que en la cepa W3110(pACYC-SrpC) el gen *srpC* se expresa más en CN que en medio mínimo 2 mM. Esto concuerda ampliamente con los resultados obtenidos de las curvas de susceptibilidad a cromato, donde la cepa W3110(pACYC-SrpC) en CN mostró una mayor resistencia a cromato respecto a las otras cepas empleadas, incluido el control sensible transformado únicamente con el vector pACYC184 (**Fig. 15**). Este nivel observado probablemente representa una expresión suficiente del gen para conferir la resistencia a cromato observada.

Con los resultados obtenidos del RT-PCR, se hizo un análisis densitométrico agregando también el análisis hecho en los ensayos con la cepa W3110(pACYC-SrpC) sin cromato. En CN el resultado del análisis mostró que la expresión es prácticamente igual (**Fig. 22**), lo que indica que el cromato no afecta la expresión de *srpC* en este medio de crecimiento. Sin embargo, en medio mínimo 2 mM sulfato con cromato se vio una disminución notable de la

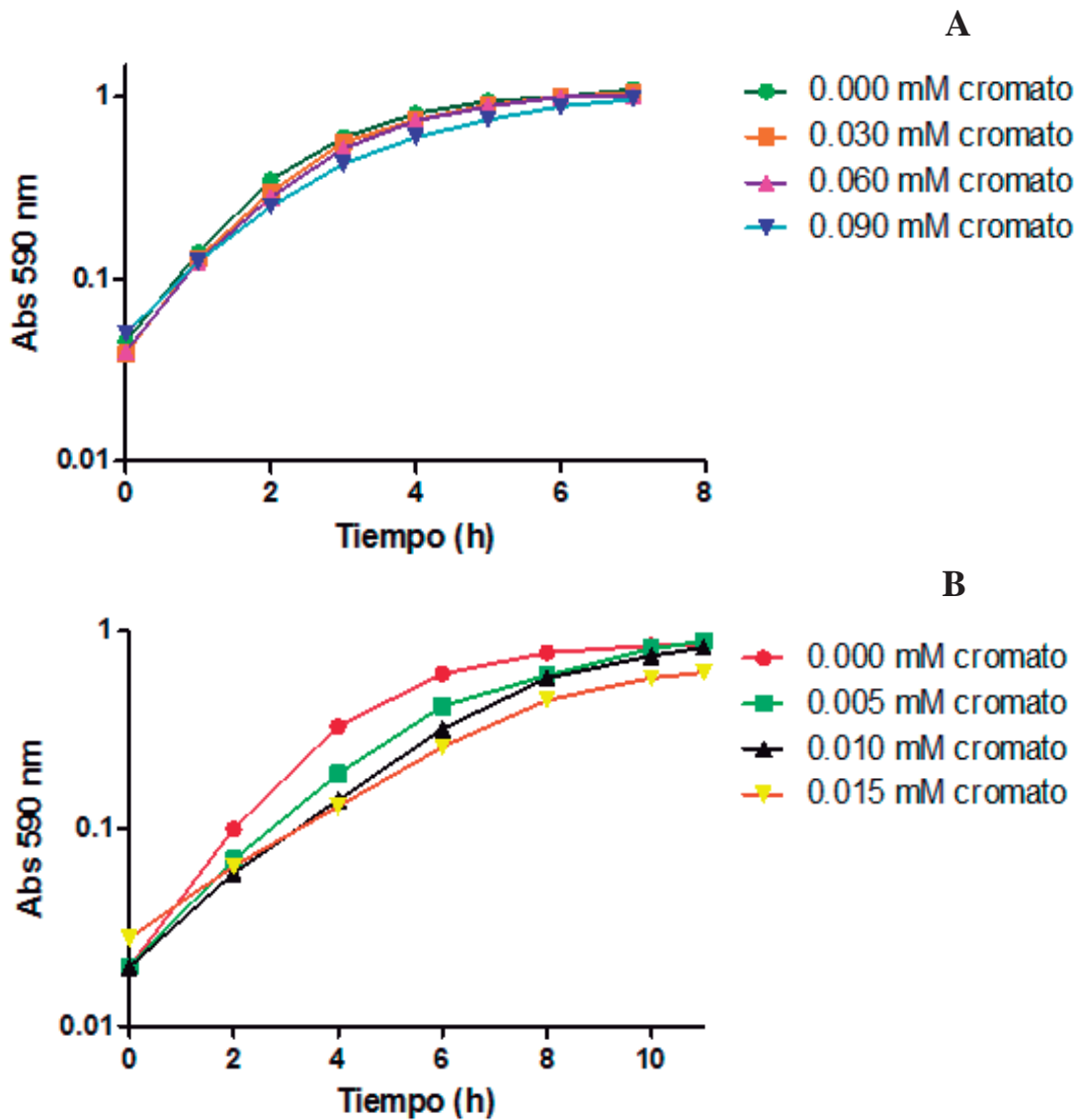


Figura 19. Cinéticas de crecimiento de la cepa W3110(pACYC-SrpC) con cromato. Se crecieron los cultivos de W3110(pACYC-SrpC) en CN (A) y medio mínimo 2 mM de sulfato (B), con las concentraciones de cromato indicadas a la derecha y se midió la absorbencia a 590 nm a los tiempos indicados.

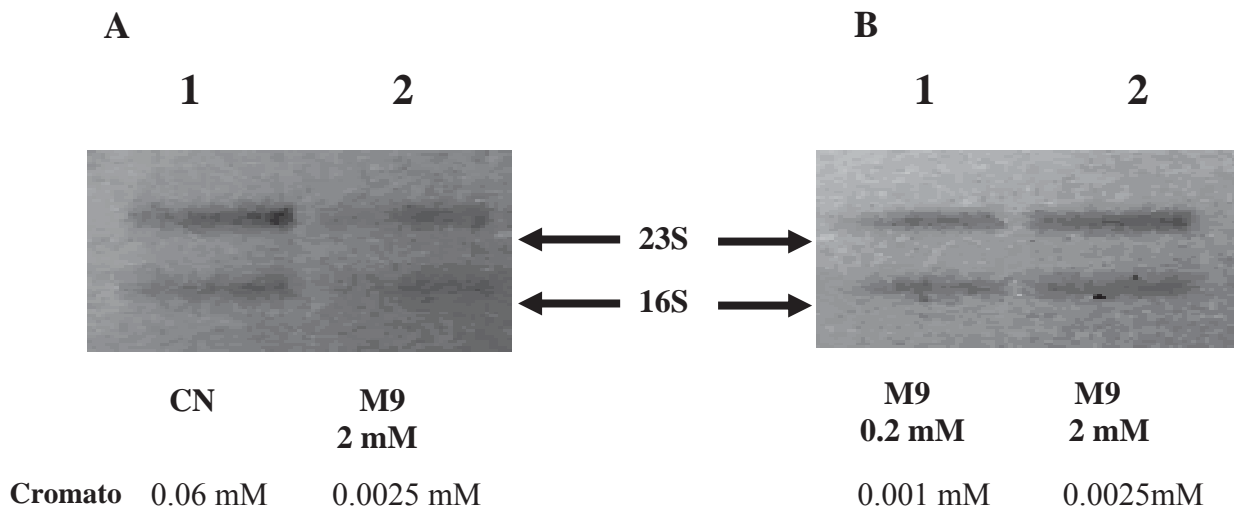


Figura 20. RNA total de las cepas que contienen al gen *srpC* de *S. elongatus* en cultivos de *E. coli* con cromato. El RNA se aisló como se describe en materiales y métodos. Corrimiento electroforético en un gel de agarosa. **(A)** RNA total de la cepa W3110(pACYC-SrpC). **(B)** RNA total de la cepa W3110 (2F10). Al centro se indica la posición de los RNA ribosomales.

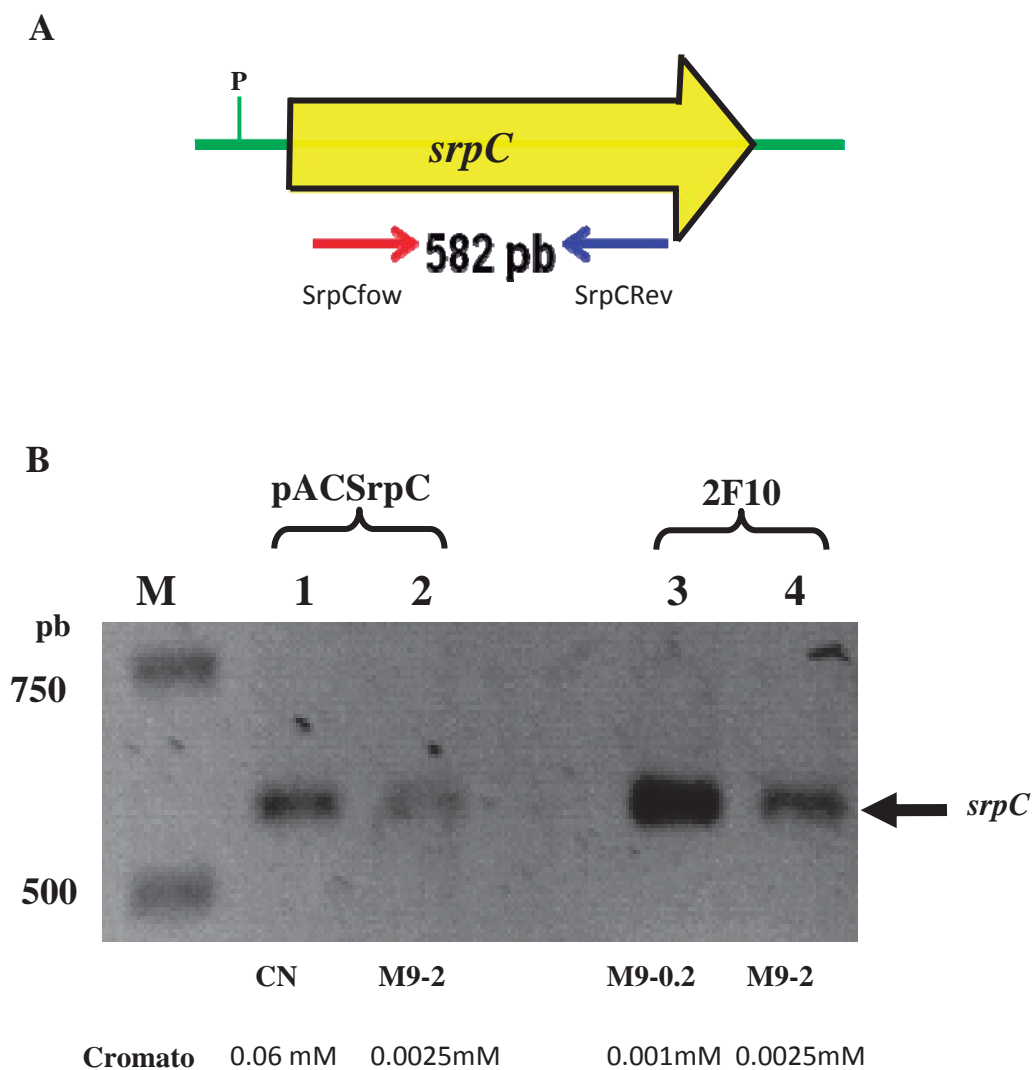


Figura 21. Expresión transcripcional del gen *srpC* de *S. elongatus* clonado en *E. coli* en presencia de cromato. (A) Esquema del gen *srpC*, indicando con flechas la dirección y posición de los oligonucleótidos, empleados para el RT-PCR. (B) Electroforesis del gel de agarosa del producto de PCR correspondiente al gen *srpC*. M, marcador de peso molecular (1kb). Se muestra un gel representativo de dos repeticiones con resultados similares para W3110(2F10) y un solo experimento representativo para W3110(pACYC-SrpC).

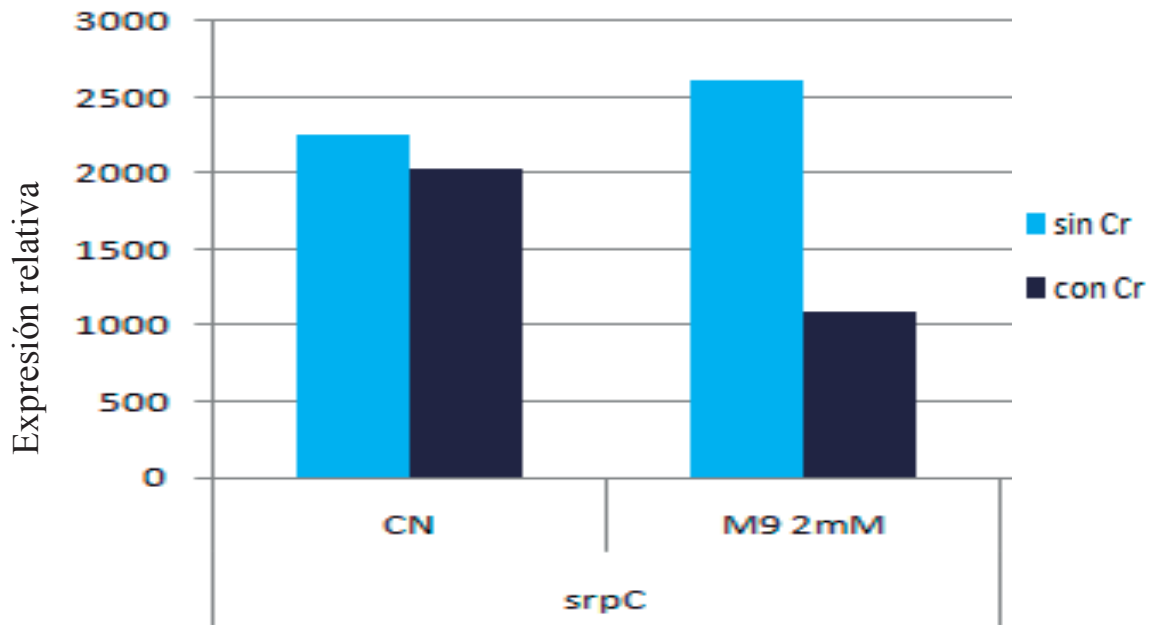


Figura 22. Expresión transcripcional del gen *srpC* de *S. elongatus* en la cepa W3110(pACYC-SrpC) con y sin cromato. Se tomaron las fotografías de los corrimientos electroforéticos de los geles con los productos de RT-PCR y se hizo el análisis con el programa ImageJ. Análisis densitométrico muestra las unidades relativas de expresión del gen *srpC* contra el medio de crecimiento utilizado, sin cromato y en presencia de cromato, CN con 0.06mM de cromato y M9 2mM sulfato con 0.0025mM de cromato. La gráfica muestra un ensayo representativo para los ensayos con cromato para CN y el promedio de dos ensayos para las demás pruebas.

expresión de *srpC* con respecto a los ensayos sin cromato (**Fig. 22**), lo que indica que la expresión de *srpC* se ve afectado en presencia de cromato en este medio de crecimiento. La expresión observada en los ensayos de RT-PCR con cromato en CN y M9 2 mM sulfato está posiblemente relacionada con lo encontrado en los ensayos de susceptibilidad a cromato (**Fig. 15**).

5.4.- Expresión del gen *srpC* en la cepa W3110(2F10) en presencia de cromato

De igual manera que los ensayos de RT-PCR en presencia de cromato para la cepa W3110(pACYC-SrpC), se añadió una concentración de cromato que no afectara el crecimiento para la cepa W3110(2F10). Las concentraciones se determinaron y eligieron mediante cinéticas de crecimiento probando diferentes concentraciones de cromato (**Fig. 23**). Para la cepa W3110(2F10) crecida en M9 0.2 mM de sulfato se utilizó 0.001 mM de cromato y para 2 mM de sulfato se utilizó 0.0025 mM de cromato,

Se obtuvo el RNA total de cada cepa en las condiciones de crecimiento utilizadas (**Fig. 20B**) y luego se realizó un ensayo de RT-PCR. Los resultados mostraron que hubo expresión del gen *srpC* en la cepa W3110(2F10) (**Fig. 21B**), pero la expresión observada fue mayor en M9 0.2 mM que en 2 mM sulfato, contrario a lo encontrado en los ensayos sin cromato (**Fig. 17B**). Estos datos no concuerdan con los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a cromato (**Fig. 14 y 15**), ya que la cepa W3110(2F10) no mostró un fenotipo de resistencia a cromato y mantuvo un comportamiento similar al control sensible en todas las condiciones probadas.

Posteriormente se realizó un análisis densitométrico donde se encontró que el gen *srpC* en la cepa W3110(2F10) no presenta una diferencia significativa de expresión en ninguno de los medios utilizados respecto a los ensayos sin cromato (**Fig. 24**). Esto posiblemente se

deba a que alguno de los genes aledaños a *srpC* presentes en 2F10 influye sobre la expresión que se observó y que esto no permita que SrpC lleve a cabo su función.

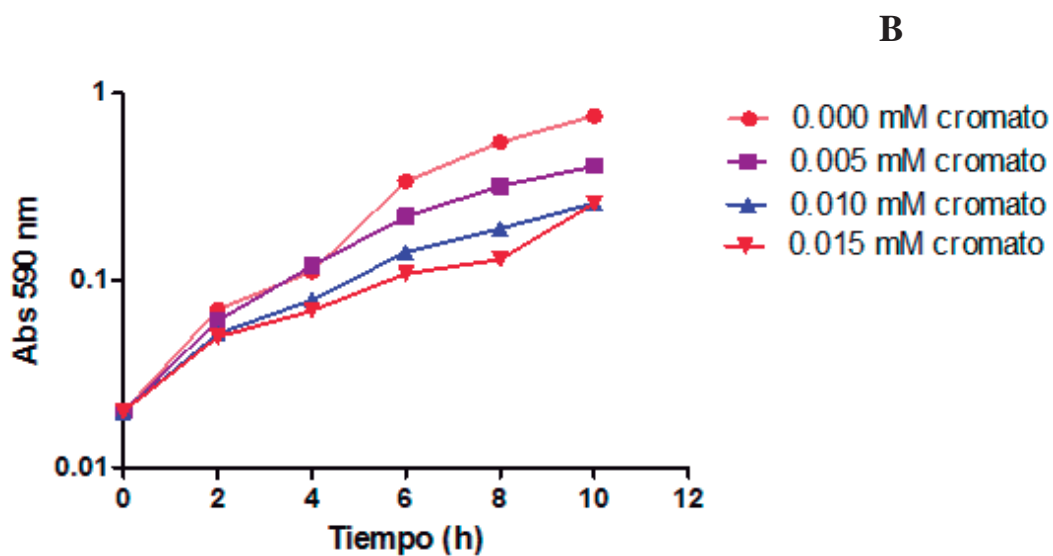
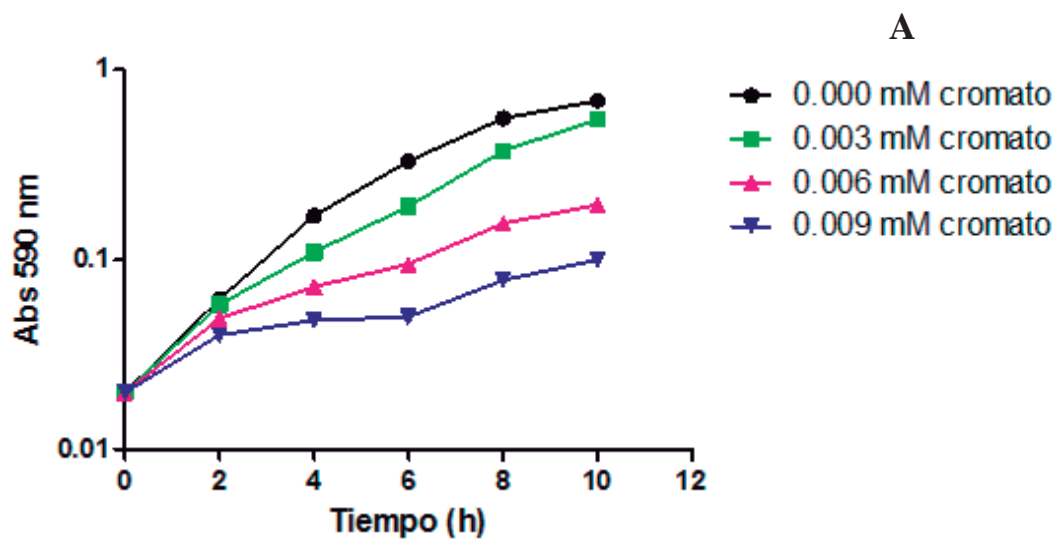


Figura 23. Cinéticas de crecimiento de la cepa W3110 (2F10) con cromato. Se crecieron los cultivos de W3110(2F10) en medio mínimo 0.2 mM (A) y 2 mM de sulfato (B), con las concentraciones de cromato indicadas a la derecha y se midió la absorbancia a 590 nm a los tiempos indicados.

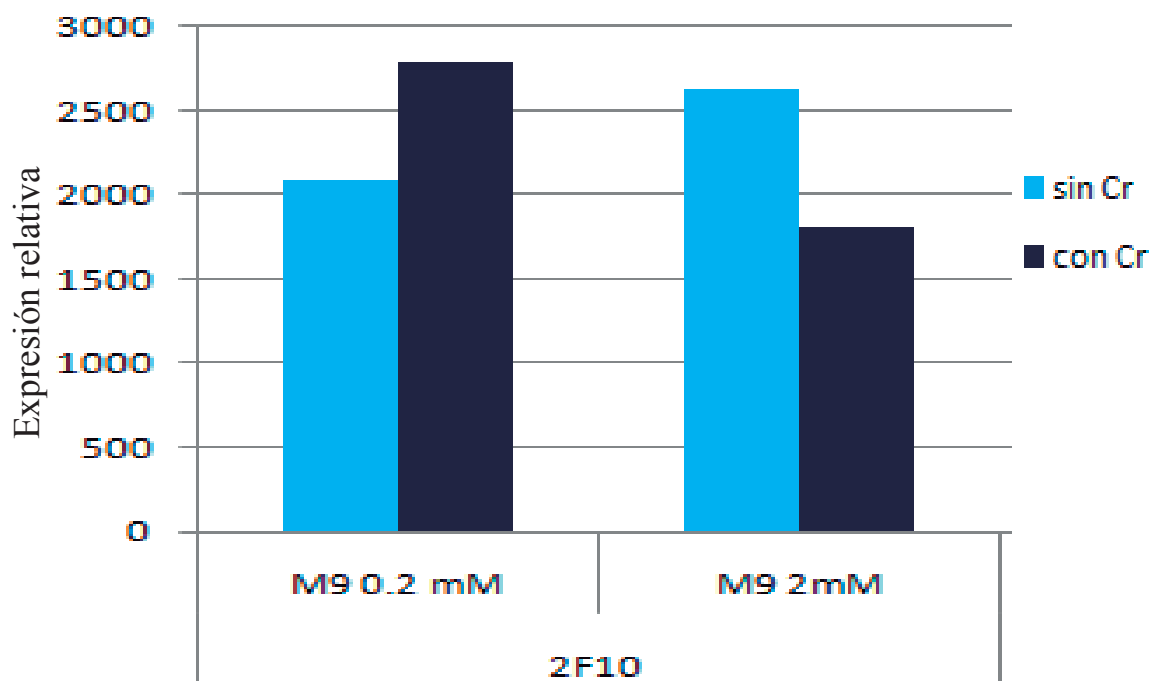


Figura 24. Expresión transcripcional del gen *srpC* de *S. elongatus* en la cepa W3110(2F10) con y sin cromato. Se tomaron las fotografías de los corrimientos electroforéticos de los geles con los productos de RT-PCR y se hizo el análisis con el programa ImageJ. Análisis densitométrico muestra las unidades relativas de expresión del gen *srpC* contra el medio de crecimiento utilizado, sin cromato y en presencia de cromato, M9 0.2 mM sulfato con 0.001mM de cromato y M9 2 mM sulfato con 0.0025mM de cromato. La gráfica muestra del promedio de dos ensayos.

IX. DISCUSIÓN

Un homólogo de la proteína ChrA de la superfamilia CHR es SrpC del plásmido pANL de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (Nicholson y Laudenbach, 1995). En pANL se han identificado varios genes cuya función es regulada por los niveles de azufre (Nicholson y Laudenbach, 1995; Chen *et al.*, 2008). Se encontró que una mutante del gen *srpC* presentó mayor resistencia a cromato comparado con la cepa silvestre, sugiriendo que posiblemente SrpC participe en la captación de cromato al interior celular (Nicholson y Laudenbach, 1995). Sin embargo, en nuestro laboratorio se demostró la función de la proteína SrpC de *S. elongatus* como un transportador de cromato, aunque no se conoce su posible relación con el sulfato (Aguilar-Barajas, 2010).

En este trabajo se realizó el análisis de la secuencia de *srpC* y encontramos que el gen cuenta con los elementos suficientes para llevar a cabo su expresión, como son las regiones consenso -35 y -10 del posible promotor, el sitio de unión al ribosoma (RBS), el codón de inicio ATG (codifica metionina) y el codón de terminación (TAG) (**Fig. 10**). Con estos elementos *srpC* podrá ser un gen funcional y por lo tanto su producto podría llevar a cabo su función como transportador de cromato.

Se realizó también una comparación de identidad y similitud de las secuencias de la proteína SrpC de la subfamilia LCHR2 con respecto a otras proteínas ChrA de función conocida, para conocer qué tan diferentes son las proteínas pertenecientes a subfamilias diferentes de la de SrpC así como también cuando pertenecen a la misma subfamilia. Se encontraron diferencias significativas entre las proteínas de cada subfamilia diferente a la de SrpC (LCHR2), observándose un porcentaje muy bajo de similitud (~37 a 44%) e identidad (~20 a 26%), comparado con el visto cuando las proteínas pertenecen a la misma

subfamilia (identidad 60% y similitud 75%) (**Tabla 2**). Con esto se mostró la posible diferencia estructural de las proteínas de cada subfamilia de la superfamilia CHR. Sin embargo, esto no necesariamente influye para que los distintos homólogos CHR lleven a cabo la función como transportadores de cromato.

Debido a que la función de otros genes *chr* ha sido demostrada cuando se clonaron en cepas de *E. coli* o de *P. aeruginosa*, se comenzó el trabajo experimental clonando el gen *srpC* en el vector pUCP20 (**Fig. 12**), un vector binario de alto número de copias que se replica en los dos organismos mencionados. Se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en medio rico y medio mínimo en la cepa transformante de *P. aeruginosa* PAO1 (pUCSrpC). Con el gen *srpC* clonado en pUCP20 los resultados para ambos medios de crecimiento se encontró un comportamiento similar de susceptibilidad a la cepa utilizada como control sensible transformada únicamente con el vector PAO1 (pUCP20) (**Fig. 13**). Esto indica que en estas condiciones de crecimiento *srpC* no confirió un fenotipo de resistencia a cromato, siendo un resultado inesperado ya que para muchos homólogos CHR ampliamente estudiados se ha demostrado su función en *P. aeruginosa* (Aguilar-Barajas *et al.*, 2008; León-Márquez, 2009).

Se transfirió después al plásmido pUCSrpC a la cepa W3110 de *E. coli*, además que se incluyó al cósmido 2F10, que forma parte de una biblioteca genómica del plásmido pANL de *S. elongatus* que contiene el gen *srpC* junto con otros genes relacionados con el metabolismo de azufre. Esto se hizo considerando que estos genes probablemente influyen en la expresión de *srpC*. En los ensayos en CN, las cepas W3110(pUCSrpC) y W3110(2F10) mantuvieron un comportamiento similar al control sensible (**Fig. 14A**). Posteriormente se hicieron pruebas en medio mínimo M9 2 mM sulfato y se encontró que W3110(pUCSrpC) y W3110(2F10) mostraron una sensibilidad a cromato mayor con

respecto al control transformado únicamente con el vector (pUCP20) (**Fig. 14B**). Debido a que el gen *srpC* proviene de una región genómica involucrada con el metabolismo o transporte de azufre, se disminuyó el sulfato en medio M9 a 0.2 mM, para ver si esto pudiera influir para su expresión. Sin embargo, su comportamiento fue similar al control sensible (**Fig. 14C**).

Lo anterior indica que en el vector pUCP20 el gen *srpC* no se expresa para originar un producto que lleve a cabo su función como transportador de cromato, ya que no se vio un fenotipo de resistencia en *P. aeruginosa* ni en *E. coli*. Esto probablemente se debe a que algún componente de los medios de cultivo utilizados, como el sulfato, impide que el gen *srpC* en pUCP20 se exprese y por tanto lleve a cabo su función, debido a que como ya se mencionó, *srpC* proviene de un región que está involucrada con el metabolismo de azufre. Además que cuando hay una sobreexpresión de proteínas de membrana éstas con frecuencia se precipitan y forman agregados (Wagner *et al.*, 2007), lo que probablemente ocurra con la proteína SrpC cuando el gen *srpC* se expresa en pUCP20, que es un vector de alto número de copias. Sin embargo, en el cósmido 2F10 algunos de los genes aledaños a *srpC* puede influir de manera negativa sobre la expresión de *srpC*, debido a las concentraciones empleadas de sulfato en los medios utilizados.

Posteriormente se utilizó la cepa W3110(pACYC-SrpC), que solamente se había probado previamente en medio mínimo M9 2 mM (Aguilar- Barajas, 2010) y ahora se probó en otros medios de crecimiento. Los ensayos de susceptibilidad se realizaron inicialmente en CN, donde se encontró una considerable resistencia a cromato respecto a la cepa control (**Fig. 15A**). Se realizaron también los ensayos en M9 0.2 mM sulfato, donde se esperaba un fenotipo de resistencia a cromato similar al encontrado en CN; sin embargo, la cepa se comportó de una manera similar en cuanto a la susceptibilidad a cromato respecto al control

sensible (**Fig. 15B**). Esto indica que el vector pACYC184 de bajo número de copias, favorece la expresión del gen *srpC* en CN ya que presentó un fenotipo de resistencia a cromato; sin embargo, en M9 0.2 mM sulfato la expresión de *srpC* se ve afectada posiblemente por la baja concentración de sulfato empleada con el gen clonado en el vector pACYC184, ya que fue la única condición en donde no se vio la función de *srpC* en este vector.

Para saber si *srpC* se expresa de forma constitutiva o de forma inducible en presencia a cromato se hizo un análisis de la expresión para el gen *srpC* de *S. elongatus*. Estos ensayos además permiten conocer lo que puede suceder por los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad a cromato.

Se realizó el análisis de la expresión transcripcional mediante RT-PCR. Para ello se utilizó la cepa W3110(pACYC-SrpC), en los medios de crecimiento donde se vio la función de SrpC. También se utilizó la cepa W3110(2F10), debido a que los genes que se encuentran junto con *srpC* se localizan en una región relacionada con el metabolismo o transporte de azufre y éstos puedan influir para su expresión al variar la concentración de sulfato en el medio de cultivo.

Se obtuvo el RNA total de los cultivos sin cromato de la cepa W3110(pACYC-SrpC) y W3110(2F10) (**Fig. 16**) y se realizó el ensayo del RT-PCR, encontrando que sí ocurrió la expresión del gen *srpC* en estas cepas, en los diferentes medios de crecimiento utilizados (**Fig. 17**). Estos resultados indicaron que el gen *srpC* se transcribió en las condiciones utilizadas, aunque la expresión de 2F10 posiblemente se debe a los medios de crecimiento usados, debido a las concentraciones de sulfato empleadas considerando que *srpC* se encuentra asociado con genes involucrados en el metabolismo de azufre.

A continuación se hizo un análisis densitométrico para determinar si había una diferencia de expresión más clara que de forma visual no se observaba. El análisis corroboró que no hay una diferencia notable de expresión de *srpC* de las diferentes cepas en los medios utilizados, lo que indica que el gen *srpC* se transcribe de forma constitutiva (**Fig. 18**).

Posteriormente se realizaron los ensayos de RT-PCR a partir de cultivos con cromato, añadiendo una concentración mínima donde no se viera afectado el crecimiento de las cepas; esto para determinar si el cromato afectaba la expresión que se había visto anteriormente. Se observó una ligera disminución en la expresión del gen *srpC* ante la presencia a cromato en condiciones probadas con las diferentes cepas, respecto a los resultados observados en los ensayos sin cromato (**Fig. 21B**). En el análisis densitométrico, la cepa W3110(pACYC-SrpC) en CN no mostró una diferencia de expresión con respecto a los resultados vistos en los ensayos sin cromato (**Fig. 22**). Sin embargo, los resultados observados en medio mínimo 2 mM mostraron una diferencia de expresión significativa del gen *srpC* cuando está en presencia de cromato que cuando se encuentra sin este ión (**Fig. 22**). La cepa W3110(2F10), por otra parte, no presentó, en ambos medios de crecimiento utilizados, una diferencia significativa de expresión respecto a los ensayos sin cromato (**Fig. 24**). Los resultados obtenidos para W3110(pACYC-SrpC) indican que la expresión del gen *srpC* en CN no se ve afectado ante la presencia de cromato, pero de forma contraria en los ensayos vistos en M9 2 mM sulfato probablemente hay una represión de la expresión ante cromato, aunque para ambos medios de cultivo la expresión determinada probablemente sea la suficiente para presentar el fenotipo de resistencia a cromato que se vio en los ensayos de susceptibilidad (**Fig. 15**). Aunque estos resultados no concuerdan con los ensayos de susceptibilidad a cromato de la cepa con 2F10, ya que existe expresión aun con cromato pero que ésta probablemente vaya disminuyendo con respecto a mayor

concentración de cromato empleada en los ensayos de susceptibilidad y esto esto se deba a que alguno de los genes con los que se encuentra asociado *srpC* en la región de metabolismo de azufre en 2F10 influya en su expresión, ya que se identificó un posible regulador transcripcional denominado anL44 localizado rio arriba y éste pueda ser el causante de ello, regulándolo de manera contraria al gen *srpC*.

X. CONCLUSIONES

El gen *srpC* confirió resistencia a cromato en *E. coli*, lo que confirma su papel como un determinante de resistencia al oxianión.

El gen *srpC* se expresó de forma constitutiva y su expresión se vio ligeramente disminuida en presencia de cromato.

El gen *srpC* del cósmido 2F10 no confirió resistencia a cromato en *E. coli*, sin embargo, se observó su expresión, indicando que alguno de los genes aledaños a *srpC* afecta su transcripción.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Barajas, E. (2010). Análisis funcional de homólogos bacterianos de la superfamilia CHR. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Aguilar-Barajas, E., Paluscio, E., Cervantes, C. y Rensing, C. (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **285**:97-100.
- Alloway, B. J. (1990). Heavy Metals in Soil. Ed. Wiley, Nueva York.
- Álvarez, A. H., R. Moreno-Sánchez y Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **181**:7398-7400.
- Anderson R. A., (1997) Chromium as an essential nutrient for humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. **26**:535-541.
- Bachmann, B. J., Low, K. B. y Taylor, A. L. (1976). Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. Bacteriol Rev. **40**:116-167
- Ballatori, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. Environ. Health Perspect. **110**:689-694.
- Birnboim H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **24**:1513–1523.

- Branco, R., Chung, AP., Johnson, T., Gurel, V., Morais, P. y Zhitkovich, A. (2008). The chromate-inducible *chrFACB* operon from the transposable element *TnOtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. *J. Bacteriol.* **190**:6993-7003.
- Castenholz, R. W. (1982). Motility and taxes. En N. G. Carr & B. A. (eds.). Whitton. *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles. p. 413–439.
- Cervantes, C. y Campos-García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. En: Nies D. H, Silver S. (eds.). *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin. p. 407–420.
- Cervantes, C. y Silver, S. (1996). Sistemas de resistencia a metales en *Pseudomonas*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **38**:45-64.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:335-347.
- Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. K. Misra y Silver, S. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* **172**:287-291.
- Chen, Y., Holtman, C. K., Magnuson, R. D., Youderian, P. A. y Golden, S. S. (2008). The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plasmid* **59**:176-192.
- Díaz-Magaña, A., Aguilar-Barajas, E., Moreno-Sánchez, R., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, E., Vargas, E. y Cervantes, C. (2009). Short-chain chromate ion

transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**:5441-5445.

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

for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **241**:3962-3969.

- Frenkel, A., Gaffron, H. y Battley, E. H. (1950). Photosynthesis and photoreduction by the blue green alga, *Synechococcus elongatus*, Nag. *Biology Bulletin* **99**:157-162.
- Henne, K. L., Nakatsu, C. H., Thompson, D. K. y Konopka, A. E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiology* **9**:199.
- Holloway, BW. (1969). Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol Rev.* **33**:419-443.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, JF. (1982). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**:2989-2998.
- Jiménez-Mejía, R., Campos, J. y Cervantes, C. (2006). Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**:178-184.
- Johnson, P. W. y Sieburth, J. M. (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Ocenogr.* **24**: 928–935.

- Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N., GroBe, C. y Nies, D.H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. Arch. Microbiol. **179**:15-25.
- Kieser T. (1984). Factors affecting the isolation of CC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid **12**: 10-36.
- León-Márquez, Y. L. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Luna-Luna, M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- McGrath, S. P. y Smith S. (1990). Chromium and nickel. En: Heavy Metals in Soil. Alloway, B. J. (ed.). Wiley, New York. p. 125-146.
- Nicholson, M. L. y Laudenbach, D. E. (1995). Genes encoded on a cyanobacterial plasmid are transcriptionally regulated by sulfur availability and CysR. J. Bacteriol. **177**:2143–2150.
- Nies, A., D. H. Nies y S. Silver (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem. **265**:5648-5653.
- Nies, D. H. y Silver, S. (1989). Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. J. Bacteriol. **171**:4073-4075.

- Nies, D. H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. y Saier, M. H. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* **180**:5799-5802.
- Ohio Environmental Protection Agency (2002). Chromium and chromium compounds. Pollution Prevention Fact Sheet. No. 90. Columbus, Ohio.
- Ohtake, H., C. Cervantes y S. Silver (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**:3853-3856.
- Pardee, A. B., Prestidge, L. S., Whipple, M. B. y Dreyfuss, J. (1966). A binding site
- Perkins, F. O., Haas, L. W., Phillips, D. E. y Webb, K. L. (1981). Ultrastructure of a marine *Synechococcus* possessing spinae. *Can. J. Microbiol.* **27**: 318–329.
- Pimentel, B.E., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**:249-254.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2007). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* **21**:321–332.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. y Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiology.* **111**: 1–61.
- Saier, M. H., Jr (2003). Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.* **48**:1145-1156.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Shupak, S.I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ. Health Perspect.* **92**:7-11.
- Silver, S. y L. T. Phung (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**:587-605.
- Vincent, J. B. (2004). Recent developments in the biochemistry of chromium (III). *Biol. Trace Elem. Res.* **99**:1-16.
- Wagner, S., Baars, L., Yttersberg, J., Klussmeier, A., Wagner, C.S., Nord, O., Nygren, P., van Wijk, K.J. y de Gier, J. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics* **6**:1527-1550.
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Guillard, R. R. L. y Brand, L. E. (1979). Widespread occurrence of a unicellular marine planktonic cyanobacterium. *Nature* **277**:293-294.
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Valois, F. W. y Franks, D. G. (1986). Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Can Bull Fish Aquat Sci.* **214**: 71–120.
- Waterbury, J. B., Willey, J. M., Franks, D. G., Valois, F. W. y Watson, S. W (1985). A cyanobacterium capable of swimming motility. *Science* **30**: 74–76.
- West, S. E. y Schweizaer, H. P. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**:81-86.

- Wong, P. T. y Trevors. J. T. (1988) Chromium toxicity to algae and bacteria. En: Nriagu J. O., Nieboer E. (eds.). Chromium in the natural and human environments. Wiley, New York. p. 305-315.
- Zhitkovich, A., Quievryn, G., Messer, J., y Motylevich, Z. (2002). Reductive activation with cysteine represents a chromium (III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium (VI). Environ. Health Perspect. **110**:729-731.