



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

TESIS

Análisis de la función del gen *ywrc* de *Bacillus subtilis*

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

Selene Jacobo Arreola

ASESOR:

D.C. CARLOS CERVANTES VEGA

CO-ASESORA:

D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ

MORELIA MICH., OCTUBRE DE 2010

INDICE

INDICE	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.- GENERALIDADES DEL CROMO	1
2.- INTERACCIONES BACTERIANAS CON EL CROMO	1
3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A CROMATO	2
4.- ANÁLISIS FILOGÉNÉTICO DE LOS TRANSPORTADORES CHR	2
5.- GENES ADYACENTES A <i>chrA</i>	4
6.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA	8
7.- FAMILIA DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES Lrp	10
a) Estructura de las proteínas Lrp	12
b) Regulación de las proteínas Lrp	12
c) Función de las proteínas Lrp	13
II. ANTECEDENTES	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVO GENERAL	16
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Reactivos y Medios de cultivo	18
2. Cepas empleadas	18
3. Plásmidos empleados	19
4. Pruebas de susceptibilidad a cromato	19
5. Análisis de secuencias	22
6. Aislamiento de DNA plasmídico	22
7. Electroforesis en geles de agarosa	23
8. Aislamiento del DNA de geles de agarosa	24
9. Purificación de DNA total	24
10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
11. Tratamientos enzimáticos del DNA o RNA	25
a) Restricción con endonucleasas	25
b) Ligaciones	25
c) Tratamientos con DNAsa	27
12. Transformación	27
a) Preparación de células competentes	27
b) Transformación de <i>E. coli</i>	28
13. Aislamiento de RNA total	28
14. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)	29
IX. RESULTADOS	30
1.- Análisis de promotores y terminadores transcripcionales	30

2.- Probables proteínas homólogas a YwrC de <i>B. subtilis</i> -----	30
3.- Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de <i>B. subtilis</i> -----	37
4.- Clonación de los genes <i>chr</i> de <i>B. subtilis</i> 168 -----	37
5.- Clonación de los genes <i>chr</i> en el vector pGEM-T -----	37
6.- Subclonación en el vector pACYC184 -----	41
7.- Subclonación en el vector pUCP20 -----	41
8.- Pruebas de susceptibilidad a cromato -----	44
9.- Análisis transcripcional de los genes <i>chr</i> de <i>B. subtilis</i> expresados en <i>E. coli</i> -----	47
X. DISCUSIÓN -----	53
XI. CONCLUSIÓN -----	60
XII. BIBLIOGRAFIA -----	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte de cromato, toxicidad y resistencia en células bacterianas -----	3
Figura 2. Análisis filogenético de las proteínas de la superfamilia CHR -----	5
Figura 3. Distribución y organización de las proteínas pertenecientes a la superfamilia CHR -----	6
Figura 4. Comparación de los determinantes genéticos bacterianos de resistencia a cromato -----	9
Figura 5. Mapas del vector pGEMT -----	20
Figura 6. Mapas de los vectores pUCP20 y pACYC184 -----	21
Figura 7. Análisis la secuencia del gen <i>ywrC</i> de <i>B. subtilis</i> 168 -----	31
Figura 8. Alineamiento de las proteínas homólogas a YwrC -----	34
Figura 9. Alineamiento de las proteínas parálogas a YwrC -----	36
Figura 10. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>B. subtilis</i> -----	38
Figura 11. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>B. subtilis</i> B168 y A533 -----	39
Figura 12. Amplificación de los genes <i>chr</i> de <i>B. subtilis</i> 168 -----	40
Figura 13. Obtención del plásmido pGEywrC- <i>chr3NC</i> -----	42
Figura 14. Obtención del plásmido pACywrC- <i>chr3NC</i> -----	43
Figura 15. Obtención del plásmido pUCywrC- <i>chr3NC</i> -----	45
Figura 16. Susceptibilidad a cromato de cepas de <i>E. coli</i> con los genes <i>ywrC-<i>chr3N-<i>chr3C</i></i></i> de <i>B. subtilis</i> en un vector de bajo número de copias -----	46
Figura 17. Susceptibilidad a cromato de cepas de <i>E. coli</i> con los genes <i>ywrC-<i>chr3N-<i>chr3C</i></i></i> de <i>B. subtilis</i> en un vector de alto número de copias -----	48
Figura 18. Susceptibilidad a cromato de la cepa de <i>E. coli</i> pACywrC- <i>chr3NC</i> -----	49
Figura 19. Análisis de expresión del gen <i>chr3N</i> -----	51
Figura 20. Análisis de expresión del gen <i>chr3N</i> en presencia y ausencia de <i>chrS</i> -----	52
Figura 21. Mecanismo de regulación del gen <i>chrS</i> de <i>B. subtilis</i> -----	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR y RT-PCR de los genes <i>chr</i> de <i>B. subtilis</i> 168 -----	26
Tabla 2. Posibles proteínas homólogas a <i>ChrS</i> -----	32
Tabla 3. Proteínas parálogas a YwrC en el genoma de <i>B. subtilis</i> 168 -----	35

RESUMEN

El mecanismo de resistencia a cromato mejor estudiado es el conferido por el transportador de membrana ChrA que pertenece a la superfamilia CHR. Esta superfamilia comprende dos familias: proteínas grandes LCHR con un tamaño de ~400 aminoácidos (aa) y proteínas pequeñas SCHR de un tamaño de ~200 aa. El genoma de *Bacillus subtilis* 168 codifica un par de proteínas SCHR (Chr3N y Chr3C) que confieren resistencia a cromato cuando se expresan en pareja en *Escherichia coli*. Río arriba del gen que codifica a la proteína Chr3N, se encuentra el gen *ywrC* que tiene homología con la familia de proteínas reguladoras Lrp. Por lo anterior, se propone que *ywrC* es el regulador de la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C*, formando un operón. El objetivo de este trabajo es probar la funcionalidad del gen *ywrC* de *B. subtilis* 168. Mediante pruebas de susceptibilidad, se encontró que las mutantes *chr3N*⁻ y *chr3C*⁻ de *B. subtilis* son más sensibles a cromato que la cepa silvestre, mientras que la mutante *ywrC*⁻ presentó un fenotipo de resistencia a cromato. Estos resultados sugieren que el gen *ywrC*, denominado en este trabajo *chrS*, funciona como un regulador negativo que, al eliminarse, permite una mayor expresión de los genes *chr3N* y *chr3C*. El grupo de genes *chrS-chr3N-chr3C* se clonó en el vector de expresión pACYC184 y el plásmido recombinante se transfirió a *E. coli*. Mediante pruebas de susceptibilidad se encontró que en las transformantes de *E. coli* la resistencia a cromato disminuyó con la presencia de *chrS*, lo que confirmó el resultado obtenido con las mutantes de *B. subtilis* de que este gen actúa como un regulador negativo. Por otra parte, se analizó el patrón de expresión de los genes *chr3N* y *chr3C* al estar presente el gen *chrS*, mediante ensayos de RT-PCR. El resultado señaló que efectivamente el gen *chrS* reprime la expresión de los genes *chr* de *B. subtilis* 168 mientras que el cromato induce dicha expresión. Con esto se concluye que los genes *chrS-chr3N-chr3C* funcionan como un operón cuya expresión es regulada por el producto de *chrS* que probablemente es miembro de la familia Lrp de reguladores transcripcionales.



I. INTRODUCCION

1.- GENERALIDADES DEL CROMO

El cromo es un metal de número atómico 24, peso atómico 52 g/mol, localizado en el grupo VI B de la tabla periódica y es miembro de la primera serie de los metales de transición. El cromo es el séptimo elemento más abundante sobre la tierra. Diversos compuestos del cromo están presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras lo cual ha causado que sea considerado un serio contaminante ambiental (Khasim et al., 1989).

En la naturaleza, los estados más estables del cromo son el Cr(III) y el Cr(VI) (Cervantes et al., 2001). El Cr(VI) usualmente se encuentra en forma de los iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), los cuales atraviesan fácilmente las membranas biológicas haciéndolo más tóxico. El Cr(III), relativamente inocuo, se encuentra en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, los cuales son insolubles a pH cercano a 5.5; el Cr(III) frecuentemente se encuentra unido a materia orgánica en suelos y ambientes acuáticos. El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr(III); esta transformación es más rápida en ambientes ácidos (McGrath y Smith, 1990).

2.- INTERACCIONES BACTERIANAS CON EL CROMO

En un gran número de especies bacterianas se ha observado que el transporte del cromato (CrO_4^{2-}) a través de las membranas ocurre mediante la vía de captación del sulfato (SO_4^{2-}) debido a la similitud química que existe entre estos dos oxianiones; esto hace que el cromato sea un inhibidor competitivo del transporte de sulfato (Nies et al., 1989). En el citoplasma, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con la reducción



de Cr(VI) a Cr(III) que causa estrés oxidativo (Kadiiska et al., 1994). El Cr(III) puede ejercer efectos tóxicos adicionales por su capacidad para unirse a los fosfatos del DNA (Plaper et al., 2002) y a los grupos carboxilo y sulfhidrilo de las proteínas (Levis y Bianchi, 1982).

3.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A CROMATO

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de diversos metales tóxicos (Cr, Cu, Pb, Cd, Ag) (Silver y Phung, 2005). En el caso del cromo, estos mecanismos incluyen la reducción extracelular del Cr(VI), sistemas de reparación de daños al DNA y la protección contra estrés oxidativo, todos ellos codificados por genes cromosómicos (Ramírez-Díaz et al., 2008) (**Figura 1**). La resistencia conferida por plásmidos es a través de transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular. El sistema de expulsión del cromato se identificó inicialmente en los plásmidos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* y pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans* que codifican la proteína ChrA (Cervantes et al., 2001). Esta proteína expulsa el cromato del citoplasma en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria (Pimentel et al., 2002). La proteína ChrA posee 416 aminoácidos (aa) de los cuales el 62% son hidrofóbicos; su perfil hidropático sugirió inicialmente que ChrA es una proteína de membrana (Cervantes y Silver, 1992). Se encontró por medio de fusiones traduccionales con proteínas reporteras (fosfatasa alcalina y β -galactosidasa) que ChrA posee 13 segmentos transmembranales conectados por seis asas periplásmicas y seis citoplásmicas, con su extremo amino terminal localizado en el citoplasma y su extremo carboxilo terminal localizado en el periplasma (Jiménez-Mejía et al., 2006).

4.- ANÁLISIS FILOGÉNÉTICO DE LOS TRANSPORTADORES CHR

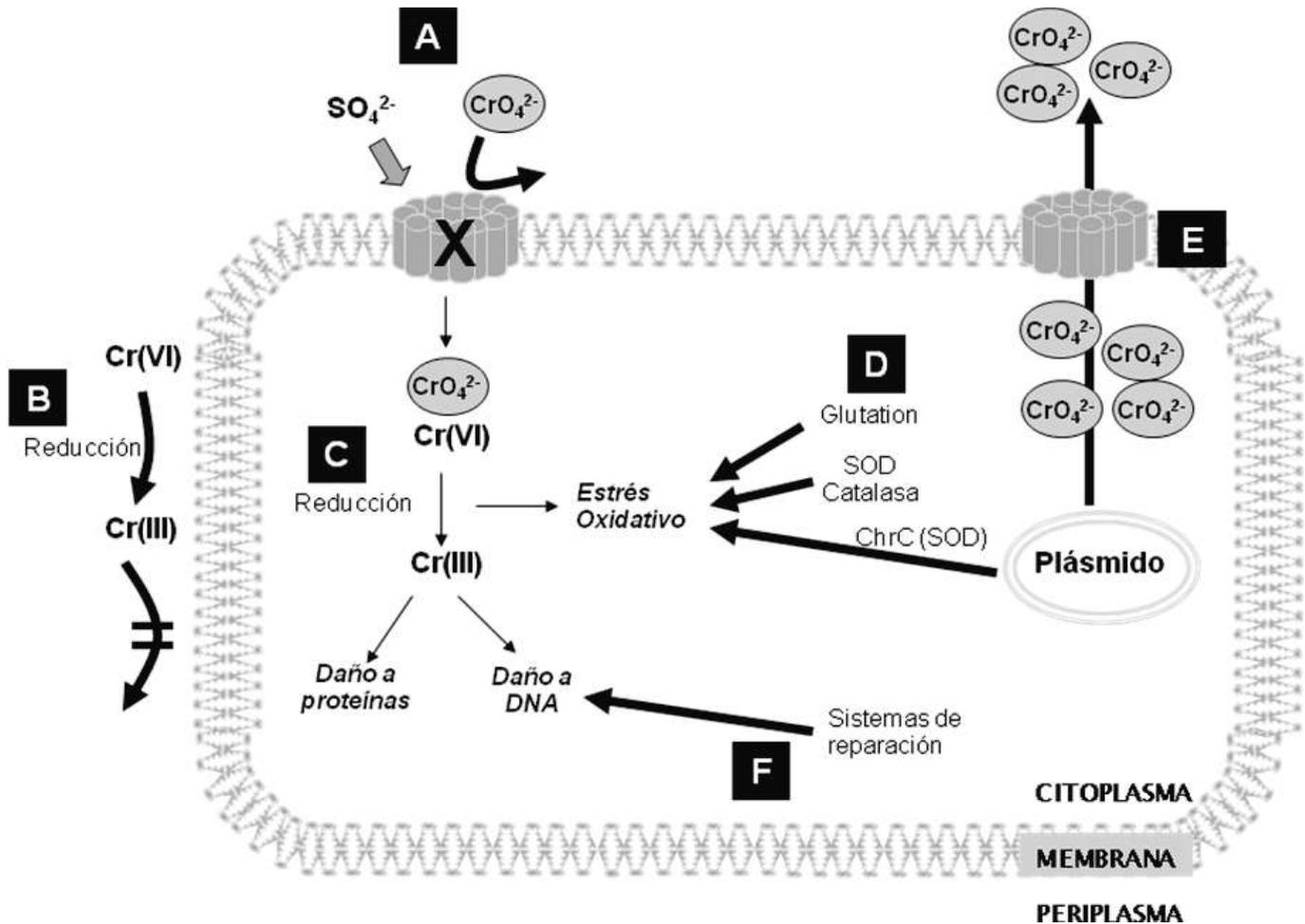


Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia a cromato en células bacterianas. Los mecanismos de daño y resistencia se indican con flechas delgadas y gruesas, respectivamente. (A) La ruta de captura de sulfato codificada en el cromosoma es utilizada por el cromato para entrar a la célula; cuando se muta el transportador de sulfato (X) el transporte de cromato disminuye. (B) La reducción extracelular de Cr(VI) a Cr(III), el cual no atraviesa la membrana. (C) La reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) puede generar estrés oxidativo así como daño a DNA y proteínas. (D) Enzimas destoxicantes están involucradas en la protección contra estrés oxidativo, minimizando los efectos tóxicos de cromato. (E) Transportadores codificados en plásmidos y cromosomas pueden expulsar cromato del citoplasma. (F) Los sistemas de reparación participan en la protección del daño generado por derivados de Cr (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2008).



La familia CHR fue descrita inicialmente por Nies et al. (1998) como un pequeño grupo de proteínas procarióticas involucradas en el transporte de cromato o de sulfato. Actualmente la base de datos de proteínas contiene varias docenas de homólogos de la proteína ChrA, por lo cual se realizó un análisis filogenético de los miembros de la superfamilia CHR, identificando 135 miembros, distribuidos en los tres dominios de la vida: Eubacteria, Archaea y Eukaryota (**Figura 2**) (Díaz-Pérez et al., 2007). La amplia distribución filogenética sugiere un origen común ancestral para la superfamilia CHR. De las 135 secuencias proteicas homólogas a ChrA de *P. aeruginosa*, 128 pertenecen a bacterias, una a arquea y seis a hongos.

Durante la búsqueda de las proteínas CHR por Díaz-Pérez et al. (2007) se identificaron proteínas grandes, denominadas CHR de cadena larga (LCHR) o bidominio, con un tamaño de 345-495 aa; y proteínas pequeñas a las que se les denominó CHR de cadena corta (SCHR) o monodominio, con un tamaño de 123-234 aa (**Figura 3**). Las proteínas bidominio (LCHR) están constituidas por dos dominios homólogos, lo que sugiere que su origen fue a través de un evento de duplicación y posterior fusión de dos genes contiguos que codifican a las proteínas SCHR, por lo que probablemente tanto las proteínas de cadena larga como las de cadena corta provienen de un mismo gen que codificaba a una proteína SCHR ancestral (Díaz-Pérez et al., 2007) (**Figura 3**).

5.- GENES ADYACENTES A ChrA

En varios organismos que tienen genes *chrA* las proteínas codificadas por genes adyacentes están relacionadas con su funcionalidad, generalmente por que funcionan como operones.

Cupriavidus metallidurans es un bacilo gram negativo no formador de espora, encontrado usualmente en suelos contaminados con metales pesados, es una bacteria aerobia, ca-

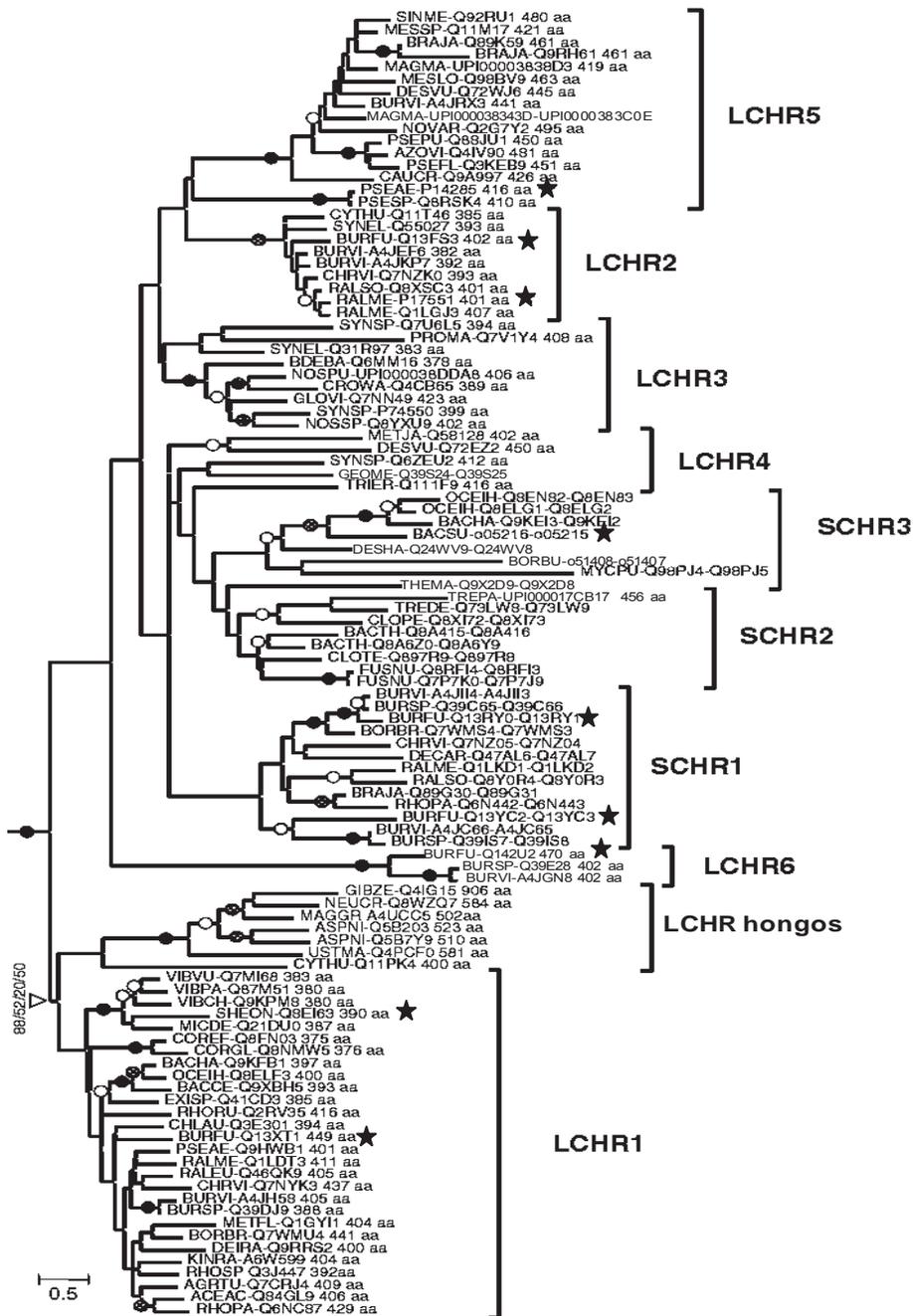


Figura 2. Análisis filogenético de las proteínas de la superfamilia CHR. Los nombres de las secuencias se indican por los nombres abreviados de las especies, seguidos del número de acceso de la base de datos Uniprot y del tamaño de la secuencia de la proteína (aa). Se indican con una estrella las proteínas de las que se posee evidencia experimental de su función. Modificada de Díaz-Pérez et al., 2007.

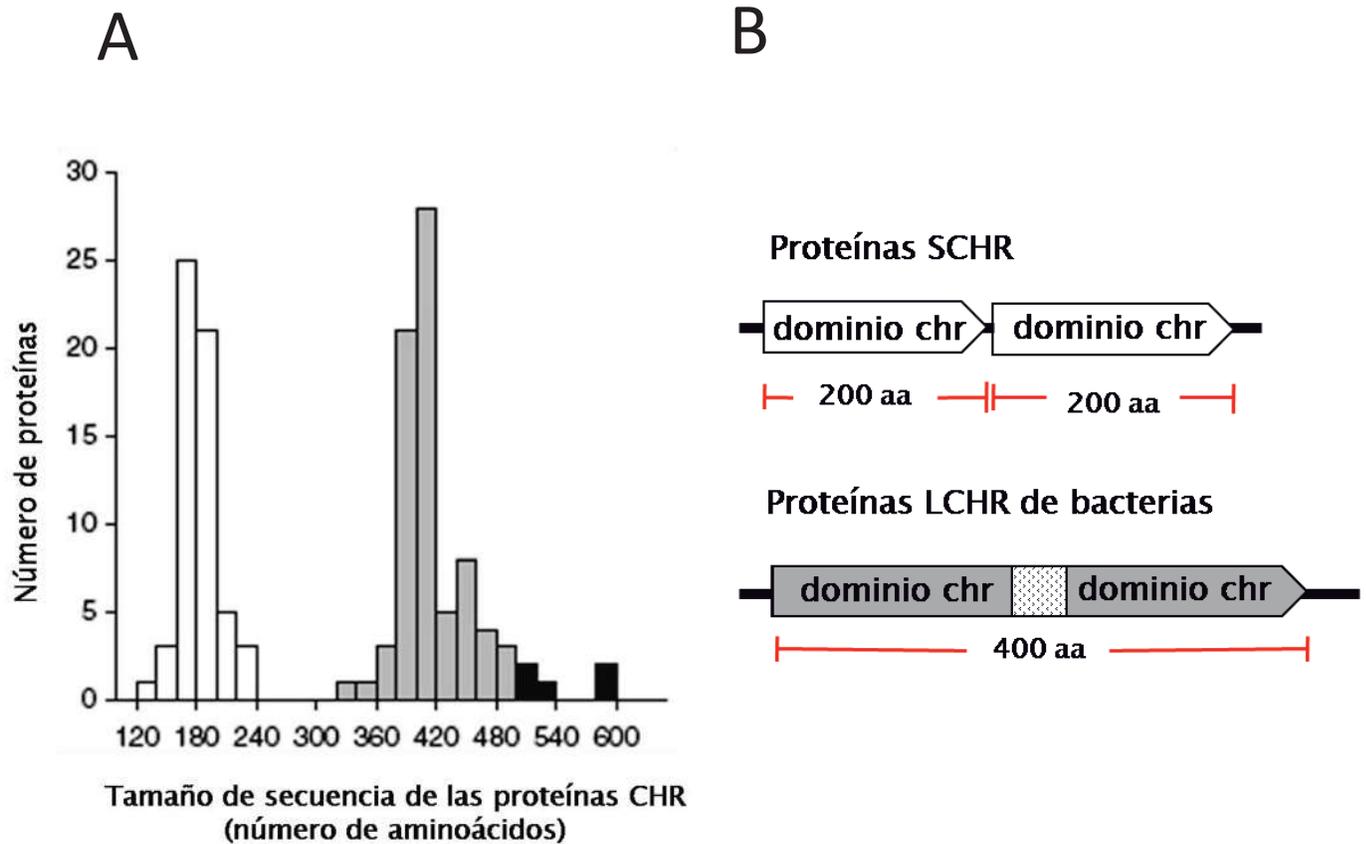


Figura 3. Distribución y organización de las proteínas pertenecientes a la superfamilia CHR. A) El primer grupo del histograma (barras en blanco) corresponde a las proteínas bacterianas de cadena corta o monodominio (SCHR); el segundo grupo (barras en gris) corresponde a las proteínas bacterianas de cadena larga o bidominio (LCHR); un tercer grupo incluye a las proteínas de hongos de cadena larga o bidominio (LCHR de hongos) (barras negras). B) Representación esquemática de los dominios en las proteínas pertenecientes a la superfamilia CHR. Se muestran SCHR bacterianas (monodominio) y LCHR bacterianas. Modificada de Díaz-Pérez et al., 2007.



paz de degradar xenobióticos en presencia de altas concentraciones de metales pesados. Tiene dos determinantes de resistencia a cromato: *chr₁* del plásmido pMOL28 (genes *chrI*, *chrB₁*, *chrA₁*, *chrC*, *chrE*, *chrF₁*) y *chr₂* en el cromosoma (genes *chrB₂*, *chrA₂*, *chrF₂*), que al expresarse en conjunto aumentan el nivel de resistencia a cromato (Juhnke et al., 2002). Al deletar varios genes, se encontró que *chrI*, *chrC*, *chrA₂*, *chrB₂* y *chrF₂* son indispensables para brindar resistencia a cromato. También se encontró que la proteína ChrC tiene actividad de superóxido dismutasa y que las proteínas ChrI, ChrB₁, ChrB₂, ChrF₁ y ChrF₂ funcionan como reguladores de la expresión de los genes involucrados en la resistencia a cromato (Juhnke et al., 2002).

Ochrobactrum tritici 5bv11 es una bacteria gram negativa, móvil, aerobia obligada, capaz de reducir nitratos, utiliza una variedad de aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos como fuentes de carbono, es un subgrupo de las α -proteobacterias estrechamente relacionado con el género *Brucella*. En el genoma de *O. tritici* se identificó el transposón TnOtChr que contiene el grupo de genes *chrB*, *chrA*, *chrC*, y *chrF*; todos ellos relacionados con la resistencia a cromato (Branco et al., 2008). Se observó que los genes *chrA* y *chrB* son esenciales para la resistencia a cromato, mientras que *chrB* actúa como regulador de la expresión del operón *chr*. ChrC tiene actividad de superóxido dismutasa y la expresión de las proteínas ChrC, ChrF, y ChrB juntas provee de una importante segunda línea de defensa ante una gran producción de superóxido en respuesta al cromato (Branco et al. 2008).

Shewanella sp. ANA-3 es un bacilo gram negativo, aerobio facultativo ampliamente distribuido en ambientes marinos y aguas dulces, es capaz de reducir varios metales por lo que puede ser usada en proyectos de biorremediación. Se encontró que tiene los genes plasmidicos de resistencia a cromato *chrB*, *chrA* y *chrC*, que forman un operón; se



observó que para aumentar los niveles de resistencia era necesaria la expresión del operón completo (Aguilar-Barajas et al., 2008).

Arthrobacter sp. FB24 es una bacteria gram positiva, con un contenido alto de G+C presente en suelos limpios o contaminados, presenta altos niveles de resistencia a una gran variedad de metales tóxicos, fue aislada de suelos contaminados con cromato de plomo. En su genoma se encontró un determinante de resistencia a cromato que consiste en ocho genes. Incluye *chrA* que codifica una posible proteína que expulsa el cromato, tres genes cuyo producto protéico tiene una secuencia de aminoácidos similar a los dominios amino y carboxilo de ChrB una probable proteína reguladora. Hay también tres genes que anteriormente no habían sido asociados a la resistencia a cromato en otras bacterias, que codifican una oxidorreductasa, una proteína con función desconocida y una lipoproteína (Henne et al 2009).

En todos los ejemplos antes mencionados los productos de los genes cercanos a los que codifican a la proteína ChrA actúan ya sea disminuyendo los daños por especies reactivas de oxígeno, como reguladores transcripcionales o como genes accesorios que aumentan la expresión de los genes *chr*.

En la **Figura 4** se muestra la comparación de determinantes genéticos *chr* de resistencia a cromato; en *Arthrobacter* sp. FB24 tiene un arreglo genético similar al encontrado en *Arthrobacter* sp. CHR15, mientras que difieren de los de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans* por el número y distribución de los determinantes, respectivamente; se observa que el transposon de *O. tritici* tiene un arreglo genético similar al determinante *chr1* de *C. metallidurans*. Genes adicionales involucrados en la resistencia a cromato en *C. metallidurans*, como los que codifican la superóxido dismutasa no están presentes en el resto de los organismos. En general se observa que son pocas las diferencias en la distribución o la diversidad de genes relacionados a la resistencia a cromato, sin embargo,

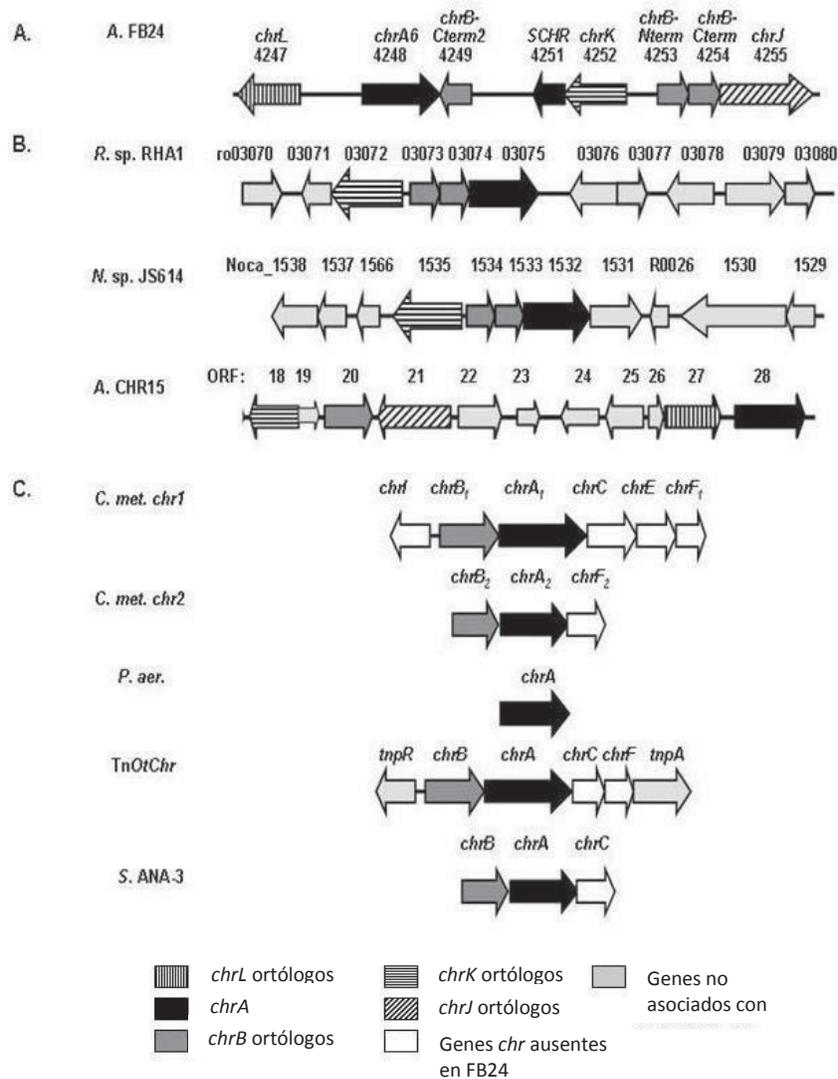


Figura 4. Comparación de los determinantes genéticos bacterianos de resistencia a cromato. Los genes así como la dirección de la transcripción, se encuentran representados por flechas; el nombre de los genes se encuentra sobre cada flecha. *R. sp. RHA1*, *Rhodococcus sp. RHA1* [GenBank: NC_008268]; *N. sp. JS614*, *Nocardiodes sp. JS614* [GenBank: NC_008699]; *A. CHR15*, *Arthrobacter sp. CHR15* plásmido pCHR15; *C. met. chr1* y *chr2*, *C. metallidurans* determinantes de resistencia a cromato 1 (plásmido pMOL28) y 2 (cromosomal); *P. aer.*, *P. aeruginosa* plásmido pUM505; *TnOtChr*, transposón de *Ochrobactrum tritici* 5bv11; *S. ANA-3*, cepa de *Shewanella sp.* operón *chrBAC*, plásmido 1 [GenBank: CP000470]. Modificado de Henne et al., 2009.



es probable que estas diferencias brinden mecanismos más eficientes y regulables necesarios para cada bacteria.

6.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

El mecanismo básico mediante el cual las bacterias controlan la transcripción de sus genes fue formulado por Jacob y Monod en 1961. Ellos propusieron que la expresión de los genes (transcripción) está regulada por las acciones negativas y positivas de proteínas de unión al DNA con especificidad de sitios, denominadas represores y activadores, respectivamente.

Los represores se unen a sitios operadores y bloquean la iniciación de la transcripción, mientras que los activadores se unen al DNA y estimulan la iniciación de ese proceso. Las afinidades de estas proteínas por el DNA están influidas por la unión de ligandos de bajo peso molecular que pueden actuar como inductores o correpresores. Tanto la inducción como la represión enzimática actúan a través del control de la transcripción en el paso de iniciación. Muchos genes se expresan únicamente cuando se necesitan los productos génicos correspondientes, es decir, para utilizar un sustrato disponible, para sintetizar un metabolito complejo que no está en el medio en el que crecen o para responder de algún modo a los cambios de las condiciones ambientales (Mathews et al., 2002).

Como consecuencia de las interacciones con el medio ambiente, las bacterias han desarrollado una gran variedad de arreglos regulatorios y una organización de los genes en grupos con función relacionada. Cuando un conjunto de genes comparte la misma unidad de transcripción, se le conoce como operón. De la misma forma, un regulón se describe como un grupo de genes dispersos a lo largo del genoma u operones regulados por la misma proteína en respuesta a un estímulo común (Maas y Clark 1964).

7.- FAMILIA DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES Lrp



Existe una gran variedad de reguladores transcripcionales en las bacterias uno de estos grupos es el de los reguladores Lrp. La familia Lrp de reguladores transcripcionales se encuentra distribuida en bacterias y arqueas actuando como sistemas reguladores del metabolismo de aminoácidos o procesos relacionados, de manera global y específica, frecuentemente en respuesta a la presencia de aminoácidos exógenos (Brinkman et al., 2003).

En 44 de 83 genomas bacterianos analizados (53%) se han identificados uno o más reguladores transcripcionales Lrp. Cerca de 45% de genomas bacterianos (30 de 67) y 94% (15 de 16) de arqueas contienen al menos un homólogo Lrp (Brinkman et al., 2003). En los genomas eucariotes no se han identificados homólogos Lrp, por lo que se piensa que estos reguladores transcripcionales están restringidos a procariotes.

El miembro mejor estudiado de la familia Lrp es el de *E. coli* (EcoLrp) (Thaw et al., 2006). La Proteína Reguladora en respuesta a Leucina (Lrp) es un regulador global en *E. coli*, que afecta la expresión de varios genes y operones. En *E. coli*, la proteína Lrp frecuentemente actúa en conjunto con otros reguladores globales (Mathew et al., 1996) como CRP (Proteína Receptora de AMPc) (Weyand et al., 2001), IHF (Factor de Integración al Huésped) (Paul et al., 2001) y la proteína histona H-NS (Levinthal et al., 1994).

La amplia distribución de homólogos Lrp en arqueas y bacterias sugiere que este tipo de reguladores estuvo presente en un ancestro universal común. En algunos genomas, docenas de parálogos de Lrp están presentes (e.g. 20 copias en *Mesorhizobium loti*), en otros unos cuantos (e.g. tres copias en *E. coli*), o ninguno (e.g. *Buchnera* spp., *Mycoplasma* sp. y *Chlamydia* spp.) (Brinkman et al., 2003).

Los miembros de la familia Lrp son pequeñas proteínas de unión al DNA con masas moleculares de alrededor de 15 kDa (~165 aa). El estado multimérico de homólogos Lrp



a partir de organismos tan distintos como *E. coli* (Willins et al., 1991, Chen et al., 2001a), *Agrobacterium tumefaciens* (Jafri et al., 1999), *P. aeruginosa* (Madhusudhan et al., 1995) y *Pyrococcus furiosus* (Brinkman et al., 2000) incluye dímeros, tetrámeros, octámeros y hexadecámeros.

En *E. coli* se ha demostrado que la unión no específica de Lrp al DNA varía significativamente, dependiendo de las condiciones nutricionales y la fase de crecimiento (Chen et al., 2001b). Los niveles de Lrp varían en función de la fase de crecimiento en las células que crecen en medio rico, pero en células crecidas en medio mínimo, no hay variación. Se han reconocido seis patrones diferentes de regulación por Lrp, dependiendo de si actúa positiva o negativamente y la manera en que la leucina afecta la expresión (Chen et al., 2001b).

a) Estructura de las proteínas Lrp

Las proteínas Lrp contienen tres dominios funcionales de tamaños equivalentes: un dominio N-terminal que tiene el sitio de unión al DNA (dominio N-terminal con conformación hélice-vuelta-hélice (HTH)), un dominio intermedio que es el responsable de la activación de la transcripción y un dominio C-terminal (conformación $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ o “ $\alpha\beta$ -sandwich”) que es requerido para responder a leucina (Ettema et al., 2002).

b) Regulación de las proteínas Lrp

Se ha reportado que varios reguladores transcripcionales procarióticos (e.g. CRP, LacI, BirA, AraC) responden a la interacción con sus efectores específicos con cambios estructurales pequeños pero significativos (Harman, 2001). La observación de que una gran variedad de polipéptidos son regulados por Lrp de forma independiente a leucina exógena plantea la cuestión de cómo se modula el efecto de Lrp en estos polipéptidos. Si esta regulación es en efecto modulada en respuesta a la alteración de las condiciones fisiológicas, la actividad de la proteína Lrp puede ser modulada, ya sea por metabolitos no



identificados o por interacción con otras proteínas reguladoras, cuya expresión o actividad es modulada en respuesta a las cambiantes condiciones fisiológicas (Ernsting et al., 1991).

c) Función de las proteínas Lrp

De los cientos de homólogos Lrp que se han identificado en genomas procariotes, sólo un pequeño número se ha caracterizado. En miembros de las γ -proteobacterias Lrp parece estar bien conservado teniendo elevados porcentajes de identidad con miembros de *Salmonella typhimurium* (99%), *Yersinia pestis* (93%) y *Haemophilus influenzae* (77%). Algunos autores proponen que el rol de regulador global de Lrp está limitado a bacterias entéricas, permitiéndoles adaptarse a sus extremos nichos ecológicos, aunque esto no quiere decir que en otros organismos las proteínas Lrp necesariamente lleven a cabo función reguladora (Friedberg et al., 2001).

Un análisis de la secuencia del DNA de *B. subtilis* 168 mostró un número inesperado de homólogos Lrp (LrpA, LrpB, LrpC, AziB, YezC, YwrC y YugG), cuyo grado de identidad con la proteína EcoLrp está entre 25 y 34% (Beloin et al., 2000). La redundancia de los genes *lrp* en *B. subtilis* y la información disponible de cuatro proteínas (LrpA, LrpB, AziB y LrpC) podría indicar que tal vez actúan cooperativamente en diferentes situaciones que permiten a *B. subtilis* adaptarse a cambios en la disponibilidad de nutrientes u otros parámetros de crecimiento celular.



II. ANTECEDENTES

La funcionalidad de las proteínas de la familia LCHR de la superfamilia CHR se ha estudiado ampliamente, pero hasta hace muy poco no se contaba con reportes acerca de las funciones de las proteínas pequeñas de la familia SCHR. Al encontrar solo cuatro organismos de las 135 secuencias que componen la superfamilia CHR (*Desulfotomaculum reducens* MI-1, *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901 y *Legionella pneumophila* str. Len) que tienen un solo gen *chr* monodominio, se sugirió que la mayoría de las proteínas SCHR no son funcionales como monómeros (Díaz-Pérez et al., 2007). Se postuló también que posiblemente las proteínas SCHR poseen una estructura de heterodímero dada por los dos polipéptidos codificados por los genes *chr* monodominio contiguos, los cuales se relacionan con la parte amino y carboxilo terminal de proteínas bidominio (LCHR) presentes en la superfamilia CHR (Nies et al., 2003). En el genoma de *B. subtilis* 168 se localizó un par de genes *schr* (inicialmente llamados *ywrA* y *ywrB*) que codifican a las proteínas Chr3N y Chr3C, pertenecientes a la subfamilia SCHR3. Estas proteínas confieren resistencia a cromato en *E. coli* solamente cuando ambas proteínas se expresan, confirmando que las proteínas SCHR no son funcionales como monómeros (Díaz-Magaña et al., 2009). Este fue el primer reporte acerca de la funcionalidad de proteínas SCHR. Los genes que codifican este par de proteínas monodominio se encuentran traslapados y se transcriben a través de un RNA mensajero bicistrónico, generado probablemente por un promotor río arriba del gen *chr3N* (Díaz-Magaña et al., 2009). Río arriba del gen *chr3N* se encuentra el gen *ywrC*, que codifica una proteína predicha que tiene homología con miembros de la familia de reguladores transcripcionales Lrp. Por esta razón se propone en este trabajo que el gen *ywrC*, forma parte de un operón



en conjunto con los genes *schr* y que su producto funciona como un regulador transcripcional que controla la expresión de los genes adyacentes.



III. JUSTIFICACION

Se ha observado que aledaño a algunos genes *chr* se encuentran genes que actúan como reguladores, formando operones. Una vez determinada la función de resistencia a cromato del par de genes *schr* de *B. subtilis* y debido a que no se tiene información acerca de la regulación de éstos, es importante estudiar el papel del gen *ywrC* como un probable regulador de la expresión de los genes *schr*.

IV. HIPOTESIS

El gen *ywrC* participa en la regulación de la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C* de *B. subtilis* 168.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del gen *ywrC* sobre la regulación de la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C*.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Caracterizar mutantes de *B. subtilis* 168 afectadas en los genes *chr3N*, *chr3C* y *ywrC*.
- 2.- Determinar el efecto de *ywrC* sobre la función de los genes *chr3N-chr3C*.
- 3.- Determinar el efecto del gen *ywrC* sobre la expresión de *chr3N-chr3C*.



VII. EXTRATEGIA EXPERIMENTAL

OBJETIVO 1

Determinar la susceptibilidad a cromato de mutantes de *B. subtilis*

Medio rico (LB)

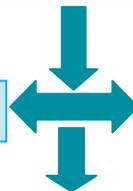


Medio mínimo (M9)

OBJETIVO 2

Clonar el grupo de genes *ywrC-chr3N-chr3C* de *B. subtilis* en:

pUCP20 vector de alto No. de copias



pACYC184 vector de bajo No. de copias

Transferir los plásmidos recombinantes a *Escherichia coli*

Determinar la susceptibilidad a cromato de las transformantes

OBJETIVO 3

Analizar la expresión mediante RT-PCR del gen *chr3N*

En ausencia del gen *ywrC*



En presencia del gen *ywrC*

Con cromato / Sin cromato



VIII. MATERIALES Y METODOS

1.- REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

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

- Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- Agar Luria Bertani (AL): Al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico.
- Caldo nutritivo (CN): peptona de gelatina 0.5% y extracto de carne de res 0.3%.
- Medio mínimo (M9): sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, CaCl₂ 2H₂O 0.1 mM y MgSO₄ 7H₂O 2mM (Sambrook et al., 1989).

2.- CEPAS EMPLEADAS

■ *Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*, BGSC 1A1) donada por el Dr. Mario Pedraza Reyes; Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato.

■ Mutantes por mutación insercional de *B. subtilis* 168: A569 (*chr3C*), A570 (*chr3N*) y A533 (*ywrC*) donadas por el Dr. Hironori Niki; Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, Japan.

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

■ JM101. *supE*, *thi-1* Δ (*lac-proAB*) [F', *traD36*, *proAB*, *laq*^qZΔM15] (Yanisch-Perron et al., 1985).

■ XL1-Blue. *end A1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* *supE44* *recA1* *lac* [F' *proAB* *laq*^q ZΔM15 Tn10 (Tc)] (Stratagene).

■ W3110. F', *mcrA*, *mcrB* in (*rrnD-rrnE*) (Hayashi et al., 2006).



3.-PLÁSMIDOS EMPLEADOS

- pGEM-T (Promega), utilizado para la recuperación de productos de PCR, tiene en sus extremos 3' o 5' dos timinas que favorecen la ligación de los productos de PCR, cuenta con un gen de resistencia a ampicilina y porta un segmento de DNA que codifica la región amino terminal de la β - galactosidasa, que permite la alfa complementación. Las bacterias Lac⁺ forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido). Un inserto dentro de *lacZ* impide la actividad enzimática y se originan colonias blancas Lac⁻ (Figura 5A).
- pUCP20, vector de clonación de alto número de copias que contiene un gen de resistencia a ampicilina y orígenes de replicación para *E. coli* y *P. aeruginosa* (West y col., 1994). En *E. coli* presenta un número de copias de alrededor de 500 (Figura 6A).
- PACYC184, vector de clonación de bajo número de copias con alrededor de 15 copias por célula y genes de resistencia a cloranfenicol y tetraciclina (Sambrook et al., 1989) así como origen de replicación para *E. coli* (Chang y Cohen, 1978; Rose, 1988) (Figura 6B).

4.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO

De un cultivo que se incubó durante toda la noche se tomaron 40 μ l para inocular tubos con 4 ml de medio CL o medio mínimo M9 con concentraciones crecientes de cromato. Los tubos se incubaron 22 h para los cultivos de *E. coli* y de *B. subtilis* en medio mínimo y de 8 h para *B. subtilis* en CL a 37°C con agitación constante (220 rpm). La susceptibilidad a cromato se determinó en función del crecimiento de los cultivos al medir la absorbencia

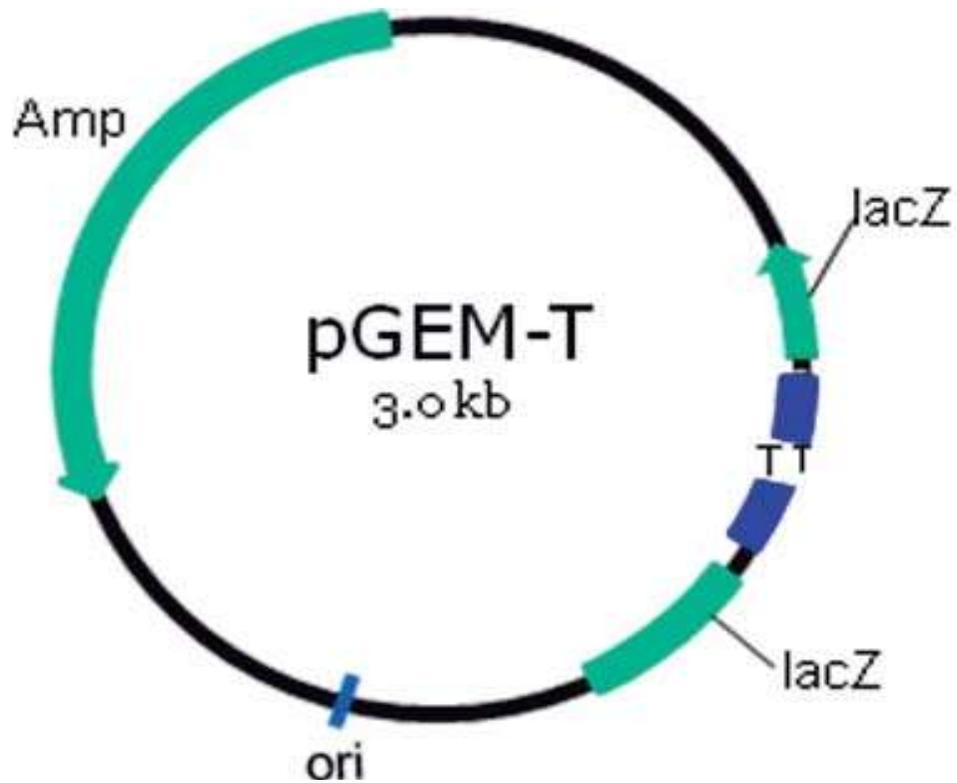
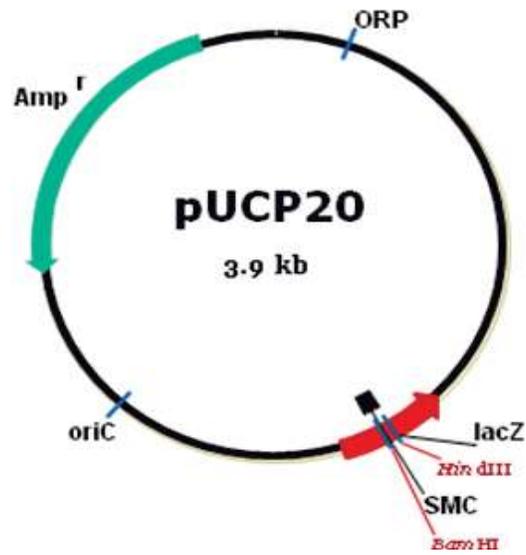


Figura 5. Mapa del vector pGEM-T. Empleado para la recuperación de fragmentos provenientes de PCR. amp, gen de resistencia a ampicilina; ori, origen de replicación para *E. coli*; lacZ, porción codificante de la β -galactosidasa; T, timinas en los extremos 3' o 5' del vector que permite la complementariedad de las bases con las adeninas que flanquean a los productos de PCR. (Promega).



A



B

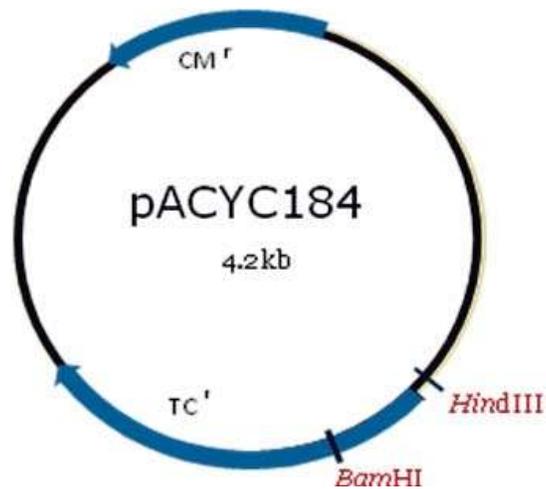


Figura 6. Vectores. A) Mapa del vector binario pUCP20 de alto número de copias. Amp, gen de resistencia a ampicilina; ori y ORP, orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas*, respectivamente; rep, gen que codifica para una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; lacZ, una parte del gen β -galactosidasa y SMC, sitio múltiple de clonación (West et al., 1994). B) Mapa del vector pACYC184 de bajo número de copias. Tc^r, gen de resistencia a tetraciclina; Cm^r, gen de resistencia a cloranfenicol. Se muestran los sitios de reconocimiento para algunas endonucleasas.



a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21.

5.- ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Se realizaron búsquedas de secuencias a través del servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). De esta base de datos se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para realizar alineamientos de las secuencias de interés. En http://www.fruitfly.org/seq_tools/other.html se realizó el análisis del promotor del gen *ywrC*, 310 aa río arriba del codón de inicio. En <http://www.softberry.ru/cgi-bin/programs/gfindb/findterm.pl> se realizó la búsqueda de terminadores transcripcionales. También se utilizó el programa Bioedit para realizar alineamientos (Clustal W) entre proteínas homólogas y parálogas de YwrC.

6.- AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

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

Un cultivo bacteriano crecido en CL durante 18 h a 37°C con agitación (220 rpm) se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución STE [Sacarosa 50 mM, Tris-HCl (hidroximetilaminometano- ácido clorhídrico) 25 mM pH 8.0 y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM pH 8.0] y se le adicionaron 20 µl de lisozima (20mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C por 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 300 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1%, se agitó suavemente y se mantuvo en hielo. Se le adicionó 250 µl de una solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8 (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial), se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó



durante 10 min a 13000 rpm y posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 μ l de la mezcla fenol/cloroformo 1:1, mezcló moderadamente procediendo a centrifugar durante 10 min a 13000 rpm, recuperándose la fase acuosa superior a la que se le agregó 500 μ l de cloroformo se mezcló suavemente procediendo a centrifugar durante 3 min a 13000 rpm se transfirió la fase superior a otro tubo y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío. Se incubó durante 20 min a -80°C o 1 hora a -20°C . Se centrifugó durante 15 min temperatura ambiente a 13000 rpm y la pastilla se lavó dos veces con 500 μ l de etanol al 70% centrifugando durante 3 min entre cada lavado. Se secó la pastilla a 65°C y se resuspendió en 50 μ l de agua HPLC estéril. Se adicionó 5 μ l de RNasa (a concentración de 2 mg/ml) se incubó a 37°C durante 30 min y se inactivó a 65°C por 15 min. Las muestras se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

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



8.- AISLAMIENTO DEL DNA DE GELES DE AGAROSA

Para purificar el DNA empleado en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

9.- PURIFICACIÓN DE DNA TOTAL

Se recuperó la pastilla celular de un cultivo crecido toda la noche, se centrifugó 2 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución TE 50/20 y se centrifugó nuevamente. Se adicionó 450 µl de solución TE 50/20 y se resuspendió. Se agregó 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló en vortex y se incubó 30 min a 37°C. Se adicionaron 25 µl de pronasa (pronasa E o proteinasa K 20 mg/ml), se mezcló y se incubó 15 min a 37°C. Se agregaron 50 µl de SDS al 10%, se mezcló en vortex e incubó 15 min a 37°C. Se incubó la solución de CTAB/NaCl (bromuro de cetiltrimetilamonio/cloruro de sodio) a 65°C. Se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M, se mezcló vigorosamente en vortex y se incubó a 65°C por 5 min. Se agregaron 80 µl de solución CTAB/NaCl mezclando en vortex, se incubó 10 min a 65°C. Se adicionó 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex hasta homogenizar y se centrifugó 5 min a 10000 rpm. Se transfirió la fase acuosa y se agregó 500 µl de fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), se mezcló en vortex y centrifugó 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 1 ml de etanol absoluto. Se mantuvo 1 hora a -20°C o 20 minutos a -80°C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se lavó la pastilla 3 veces con etanol al 70%. Se secó la pastilla y se resuspendió en 45 µl de agua HPLC o buffer TE (Tris-EDTA), se agregaron 5 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 15 min. Se inactivó la RNasa a 65°C durante 10 min. Se corrieron 2-5 µl en un gel de agarosa.



10.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia de las regiones aledañas a los genes que se pretenden amplificar (**Tabla 1**). Se hizo una mezcla que contiene DNA cromosómico de *B. subtilis* 168, oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 20 picomoles (pmol); 12.5 µl de la mezcla de reacción Super Mix II que contiene la enzima *Taq* polimerasa, anticuepos anti-*Taq*, una proteína AccuPrime termoestable, MgCl₂ y dNTPs a concentraciones optimizadas. La mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 seg, alineamiento a 48°C por 40 seg y extensión a 72°C 2 min 30 seg, por último a un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Lo anterior se realizó en un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cycle.

11.- TRATAMIENTOS ENZIMATICOS DEL DNA o RNA

a) Restricción con endonucleasas

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

b) Ligaciones

Después de la recuperación y purificación de los fragmentos de DNA del gel de agarosa fueron ligados utilizando la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). Las ligaciones se dejaron como mínimo toda la noche a 4°C y las proporciones inserto-vector variaron según el experimento realizado. Se emplearon de 3-5 µl de la mezcla de ligación en la transformación.



Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR y RT-PCR de los genes *chr* de *Bacillus subtilis* 168.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5' --> 3')		DIRECCION
a) PCR				
<i>ChrS-chr3N-chr3C</i>	B_Sub_YwrCD	CGT TGC CTC CCT TAT <u>CTA GAA</u> TGC	a	DIRECTO
	Bsu_A_R	GAA GGT CCA <u>GGA TCC</u> TGT TTG G	b	REVERSO
b) RT-PCR				
<i>chr3N</i>	RT-PCR ChrASn_D	TCT GCC TAC ATG TCT TGC GAT GGT		DIRECTO
	RT-PCR ChrASn_R	ATG ACC AGG CCG GGA TTA ATC TGT		REVERSO

a) Oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR. Subrayados y en rojo se indican los sitios de restricción para las enzimas ^a *XbaI* y ^b *BamHI* introducidos en la secuencia de los oligonucleótidos. b) Oligonucleótidos empleados para la amplificación por RT-PCR y PCR de la región interna del gen *chr3N*.



c) Tratamiento con DNAsa

El RNA total fue tratado con RQ1 RNase-Free DNAsa (Promega) utilizando una unidad por μg de RNA. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 10 min. Posteriormente se adicionó $1\mu\text{l}$ de solución de paro y se incubó a 65°C durante 5 min para inactivar la DNAsa. Las muestras se almacenaron a -70°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

12.- TRANSFORMACION

a) Preparación de células competentes

* *Escherichia coli*

De un cultivo crecido durante toda la noche se tomaron 4 ml para inocular 250 ml de CL contenidos en un matraz de 1L y se incubó durante 3 h a 37°C con agitación constante hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente se mantuvo el cultivo en hielo durante 20 min y se distribuyeron alícuotas en tubos para centrifugar durante 10 min a 9500 rpm a 4°C . La pastilla se lavó dos veces por resuspensión con agua estéril fría y se centrifugó entre cada lavado en las condiciones antes descritas. Después del último lavado la pastilla se resuspendió en agua estéril más glicerol al 20%. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 0.2 ml en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Estas células se utilizaron para la transformación o bien fueron almacenadas a -80°C (Sambrook et al., 1989).

* *Bacillus subtilis*

Medios

-Sales Bacillus 10X: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , citrato de sodio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, agua.

-Medio A: Agua estéril, Base medio A 10X y Sales Bacillus 10X.

-Medio B: Medio A, 50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 250 nM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.



-Base Medio A 10X: extracto de levadura, casaminoácidos, agua destilada, glucosa al 50%

Se inocularon 10 ml de medio A de un cultivo crecido toda la noche a 37°C, se leyó la absorbencia a 650 nm en el espectrofotómetro, posteriormente se realizó una dilución con medio A nuevo hasta obtener una absorbencia de 0.1 – 0.2. Después se incubó el cultivo a 37°C con agitación constante y se leyó la absorbencia cada 30 min; se graficó hasta obtener la t_0 (punto en el cual las células entran en fase estacionaria). A partir de este punto se incubó 90 min más y después se transfirieron 500 μ l del cultivo a un tubo con 450 μ l de medio B precalentado a 37°C, se incubaron los cultivos diluidos a 37°C por 90 min. Para realizar la transformación se adicionó 1 μ g de DNA a las células competentes y se incubó a 37°C por 30 min (Yasbin et al., 1975).

b) Transformación de *E. coli*

Se utilizaron de 3-5 μ l de una mezcla de ligación de DNA, la cual se adicionó a 100 μ l de células competentes. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación previamente enfriada en hielo para después ser colocada en un electroporador 2510 de Eppendorf al cual se le dio un pulso de 2.4 KV. Inmediatamente después se le adicionó 2 ml de CL precalentado y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación constante. Se tomaron 100 μ l de la mezcla previamente concentrada y se plaqueó en cajas con el antibiótico adecuado para seleccionar las clonas.

13.- Aislamiento de RNA total

El RNA total se obtuvo utilizando el reactivo TRI Reagent Solution (Ambion), de acuerdo al siguiente protocolo:

Un cultivo bacteriano crecido en 4 ml de M9 durante 18 h a 37°C con agitación constante se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm. Se



decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 μ l de Lisozima/TE (4 mg/ml), se incubó a 37°C por 5 min, después se le adicionó 1 ml de reactivo TRI, procediendo a centrifugar por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se adicionó 200 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se centrifugó por 10 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se adicionó 500 μ l de isopropanol, se agitó vigorosamente durante 10 seg y se centrifugó por 10 min a 4°C. El sobrenadante se removió cuidadosamente, se transfirió a otro tubo, se le adicionó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Se removió el etanol, se secó la pastilla de 3-5 min a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 25 μ l de agua libre de nucleasas. Las muestras se almacenaron a -70°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

14.- Transcripción reversa – PCR (RT-PCR)

El RT-PCR fue realizado con el RNA total aislado y con el kit Master Amp RT-PCR (Epicentre Biotechnologies) de un sólo paso, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron los oligonucleótidos presentados en la **Tabla 1**.



IX. RESULTADOS

1.- Análisis de promotores y terminadores transcripcionales

Con la finalidad de encontrar regiones conservadas que sugieran que se trata de un gen funcional, se analizó la secuencia del extremo 5' del gen *ywrC* que se encuentra en la posición 3720925 a 3721401 en el genoma de *B. subtilis* 168. Como se muestra en la **Figura 7** se encontraron posibles regiones consenso -35 y -10 de promotores; también se identificó un posible sitio de unión al ribosoma pero no se encontró terminador transcripcional. En el análisis de la secuencia de *ywrC* fueron identificados el codón de inicio (TTG) y el codón de paro (TAA) necesarios para la traducción de la proteína correspondiente, así como también el codón de inicio del gen *chr3N* (ATG) (**Figura 7A**). Debido a las regiones conservadas encontradas en el gen *ywrC*, este análisis nos indica que es posible la expresión y funcionalidad del gen. Con la ayuda del programa blast2seq del ncbi se encontró que una probable región de unión al DNA (**AGAATTTTATTCT**) aparece cuatro veces en el gen *ywrC* (**Figura 7A**).

2.- Probables proteínas homólogas a YwrC de *B. subtilis*

Se realizó una búsqueda de probables proteínas homólogas a ChrS para conocer el grado de identidad y si tienen alguna función asignada, que coincida con la probable función reguladora del producto del gen *ywrC*. Fue de nuestro interés analizar con más detalle las proteínas obtenidas en el blast, el arreglo génico y características. La **Tabla 2** muestra que los organismos que poseen los probables homólogos son principalmente del género *Bacillus* o de géneros relacionados (*Geobacillus*, *Paenibacillus* y *Clostridium*), cuyas especies son capaces de sobrevivir en medios hostiles mediante la formación de estructuras de resistencia, las endosporas.

Adicionalmente se encontró un organismo Gram negativo (*Halothermothrix orenii* H168)

Tabla 2. Posibles proteínas homólogas a YwrC de *B. subtilis*

Organismo	Nº de aa	Función de proteínas codificadas por genes adyacentes a homólogos Lrp ¹	I/S *	Nº acceso
<i>Bacillus subtilis</i> 168	158	Probable gamma glutamil transferasa/ transportadores de iones	-	GeneID: 936886
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	158	Probable gamma glutamil transferasa/ Probable transportador de cromato	87/94	GeneID: 3028203
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	158	Probable gamma glutamil transferasa/ Probable transportador de cromato	88/93	GeneID: 5460409
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	158	?	85/93	ZP_03054958.1
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	170	Acetolactato descarboxilasa/ transportador CHR	78/86	GeneID:5622568
<i>Paenibacillus sp.</i> JDR-2	160	Gamma glutamil transferasa/ transportador cromato	66/81	GeneID:8129521
<i>Geobacillus sp.</i> Y412MC10	160	Transportador de cromato/ Proteína CapA (síntesis de capsula)	64/79	GeneID:8515436
<i>Bacillus coagulans</i> 36D1	158	?	63/82	ZP_04430387.1
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	149	Transportador de oligopéptidos ABC /Proteína Q de fase II de esporulación	49/68	GeneID:4968209
<i>Geobacillus sp.</i> G11MC16	156	?	48/67	ZP_03148430.1
<i>Bacillus sp.</i> SG-1	149	?	49/66	ZP_01860043.1
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	152	Familia de proteínas de expulsión MATE/Pirofosfatasa translocadora de protones de unión a membrana	41/65	GeneID:5743100
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	155	Alfa glucosidasa/ Proteína con dominio GAF	33/58	GeneID:7312725

¹ Proteína río arriba a homólogo YwrC / Proteína río abajo a homólogo; * I=% de aa idénticos; S=% de aa similares; ? no hay información acerca de esta proteína.



también capaz de sobrevivir en ambientes extremos. El tamaño de las proteínas es parecido (149-170 aa) y la función predicha en varios de los genes adyacentes interesantemente es de proteínas transportadoras, en algunos casos de cromato.

Para identificar regiones conservadas a lo largo de las secuencias de este grupo de proteínas, se realizó el alineamiento mostrado en la **Figura 8**. Se observa que hay varias regiones conservadas, lo que sugiere que se trata de proteínas que posiblemente tienen un ancestro en común pero que sufrieron un evento de especiación y es posible que aún compartan funciones. La representación del alineamiento ilustra cambios tales como mutaciones puntuales (que aparecen como diferentes caracteres en una sola columna del alineamiento) y la inserción o eliminación de aminoácidos (que aparecen como huecos en una o varias de las secuencias en la alineación).

Las proteínas encontradas en este análisis están reportadas como reguladores de la familia Lrp, pero no hay reportes de que alguna haya sido caracterizada con respecto a su función.

Como se sabe que en el genoma de *B. subtilis* se encuentran siete proteínas parálogas a YwrC (Beloin et al., 2000), se buscó la secuencia de todas ellas para YwrC analizar el contexto genómico en el cual se encuentran, si han sido caracterizadas y cuánto se parecen a YwrC. En la **Tabla 3** se muestra que las funciones que han sido reportadas son muy variables (proteínas asociadas al DNA, procesos de esporulación, transporte de aa, entre otras) y el contexto genómico en el cual se encuentran no es tampoco parecido. La **Figura 9** muestra un alineamiento realizado a las proteínas parálogas a YwrC. De igual manera que para las proteínas homólogas, el alineamiento muestra los aminoácidos o dominios conservados entre ellas. Se observa que son muy pocas las regiones que se encuentran conservadas, lo que sugiere que estas proteínas no llevan a cabo la misma función.

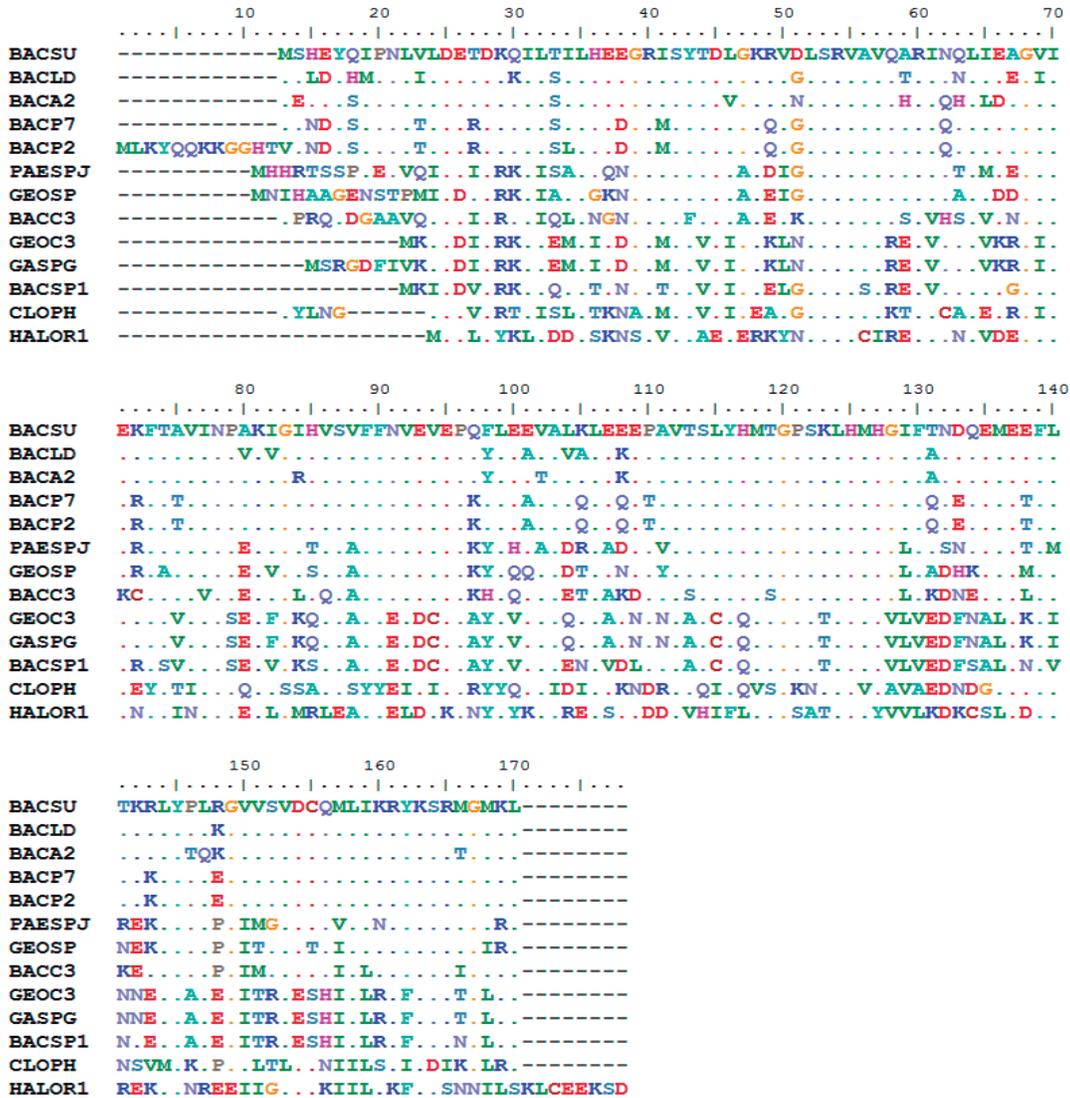


Figura 8. Alineamiento de las proteínas homólogas a Ywrc. Se utilizó el programa Bioedit; los puntos a lo largo de las secuencias representan los aa que son idénticos, los guiones representan regiones sin aa en común. Abreviatura: BACSU (*Bacillus subtilis*), BACLD (*Bacillus licheniformis* ATCC 14580), BACA2 (*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42), BACP7 (*Bacillus pumilus* ATCC 7061), BACP2 (*Bacillus pumilus* SAFR-032), PAESPJ (*Paenibacillus* sp. JDR-2), GEOSP (*Geobacillus* sp. Y412MC10), BACC3 (*Bacillus coagulans* 36D1), GEOC3 (*Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2), GASPG (*Geobacillus* sp. G11MC16), BACSP1 (*Bacillus* sp. SG-1), CLOPH (*Clostridium phytofermentans* ISDg), HALOR1 (*Halofermothrix orenii* H 168).

**Tabla 3.** Proteínas parálogas a YwrC en el genoma de *Bacillus subtilis* 168

Proteína	Nº de aa	Función	Función de proteínas codificadas por genes adyacentes a parálogos ¹	I/S*	Nº ACCESO
YwrC	158	?	Probable gamma glutamil transferasa/ transportadores de iones		GeneID: 936886
LrpC	144	Condensación del cromosoma, empaquetamiento dinámico del DNA, esporulación, metabolismo de aa, involucrado en la transacción de DNA durante la recombinación y reparación del DNA, respuesta a disminución de nutrientes	Proteína hipotética/DNA topoisomerasa III	20/42	GeneID: 940147
LrpA	138	Implicados en esporulación dependiente de KinB	Alcano monooxigenasa/LrpB	20 /44	GeneID: 938119
LrpB	149	Implicados en esporulación dependiente de KinB	LrpA/Hidrolasa	16/41	GeneID: 939912
AzIB	157	Confiere resistencia a 4-azaleucina, el operón <i>azlBCDEF</i> involucrado en el transporte de aminoácidos de cadena ramificada	Transportador de aa ramificados/ probable inhibidor de ribonucleasa	27/46	GeneID: 937625
YezC	139	?	Fosforribosilamina glicina ligasa /poliamina permeasa	21/38	GeneID: 936047
YugG	166	?	Proteína hipotética/ probable hidrolasa	21/39	GeneID: 937166

¹ Proteína río arriba a parálogo YwrC / Proteína río abajo a parálogo; * I=% de aa idénticos; S=% de aa similares; ? no hay información acerca de esta proteína.



Figura 9. Alineamiento de las proteínas parálogas a YwrC. Se utilizó el programa Bioedit; los puntos a lo largo de las secuencias representan los aa que son iguales, los guiones representan regiones sin aa en común.



3.- Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de *Bacillus subtilis*

Al inicio de este trabajo se contaba con un grupo de mutantes afectadas en los genes *ywrC*, *chr3N* y *chr3C*. Para evaluar el fenotipo de las mutantes de *B. subtilis* se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato. Las cepas se crecieron en CL con concentraciones crecientes de cromato a 37°C con agitación y se midió el crecimiento de los cultivos usando un espectrofotómetro. El fenotipo de susceptibilidad a cromato de las mutantes se evaluó utilizando como cepa control *B. subtilis* 168 (silvestre). En la **Figura 10** se observa que las mutantes que tienen interrumpidos los genes *chr3N* (A570) y *chr3C* (A569) tuvieron un crecimiento menor al presentado por la cepa control; aunque las diferencias de crecimiento no fueron muy claras, este comportamiento se mantuvo a las diferentes concentraciones de cromato empleadas. Este fenotipo sensible era de esperarse, ya que el par de genes *chr* son los que brindan la resistencia a cromato a *B. subtilis*. Por otra parte, la cepa A533, que tiene el gen *ywrC* interrumpido, mostró un mayor crecimiento en presencia de cromato, al presentado por el control (**Figura 11**); este fenotipo resistente sugiere que este gen regula la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C* de manera negativa, ya que al no estar presente permite una mayor expresión de los genes *chr*, lo que origina un mayor nivel de resistencia a cromato.

4.- Clonación de los genes *ywrC-chr3N-chr3C* de *B. subtilis* 168

Para realizar la clonación de los genes *ywrC-chr3N-chr3C* previamente se amplificaron por PCR, para lo cual se empleó una pareja de oligonucleótidos (**Tabla 1**) y las condiciones mencionadas en Métodos. Los productos amplificados se sometieron a corrimiento electroforético y se obtuvo una banda con el tamaño esperado de ~2.1 kb para el fragmento de DNA con los tres genes *ywrC-chr3N-chr3C* (**Figura 12**).

5.- Clonación de los genes *chr* en el vector pGEM-T

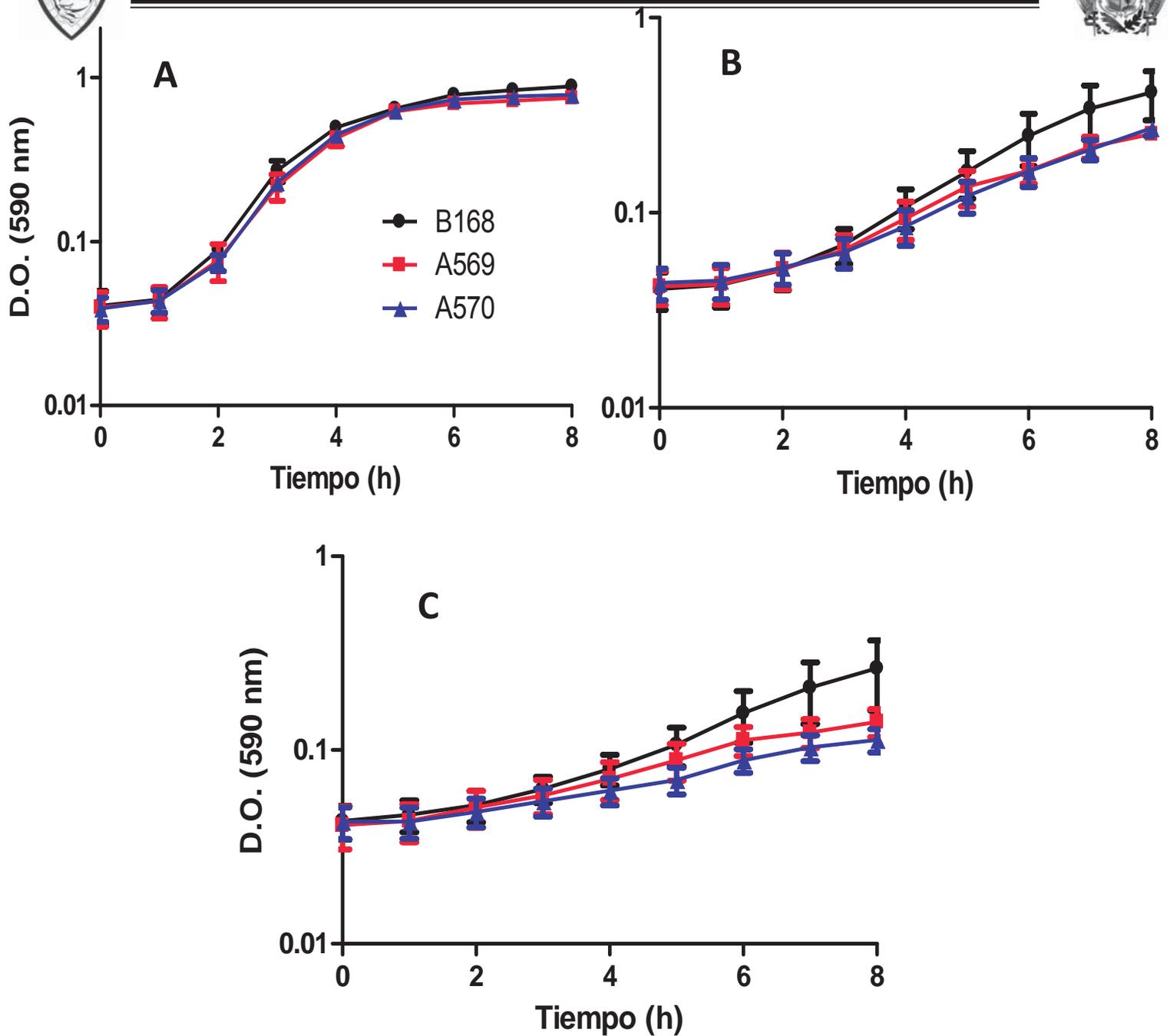


Figura 10. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *B. subtilis*. Los cultivos se crecieron en CL a 37°C con agitación constante a los tiempos mostrados, con las siguientes concentraciones de cromato: **A** sin cromato, **B** con 5 mM de cromato y **C** con 7 mM de cromato. Se midió la absorbencia a 590 nm. Control cepa silvestre *B. subtilis* 168 (B168), mutantes A569 (*chr3C*) y A570 (*chr3N*). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3.

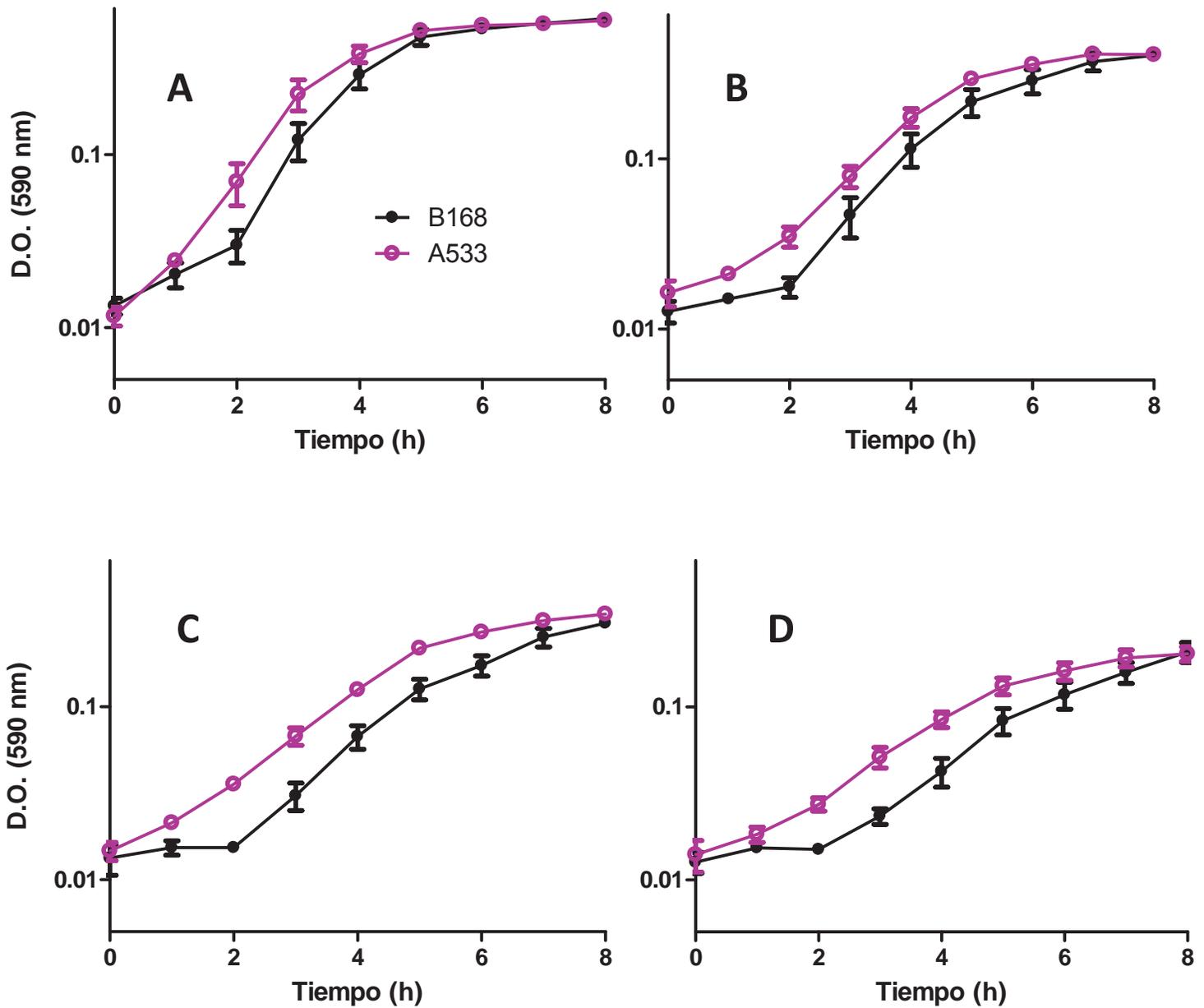


Figura 11. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *B. subtilis*, B168 y A533. Los cultivos se crecieron en CL a 37°C con agitación constante a los tiempos mostrados, con las siguientes concentraciones de cromato: **A** sin cromato, **B** con 7 mM de cromato, **C** con 10 mM de cromato y **D** con 15 mM de cromato. Se midió la absorbencia a 590 nm. Control cepa silvestre *B. subtilis* 168 (B168), mutante A533 (*ywrC*). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3.

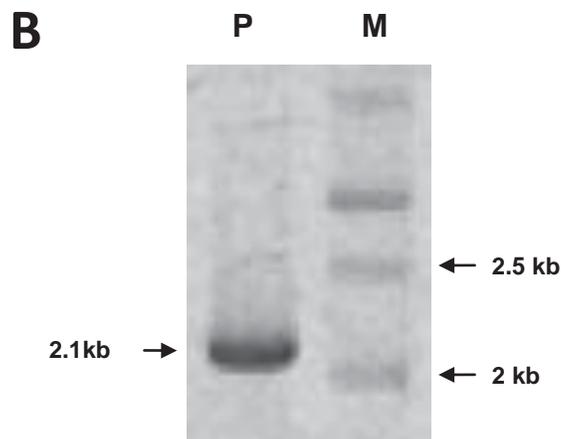
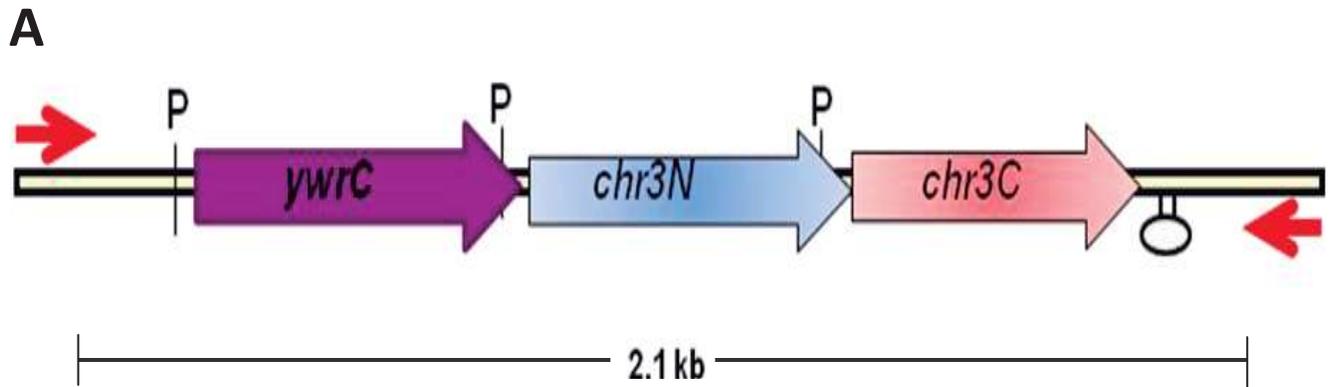


Figura 12. Amplificación de los genes *chr* de *Bacillus subtilis* 168. **A)** Representación de los genes *chr*. Se muestran con flechas gruesas los genes y la dirección de la transcripción; Con flechas rojas se muestra la dirección y posición de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación. En la parte inferior se muestra el tamaño del fragmento predicho para la amplificación. También se indican los posibles promotores (P) y el posible terminador transcripcional (Q). **B)** Fotografía de un gel de agarosa que muestra en el carril P el producto de PCR de los genes *chr*; el carril M representa el marcador de peso molecular de 1kb escalera.



Para recuperar el fragmento de DNA con los genes *ywrC-chr3N-chr3C* amplificado por PCR, se clonó en el vector pGEM-T y el plásmido recombinante pGEywrC-*chr3NC* obtenido (**Figura 13 A**) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue. La presencia y el tamaño del inserto fue verificada con ensayos de restricción utilizando las enzimas *XbaI* y *BamHI*, con las cuales se liberaron bandas de ~3 kb, correspondiente al vector linearizado, y de 2.1 kb, correspondiente al inserto con los genes *ywrC-chr3N-chr3C* clonados, lo que indicó que la recuperación del producto de PCR fue correcta (**Figura 13 B**).

6.- Subclonación en el vector pACYC184

Para analizar el fenotipo presentado de los genes *ywrC-chr3N-chr3C*, se subclonaron en pACYC184, vector de bajo número de copias. El fragmento obtenido de la digestión del plásmido recombinante pGEywrC-*chr3NC* con *XbaI* y *BamHI*, se purificó y se ligó con el vector pACYC184 digerido con las mismas enzimas. El plásmido recombinante obtenido, denominado pACywrC-*chr3NC* (**Figura 14 A**), se empleó para transformar células de *E. coli* W3110. La caracterización de este plásmido se realizó por digestión con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, con las cuales se liberaron las bandas esperadas del vector linearizado (3.9 kb) y el inserto de los genes clonados (2.1 kb) con lo que confirmamos que la subclonación se llevó a cabo correctamente (**Figura 14 B**).

7.- Subclonación en el vector pUCP20

Con la finalidad de estudiar el fenotipo de los genes *ywrC-chr3N-chr3C* en *E. coli*, también se subclonaron en pUCP20, vector de alto número de copias. El fragmento obtenido de la digestión con *XbaI* y *BamHI* se purificó y se ligó con el vector pUCP20 digerido con las mismas enzimas. El plásmido recombinante obtenido, denominado pUCywrC-*chr3NC*

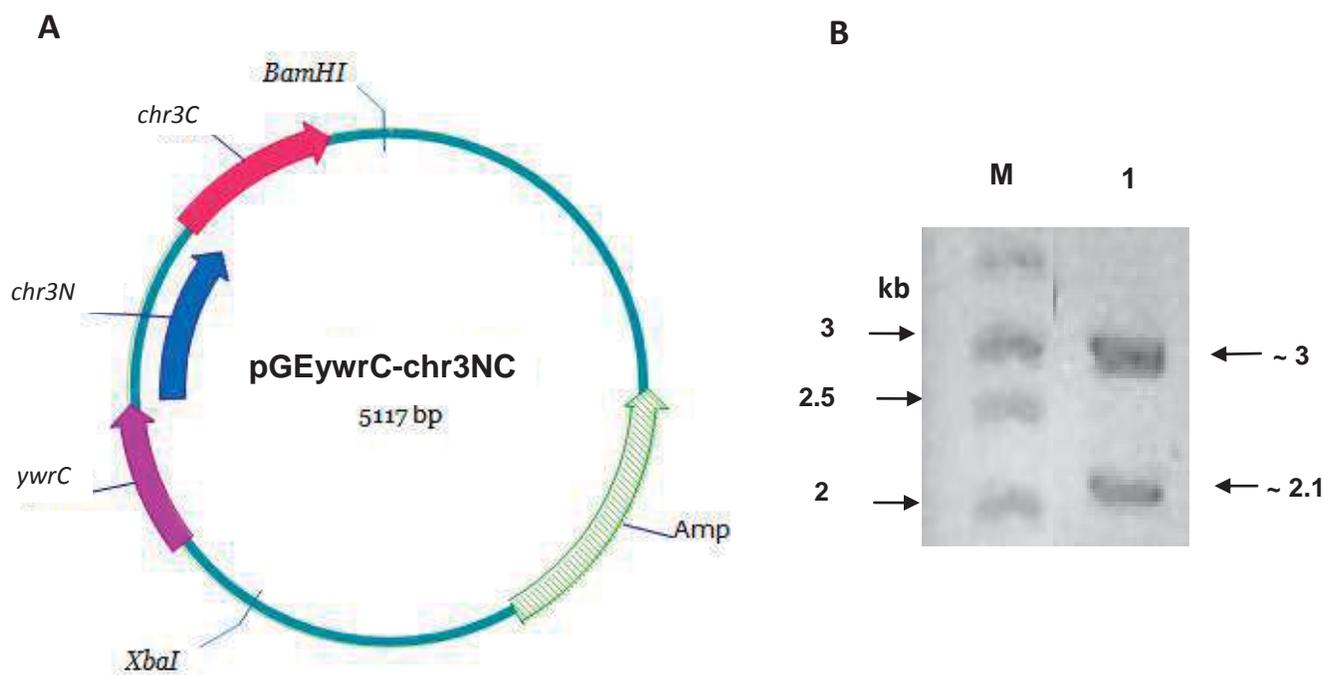


Figura 13. Obtención del plásmido pGEywrC-chr3NC. A) Esquema del plásmido recombinante pGEchrS-chr3NC obtenido al clonar los genes obtenidos por PCR y el vector pGEM-T. Se muestra el inserto de los genes *ywrC-chr3N-chr3C*, los sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *BamHI* y el gen de resistencia a ampicilina (Amp). B) Electroforesis en gel de agarosa. Carril M; marcador de 1kb; carril 1, plásmido pGEywrC-chr3NC digerido con *XbaI* y *BamHI*, las flechas señalan los tamaños en kb, del marcador así como de las bandas obtenidas en el ensayo de restricción.

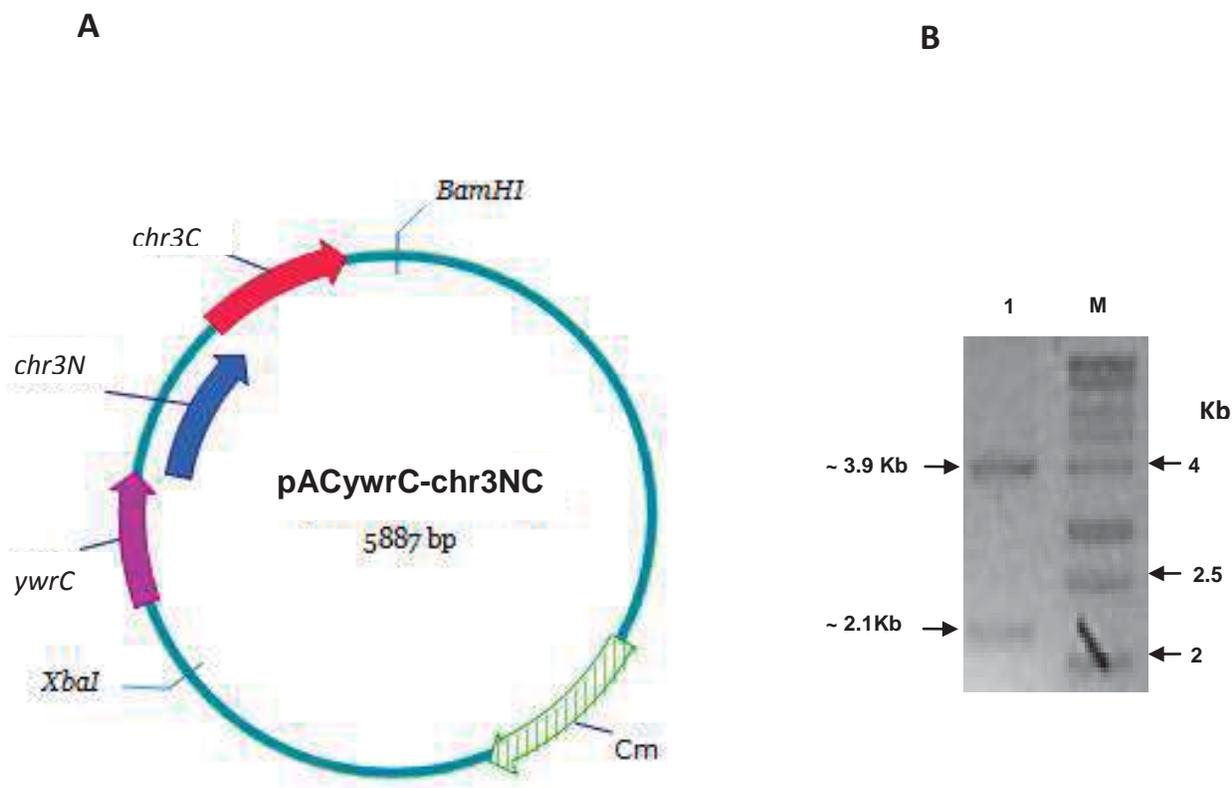


Figura 14. Obtención del plásmido pACYwrC-chr3NC. A) Esquema del plásmido recombinante pACYwrC-chr3NC obtenido por la ligación de los genes *chr* y el plásmido pACYC184 digeridos previamente con las enzimas de restricción indicadas. Se muestra el inserto de los genes *ywrC-chr3N-chr3C*, los sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *BamHI* y el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm) **B**) Electroforesis en gel de agarosa, carril M; marcador de 1kb; carril 1 pACYwrC-chr3NC digerido con *XbaI* y *BamHI*, las flechas señalan los tamaños en kb, del marcador así como de las bandas obtenidas en el ensayo de restricción.



(Figura 15 A) se empleó para transformar células de *E. coli* W3110. La caracterización de este plásmido se realizó por digestión con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, con las cuales se liberaron el vector linearizado (~3.9 kb) y el inserto de los genes clonados (2.1 kb). El patrón de bandeo en el gel de agarosa indicó que la subclonación se llevó a cabo correctamente (Figura 15 B).

8.- Pruebas de susceptibilidad a cromato

- o Genes *chr* de *B. subtilis* en el vector pACYC184

Para evaluar la participación del gen *ywrC* en el fenotipo de resistencia a cromato conferida por los genes *chr3N-chr3C* clonados en el vector de bajo número de copias pACYC184, se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en medio mínimo. Como control sensible se empleó la cepa de *E. coli* W3110 (pACYC184), que solamente contiene el vector y como control resistente la cepa W3110 (pAChr3NC), que tiene clonados el par de genes *chr3N-chr3C*. Los resultados obtenidos muestran un claro papel del gen *ywrC* en la expresión del par de genes *chr3N-chr3C*, ya que se ve drásticamente disminuido el nivel de resistencia (Figura 16). Esto se ve reflejado en el menor grado de crecimiento de la cepa W3110 (pACywrC-chr3NC), en la cual el gen *ywrC* está presente, mientras que la cepa que se muestra libre de este gen, W3110 (pAChr3NC), tuvo un crecimiento mucho mayor en presencia de cromato. Este resultado indica que el gen *ywrC* disminuye la expresión del par de genes *chr* al estar clonados en grupo. Después de probar la funcionalidad del gen *ywrC* se cambió el nombre a *chrS*.

- o Genes *chr* de *B. subtilis* en el vector pUCP20

La participación del gen *chrS* en el fenotipo de resistencia a cromato de los genes *chr3N-chr3C* en el vector de alto número de copias pUCP20 se evaluó de la misma manera que en el inciso anterior. Como control sensible se empleó la cepa de *E. coli* W3110 (pUCP20)

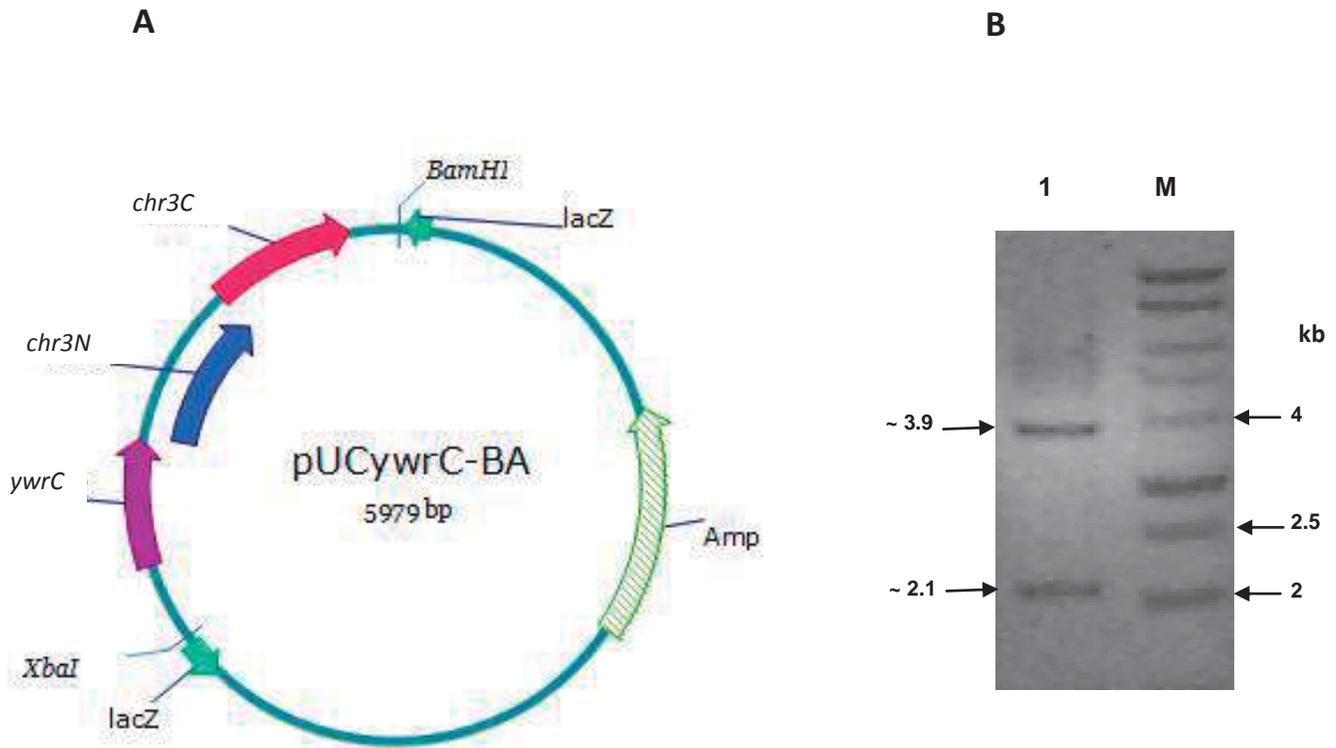


Figura 15. Obtención del plásmido pUCywrC-*chr3NC*. A) Esquema del plásmido recombinante pUCywrC-*chr3NC*, obtenido por la ligación de los genes *ywrC-*chr3N-*chr3C*** y el plásmido pUCP20 digeridos previamente con las enzimas de restricción indicadas. Se muestra el inserto de los genes *ywrC-*chr3N-*chr3C***, los sitios de restricción para las enzimas *XbaI* y *BamHI* y el gen de resistencia a ampicilina (*Amp*). B) Electroforesis en gel de agarosa, carril M; marcador de 1kb; carril 1, pUCywrC-*chr3NC* digerido con *XbaI* y *BamHI*, las flechas señalan los tamaños en kb, del marcador así como de las bandas obtenidas en el ensayo de restricción.

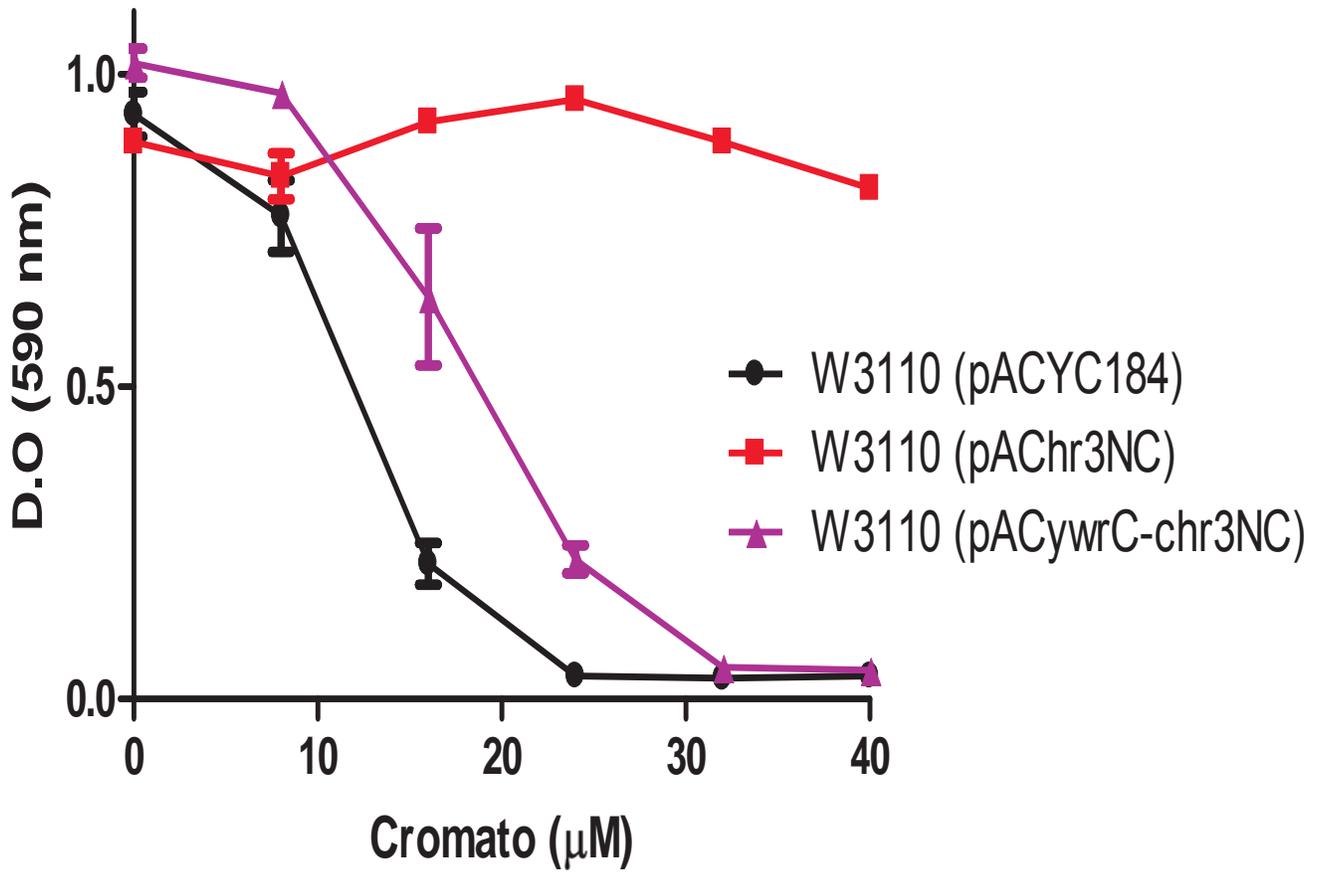


Figura 16. Susceptibilidad a cromato de cepas de *E. coli* con los genes *ywrC-chr3N-chr3C* de *B. subtilis* en un vector de bajo número de copias. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 a 37° C con agitación constante durante 22 h, con las concentraciones de cromato que se indican. Posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm. Control sensible, *E. coli* W3110 (pACYC184); control resistente, *E. coli* W3110 (pAChr3NC). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3 (duplicado).



que solamente contiene el vector y como control resistente la cepa W3110 (pUChr3NC) que tiene clonados el par de genes *chr3N-chr3C*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 17**. La cepa W3110 (pUCywrC-chr3NC), que tiene clonados los genes *chrS-chr3N-chr3C* mostró un fenotipo similar al control resistente, presentando ambas cepas un crecimiento moderadamente mayor que el control sensible. Esto indica que en el vector de alto número de copias no hay diferencia en el fenotipo de las cepas al estar presente o no el gen *ywrC*.

9.- Análisis transcripcional de los genes *chr* de *B. subtilis* expresados en *E. coli*

Para analizar el patrón de expresión transcripcional de los genes *chr3N-chr3C* al estar presente el gen *chrS*, se realizaron ensayos de RT-PCR en *E. coli* W3110. Además de comparar la expresión de los genes *chr* en presencia del gen regulador, se evaluó la expresión también en presencia de cromato por lo cual fue necesario encontrar las concentraciones adecuadas que tuvieran un mínimo efecto tóxico en el crecimiento de las cepas. Para ello se realizaron pruebas de crecimiento en medio mínimo con concentraciones crecientes de cromato (2, 4 y 6 μ M), las concentraciones probadas no tuvieron efecto tóxico considerable sobre el crecimiento, esto con respecto a la cepa control que se creció sin cromato (**Figura 18**), por lo tanto estas concentraciones se utilizaron en los ensayos.

En el ensayo de RT-PCR se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican una región interna del gen *chr3N* (**Tabla 1**), debido a que se sabe que la transcripción de los genes *chr3N-chr3C* es a través de un RNA mensajero bicistrónico que comienza en el gen *chr3N* (**Figura 19 A**). En la **Figura 19 C** se muestra el RNA total de las cepas de *E. coli* W3110 (pAChr3NC) y W3110 (pACywrC-chr3NC) obtenido como se describió en Materiales y

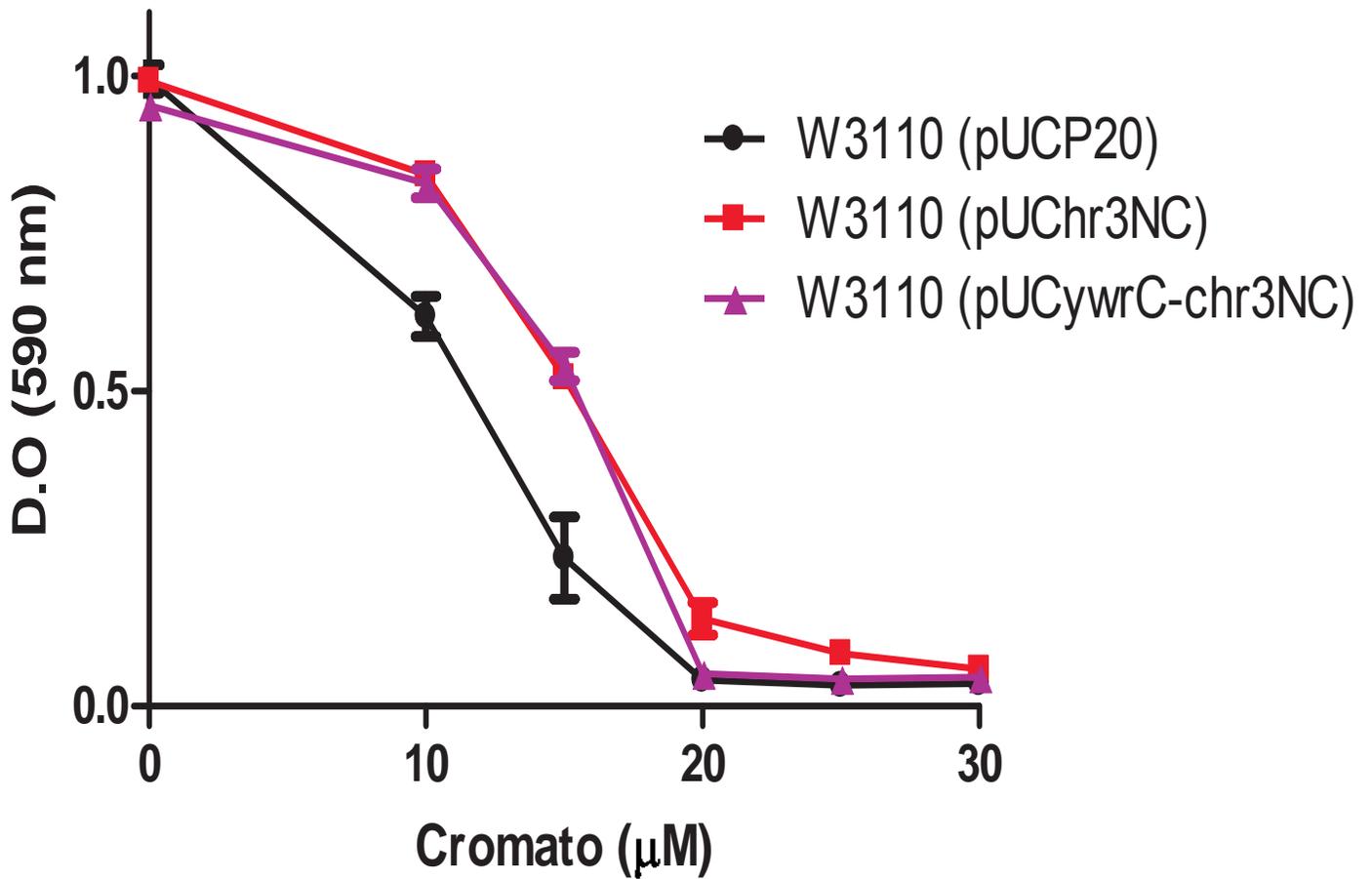


Figura 17. Susceptibilidad a cromato de cepas de *E. coli* con los genes *ywrC*-*chr3N*-*chr3C* de *B. subtilis* en un vector de alto número de copias. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 a 37° C con agitación constante durante 22 h, con las concentraciones de cromato que se indican. Posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm. Control sensible, *E. coli* W3110 (pUCP20); control resistente, *E. coli* W3110 (pUChr3NC). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3 (duplicado).

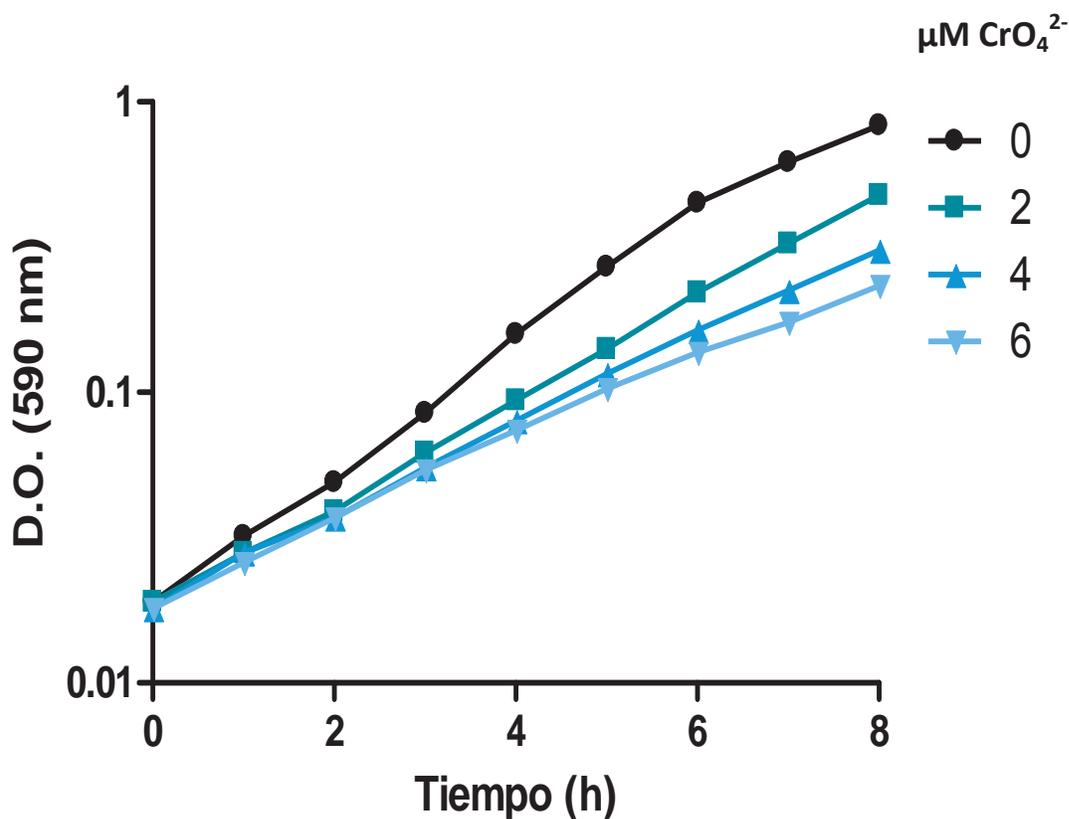


Figura 18. Susceptibilidad a cromato de la cepa de *E. coli* pACywrC-chr3NC. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 a 37° C con agitación constante por los tiempos señalados y con las concentraciones de cromato que se indican a la derecha. Se midió la absorbencia a 590 nm. Experimento representativo de *E. coli* W3110 (pACywrC-chr3NC) y *E. coli* W3110 (pAChr3NC).

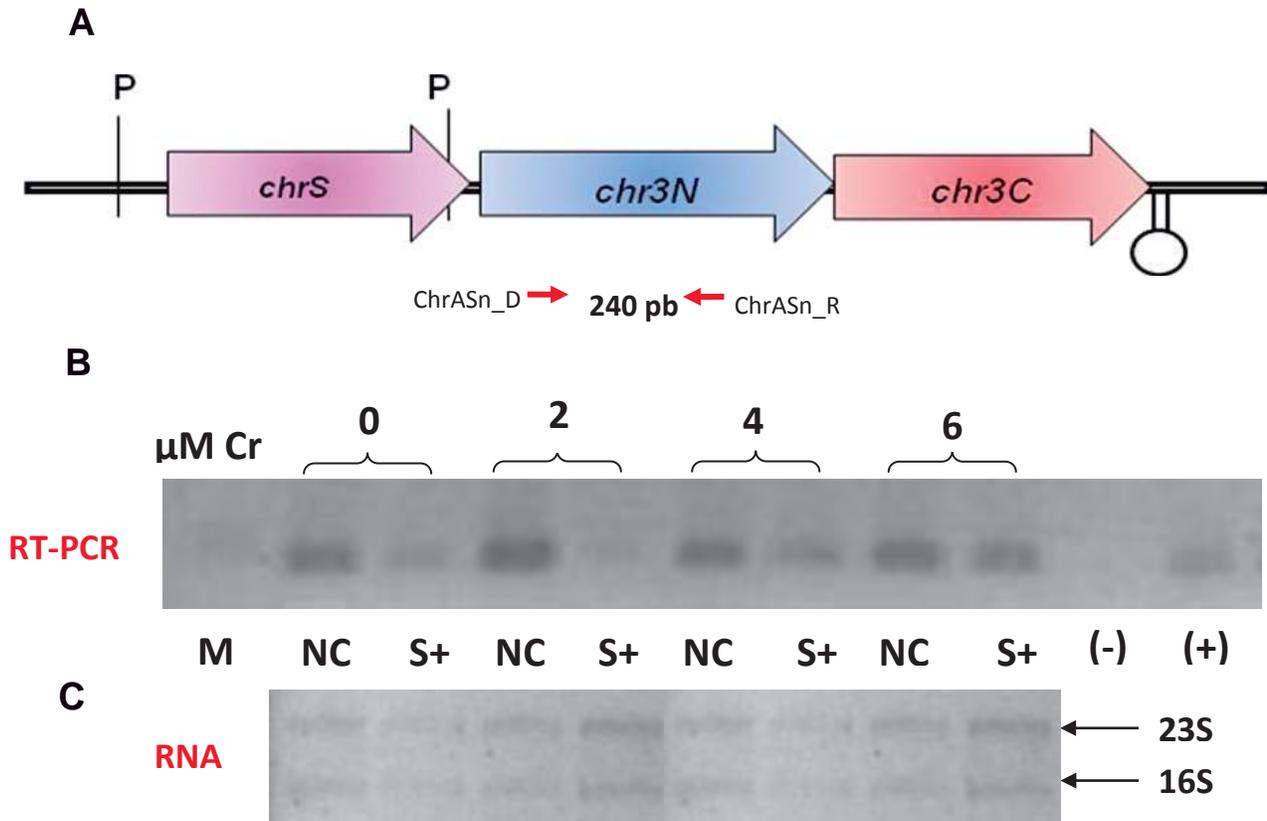


Figura 19. Análisis de expresión del gen *chr3N*. A) Se indica con flechas grandes los genes y la dirección de la transcripción; con flechas de color rojo se señala la posición y dirección de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR de los genes *chr* de *Bacillus subtilis*, así como el tamaño del fragmento predicho para la amplificación. **B)** RT-PCR. NC, *E. coli* (pAChr3N-C) y S, *E. coli* (pACchrS-*chr3NC*). M marcador de peso molecular 1Kb; + control positivo; - control negativo. Arriba se muestran las concentraciones de cromato utilizadas. **C)** RNA total de la cepas de *E. coli*. A la derecha se indica la posición de las subunidades 23S y 16S del RNA ribosomal. Las concentraciones de cromato se indican arriba de B). n= 2.



Métodos. En el gel se observan dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 23S y 16S permitiendo determinar que el RNA total utilizado para los ensayos de RT-PCR está íntegro. Los productos amplificados por RT-PCR empleando el RNA total de las cepas se sometieron a corrimiento electroforético para determinar si ocurrió la transcripción y para verificar el tamaño predicho de las bandas (**Figura 19 B**). En el gel de agarosa correspondiente a los ensayos de RT-PCR se observó que las bandas correspondientes a la cepa W3110 (pAChr3NC) en la que el gen *chrS* no está presente, tienen una mayor intensidad (carriles NC) tanto en ausencia como a diferentes concentraciones de cromato, que las bandas de la cepa W3110 (pACywrC-*chr3NC*) donde está presente el gen regulador (carriles S+), estos resultados indican que se ve reprimida la expresión de los genes *chr* (**Figura 19B**), al igual que en las pruebas de susceptibilidad antes realizadas. Como se mencionó anteriormente estos ensayos se hicieron con concentraciones crecientes de cromato e, interesadamente, se observa que al ir aumentando las concentraciones de cromato la expresión de los genes *chr3N-chr3C*, en la cepa que tiene el gen *chrS* aumenta (**Figura 19B**). Estos resultados sugieren que el cromato actúa como inductor permitiendo que los genes *chr3N-chr3C* se expresen y brinden resistencia a cromato, aún en presencia del gen regulador negativo *chrS*. Para cuantificar la expresión de los ensayos de RT-PCR se realizó un análisis densitométrico del gel de agarosa (**Figura 20**), los resultados se presentan en una grafica que muestra diferencias en el tamaño de las barras de acuerdo a la diferencia en la expresión de los genes. Como se observa en presencia de *chrS* la expresión de los genes *chr* se ve disminuida y al incrementar las concentraciones de cromato se ve inducida la expresión de los genes *chr* aumentando el tamaño de las barras.

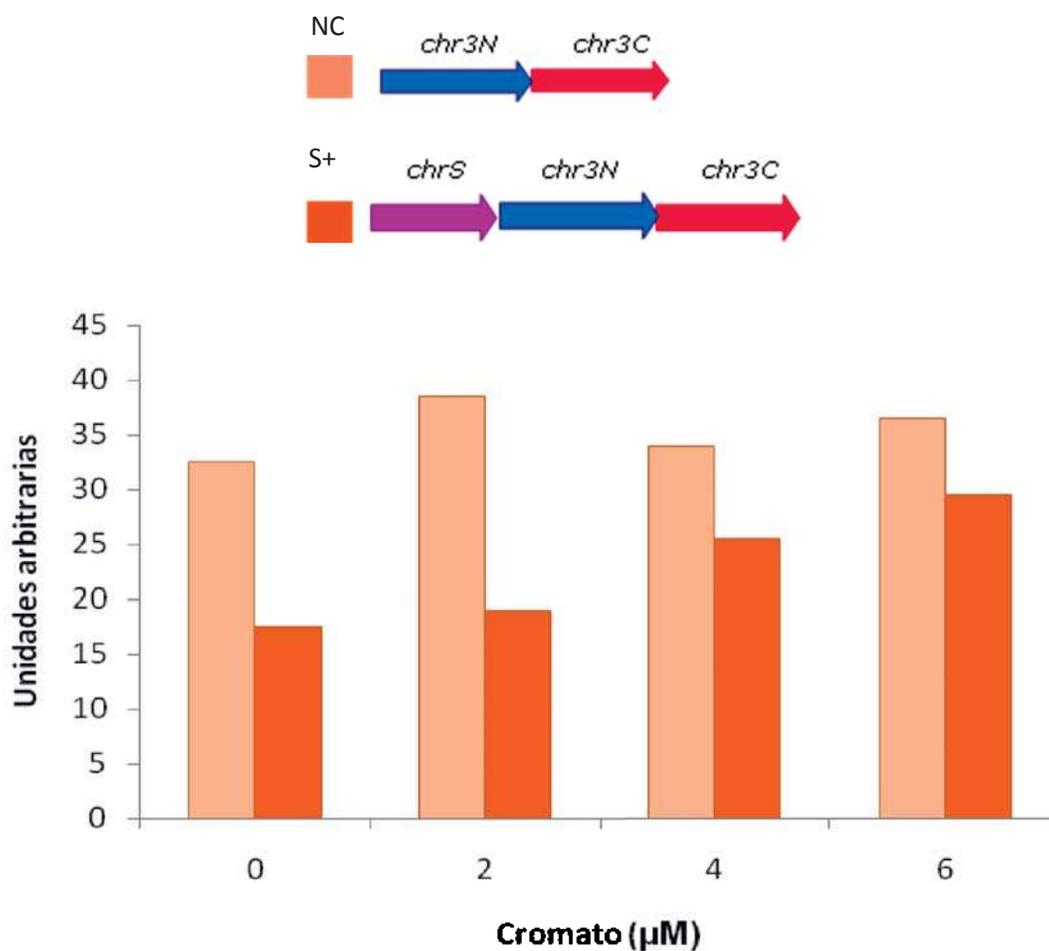


Figura 20. Análisis de expresión del gen *chr3N* en presencia y ausencia de *chrS*. Los datos de los ensayos mostrados en la Figura 19B se procesaron usando el programa Image J; NC, W3110 (pAChr3N-C) y S+, W3110 (pACywrC-*chr3NC*). Los valores son promedio de n=2.



X. DISCUSIÓN

En el genoma de *B. subtilis* 168 se localizó un par de genes *schr* que codifican las proteínas Chr3N y Chr3C, pertenecientes a la subfamilia SCHR3. Estas proteínas confieren resistencia a cromato en *E. coli* solamente cuando ambas se expresan, confirmando que las proteínas SCHR no son funcionales como monómeros (Díaz-Magaña et al., 2009). Este fue el primer reporte acerca de la funcionalidad de proteínas de la familia SCHR. Los genes que codifican este par de proteínas monodominio se encuentran traslapados y se transcriben a través de un RNA mensajero bicistrónico generado por un promotor río arriba del gen *chr3N* (Díaz-Magaña et al., 2009). Se ha visto en varios genomas bacterianos que genes adyacentes a los genes *chr* están relacionados con la funcionalidad de las proteínas CHR, funcionando como operones.

Río arriba de los genes *chr3N* y *chr3C* de *B. subtilis* se encuentra el gen *ywrC* (**Figura 7**), que codifica una proteína predicha que tiene homología con miembros de la familia de reguladores transcripcionales Lrp/AsnC.

El descubrimiento de que miembros de la familia Lrp tienen la capacidad para curvar DNA cuando se unen (Wang y Calvo, 1993), envolver el DNA y contribuir al empaquetamiento cromosomal, permitió que se propusiera que estas proteínas tienen un papel como reguladores transcripcionales (López-Torrejón et al., 2006).

La familia Lrp/AsnC de reguladores transcripcionales se encuentra distribuida en bacterias y arqueas, donde actúan como sistemas reguladores del metabolismo de aminoácidos o de procesos relacionados, de manera global y específica, frecuentemente en respuesta a aminoácidos exógenos (Thaw et al., 2006). Los miembros de esta familia son pequeñas proteínas de unión al DNA con masas moleculares de alrededor de 15 kDa que tienen tres dominios funcionales: un dominio N-terminal que contiene el sitio de unión al DNA, un dominio intermedio responsable de la activación de la transcripción y un dominio C-



terminal requerido para responder a leucina (Ettema et al., 2002). El miembro mejor estudiado de esta familia de reguladores transcripcionales es el de *E. coli* (EcoLrp), actúa como regulador global que activa o reprime la expresión de un gran número de genes (Brinkman et al. 2003).

En *B. subtilis* 168 se encuentran siete parálogos Lrp; no se sabe mucho acerca de la función de estas proteínas pero su abundancia sugiere que tienen una función más específica que la que tiene EcoLrp (López-Torrejon et al., 2006).

En este trabajo se propone que el gen *ywrC*, renombrado *chrS* (por posible regulador del par de genes ***chr*** presentes en la familia **SCHR**), forma parte de un operón en conjunto con los genes *chr3N* y *chr3C* y que su producto funciona como un regulador transcripcional que controla la expresión de los genes adyacentes.

Al analizar la secuencia del extremo 5' del gen *chrS* se identificaron las cajas consenso -35 y -10 de promotores, necesarias para la unión de la holoenzima de la RNA polimerasa I; esta región promotora mostró similitud con las secuencias consenso algo, deseable ya que mientras más se parezcan estas regiones promotoras a las secuencias consenso más eficaz es el promotor en la iniciación de la transcripción (**Figura 7A**).

Las proteínas de la familia Lrp reconocen la región consenso de unión al DNA **AGAATTTTATTCT** (Cui et al., 1995). Por lo que este sitio de reconocimiento para reguladores Lrp se buscó en la secuencia de los genes *chrS-chr3N-chr3C*. Se encontró que existen cuatro posibles sitios de unión de ChrS al DNA, tres de los sitios se localizan en la cadena complementaria del DNA y uno en la cadena codificante, aunque de los trece nucleótidos que conforman la región consenso, solamente siete se encuentran conservados (~54% de los nucleótidos) (**Figura 7A**). Interesantemente, las regiones consenso se encuentran en la secuencia del mismo gen *chrS*, lo que sugiere que de esta manera posiblemente ChrS se autorregula. La presencia de más de un sitio de unión al



DNA, y que la unión sea río abajo del promotor del gen *chrS*, también sugiere que la proteína ChrS de esta manera podría tener un mayor control sobre la expresión de los genes *chr3N-chr3C*.

Río abajo del gen *chrS* no se identificó un terminador transcripcional; sin embargo, la presencia de un terminador al extremo 3' del gen *chr3C* (Díaz-Magaña et al., 2009) sugiere que *chrS* en conjunto con *chr3N* y *chr3C* pueden constituir un operón. De esta forma, el terminador de Chr3C puede tener la función de terminar la transcripción del operón *chrS-chr3N-chr3C*. Referente a las señales de traducción, se identificó una región de unión al ribosoma (RBS) **AGCAGG** río arriba del codón de inicio (**Figura 7A**). En *B. subtilis* esta región es de gran importancia ya que es necesaria para una fuerte fijación del RNAm a la subunidad 16S del ribosoma (Rocha et al., 1999). El codón de inicio identificado para la región codificante de ChrS corresponde a TTG (**Figura 7A**) que es un codón de inicio poco frecuente, ya que la mayoría de las bacterias utilizan como codón de inicio el codón ATG, que codifica para el aminoácido metionina. Kunst et al., (1997) encontraron que en *B. subtilis* 78% de los genes comienzan con ATG, 13% con TTG y 9% con GTG. Las variaciones de los codones de inicio representan una forma sencilla que tiene la célula para variar las tasas de traducción. Por último, se identificó el codón de paro TAA (**Figura 7A**), el cual es usado comúnmente por *B. subtilis* así como también TAG (Rocha et al., 1999). La presencia de estas señales sugiere que el gen *chrS* se puede expresar en *B. subtilis*, tanto a nivel transcripcional como traduccional.

El panorama existente acerca de las funciones desempeñadas por las proteínas reguladoras de la transcripción Lrp no es muy amplio. Las funciones estudiadas en su mayoría están relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y han sido enfocadas en relación a la respuesta a leucina (Ernsting et al., 1992, Landgraf et al., 1996, Landgraf et al., 1999); una gran parte han sido descritas en *E. coli*, organismo en el cual se encontró y



estudió el primer miembro de esta familia de reguladores. Por esta razón, fue de nuestro interés conocer la diversidad de organismos que presentan homólogos al gen *chrS* de *B. subtilis* 168, con el fin de encontrar funciones distintas a las descritas en *E. coli*.

Para este fin se hizo una búsqueda de proteínas homólogas a ChrS de *B. subtilis* realizando alineamientos (ClustalW); se encontró que los homólogos identificados pertenecen a géneros relacionados (*Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*) (**Tabla 2**). Estos géneros aún conservan características comunes como la forma bacilar, se les considera firmicutes por su pared celular gram positiva y su bajo contenido de GC, tienen la capacidad de habitar y sobrevivir en nichos extremos ya que esporulan. Lo anterior sugiere que la existencia de genes homólogos *lrp* en estos géneros es debido a la transferencia vertical a partir del ancestro común del que divergieron. Por otra parte, fue interesante encontrar un homólogo Lrp en un organismo gram negativo (*Halothermothrix orenii*), bacteria también capaz de sobrevivir en ambientes extremos. Esto indica que los homólogos de Lrp, aunque predominan en estos grupos, no están restringidos a organismos gram positivos.

Con el fin de encontrar más información, se analizó el arreglo y las funciones predichas codificadas por los genes adyacentes a los genes *lrp* en los genomas bacterianos. Aunque el arreglo génico es parecido, las funciones codificadas por los genes adyacentes no fueron las mismas, aunque la mayoría codifican probables transportadores de iones. Las proteínas homólogas localizadas (**Tabla 2**) no han sido caracterizadas, pero todas han sido reportadas como probables reguladores del tipo Lrp y por lo tanto la funcionalidad, entre las proteínas de esta familia podría estar conservada.

En el genoma de *B. subtilis* se encuentran siete proteínas parálogas a ChrS (Beloin et al., 2000); en genomas procariotes existe una significativa redundancia génica (en *E. coli* casi el 30% de sus genes se podrían agrupar en familias con funciones similares) que al igual



que en genes eucariotes, es considerado un elemento importante en su evolución molecular (Pushker et al., 2004). Por lo tanto, el tener varios genes parálogos *lrp* podría ser de igual importancia en *B. subtilis*. La similitud en secuencia de las proteínas Lrp refleja una ascendencia evolutiva parecida, pero también implica una potencial divergencia funcional ya que cuatro han sido caracterizadas (LrpC, LrpA, LrpB y AzlB) y sus funciones son diferentes (**Tabla 3**); como también las funciones de las proteínas codificadas por los genes adyacentes, se podría pensar que se tratan de reguladores transcripcionales tanto específicos como globales. Esta heterogeneidad funcional puede ser una ventaja que le permite sobrevivir a *B. subtilis* en diversos hábitats ya que estas proteínas parálogas probablemente actúan cooperativamente para ayudar a la bacteria en diversas situaciones que ponen en peligro su supervivencia.

Cuando se comparó la secuencia de la proteína de ChrS con proteínas homólogas, se observó que a lo largo de la secuencia se encuentran regiones en las que los aminoácidos son idénticos (**Figura 8**), lo que sugiere que estas regiones conservadas tienen importancia en la funcionalidad de las proteínas Lrp. De acuerdo con este dato, resultó interesante al igual que con los homólogos analizar las secuencias de las proteínas parálogas. Sin embargo, no se identificaron extensas regiones conservadas (**Figura 9**) a diferencia de los alineamientos de la **Figura 8**. Esto sugiere que las diferencias en las secuencias probablemente señalan una ventaja que le brinda diversas funciones, probablemente más específicas, a estas proteínas parálogas Lrp.

Después del análisis bioinformático se evaluó el papel que tiene cada uno de los genes *chr* (*chrS*-*chr3N*-*chr3C*) en *B. subtilis* 168, utilizando cepas que tuvieran mutados estos genes, a través de pruebas de susceptibilidad a cromato. Las mutantes (*chr3N* y *chr3C*) mostraron una mayor susceptibilidad a cromato, creciendo menos que la cepa control; aunque las diferencias en el crecimiento por la exposición al cromato en estas pruebas no



fueron amplias, se observó que las mutantes afectadas en los genes *chr3N* (A570) y *chr3C* (A569) presentaron el fenotipo sensible a cromato esperado (**Figura 10**), ya que se ha demostrado que los productos de estos genes forman un canal en la membrana por el cual el cromato es expulsado al exterior celular brindando así resistencia a cromato (Díaz-Magaña et al., 2009).

La cepa A533, que tiene el gen *chrS* mutado, presentó un fenotipo resistente a cromato (**Figura 11**), esto sugiere que este gen regula la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C* de manera negativa, ya que al no estar presente probablemente genera una mayor expresión de dichos genes y con ello permite un mayor crecimiento de la cepa en un medio con cromato.

Un dato interesante se observa en la **Figura 11A**, que muestra el crecimiento de la cepa control (B168) y A533 sin cromato de las cuales se esperaría que no hubiera diferencias entre ellas. Sin embargo, la cepa que tiene interrumpido el gen *chrS* presentó un crecimiento ligeramente mayor que la cepa control. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que los reguladores transcripcionales Lrp pueden afectar la función de varios genes, debido a su capacidad de actuar como reguladores globales (Brinkman et al., 2003); en este caso, la diferencia en el crecimiento podría estar dada por que en la mutante alterada en el gen *chrS* se ven afectados genes relacionados con metabolismo celular que a su vez tengan efecto sobre el crecimiento.

E. coli no posee ningún homólogo CHR (Nies et al., 1998; Díaz-Pérez et al., 2007) así que se decidió analizar la función del gen *chrS* en la cepa de *E. coli* W3110 como huésped heterólogo. Para esto se subclonaron los genes *chrS-chr3N-chr3C* en pACYC184 y pUCP20, vectores de bajo y alto número de copias, respectivamente. Se pasaron a *E. coli* W3110 y después se analizó el fenotipo realizando pruebas de susceptibilidad a cromato en medio mínimo. Se escogieron estos vectores porque existen



reportes de cambios en la susceptibilidad a cromato de cepas con homólogos *chr* dependiendo del tipo de vector empleado en la expresión (Aguilar-Barajas et al., 2008; Díaz-Magaña et al., 2009; León-Márquez, 2009).

Cuando se clonaron los genes *chrS-chr3N-chr3C* en el vector de bajo número de copias, se observó una clara disminución de la resistencia a cromato, presentando un crecimiento de menos de la mitad en comparación con el fenotipo observado por la clona que tiene solamente los genes *chr3N-chr3C* (**Figura 16**). La disminución del crecimiento al estar presente el gen *chrS* fue tan drástica que en las concentraciones más altas de cromato el crecimiento fue semejante al control sensible que tiene el vector vacío. Este resultado confirmó los resultados obtenidos con las mutantes de *B. subtilis* de que el gen *chrS* reprime la expresión de los genes *chr3n-chr3C* (**Figura 11**). Esta represión se ve reflejada en el claro fenotipo sensible a cromato mostrado con la construcción *chrS-chr3N-chr3C* (**Figura 16**). Este demuestra un papel de regulación negativa por parte del gen *chrS*.

Al estar presente el gen *chrS* en el vector pUCP20, el fenotipo de resistencia a cromato proporcionado por los genes *chr3N-chr3C* no cambió (**Figura 17**) teniendo una resistencia baja con respecto a la cepa control sensible. Esto se debe probablemente a que al ser clonado en un vector de alto número de copias podría generarse un exceso de proteína ChrS la cual podría regular negativamente su propia expresión. Se ha reportado que algunos genes que codifican reguladores transcripcionales, tienen la capacidad de regular su propia producción (regulación autógena) y con ello su funcionalidad (Lewin 2000).

Debido a que los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a cromato en *E. coli* confirmaron que el gen *chrS* participa en la regulación de los genes *chr3N-chr3C*, se realizaron ensayos de RT-PCR en la cepa de *E. coli* W3110 para conocer el patrón de expresión de dichos genes al estar presente o no *chrS*.



La presencia del gen *chrS* ocasionó la disminución en la expresión de los genes *chr3N-
chr3C* (**Figura 18**), lo cual confirma que efectivamente el gen *chrS* regula la expresión de los genes *chr* de forma negativa. Interesantemente, se determinó que a medida que aumenta la concentración de cromato la expresión de los genes *chr* de la cepa con el plásmido pACywrC-*chr3N-
chr3C* aumentó hasta alcanzar un nivel similar a la cepa que carece del gen *chrS* (pAChr3NC) (**Figura 20**). Estos resultados parciales (n=2) sugieren que el cromato actúa como un inductor, permitiendo que los genes *chr* se expresen y las proteínas generadas cumplan su función en la resistencia a cromato aún en presencia del represor *chrS*.

En la **Figura 21** se propone la manera en que el gen *chrS* actúa como regulador transcripcional. La proteína ChrS se une a diferentes sitios (§) en el gen que la codifica evitando la unión de la RNA polimerasa así como la transcripción de los genes río abajo *chr3N-
chr3C* (1). Al estar presente el cromato (inductor), éste evita que ChrS se una a los sitios (§), lo que permite la unión de la RNA polimerasa al DNA y la subsecuente transcripción de los genes *chr3N-
chr3C* (2).

Como perspectivas de este trabajo sería interesante evaluar la interacción de ChrS con el DNA utilizando geles de retardo, así como también analizar la expresión de los genes *chrS-
chr3N-
chr3C* mediante RT-PCR en la cepa de *B. subtilis*.

XI. CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró que el producto proteico del gen *chrS* de *Bacillus subtilis* 168, predicho como un regulador transcripcional de la familia Lrp, regula de manera negativa la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C*, sugiriendo que los tres genes forman un operón.

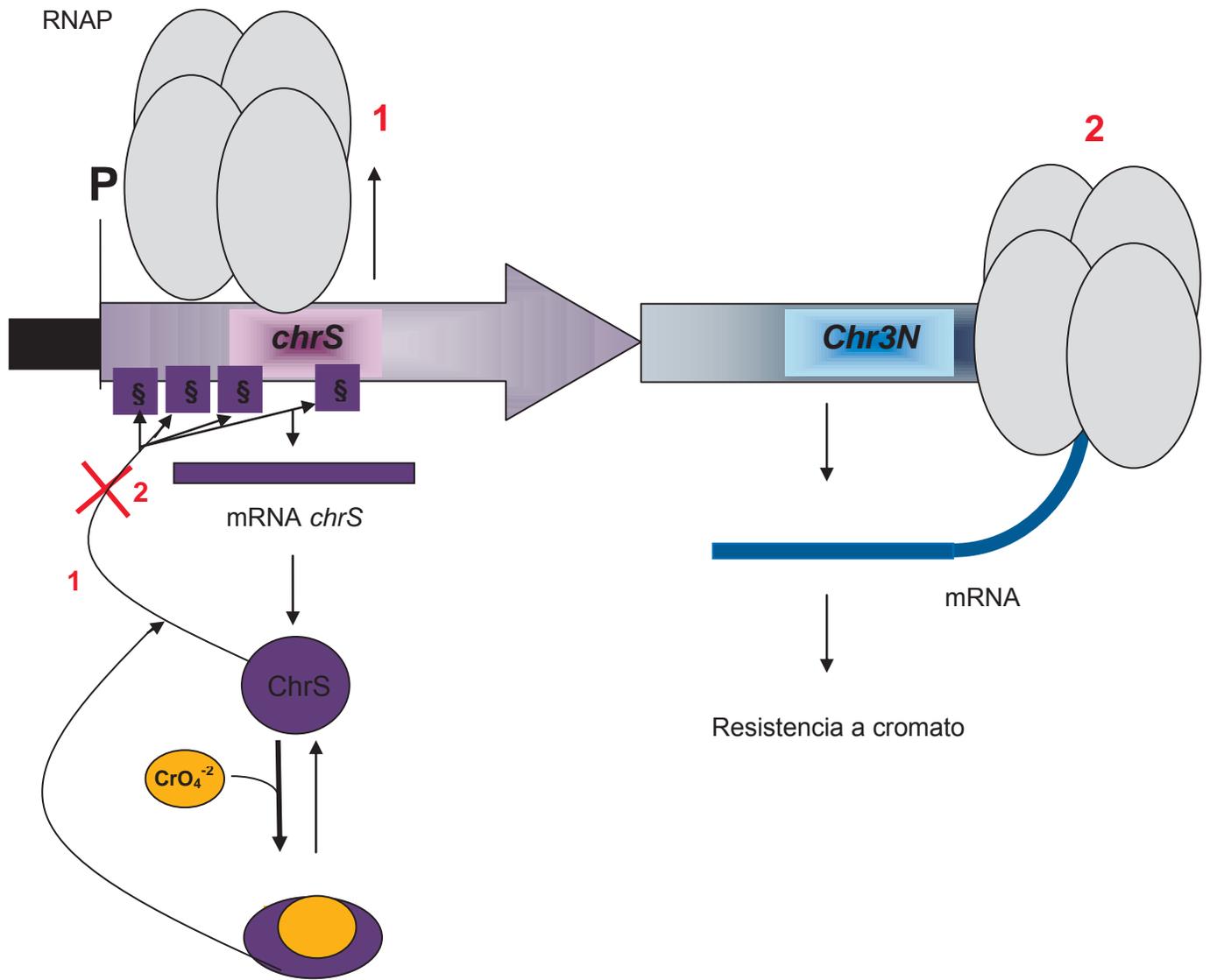


Figura 21. Modelo hipotético de la regulación del operón de *B. subtilis*. Con flechas grandes se representan los genes *chrS* y *chr3N*. Se marcan los probables sitios de unión de ChrS al DNA (§), RNAP (RNA polimerasa), CrO₄⁻² (cromato), mRNA (RNA mensajero). El mecanismo se describe en el texto.



XII. BIBLIOGRAFIA

- 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. 2851:97-100.
- Beloin C.**, Exley R., Mahé A-L., Zouine M., Cubasch S. y Le Hégarat F. (2000). Characterization of LrpC DNA-binding properties and regulation of *Bacillus subtilis* *lrpC* gene expression. J. Bacteriol. 182: 4414–4424.
- Birnboim H.C.** y Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
- Branco R.**, Chung A.P. y Morais P.V. (2008). Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. BMC Microbiol. 8:95.
- Brinkman A.B.**, Dahlke I., Tuininga J.E., Lammers T., Dumay V., de Heus E., et al. (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. J. Biol. Chem. 275:38160–38169.
- Brinkman B.**, Thijs J.G. Ettema, de Vos W.M. y van der Oost J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. J. Mol. Biol. 48:287–294.
- Cervantes C.** y Silver S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid 27:65-67.
- 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.**, Ohtake H., Chu L., Misra T.K. y Silver S. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. 172:287-291.



Chang A.C. y Cohen S.N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P154 cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134:1141-1156.

Chen S., Rosner M.H. y Calvo J.M. (2001a). Leucine-regulated self association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 312:625–635.

Chen S., Hao Z., Bieniek E. y Calvo J.M. (2001b). Modulation of Lrp action in *Escherichia coli* by leucine: effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *J. Mol. Biol.* 314:1067–1075.

Cui Y., Wang Q., Stormo G.D. y Calvo J.M. (1995). A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.* 177:4872–4880.

Díaz-Magaña A., Aguilar-Barajas E., Moreno-Sánchez R., Ramírez-Díaz M.I., Riveros-Rosas H., Vargas E. y Cervantes C. (2009). Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191:5441–5445.

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.

Ernsting B.R., Atkinson M.R., Ninfa A.J. y Matthews R.G. (1991). Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:1109-1118.

Ettema T.J.G., Brinkman A.B., Tani T.H., Rafferty J.B. y Van der Oost, J. (2002). A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 277:37464–37468.

Friedberg D., Midkiff M. y Calvo, J.M. (2001). Global versus local regulatory roles for Lrp-related proteins: *Haemophilus influenzae* as a case study. *J. Bacteriol.* 183:4004–4011.



Harman J.G. (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1547:1–17.

Hayashi K., Morooka N., Yamamoto Y., Fujita Y., Isono K., Choi S., Ohtsubo E., Baba T., Wanner B. L., Mori H y Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* 2:1-5.

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.

Ish-Horowicz D. y Burke J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998.

Jacob F. y Monod J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318-356.

Jafri S., Evoy S., Cho K., Craighead H.G. y Winans S.C. (1999). An Lrp-type transcriptional regulator from *Agrobacterium tumefaciens* condenses more than 100 nucleotides of DNA into globular nucleoprotein complexes. *J. Mol. Biol.* 288: 811–824.

Jiménez-Mejía R., Campos-García J. y Cervantes C. (2006). Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 262:178-184.

Juhnke S., Peitzsch N., Hubener N., Grosse C. y Nies D.H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* 179:15-25.

Kadiiska MB, Xiang Q.H. y Mason R.P. (1994). In vivo free radical generation by chromium (VI): An electron resonance spin-trapping investigation. *Chem. Res. Toxicol.* 7:800–805.

Khasim D. I, Kumar N. V. y Hussain, R. C. (1989). Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. *Bull. Environ. Con-*



tam. Toxicol. 43:742-746.

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert, S. et al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390:249–256.

Landgraf J.R., Boxer J.A. y Calvo J.M. (1999). *Escherichia coli* Lrp (leucine-responsive regulatory protein) does not directly regulate expression of the *leu* operon promoter. J. Bacteriol. 181:6547–6551.

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

León-Marquez Y. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de maestría. IIQB, UMSNH.

Levinthal M., Lejeune P. y Danchin A. (1994). The H-NS protein modulates the activation of the *ilvH* operon of *Escherichia coli* K12 by Lrp, the leucine regulatory protein. Mol. Gen. Genet. 242:736–743.

Levis A.G. y Bianchi V. (1982). Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds. En: Langard S (ed.) Biological and environmental aspects of chromium. Elsevier, Amsterdam, P. 171–208.

Lewin B. (2000). Genes VII. Marbán (Ed.), pp.273-318. Cambridge, Massachussetts.

López-Torrejon G, Martínez-Jiménez M.I. y Ayora S. (2006). Role of LrpC from *Bacillus subtilis* in DNA transactions during DNA repair and recombination. Nucleic Acids Res. 34:120–129.

Maas W.K. y Clark A.J. (1964). Studies on the mechanisms of repression of arginine biosynthesis in *Escherichia coli* 11. Dominance of repressibility in diploids. J. Mol. Biol. 8:365-370.

Madhusudhan K.T., Huang N. y Sokatch, J.R. (1995). Characterization of BkdR-DNA



binding in the expression of the *bkd* operon of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 177:636–641.

Mathew E., Zhi J. y Freundlich, M. (1996). Lrp is a direct repressor of the *dad* operon in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178:7234–7240.

Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahern K.G. (2002). Bioquímica. Pearson (Ed.), pp 1125-1145. Madrid, España.

McGrath S.P. y Smith S. (1990). Chromium and nickel. En: Heavy Metals in Soils. Alloway, B.J. (Ed.), pp. 125-150. Wiley, New York.

Nies D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 27:313-339.

Nies D.H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch 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.

Nies A., Nies D.H. y Silver S. (1989). Cloning and expression of plasmid genes encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 171:5065-5070.

Ohno S. (1970). Evolution by Gene Duplication. New York: Springer.

Paul L., Blumenthal R.M. y Matthews R.G. (2001). Activation from a distance: roles of Lrp and integration host factor in transcriptional activation of *Gltbdf*. J. Bacteriol. 183:3910–3918.

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

Plaper A., Jenko-Brinovec S., Premzl A., Kos J., Raspor P. (2002). Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. Chem. Res. Toxicol. 15:943–949.



Pushker R., Mira A. y Rodríguez-Valera F. (2004). Comparative genomics of gene-family size in closely related bacteria. *Genome Biology* 5:R27.

Ramírez-Díaz M. I., Díaz-Pérez C., Vargas E., Riveros-Rosas H., Campos-García J. y Cervantes C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321-332.

Rocha E.P.C., Danchin A. y Viari A. (1999). Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from genome analysis. *Nucleic Acids Res.* 17:3567-3576.

Rose R. E. (1988). The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* 16:355.

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Silver S. y Phung L.T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.

Thaw P., Sedelnikova S.E., Muranova T., Wiese S., Ayora S., Alonso J.C., Brinkman A.B., Akerboom J., van der Oost J. y Rafferty J.B. (2006). Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family. *Nucleic Acids Res.* 34:1439–1449.

Wang Q. y Calvo J.M. (1993). Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *EMBO J.* 12: 2495–2501.

West, S. E., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K. y Runyen-Janecky, L.J. (1994). Construction of improved *Escherichia coli*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148:81-86.



Weyand N.J., Braaten B.A., van der Woude M., Tucker J. y Low D.A. (2001). The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from -215. *J. Mol. Biol.* 39:1504–1522.

Willins D.A., Ryan C.W., Platko J.V. y Calvo J.M. (1991). Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.* 266:10768–10774.

Yasbin, R.E., Wilson G.A y Young F. E. (1975). Transformation and tranfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells. *J. Bacteriol.* 121:296-304.