



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Análisis de la Regulación de los Genes
chr de *Burkholderia xenovorans* LB400”**

Tesis

**Para obtener el Título de
Químico Farmacobiólogo**

Presenta:

Karina Salinas Herrera

Asesor:

D.C. Carlos Cervantes Vega

Co-asesor:

D.C. Rafael Jiménez Mejía

Morelia, Mich., Octubre de 2011

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. CARLOS CERVANTES VEGA Y LA CO-ASESORÍA DEL D.C. RAFAEL JIMÉNEZ MEJÍA.

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

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores en Ciencias Carlos Cervantes Vega y Rafael Jiménez Mejía por contribuir positivamente en la realización del presente, por sus asesorías aplicadas siempre con ética, con paciencia y profesionalidad desde el principio de esta historia de retos que significó mi tesis. Mi respeto y admiración.

A mis amigos y amigas del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por la solidaridad y el apoyo sincero, gracias por su amistad.

DEDICATORIAS

A mis papás y hermanos, a toda mi familia en general; por enseñarme el amor al estudio, confiando y comprendiendo siempre mis ideales.

A ese bebito por la esperanza que como fin tiene el conato de su vida, a mi esposo por el apoyo incondicional, por estar siempre ahí, por la resistencia de esta historia casi espontánea.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato	1
1.1 Generalidades del cromato	1
1.2 Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato	1
1.3 Mecanismo de resistencia a cromato conferido por ChrA	3
1.4 Superfamilia de transportadores CHR	3
2. Género <i>Burkholderia</i>	5
2.1 <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	7
2.2 Características genómicas de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	8
3. Redundancia génica y funcional	8
4. Regulación transcripcional	9
5. Fusiones transcripcionales	13
II. ANTECEDENTES	16
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVO GENERAL	21
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Reactivos y medios de cultivo	23
2. Cepas empleadas	23
3. Vector para fusiones transcripcionales	24
4. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las regiones promotoras de los genes <i>chr</i>	24
5. Construcción de plásmidos recombinantes	27
6. Análisis de plásmidos	27
6.1 Aislamiento de plásmidos	27
6.2 Electroforesis en geles de agarosa	27
6.3 Restricción con endonucleasas	28
7. Transformación de células competentes	28

7.1 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> JM101_____	28
7.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> JM101_____	29
7.3 Preparación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1_____	29
7.4 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> JM101_____	30
8. Determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa_____	30
IX. RESULTADOS_____	32
1. Construcción de fusiones transcripcionales_____	32
1.1 Localización de las regiones promotoras_____	32
1.2 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los genes <i>chr</i> _____	32
1.3 Amplificación por PCR de las regiones promotoras_____	35
1.4 Construcción de las fusiones transcripcionales <i>chr-lacZ</i> _____	37
2. Análisis transcripcional del probable operón <i>chrBA2FC</i> _____	37
3. Análisis transcripcional de las regiones reguladoras de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> _____	42
3.1 Cinética de expresión de <i>chrB-lacZ</i> _____	45
3.2 Cinética de expresión de <i>chr1NCb-lacZ</i> _____	49
3.3 Cinética de expresión de <i>chrA6-lacZ</i> _____	49
4. Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> _____	52
4.1 Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> (CN)_____	52
4.2 Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> (LB)_____	55
4.3 Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> (MM)_____	57
5. Efecto de la temperatura sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> _____	57
X. DISCUSIÓN_____	62
XI. CONCLUSIÓN_____	72
XII. BIBLIOGRAFÍA_____	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expulsión de cromato por la proteína ChrA de <i>P. aeruginosa</i> _____	4
Figura 2. Distribución taxonómica de los transportadores de la superfamilia CHR_____	6
Figura. 3. Localización de los genes <i>chr</i> en el genoma de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400_____	10
Figura 4. Elementos de la regulación transcripcional_____	12
Figura 5. Fusión transcripcional para la caracterización o identificación de un posible promotor_____	15
Figura 6. Susceptibilidad a cromato de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400_____	17
Figura 7. Vector pLP170 para fusiones transcripcionales_____	25
Figura 8. Diseño de oligonucleótidos para los genes <i>chr</i> de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400_____	34
Figura 9. Amplificación por PCR de las regiones promotoras de los genes <i>chr</i> _____	36
Figura 10. Representación esquemática de la construcción de las fusiones transcripcionales_____	38
Figura 11. Caracterización del los plásmidos recombinantes <i>pchr-lacZ</i> _____	39
Figura 12. Actividad transcripcional del probable operón <i>chrA2BFC</i> _____	41
Figura 13. Actividad transcripcional de las fusiones <i>chrB-lacZ</i> y <i>chrBA-lacZ</i> _____	43
Figura 14. Efecto del cromato sobre la actividad transcripcional de las fusiones <i>chrB-lacZ</i> y <i>chrBA-lacZ</i> (MM)_____	44
Figura 15. Fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400_____	46
Figura 16. Análisis de las regiones reguladoras de los homólogos <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400_____	47
Figura 17. Cinética de expresión de la fusión <i>chrB-lacZ</i> _____	48
Figura 18. Cinética de expresión de la fusión <i>chr1NCb-lacZ</i> _____	50
Figura 19. Cinética de expresión de la fusión <i>chrA6-lacZ</i> _____	51
Figura 20. Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de los genes <i>chr</i> __	53

Figura 21. Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> en CN_____	54
Figura 22. Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> en LB_____	56
Figura 23. Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> en MM_____	58
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la expresión de los promotores de los genes <i>chr</i> _____	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resistencia a cromato conferida por los homólogos <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> expresados en <i>E. coli</i> a partir de diferentes plásmidos y crecida en medios de cultivo diferentes_____	18
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> _____	26
Tabla 3. Ubicación de las secuencias promotoras de los homólogos <i>chr</i> presentes en <i>B. xenovorans</i> LB400_____	33
Tabla 4. Resumen de la actividad transcripcional de las fusiones <i>chr-lacZ</i> en diferentes medios de cultivo_____	61

RESUMEN

La bacteria *Burkholderia xenovorans* LB400 posee en su genoma seis homólogos de la superfamilia de transportadores de cromato CHR que se expresan a nivel transcripcional de manera diferencial en presencia de sulfato y cromato. En este trabajo se construyeron fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los seis homólogos *chr* con el gen reportero *lacZ*, que permitan evaluar la actividad transcripcional de cada gen bajo diferentes condiciones de crecimiento. Tres de los homólogos *chr* presentaron niveles de transcripción diferencial: *chrA6*, *chr1NCb* y *chrB* (gen que es parte del operón *chrBA2CF*). Al realizar cinéticas de expresión, se observó que al entrar las cepas con las tres fusiones a la fase estacionaria la actividad de *lacZ* descendió, recuperándose horas más tarde para mantenerse casi constante hasta las 24 h. Al someter las cepas con las fusiones a distintas condiciones nutricionales se observó una respuesta diferencial, siendo la fusión *chrA6-lacZ* la que mostró el doble de actividad en los medios ricos en nutrientes que en un medio mínimo. Al crecer las mismas cepas en caldo nutritivo y presencia de cromato, la actividad transcripcional de los genes *chrB* y *chr1NCb* aumentó. Al comparar dos temperaturas de crecimiento, 30 y 37°C, la fusión *chrA6-lacZ* presentó una actividad ~23 veces mayor a de 37°C. De estos resultados se concluyó que las condiciones ambientales regulan la actividad transcripcional de los homólogos *chr* presentes en *B. xenovorans* LB400, favoreciendo a esta bacteria en condiciones de estrés metabólico y pudiendo soportar la presencia del cromato.

I. INTRODUCCIÓN

1. Mecanismos bacterianos de resistencia a cromo

1.1 Generalidades del cromo

El cromo (Cr) tiene un gran número de aplicaciones a nivel industrial, como son: protector y acabados brillantes sobre metales, componente en aleaciones del acero inoxidable, pigmentos, curtido de pieles y textiles, conservador de la madera, catalizador, en cintas magnéticas de dióxido de cromo, en el etiquetado de glóbulos rojos, como fungicida, entre otras (Shupak, 1991). El uso generalizado del Cr en diversos procesos industriales lo ha convertido en un serio contaminante de aire, suelo, y agua (Khasim y col., 1989). La toxicidad del Cr(VI) está relacionada con el proceso de reducción a estados de oxidación más bajos y en este proceso se forman radicales libres que pueden desencadenar alteraciones directamente en el DNA (Cervantes y col., 2001), además de reducción dentro de la célula del Cr(VI) a Cr(III), el cual tiene la capacidad de formar compuestos estables con varios ligandos entre ellos proteínas y DNA (Zhitkovich, 2001).

1.2 Mecanismos bacterianos de resistencia a cromo

La presencia de altas concentraciones de cromo (CrO_4^{-2}) en el ambiente ha seleccionado variantes bacterianas resistentes a este oxianión. Dichos organismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos del cromo (Silver y Phung, 2005). Los mecanismos de resistencia a cromo pueden ser codificados por genes localizados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano (Cervantes y col., 2001). Usualmente, los genes localizados en plásmidos codifican

transportadores de membrana denominados ChrA, los cuales directamente median la expulsión del ion cromato del citoplasma hacia el periplasma celular evitando de esta forma los efectos tóxicos del cromato en el interior de la célula (Ramírez-Díaz y col., 2007). Por otro lado, los sistemas de resistencia codificados por cromosomas están generalmente relacionados con estrategias como reducción específica o inespecífica de Cr(VI), destoxificación de radicales libres y reparación de daño al DNA (Ramírez-Díaz y col., 2007). Sin embargo, a la fecha se han descrito sistemas de resistencia homólogos a ChrA que median la expulsión del cromato cuyos genes se ubican en el cromosoma. En el 2009 se describió que en el cromosoma de *Bacillus subtilis* 168 están presentes los genes *chr3N* y *chr3C* que codifican a los transportadores de membrana Chr3N y Chr3C, capaces de conferir resistencia a cromato cuando se expresan en pareja en *Escherichia coli* (Díaz-Magaña y col., 2009); otro ejemplo son los genes *chrA6*, *chr1NCa* y *chrA1a* de *Burkholderia xenovorans* LB400 que en condiciones específicas son capaces de conferir resistencia a cromato cuando se expresaron en *E. coli* (León-Márquez 2009). La bacteria *Ochrobactrum tritici* 5bv11, que fue aislada de un conjunto de bacterias adaptadas a vivir en el medio ambiente con altas concentraciones de cromo, contiene también genes cromosómicos que confieren tolerancia a Cr(VI), localizados en el transposón TnOtChr (Branco y col., 2008). *Cupriavidus metallidurans* (antes *Alcaligenes eutrophus* y *Ralstonia metallidurans*) es otro ejemplo de bacterias con homólogos *chr* presentes en cromosoma, ya que posee el gen *chrA2* que responde a la exposición a cromato (Nies y col., 1990).

1.3 Mecanismo de resistencia a cromato conferido por ChrA

Dos de las proteínas ChrA más ampliamente estudiadas son la codificada en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y la del plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* (Nies y col., 1990). ChrA de *P. aeruginosa* es una proteína hidrofóbica que consta de 416 aminoácidos (aa) y que posee una topología de 13 segmentos transmembranales (STMs) (Jiménez-Mejía y col. 2006), mientras que ChrA de *C. metallidurans* es de 401 aa y posee una topología de 10 STMs (Nies y col. 1998).

Funcionalmente sólo se ha caracterizado ChrA de *P. aeruginosa*, a la cual se ha dado un papel de transportador de membrana interna que expulsa el cromato del citoplasma utilizando la fuerza protón motriz como fuente de energía, evitando así sus efectos tóxicos dentro de la célula (Álvarez y col., 1999; Pimentel y col., 2002) (**Figura 1**).

1.4 Superfamilia de transportadores CHR

En 1998 el análisis de algunos genomas secuenciados permitió identificar varios posibles homólogos a la proteína ChrA, que en un principio se agruparon como la familia CHR de transportadores de cromato (Nies y col., 1998). Más recientemente, mediante una búsqueda exhaustiva en los genomas secuenciados disponibles en las bases de datos hasta ese momento, se identificaron 135 secuencias homólogas a ChrA, pertenecientes a bacterias, hongos y arqueas, las cuales integran la superfamilia de transportadores CHR (Díaz Pérez y col., 2007). De acuerdo al análisis filogenético de los transportadores, éstos se clasificaron de acuerdo a su tamaño en proteínas bacterianas monodominio, o CHR de

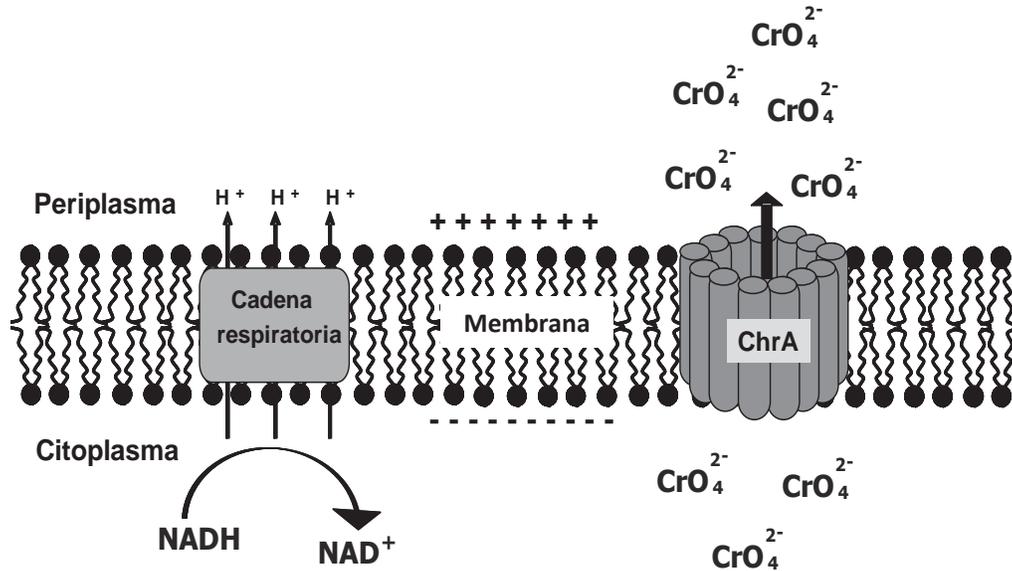


Figura 1. Expulsión de cromato por la proteína ChrA de *P. aeruginosa*. La proteína membranal ChrA expulsa los iones cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma hacia el espacio periplásmico empleando el potencial de membrana generado durante el bombeo de protones de la cadena respiratoria (Adaptado de Álvarez, 1999).

cadena corta (SCHR), con una longitud de aproximadamente 200 aa, y en proteínas bidominio, con una longitud de alrededor de 400 aminoácidos, llamadas CHR de cadena larga (LCHR) (Díaz Pérez y col., 2007). Con respecto a la distribución de las proteínas LCHR en bacterias, se encontró que las β -proteobacterias son el grupo taxonómico con el mayor número de homólogos de ChrA, presentando proteínas de cinco subfamilias diferentes, cuatro de éstas LCHR (**Figura 2**). Algunos organismos pertenecientes a esta división son *C. metallidurans*, bacteria resistente a cromato que posee tres LCHRs y un par de SCHR, *Burkholderia vietnamiensis* G4 que posee cinco LCHRs y dos pares de SCHR, y *B. xenovorans* LB400 que posee cuatro LCHRs y dos pares de SCHR (Díaz-Pérez y col., 2007). El hecho de que estos organismos posean más de un sistema de resistencia a cromato puede conferir la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales y/o nutricionales en las cuales el cromato es el común denominador tóxico.

2. Género *Burkholderia*

El género *Burkholderia*, del filo β -proteobacteria, es un grupo de organismos filogenéticamente bien definido que agrupa especies que habitan diversos nichos ecológicos, las especies descritas comprenden bacterias aisladas del suelo y la rizósfera, así como patógenos de plantas, patógenos de humanos y patógenos oportunistas de humanos (Payne y col., 2005). Las bacterias del género *Burkholderia* son bacilos Gram negativos, no fermentadores, con uno o varios flagelos polares, son productores de catalasa y la actividad de oxidasa varía entre las especies. Todas las especies pueden crecer con los

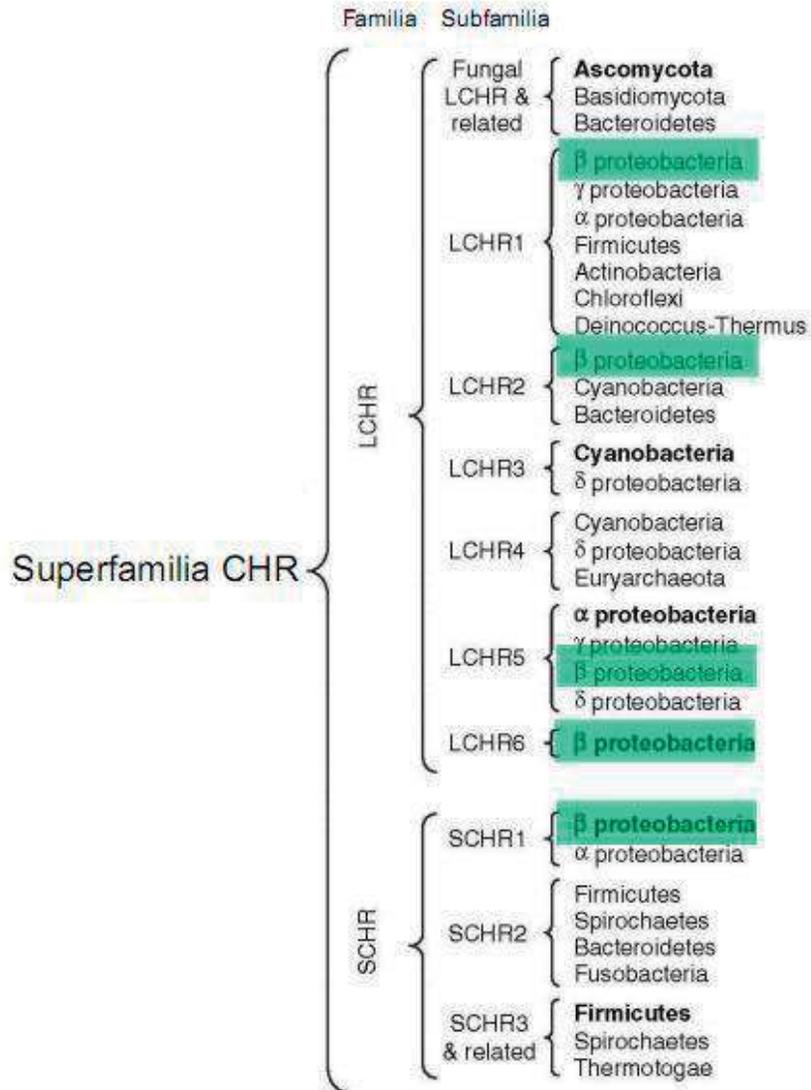


Figura 2. Distribución taxonómica de los transportadores de la superfamilia CHR. Se indican la familia y subfamilia a la que pertenecen los transportadores de la superfamilia CHR y los grupos taxonómicos a los que pertenecen los microorganismos que presentan proteínas ChrA. Las β -proteobacterias (en recuadro verde) presentan proteínas de cuatro subfamilias LCHR, además de la subfamilias SCHR1 (Modificado de Díaz-Pérez y col., 2007).

siguientes sustratos como fuente única de carbono: glucosa, glicerol, inositol, galactosa, sorbitol y manitol. El contenido promedio de G-C de sus genomas es de 59 a 69.5 mol/% (Gillis y col., 1995).

2.1 *Burkholderia xenovorans* LB400

B. xenovorans LB400 fue aislada de muestras de suelo contaminado con bifenilos policlorados (PCB) en Moreau, Nueva York, EEUU, por ingenieros de la compañía General Electric; es el mejor degradador de PCB estudiado ya que es capaz de oxidar más de 20 especies de PCB, incluyendo algunos con 4, 5 y 6 sustituciones de cloro en los anillos de bifenilo (Goris y col., 2004). Proviene de un grupo filogenético de aislados de la rizosfera y suelos con una gran variedad de compuestos aromáticos de origen natural (Bedard y col., 1986). Además de la degradación de uno de los contaminantes más difíciles de degradar, el género *Burkholderia* es importante también para la economía del carbono del suelo, fija N₂ y ayuda a las plantas para la fijación de CO₂ (Goris y col., 2004). Esta bacteria es conocida por muchos nombres, originalmente se había descrito como *Pseudomonas cepacia* y después *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia spp*, *Burkholderia fungorum* y ahora *Burkholderia xenovorans*. Este organismo se asignó en el género *Burkholderia*, ya que su secuencia del RNAr 16S muestra una similitud de 98.6% con las cepas tipo *B. graminis* y *B. terricola* (Goris et al, 2004). Son bacilos rectos (1-2 µm de largo y 0.5 µm de ancho), Gram negativos, móviles, no esporulados, crece en agar nutritivo a 28°C pero no a 42°C ni en presencia de acetamida, NaCl (6% p/v) o lactosa (10% p/v), no produce ácido o H₂S en agar triple azúcar-hierro y no produce indol o

pigmentos (Goris y col., 2004).

2.2 Características genómicas de *Burkholderia xenovorans* LB400

La secuenciación del genoma de *B. xenovorans* LB400 reveló que tiene un tamaño de 9.73 megapares de bases (Mpb), con aproximadamente 9,000 secuencias codificantes distribuidas en tres replicones designados como cromosoma 1 (4.90 Mpb), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y megaplásmido (1.47 Mpb). El cromosoma 1 es considerado el cromosoma medular ya que en él se codifican las funciones celulares básicas, por ejemplo, la maquinaria requerida para la traducción, replicación, división celular y el metabolismo de nucleótidos. Tanto el cromosoma 2 como el megaplásmido tienen funciones enfocadas al metabolismo energético, secundario, transporte y metabolismo de iones inorgánicos y aminoácidos (Chain y col., 2006). Es común para la mayoría de las especies de *Burkholderia* tener un genoma grande, compuesto por varios replicones, así como la presencia de múltiples secuencias de inserción que les confieren alta plasticidad genómica, lo cual explica la versatilidad de colonizar nuevos nichos y en procesos metabólicos del género (Lessie y col., 1996).

3. Redundancia génica y funcional

Los organismos vivos han evolucionado para ser funcionales en entornos difíciles y con frecuencia variables, ésta capacidad se denomina robustez; una fuente común de robustez es la redundancia génica (Kitano, 2004). Por lo tanto, varias copias de miembros de familias de genes proporcionan una aparente redundancia funcional de la actividad de la proteína en particular y

se explican a veces por la necesidad de la célula para tener sistemas de copia de seguridad, y otras veces se explica por la necesidad de la célula para adaptarse a diferentes condiciones de estrés (Aslund y col., 1999). La redundancia génica y funcional parece ser un aspecto importante en genomas bacterianos grandes. El análisis del genoma de *B. xenovorans* reveló que 1,581 secuencias codificantes (17.6% del total de genes) tienen un parálogo dentro del mismo genoma de *B. xenovorans* LB400 y no un ortólogo en otros 260 genomas secuenciados. Hasta la fecha, este porcentaje de redundancia génica y funcional representa el más alto existente entre los genomas de bacterias de vida libre, donde el promedio de redundancia génica es de 7.6% (Chain y col., 2006). Dentro de la lista de genes redundantes del genoma de *B. xenovorans* LB400 se encuentran seis genes homólogos a *chrA* de *P. aeruginosa* (**Figura 3**), que están relacionados con la resistencia que presenta esta bacteria a cromato. Tres de ellos están localizados en el cromosoma 1, dos en el cromosoma 2 y uno más ubicado en el megaplásmido (León-Márquez y col., 2009).

4. Regulación transcripcional

Al ser los genes segmentos de DNA capaces de dirigir la síntesis de proteínas determinadas, han de contener las señales o información necesaria para realizar estos procesos, según un criterio de funcionalidad. Un gen estará constituido por un promotor, que es una breve secuencia de nucleótidos que es reconocida por la enzima RNA polimerasa, una región codificante, que es el fragmento de DNA que determina la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada con su respectivo codón de inicio y

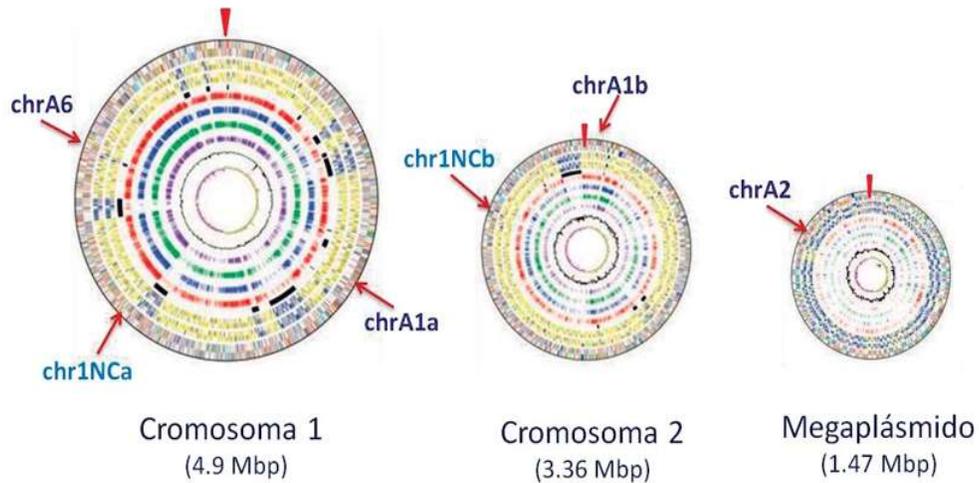


Figura. 3. Localización de los genes *chr* en el genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400. Se muestra el esquema y el tamaño de los tres replicones presentes en *B. xenovorans* LB400, denominados Cromosoma 1, Cromosoma 2 y Megaplásmido. Se indica la localización de los seis homólogos *chr* distribuidos en cada uno de los replicones: cuatro homólogos de la familia LCHR (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6) y dos homólogos de la familia SCHR (Chr1NCa y Chr1NCb) (Modificado de Chain y col., 2006).

codón de terminación, y que contiene las señales que determinan el paro en el proceso de transcripción (**Figura 4A**). Todas estas señales son decodificadas por interacciones establecidas con proteínas específicas (Hawkins, 1996).

Las bacterias poseen una compleja red de sistemas de regulación, que actúan como sensores de estrés y efectores que garantizan una respuesta molecular coordinada y eficaz debido a cambios de estímulos ambientales (Helmann, 2009). El componente central en la regulación transcripcional en las bacterias es la RNA polimerasa, enzima responsable de la transcripción de los genes de esos organismos. La RNA polimerasa es un complejo proteico que estructuralmente está formada por las subunidades beta (β), beta prima (β'), dos subunidades alfa (α) y la subunidad omega (ω), además de un factor dissociable conocido como factor sigma (σ) (Helmann, 2009) (**Figura 4B**). En la mayoría de las especies bacterianas la expresión de los genes es estrechamente controlada por un repertorio de reguladores transcripcionales y varios factores sigma que son capaces de distinguir a los promotores necesarios para diferentes funciones celulares (Potvin y col., 2008). El paso principal en la iniciación de la transcripción es el reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa (Browning y col., 2004). Son cinco mecanismos moleculares los que modulan la correcta distribución de la RNA polimerasa entre los promotores, éstos son la secuencia del promotor, factores σ , pequeños ligandos, los factores de transcripción y la estructura plegada del cromosoma bacteriano; cada uno de estos mecanismo permite la variación en el nivel de expresión de los genes (Browning y col., 2004). El conjunto de los factores mencionados le da a las

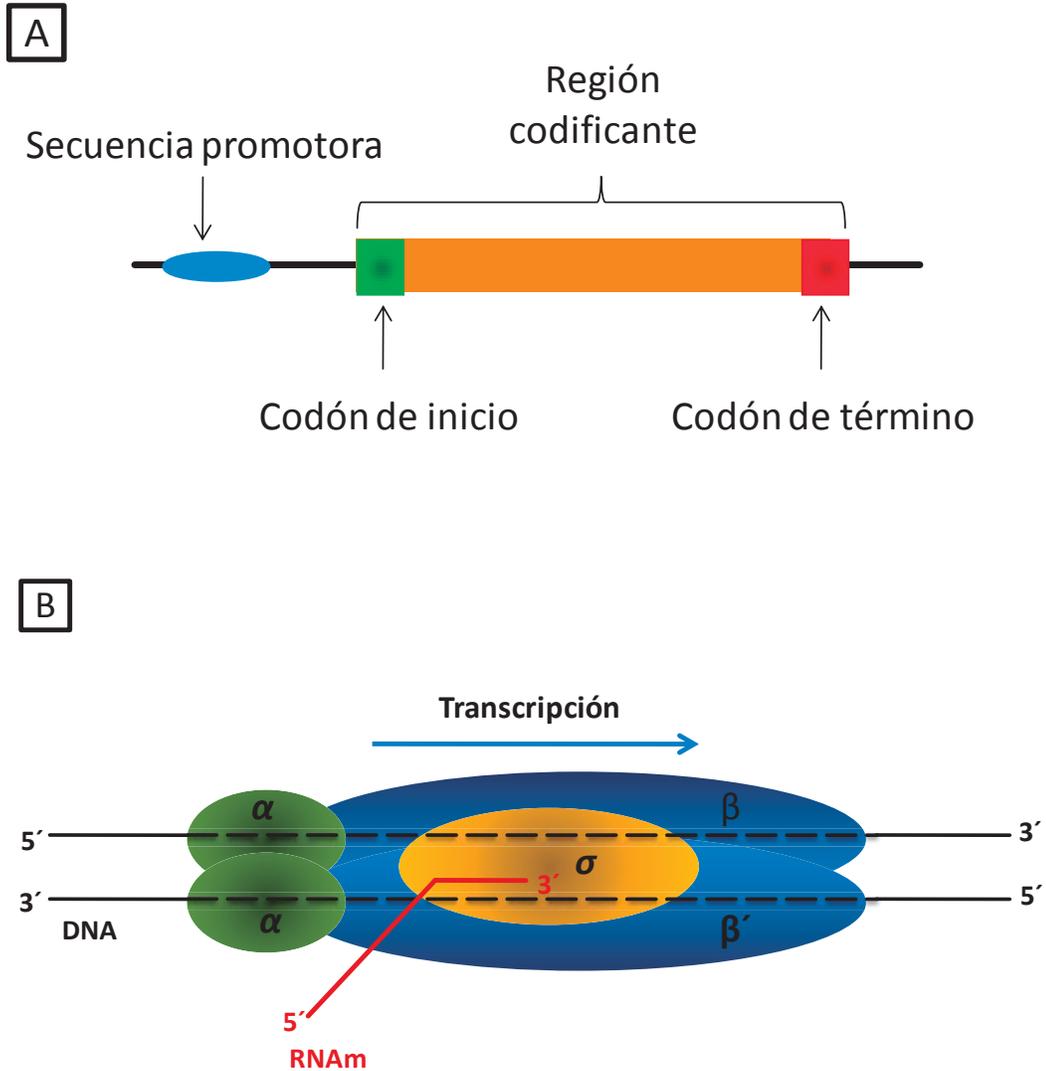


Figura 4. Elementos de la regulación transcripcional. **A.** Componentes estructurales de genes procariotas. **B.** RNA polimerasa. Se muestra el esquema de la holoenzima bacteriana, en color verde las dos subunidades α , en color azul las subunidades β y β' , y en color amarillo la subunidad σ . La flecha indica el sentido de la transcripción. La línea inferior muestra una molécula naciente de RNA mensajero.

bacterias su característica más destacada que es la adaptación a las condiciones cambiantes del medio en el que se desarrollan, modificando su patrón de expresión génica en función de dichas condiciones (Browning y col., 2004).

5. Fusiones transcripcionales

La fusión de genes se utiliza con frecuencia para analizar la expresión génica y la actividad del promotor, haciendo uso de genes reporteros, ya que para muchos genes es difícil el ensayo del producto como forma de monitoreo de la expresión (Forsberg y col., 1994). Un gen reportero se define como una secuencia definida de nucleótidos que cuando se introduce en un sistema biológico se obtiene un fenómeno fácilmente medible, esto proporciona un parámetro práctico que se correlaciona con los eventos moleculares asociados con la expresión genética (Wood, 1995). Las proteínas codificadas por genes reporteros más usadas son: β -galactosidasa, luciferasa, hormona del crecimiento (HG), β -glucuronidasa (GUS), fosfatasa alcalina (AP) y, más recientemente, β -lactamasa y proteína verde fluorescente (GFP) (Schenborn y col., 1999). Estos genes reporteros se encuentran en vectores de expresión que, además de los componentes necesarios de los vectores para la producción óptima, presentan consideraciones adicionales para su diseño. El gen reportero no debe de tener elementos de control ni sitios de regulación, posee un gen de selección y un origen de replicación generalmente para *E. coli*. Muchos vectores reporteros poseen dos sitios de multiclonación uno flanqueando río arriba al gen reportero, con la finalidad de clonar un posible promotor o potenciador;

el otro sitio de clonación se puede utilizar para incorporar marcadores de selección genética (Schenborn y col., 1999).

Algunas aplicaciones de los genes reporteros son: identificación y caracterización funcional de promotores o potenciadores, identificación de interacciones entre proteínas, monitoreo de la lisis celular, ensayos virales y mecanismos de acción, eventos de recombinación dirigida de genes, transporte intracelular, etc. Para la identificación y caracterización funcional de un promotor o potenciador las regiones promotoras se clonan río arriba del gen reportero (**Figura 5**) y el gen quimérico se introduce en células cultivadas, la expresión de la proteína reportera se correlaciona con la actividad transcripcional del gen reportero. Los ensayos para detectar las proteínas reporteras son de gran versatilidad, ya que pueden ser identificadas mediante características endógenas tales como su actividad enzimática, o ensayos basados en anticuerpos (Schenborn y col., 1999).

Como ya se mencionó, un ejemplo de proteína reportera detectada por su actividad enzimática es la β -galactosidasa, que es transcrita y traducida del gen reportero *lacZ*. Algunas características de LacZ son que es una enzima tetramérica, cataliza la hidrólisis de galactósidos, por ejemplo o-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG), que es un sustrato cromógeno fácilmente detectable (Schenborn y col., 1999).

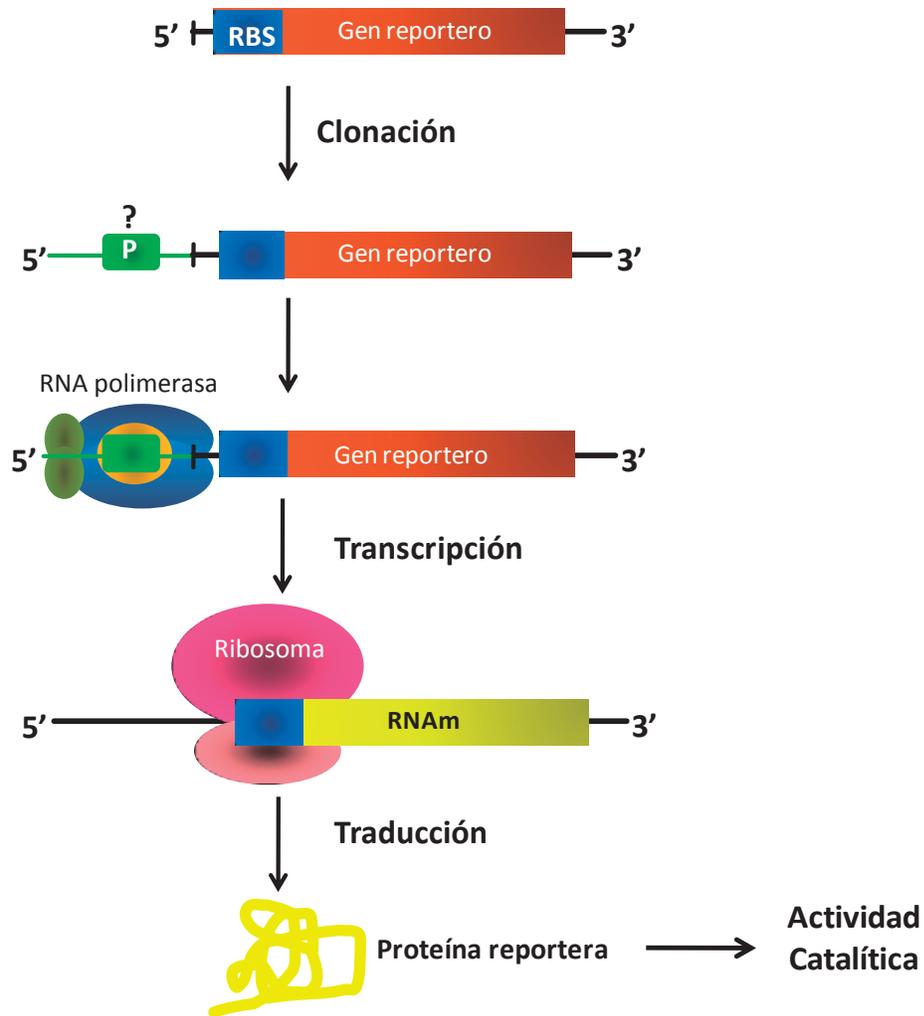


Figura 5. Fusión transcripcional para la caracterización o identificación de un posible promotor. La expresión del gen reportero estará regulada por la región promotora insertada río arriba. Si el promotor es funcional, es reconocido por la RNA polimerasa para su transcripción y posterior traducción del RNAm a la proteína reportera. El gen reportero posee su propio sitio de unión a ribosoma (RBS), asegurando que no se condicione la traducción, la proporción de proteína reportera, medida por medio de su actividad catalítica, estará relacionada directamente con la actividad transcripcional del promotor insertado.

II. ANTECEDENTES

De acuerdo al análisis filogenético de la superfamilia de transportadores CHR realizado por Díaz-Pérez y col. (2007), se encontró que en el genoma de *B. xenovorans* LB400 se codifican cuatro homólogos de la familia **LCHR** denominados ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6 y dos homólogos de la familia **SCHR**, Chr1NCa y Chr1NCb. De acuerdo con esto, se observó que *B. xenovorans* LB400 presentó un mayor nivel de resistencia a cromato comparado con cepas de referencia no resistentes a cromato (**Figura 6**), sugiriendo que los homólogos *chr* presentes en LB400 son responsables de dicha resistencia.

En nuestro laboratorio, León-Márquez (2009) determinó que ChrA1a, ChrA2 y ChrA6 de *B. xenovorans* LB400 confieren resistencia a cromato en diferentes condiciones de crecimiento bacteriano cuando se expresaron en *E. coli* a partir de vectores de alto (pUCP20) o bajo número de copias (pACYC184). También en nuestro grupo de trabajo, Díaz-Magaña y col. (2009) determinaron que el homólogo Chr1NCb de LB400 confiere resistencia a cromato a *E. coli* cuando se expresa a partir de un plásmido. También se determinó que los homólogos Chr1NCa y ChrA1b confieren un fenotipo de resistencia a cromato cuando se expresaron en *E. coli* a partir de los vectores pUCP20 y pACYC184, respectivamente (Luna-Luna, 2010) (**Tabla 1**). De estos resultados se concluyó que los genes *chr* de *B. xenovorans* probablemente se expresan bajo diferentes condiciones de cultivo en *E. coli*.

Con el propósito de analizar la expresión de los genes *chr* de LB400,

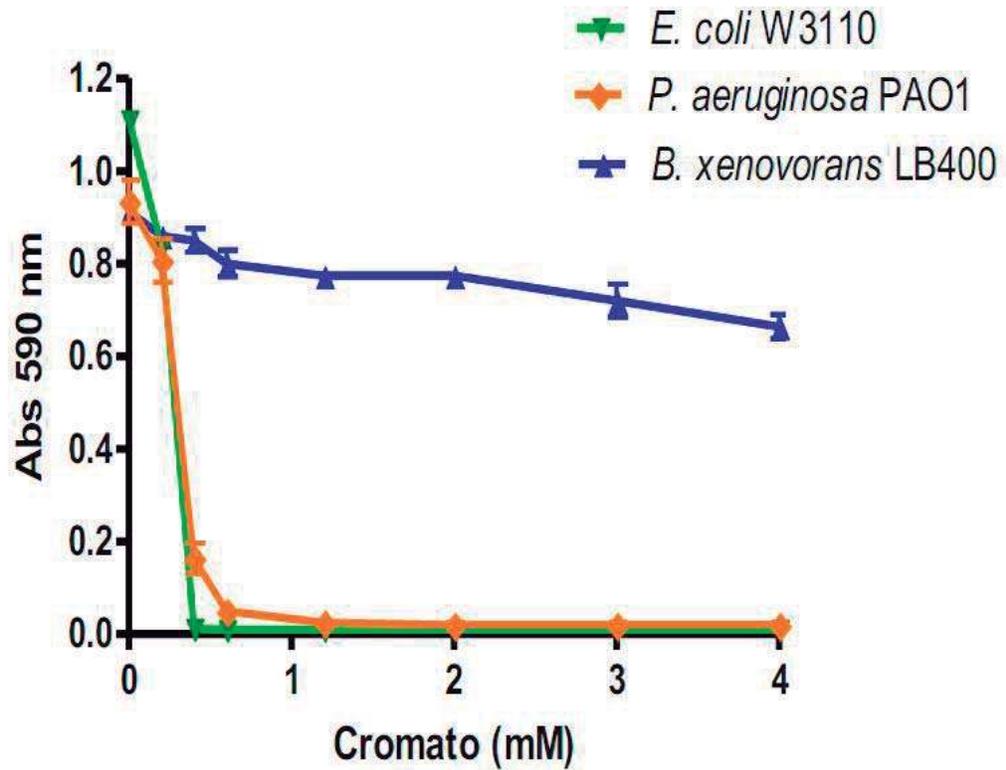


Figura 6. Susceptibilidad a cromato de *Burkholderia xenovorans* LB400. Los cultivos de *E. coli* W3110, *P. aeruginosa* y *B. xenovorans* se crecieron durante 24 h con agitación constante en caldo nutritivo a 30°C, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbencia a 590 nm. Tomada de León-Márquez, 2009.

Tabla 1. Resistencia a cromato conferida por los homólogos *chr* de *B. xenovorans* expresados en *E. coli* a partir de diferentes plásmidos y crecida en medios de cultivo diferentes.

Genes ^a	Caldo nutritivo		Medio mínimo	
	pACYC184	pUCP20	pACYC184	pUCP20
<i>chrA1a</i> *	S	S	R	S
<i>chrA6</i> *	S	R	S	S
<i>chr1NCa</i> ***	S	S	S	R
<i>chrA1b</i> ***	S	S	R	S
<i>chr1NCb</i> **	S	S	R	R
<i>chrA2</i> *	S	R	S	R

a. Se indica el nombre de los homólogos *chr*. R= Resistente S= Sensible. (*León-Márquez, 2009, **Díaz-Magaña, 2009, ***Luna-Luna, 2009).

mediante ensayos de RT-PCR, Luna-Luna (2010) determinó los patrones de expresión a nivel transcripcional de los genes *chr* en diferentes condiciones de cultivo bacteriano. En dicho trabajo se encontró que los genes *chr* se expresan diferencialmente dependiendo de las concentraciones de sulfato y cromato presentes en el medio de cultivo, de tal forma que el sulfato reprime la expresión de los genes *chrA1a*, *chrA1b*, *chrA2*, *chrA6*, *chr1NCa* y *chr1NCb*, mientras que el cromato indujo la expresión de la mayoría de los genes, *chrA1a*, *chrA1b*, *chrA2*, *chrA6* y *chr1NCa*. Derivado de estos resultados se formuló la hipótesis de que a altas concentraciones de sulfato (2 mM) ocurre la activación de un represor y que al tratar los cultivos con cromato, éste ión desplaza al represor unido al promotor/operador e induce la expresión.

A la fecha hay muy poca información acerca de la regulación de la expresión de los genes de resistencia a cromato, Branco y colaboradores (2008) identificaron el transposón TnOtChr en la bacteria *O. tritici* 5bv11, la cual es capaz de tolerar concentraciones mayores a 50 mM de cromato. El transposón TnOtChr agrupa los genes de resistencia a cromato *chrB*, *chrA*, *chrC* y *chrF*, localizados entre genes que codifican una transposasa y una resolvasa. También se encontró que los genes *chrB* y *chrA* son esenciales para la resistencia a cromato por *O. tritici*, no así *chrF* y *chrC*. Además se determinó que el promotor *chr* localizado río arriba de *chrB*, es fuertemente inducido por cromato o dicromato, mientras que el Cr(III), agentes oxidantes, sulfato u otros oxianiones no provocaron ningún cambio en su expresión. De acuerdo con ese trabajo, se propuso que la proteína ChrB actúa como un sensor de cromato que regula la expresión del operón *chrBACF* (Branco y

col., 2008).

En el megaplásmido de *B. xenovorans* se encuentra un posible operón (*chrBA2FC*), que codifica a proteínas que presentan una alta identidad y similitud con las proteínas codificadas en el transposón TnOTChr, de igual forma presenta a las transposasas y las resolvasas que los flanquean, además de que los genes que codifican estas proteínas presentan el mismo arreglo, lo que sugiere una regulación y función similar.

III. JUSTIFICACIÓN

El genoma de *B. xenovorans* LB400 posee seis homólogos *chr* que se expresan de manera diferencial a nivel transcripcional en presencia de cromato y sulfato; sin embargo, no se han analizado otras condiciones específicas de regulación de sus promotores que lleve a comprender la razón por la cual esta bacteria posee un gran número de homólogos para una misma probable función.

IV. HIPÓTESIS

Los promotores de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400 se regulan diferencialmente en respuesta a distintas condiciones de nutrientes y a la temperatura de crecimiento.

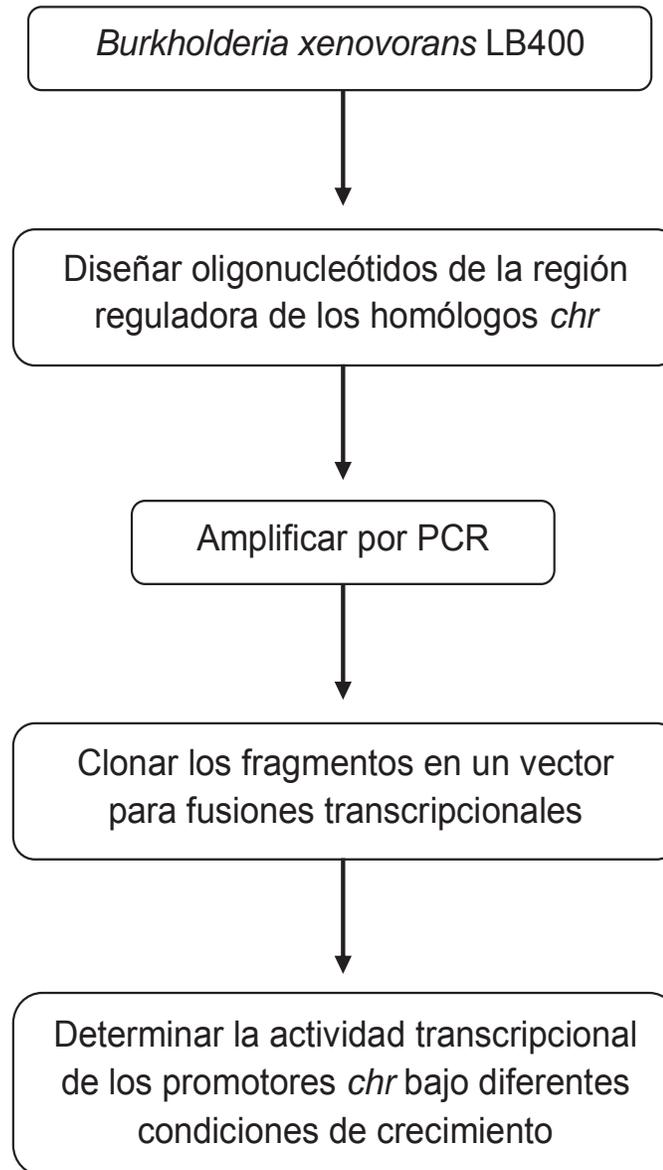
V. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 bajo diferentes condiciones de crecimiento.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Fusionar los genes *chr* de *B. xenovorans* con un gen reportero.
2. Analizar la expresión de los genes *chr* de las fusiones bajo distintas condiciones de nutrientes y temperaturas de crecimiento.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

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.

- ~ K₂CrO₄ (Merck)
- ~ Caldo Luria Bertani (LB): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- ~ Agar Luria Bertani: NaCl 1%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y 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 2 mM (Sambrook y col., 1989).
- ~ O-nitrofenol β-D-galactósido (Sigma).

2. Cepas empleadas

- ~ *B. xenovorans* LB400 (Goris y col. 2004). Cepa donada por el Dr. Jesús Caballero Mellado[†] del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

Cepas empleadas como receptoras en la transformación:

- ~ *E. coli* JM101. *supE thi-1Δ(lac-proAB)* [F'⁺traΔ36 proAB lacI^q ΔM15] (Yanisch-Perron y col., 1985).
- ~ *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1969).

3. Vector para fusiones transcripcionales

El vector pLP170 (Preston y col., 1997) es de alto número de copias, contiene al gen reportero *lacZ* sin promotor, posee un gen de resistencia a ampicilina, orígenes de replicación para *E. coli* y *P. aeruginosa*; además posee sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *BamHI* con las cuales va a ser digerido para su posterior ligación con las regiones promotoras de los genes *chr* (**Figura 7**).

4. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las regiones promotoras de los genes *chr*

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400 en la base de datos del NCBI para diseñar los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de las posibles regiones promotoras. Los oligonucleótidos se diseñaron siguiendo los siguientes criterios: un número de nucleótidos de 25, con un porcentaje de G-C muy cercano entre el oligonucleótido directo y reverso, a los oligonucleótidos directos se les insertó un sitio de restricción para la enzima *EcoRI* y al reverso un sitio para la enzima *BamHI*. Se analizó que no formaran estructuras secundarias en la misma secuencia de los oligonucleótidos. Para su diseño se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.1 (**Tabla 2**). Para las reacciones de PCR se usaron las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C/5 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos a 95°C/30 seg (desnaturalización), 55°C/30 seg (alineamiento), 72°C/1 min (extensión), y un ciclo final de extensión a 72°C/10 min.

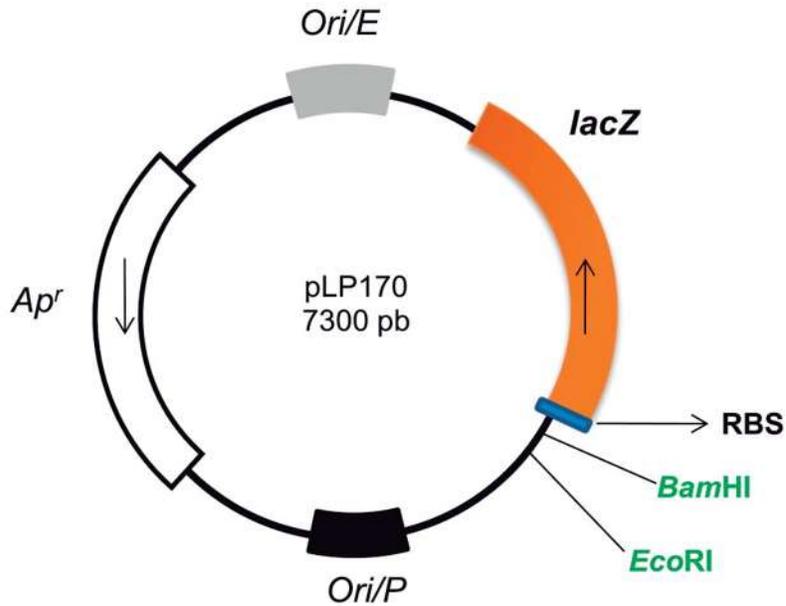


Figura 7. Vector pLP170 para fusiones transcripcionales. Es un vector de expresión que posee un gen de selección de resistencia a ampicilina (Ap^r), orígenes de replicación para *E. coli* (*Ori/E*) y para *P. aeruginosa* (*Ori/P*), sitios de *Bam*HI y *Eco*RI, y el gen reportero *lacZ* sin promotor y con sitio de unión a ribosoma (RBS) (Preston y col., 1997).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes *chr* de *B. xenovorans*.

Oligonucleótido ^a	Secuencia (5' - 3') ^b	Enzima de restricción
Bxe_DchrB	GCAC <u>GAATTC</u> ATGCTCCAGGCATCGGG	<i>EcoRI</i>
Bxe_RchrB	TGCG <u>GGATCC</u> GGCGCTCGCGGAGGGGA	<i>BamHI</i>
Bxe_DchrA	ATGC <u>GAATTC</u> CTATGAGGTCATCCGCA	<i>EcoRI</i>
Bxe_RchrA	ATCA <u>GGATCC</u> ACAGCGTATAGCTGCGA	<i>BamHI</i>
Bxe_DchrA1a	GATC <u>GAATTC</u> GAAAGCGCGCACTTC	<i>EcoRI</i>
Bxe_RchrA1a	CATG <u>GGATCC</u> GTCGTAATGGTCAAG	<i>BamHI</i>
Bxe_Dchr1NCa	GTGA <u>GAATTC</u> GCGCGTTCATCATGT	<i>EcoRI</i>
Bxe_Rchr1NCa	CAAC <u>GGATCC</u> ATCTGCAGCAACGAC	<i>BamHI</i>
Bxe_Dchr1NCb	GTCAG <u>GAATTC</u> TGAAGAATTCCGACGCG	<i>EcoRI</i>
Bxe_Rchr1NCb	CGCC <u>GGATCC</u> TTCCCAAACGGTGGGCG	<i>BamHI</i>
Bxe_DchrA6	CTC <u>GAATTC</u> GAAATCACTGAAACGG	<i>EcoRI</i>
Bxe_RchrA6	GAAC <u>GGATCC</u> CATAGCGGTTCCCGT	<i>BamHI</i>
Bxe_DchrA1b	GTCG <u>GAATTC</u> GTATCTGCAGGACTC	<i>EcoRI</i>
Bxe_RchrA1b	AAAC <u>GGATCC</u> AGGACTTCGGAAGCA	<i>BamHI</i>

a. Se indica el nombre del oligonucleótido y su orientación: directo (D), reverso (R). b. Se indica en negritas y subrayado el sitio de restricción insertado en el oligonucleótido para utilizarse en la clonación de los productos de PCR.

5. Construcción de plásmidos recombinantes

Los productos de DNA amplificados por PCR se purificaron con el kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega de acuerdo a las instrucciones del proveedor, posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. De igual forma, el vector pLP170 fue digerido con las mismas enzimas. Posteriormente los fragmentos de PCR digeridos se ligaron en el plásmido pLP170 manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando una unidad de la enzima T4 DNA ligasa de Promega. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.

6. Análisis de plásmidos

6.1 Aislamiento de plásmidos

El DNA de los plásmidos se obtuvo por el método de lisis alcalina (adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1982).

6.2 Electroforesis en geles de agarosa

El DNA aislado se sometió a un corrimiento electroforético, en geles de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE [Tris-acetato 0.04 M (pH 8.0) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.001 M (pH 8.0)]. El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal conteniendo el mismo amortiguador. Las muestras de DNA se mezclaron con amortiguador de carga [azul de bromofenol 0.05%, EDTA 0.1 M (pH 8.0), SDS 0.5%, sacarosa 40%] y se descargó en los orificios del gel. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 125 voltios durante 30-40

min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas de DNA teñidas se observaron por medio de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (UV-Products Inc.). Como marcador de tamaño molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *Hind*III o el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

6.3 Restricción con endonucleasas

Los DNA plasmídicos se digirieron utilizando una unidad de cada endonucleasa de restricción (Promega) por microgramo de DNA e incubando a 37°C 4-5 h. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

7. Transformación de células competentes

7.1 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* JM101

Se inocularon 100 ml de LB con 1ml de un cultivo de *E. coli* JM101 crecido a 37°C con agitación constante de 220 rpm durante toda la noche. Las células se dejaron crecer a 37°C con agitación constante de 220 rpm hasta que alcanzaron una absorbancia de 0.6 a 590 nm (2-3 h aproximadamente). Posteriormente las células se mantuvieron en hielo por 20 min y para todos los pasos subsecuentes, tanto las células como el material que se utilizó se mantuvieron a temperatura cercana a 4°C. Las células se obtuvieron centrifugando a 6000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga Thermo IEC multi RF. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y las células

obtenidas se lavaron en dos ocasiones con agua desionizada estéril y fría, centrifugando a 8000 rpm durante 10 min a 4°C en cada lavado. Al final las células se resuspendieron en 500 µl de glicerol al 10%, estéril frío y la suspensión se guardó en alícuotas de 800 µl a -80°C.

7.2 Transformación de células competentes de *E. coli* JM101

La transformación con DNA de plásmidos recombinantes se realizó mediante el método de electroporación:

En un tubo Eppendorf se mezclaron 80 µl de células competentes con 2 µl de DNA plasmídico. La mezcla se colocó entre los electrodos de una celda de electroporación fría. Se ajustó el micropulso a 2000 V, la celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador 2510 (Eppendorf) y se dio un pulso de 4-5 milisegundos. Inmediatamente la mezcla se transfirió a un tubo con 2 ml de CL. Se incubó a 37°C por 2 h con agitación constante. Se distribuyeron 100 µl del cultivo en cajas de AL adicionando 150 µg/ml de ampicilina, las colonias obtenidas se crecieron en 4 ml de CL para realizar aislamiento y purificación de DNA.

7.3 Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa* PAO1

Las células se prepararon siguiendo el protocolo de Enderle y Farwell (1998), como se describe a continuación: una caja petri con LB se inoculó con *P. aeruginosa* PAO1 incubando a 37°C por 16 h o hasta que las colonias alcanzaron ~1 mm de diámetro, almacenando las cajas a temperatura ambiente hasta su uso. Se transfirieron aproximadamente 3 mg de células en 500 µl de agua desionizada estéril y se resuspendió suavemente en

vortex hasta que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 13000 rpm en una microcentrifuga por 1 min y se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 500 μ l de agua desionizada estéril y se centrifugó a 13000 rpm 1 min. Se repitió este paso y la mezcla se usó para la transformación por electroporación.

7.4 Transformación de células competentes de *E. coli* JM101

La transformación se realizó mediante el método de electroporación descrito anteriormente, realizándose la selección de las transformantes en cajas de AL adicionando 400 μ g/ml de carbenicilina.

8. Determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa

Se registró la densidad celular midiendo la absorbancia a 600 nm del cultivo crecido en condiciones específicas, se tomó 1.5 ml, se centrifugó 2 min a 12000 rpm, eliminando el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con 500 μ l de buffer TDTT (Tris 50 mM-Dithiothreitol 30 μ M); se centrifugó 2 min a 12000 rpm, se decantó y eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular en 500 μ l de buffer TDTT, se sonicó hasta claridad, y se centrifugó 5 min 12000 rpm recuperando el sobrenadante. Se tomaron 5 μ l de los extractos celulares y se resuspendieron en 995 μ l de buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04 M, KCl 0.01 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 M y β -mercaptoetanol 0.05 M), se agregó 200 μ l de ONPG (O-nitrofenol β -D-galactósido) (4mg/ml de buffer Z), se incubó la mezcla de reacción 15 min a 37°C, y se detuvo la reacción con 250 μ l de NaCO_3 2 M. Finalmente, se midió la densidad óptica a 420 nm. Para obtener las unidades

de β -galactosidasa se empleó la siguiente fórmula (modificado de Miller 1972):

$$\text{Unidades de } \beta \text{ – galactosidasa (UM)} = \frac{1000 \times \text{D. O. } 420\text{nm}}{t \times V \times \text{D. O. } 600\text{nm}}$$

IX. RESULTADOS

1. Construcción de fusiones transcripcionales

1.1 Localización de las regiones promotoras

Como primer paso para la construcción de las fusiones transcripcionales usadas en este trabajo, se hizo el diseño de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las regiones. Para ello se localizaron los probables promotores de los genes *chr* con la finalidad de conocer la ubicación a la que se encuentran respecto del codón de inicio de la traducción. Se observó que, en promedio, los promotores predichos se encuentran a una distancia de entre 28 y 79 nucleótidos río arriba del ATG de inicio de la traducción de los genes *chr* (**Tabla 3**).

1.2 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los genes *chr*

Para el análisis del posible operón *chrBACF*, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos con la finalidad de determinar si cada unidad transcripcional tiene su propio promotor (**Figura 8A**). El primer par de oligonucleótidos abarca una región de 700 pb, 60 pb dentro de la región codificante del gen *chrB* y 640 pb río arriba del ATG de inicio (**Figura 8A, esquema 1**); de esta manera se tiene más certeza de que los productos amplificados abarcan tanto el promotor como la región reguladora. El segundo par de oligonucleótidos tiene las mismas características pero aplicadas al gen *chrA2*, 60 nucleótidos de la región codificante y 640 río arriba del codón de inicio (**Figura 8A, esquema 2**); además, utilizando el oligonucleótido directo de *chrB* y reverso de *chrA2* se logró amplificar una región de 1719 pb la cual

Tabla 3. Ubicación de las secuencias promotoras de los homólogos *chr* presentes en *B. xenovorans* LB400.

Gen	Secuencia promotora ^a	Ubicación a partir del inicio de la traducción (pb)
<i>chrA1a</i>	CTTGCGATTGACCTGCA	65
<i>chrA6</i>	TTGCCG GCCCGTCGAATCACAAGGATGAT	43
<i>chr1NCa</i>	CTGGCGAACGAGCGGCA	79
<i>chrA1b</i>	TGCAGAATGCGGGTACCTAGCCGTTAACA	37
<i>chr1NCb</i>	TTGCTCGACGCCGGTTCGGCGCTAACCT	28
<i>chrA2</i>	GTGACGACCCACCTCAGATCACTTCTTAAC	29

^a. Secuencias promotoras predichas en base al programa PromScan.

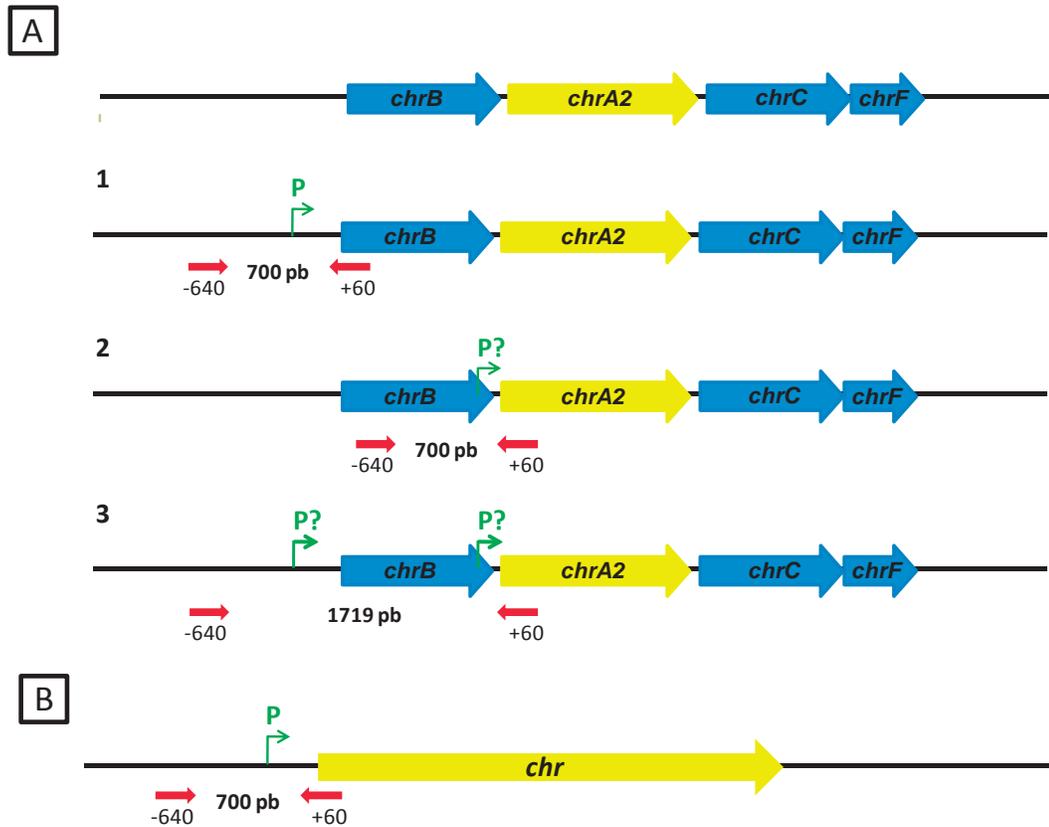


Figura 8. Diseño de oligonucleótidos para los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Con flechas grandes se señala la dirección de la transcripción y el nombre del gen correspondiente. Con flechas rojas pequeñas se muestra la posición de los oligonucleótidos a utilizar para la amplificación de cada uno de los genes *chr*. Se indica el tamaño en pares de bases (pb) del producto predicho de la amplificación. También se indican con flechas verdes los posibles promotores (P). **A)** Oligonucleótidos diseñados para el análisis del posible operón *chrBACF*. **B)** Oligonucleótidos de los genes *chr* (*chrA1a chrA1b, chrA6, chr1NCa* y *chr1NCb*).

abarca desde 640 pb río arriba del codón de inicio de *chrB* e incluye la región estructural del gen *chrB* y va hasta 60 pb del gen *chrA2* (**Figura 8A, esquema 3**), esto último para conocer el papel del *chrB* en la actividad transcripcional.

En la **Figura 8B** se muestran los oligonucleótidos diseñados para el análisis de los cinco genes *chr* restantes (*chrA1a*, *chrA1b*, *chrA6*, *chr1NCa* y *chr1NCb*): 60 nucleótidos dentro de la región codificante del gen y 640 nucleótidos río arriba del ATG de inicio. También dentro de la secuencia de cada oligonucleótido se insertó una secuencia de reconocimiento para la enzima *EcoRI* en el caso de los oligonucleótidos directos y para *BamHI* para los oligonucleótidos reversos.

1.3 Amplificación por PCR de las regiones promotoras

Para analizar las regiones promotoras de los homólogos *chr*, éstas fueron amplificadas por PCR usando como molde el DNA total de *B. xenovorans* LB400 y los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 2**. Para verificar el tamaño de los productos amplificados, se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se compararon con un marcador de tamaño molecular conocido. Para el fragmento que abarca la región promotora del gen *chrB* y la del gen *chrA2* del probable operón *chrBA2CF* se obtuvieron fragmentos de 700 pb, mientras que para la que abarca desde la región promotora de *chrB* hasta el inicio de la región codificante de *chrA2*, que se denominó *chrBA*, se obtuvo una banda de amplificación de 1.7 kb (**Figura 9A**). Para las regiones promotoras de los cinco genes *chr* se obtuvieron bandas de 700 pb (**Figura 9B**). Para todas las regiones promotoras analizadas se obtuvieron fragmen-

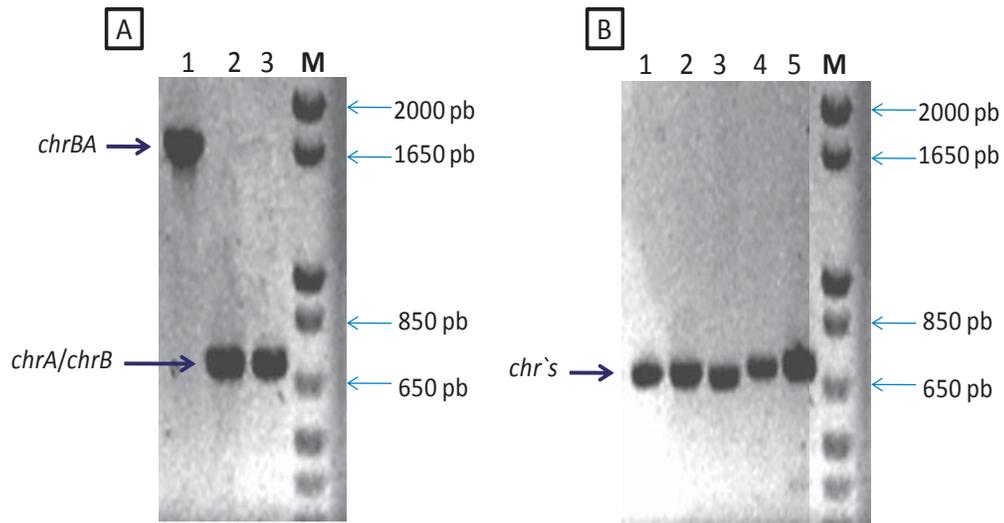


Figura 9. Amplificación por PCR de las regiones promotoras de los genes *chr*. **A)** Fotografía del gel de agarosa del corrimiento electroforético de los fragmentos amplificados por PCR: **1**, *chrBA*; **2**, *chrA*; **3**, *chrB*; **M**, marcador de tamaño molecular 1 Kb plus. **B)** Fotografía del corrimiento electroforético de: **1**, *chrA1b*; **2**, *chr1NCb*; **3**, *chrA6*; **4**, *chr1NCa*; **5**, *chrA1a*; **M**, marcador de tamaño molecular 1 kb plus. A la derecha de cada fotografía se indica el tamaño de algunas bandas del marcador.

tos del tamaño esperado.

1.4 Construcción de las fusiones transcripcionales *chr-lacZ*

Posterior a su amplificación por PCR, los fragmentos conteniendo las regiones promotoras de los genes *chr* se purificaron como se indica en la sección de Métodos y posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. De igual forma, el vector pLP170 fue digerido con las mismas enzimas. Con los fragmentos de PCR digeridos se procedió a su ligación en el plásmido pLP170 (**Figura 10**). Las mezclas de ligación se transfirieron a células electrocompetentes de *E. coli* JM101 y a las células transformantes obtenidas se les realizó aislamiento de DNA plasmídico. La presencia y el tamaño del inserto fueron verificados mediante digestión con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI, con las cuáles se liberó una banda de 7.3 kb correspondiente al vector pLP170 linearizado y una banda de 1.7 kb correspondiente al inserto *chrBA* o de 700 pb para los genes *chrB* y *chrA* (**Figura 11**). De la misma forma, para los genes *chrA1a*, *chrA1b*, *chrA6*, *chr1NCa* y *chr1NCb* la digestión de los plásmidos recombinantes liberó la banda correspondiente al vector linearizado de 7.3 kb y los insertos de 700 pb (resultados no mostrados). Una vez caracterizados los plásmidos recombinantes éstos se transfirieron a células electrocompetentes *P. aeruginosa* PAO1 para su posterior análisis.

2. Análisis transcripcional del probable operón *chrBA2FC*

Para determinar si los genes *chrB* y *chrA2* del posible operón *chrBACF* se co-transcriben, o si cada uno de ellos tiene su propio promotor, se constru-

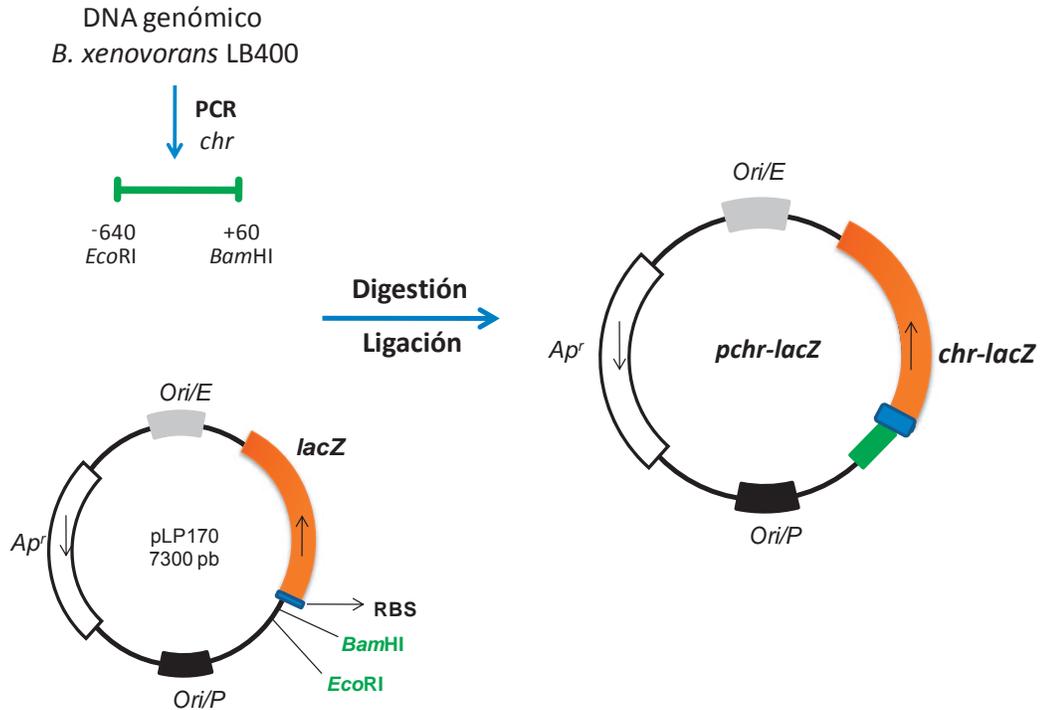


Figura 10. Representación esquemática de la construcción de las fusiones transcripcionales. Los fragmentos amplificados por PCR de las regiones promotoras de los genes *chr* y el vector pLP170 fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y posteriormente ligados, para dar origen a los plásmidos recombinantes *pchr-lacZ*. En el esquema se muestra el inserto en color verde río abajo del gen reportero *lacZ*.

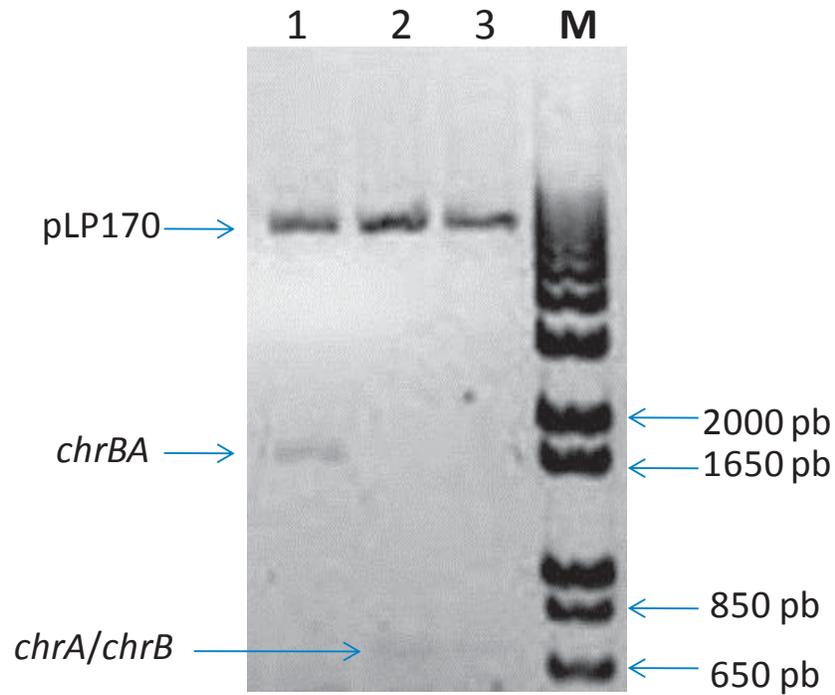


Figura 11. Caracterización de los plásmidos recombinantes *pchr-lacZ*. Fotografía del gel de agarosa del DNA plasmídico de las transformantes *E. coli* JM101 con los plásmidos recombinantes: carril 1, *pchrBA-lacZ*, 2 *pchrA-lacZ*, 3 *pchrB-lacZ*, los tres digeridos con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, M marcador de peso molecular. A la derecha de cada fotografía se indica el tamaño de algunas bandas del marcador de 1 Kb plus.

yeron tres fusiones transcripcionales. Las dos primeras contienen las probables regiones promotoras de los genes *chrB* (*chrB-lacZ*) y *chrA* (*chrA-lacZ*). La tercera fusión, abarca desde la región promotora del gen *chrB* hasta los primeros 60 nucleótidos de la región codificante de *chrA* (*chrBA-lacZ*) (**Figura 12A**). Inicialmente la expresión de las tres fusiones transcripcionales se analizó en cultivos bacterianos crecidos en CN por 4 h. Se encontró que la expresión de la fusión *chrB-lacZ* fue alta (~13,000 UM) mientras que la expresión de *chrA-lacZ* fue mínima (~300 UM) (**Figura 12B**); de acuerdo con esto *chrB* se expresa 45 veces más que *chrA*, sugiriendo que *chrA* no contiene un promotor. Por otra parte, la fusión *chrBA-lacZ* que abarca las regiones contenidas en las fusiones *chrB-lacZ* y *chrA lacZ*, tuvo una alta actividad (~9,000 UM), aunque mostró una ligera disminución con respecto a la fusión *chrB-lacZ* (**Figura 12B**). Estos resultados sugieren que la expresión de *chrBA-lacZ* depende del promotor corriente arriba de *chrB*; dado que al parecer el gen *chrA* no posee un promotor río arriba que controle su inicio en la transcripción, y se expresa a partir del promotor corriente arriba del gen *chrB*, lo que indica que estos dos genes se transcriben en operón.

Previamente León-Márquez (2009) propuso que ChrB es un regulador transcripcional que afecta la expresión de su propio promotor, por lo que, con el propósito de analizar el efecto de la presencia de *chrB* en las fusiones transcripcionales, en este trabajo se analizó la expresión de *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* en diferentes condiciones de crecimiento bacteriano. En el análisis de la expresión de dichas fusiones en condiciones nutricionales distintas, es decir, tres diferentes medios de cultivo: caldo nutritivo (CN), que

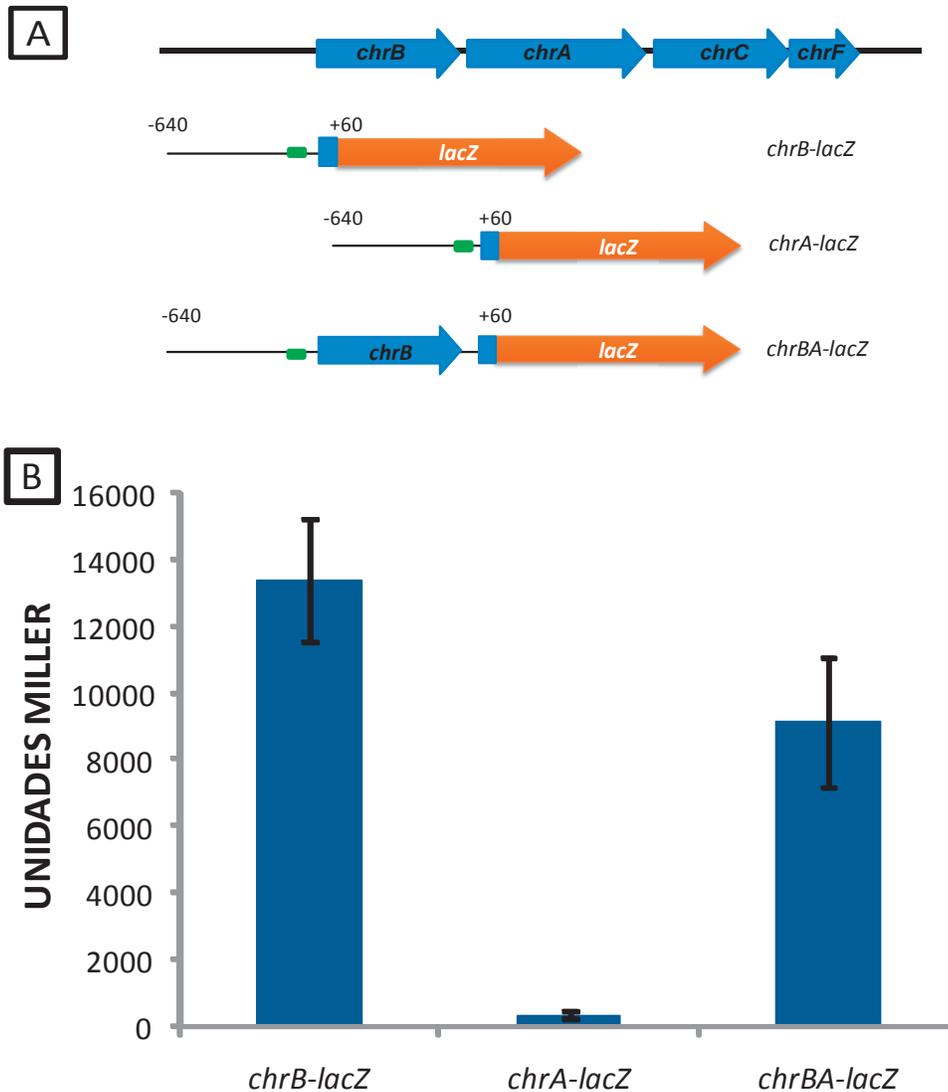


Figura 12. Actividad transcripcional del probable operón *chrA2BFC*. **A)** Esquema de la organización de los genes *chrBACF* y de las fusiones transcripcionales *chrB-lacZ*, *chrA-lacZ* y *chrBA-lacZ*. En cada una de ellas se indica la región que abarcan. **B)** Actividad enzimática de LacZ (expresada en UM) obtenida a partir de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo las fusiones abajo indicadas. La actividad de LacZ fue medida a partir de cultivos crecidos en CN a 37°C con agitación constante por 4 h. Se muestra el promedio de tres experimentos y las barras indican la desviación estándar.

es un medio rico para el cultivo de microorganismos que no presentan exigencias particulares, caldo Luria, un medio rico en nutrientes con NaCl (1%) y medio mínimo, un medio que contiene la mínima cantidad de nutrientes posibles que permite el crecimiento del microorganismo. Como se observa en la **Figura 13**, la actividad transcripcional de *chrB-lacZ* es mayor que la de *chrBA-lacZ*. Sin embargo se puede observar que cuando el cultivo con la fusión *chrB-lacZ* se creció en CN el valor de las Unidades Miller fue el mayor, comparado con los obtenidos en medio LB (~15,000) y MM (~14,000), una diferencia de 2 veces más actividad en *chrB-lacZ* en CN que en MM y LB. En la **Figura 14** se muestran los resultados obtenidos de las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* de cultivos crecidos en medio mínimo M9 (MM) con (5 μ M) y sin cromato. Se observa que la presencia de cromato no provocó un cambio significativo en valor de las Unidades Miller en la fusión *chrB-lacZ*, mientras que la actividad mostrada por *chrBA-lacZ* disminuyó ligeramente en presencia de cromato. Se puede concluir también que las condiciones nutricionales encontradas en caldo nutritivo fueron las óptimas para la transcripción de estas fusiones, además de que bajo las condiciones analizadas el gen *chrB* no demostró un claro papel de regulador o sensor de cromato, ya que la fusión que incluía este gen no mostró cambios en la actividad al crecer los cultivos en presencia de cromato.

3. Análisis transcripcional de las regiones reguladoras de los genes *chr* de *B. xenovorans*

Para evaluar los niveles y condiciones óptimas de expresión transcripcional de los cinco genes *chr* restantes presentes en el genoma de *B.*

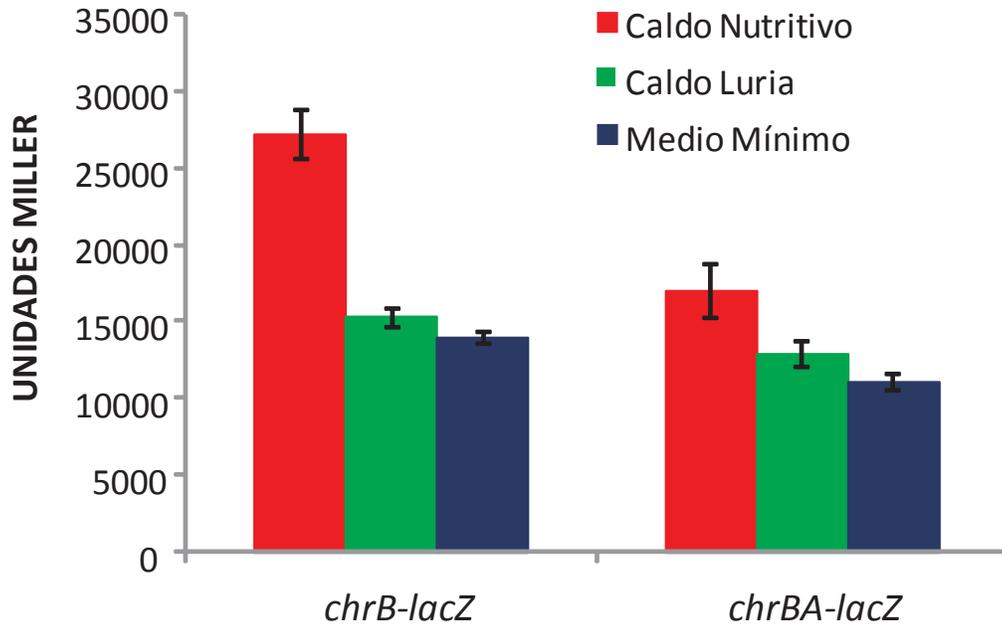


Figura 13. Actividad transcripcional de las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ*. Actividad enzimática de LacZ (expresada en UM) obtenida a partir de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* crecidas en: caldo nutritivo en barras rojas, caldo Luria en barras verdes y medio mínimo en barras azules. Los cultivos se crecieron por 6 h a 37°C con agitación constante. Se muestra el promedio de tres experimentos y las barras indican la desviación estándar.

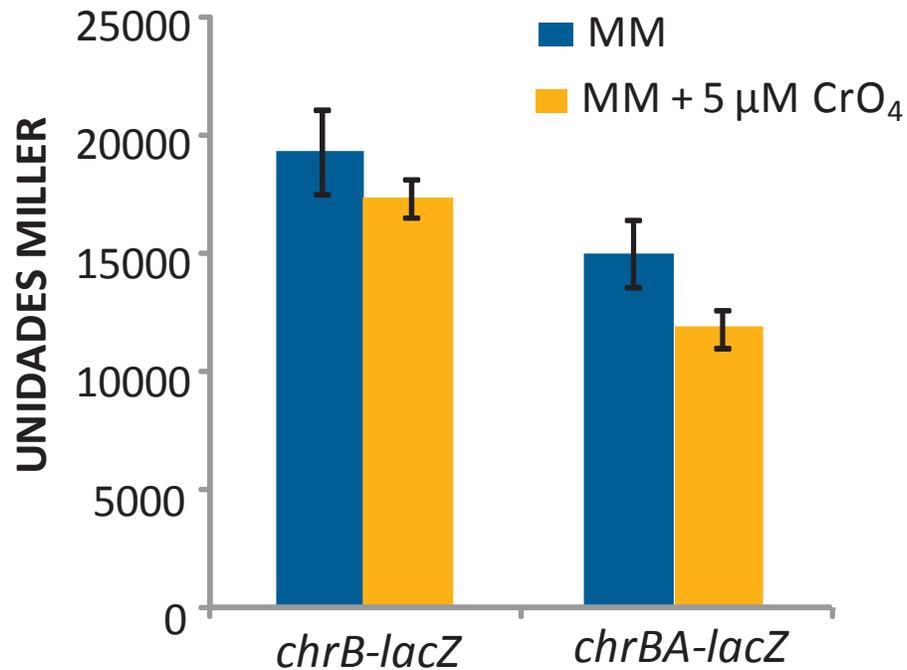


Figura 14. Efecto del cromato sobre la actividad transcripcional de las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* (MM). Actividad enzimática de LacZ (expresada en UM) obtenida a partir de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* crecidas en: medio mínimo M9 (MM) en barras azules y MM + 5 μ M de cromato en barras amarillas, los cultivos se crecieron por 6 horas a 37°C con agitación constante.

xenovorans LB400, los cuales no presentan genes *chr* vecinos, se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*. Estas fusiones abarcaron las regiones reguladoras de los genes *chrA1a*, *chr1NCa*, *chrA6*, *chr1NCb*, *chrA1b* y *chrB*, y van desde la posición -640 a la +60 respecto al codón de inicio de la traducción (**Figura 15**). Primeramente con el propósito de obtener una idea acerca del patrón de expresión general de cada una de las fusiones, se realizaron ensayos a partir de cultivos crecidos en CN a 37°C (**Figura 16**). Se observó que las fusiones *chrA6-lacZ*, *chr1NCb-lacZ* y *chrB-lacZ* mostraron niveles de expresión de ~20,000, ~4,500 y ~13,000 Unidades Miller respectivamente, en cambio, las fusiones con las regiones promotoras de los genes *chrA1a* y *chr1NCa* mostraron una actividad baja comparada con las otras tres fusiones, 900 y 500 Unidades Miller respectivamente, probablemente su expresión basal; estos bajos patrones de expresión fueron constantes en todas las condiciones analizadas, por lo cual se decidió omitir de las graficas posteriores la actividad de las fusiones *chrA1a-lacZ*, *chr1NCa-lacZ* y *chrA1b-lacZ* (ver Discusión).

3.1 Cinética de expresión de *chrB-lacZ*

Para analizar la expresión de la fusión *chrB-lacZ* en diferentes fases de crecimiento bacteriano, se realizó una cinética de expresión con la finalidad de observar si había variación en la actividad. En la **Figura 17** se muestra la curva de crecimiento de *P. eruginosa* PAO1 en CN conteniendo la fusión *chrB-lacZ*. Se observa que aproximadamente a las 9 h el cultivo termina su fase de crecimiento exponencial y comienza la fase estacionaria, manteniéndose así hasta las 24 h que duró el análisis. En la misma figura se

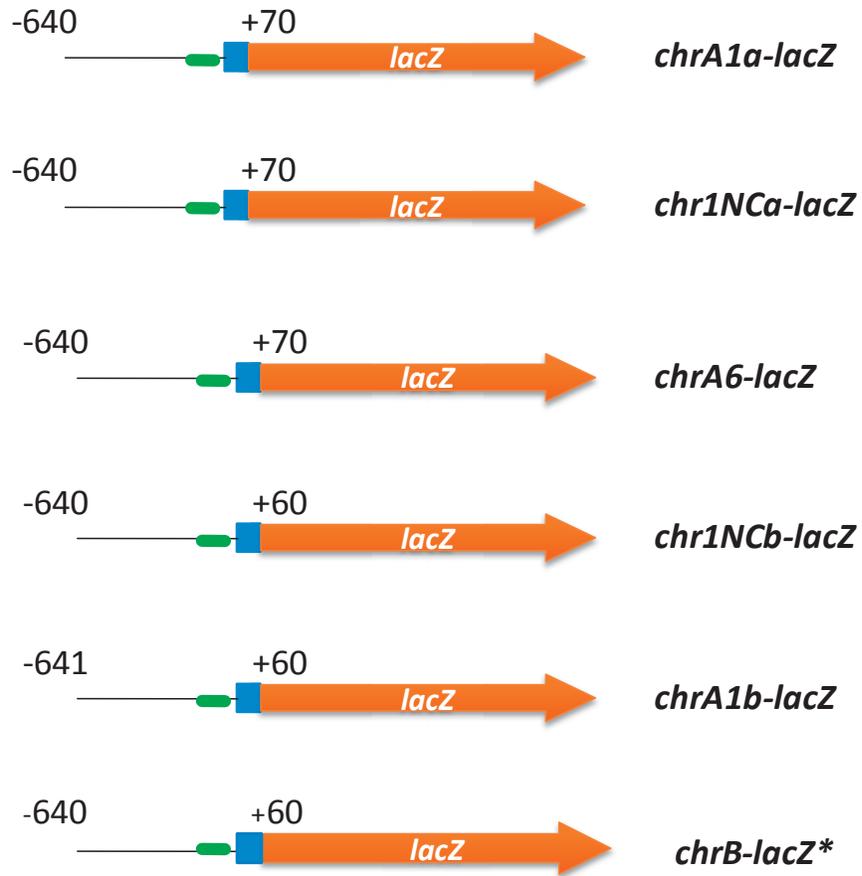


Figura 15. Fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400. Se indican las regiones que abarca cada fusión, las cuales van desde la posición -640 a la +60 a partir del ATG de cada gen, y que se fusionaron al gen reportero *lacZ*. A la derecha se indica el nombre de la fusión correspondiente; con asterisco se muestra la fusión *chrB* del operón *chrBACF* analizada previamente. En verde se indica la localización del probable promotor.

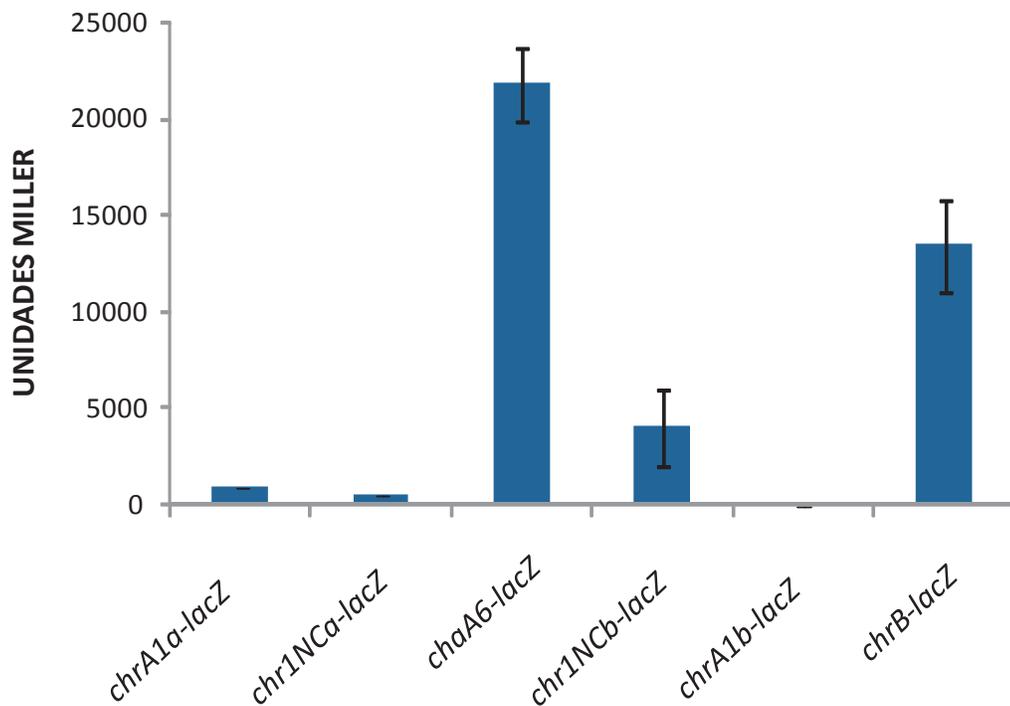


Figura 16. Análisis de las regiones reguladoras de los homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas se crecieron por 6 h en CN a 37°C con agitación constante. Se presentan las actividades diferenciales de LacZ de las fusiones indicadas abajo. Se muestra el promedio de tres experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

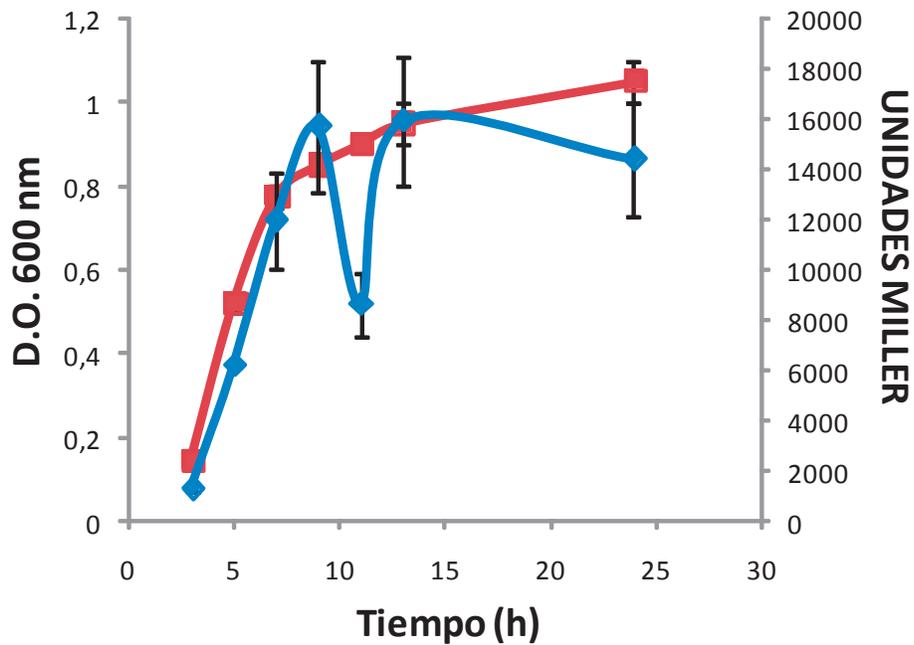


Figura 17. Cinética de expresión de la fusión *chrB-lacZ*. Se muestra la curva de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo la fusión *chrB-lacZ* en color rojo. Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante y se tomaron lecturas de densidad óptica (D.O.) a 600nm. En línea azul se presenta la cinética de expresión de la fusión *chrB-lacZ* a partir de muestras tomadas los puntos de la curva de crecimiento. Se realizó el ensayo de actividad de β -galactosidasa. Se muestra el promedio de dos experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

muestran los resultados de la cinética de expresión de la fusión *chrB-lacZ*.

Desde la tercera hora hasta la novena se muestra un incremento lineal en la actividad de la enzima β -galactosidasa, llegando a las 9 horas al valor de actividad de 15,500 UM; después de la novena hora se observa un descenso en la actividad que coincide con el inicio de la fase estacionaria, recuperándose la actividad a las 13 horas con 16,000 UM, a partir de la cual se mantiene casi constante hasta las 24 h.

3.2 Cinética de expresión de *chr1NCb-lacZ*

Con la misma finalidad, se evaluó la expresión de la fusión *chr1NCb-lacZ* a partir de cultivos crecidos en CN. En la **Figura 18** se muestran la curva de crecimiento y la actividad enzimática de β -galactosidasa en UM; el comportamiento fue muy similar a la fusión *chrB-lacZ*, ya que en el punto de que el cultivo entra a fase estacionaria se observa un descenso en la actividad enzimática, la cual se recupera más adelante.

3.3 Cinética de expresión de *chrA6-lacZ*

Igualmente se evaluó la expresión de la fusión *chrA6-lacZ*. En la **Figura 19** se muestran la curva de crecimiento en CN y la cinética de expresión; el comportamiento fue similar al de las fusiones *chrB-lacZ* y *chr1NCb-lacZ*: una disminución en la actividad enzimática al entrar el cultivo en fase estacionaria, recuperándose horas después y manteniéndose casi constante hasta las 24 h.

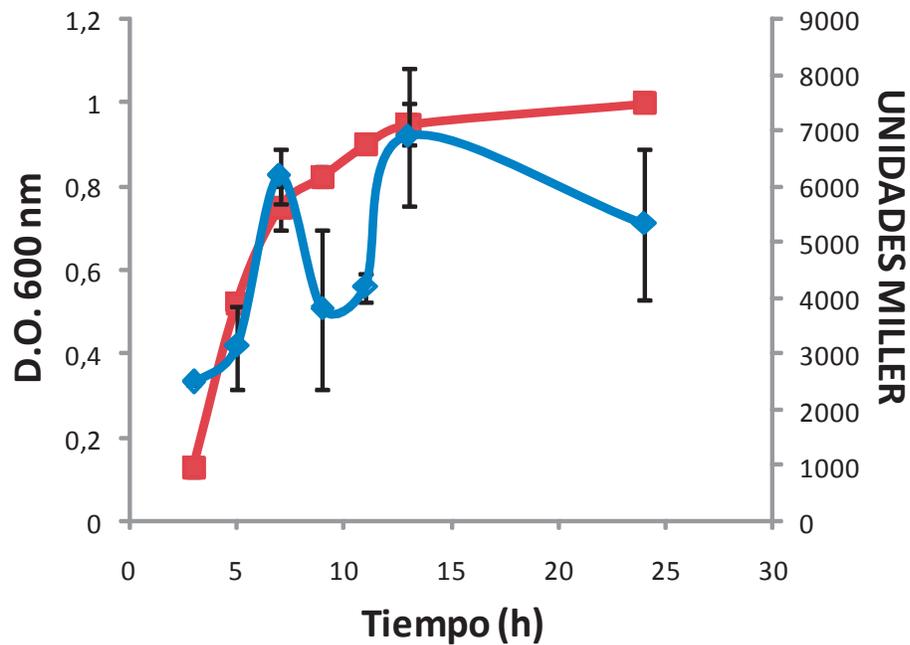


Figura 18. Cinética de expresión de la fusión *chr1NCb-lacZ*. Se muestra la curva de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo la fusión *chr1NCb-lacZ* en color rojo. Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante y se tomaron lecturas de densidad óptica (D.O.) a 600nm. En línea azul se presenta la cinética de expresión de la fusión *chrB-lacZ* a partir de muestras tomadas los puntos de la curva de crecimiento. Se realizó el ensayo de actividad de β -galactosidasa. Se muestra el promedio de dos experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

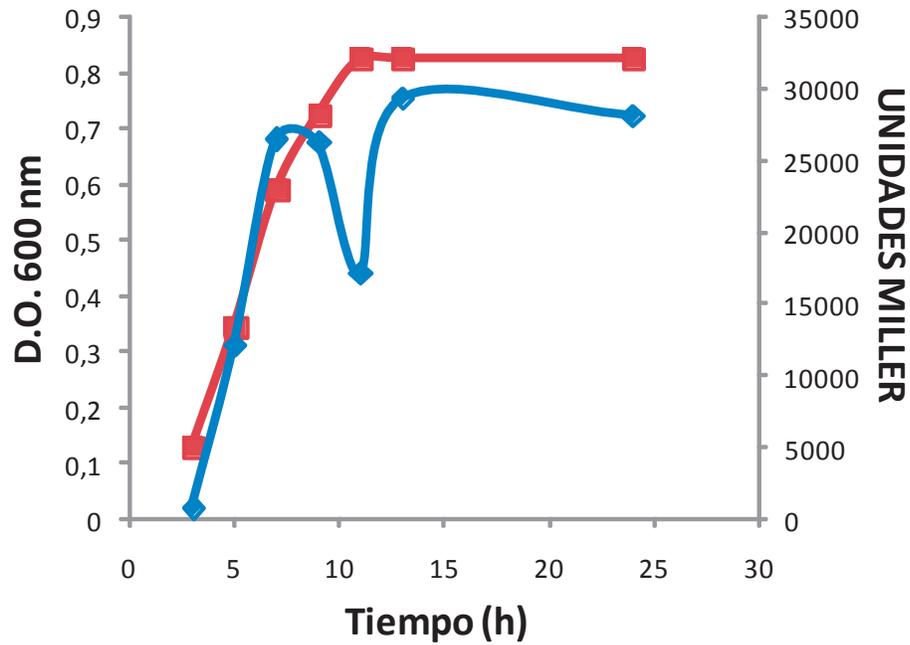


Figura 19. Cinética de expresión de la fusión *chrA6-lacZ*. Se muestra la curva de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo la fusión *chrA6-lacZ* en color rojo. Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante y se tomaron lecturas de densidad óptica (D.O.) a 600nm. En línea azul se presenta la cinética de expresión de la fusión *chrB-lacZ* a partir de muestras tomadas los puntos de la curva de crecimiento. Se realizó el ensayo de actividad de β -galactosidasa. Se muestra el promedio de dos experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

4. Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de los promotores de los genes *chr*

Se analizó si las condiciones nutricionales son un factor que determine cambios en la transcripción de los promotores de los genes *chrB*, *chrA6* y *chr1NCb*. Para esto se hicieron crecer los cultivos bacterianos de *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo las fusiones transcripcionales en los tres medios antes descritos. De forma general la fusión *chrA6-lacZ* mostró la mayor actividad enzimática de β -galactosidasa, seguida de la fusión *chrB-lacZ*, en cambio, la fusión *chr1NCb-lacZ* presentó los valores más bajos de Unidades Miller (**Figura 20**). Para la fusión *chrA6-lacZ* la expresión en CN y LB fue aproximadamente el doble que en la obtenida en MM. Para la fusión *chr1NCb-lacZ* el nivel de expresión fue baja pero no fue muy diferente en los tres medios de cultivo, de la misma forma la fusión *chrB-lacZ*, no mostró diferencia significativa entre los tres medios de cultivo. De forma general se observó que los tres genes *chr* analizados se expresan diferencialmente en respuesta a las condiciones nutricionales, siendo más evidente en la fusión *chrA6-lacZ* es la que presenta el doble de actividad en los medios ricos que en el medio mínimo.

4.1 Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes *chr* (CN)

Con la finalidad de conocer la actividad transcripcional de los genes *chr* en presencia de cromato, se realizaron los siguientes ensayos. En la **Figura 21** se muestran los resultados de la actividad transcripcional de los genes *chrA6*, *chr1NCb* y *chrB* en ausencia y presencia de cromato en cultivos

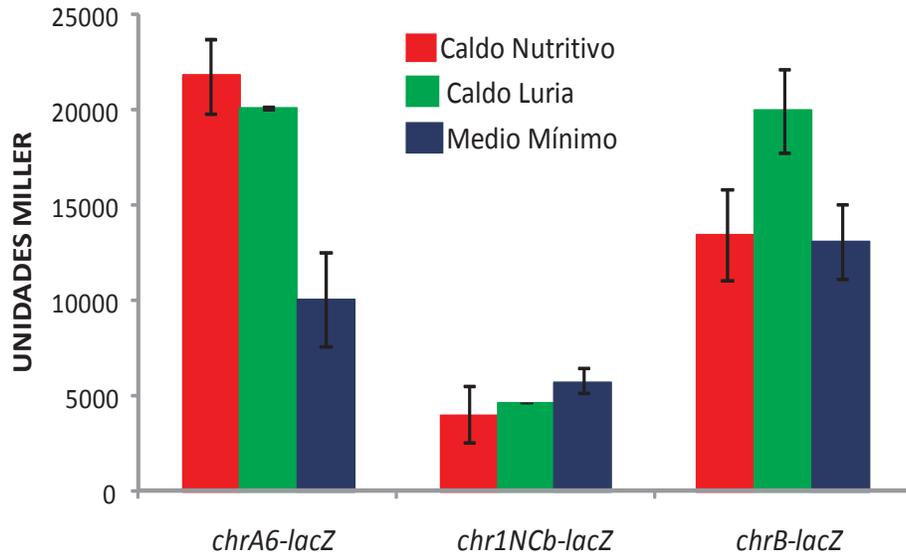


Figura 20. Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de los genes *chr*. Se crecieron los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas en tres diferentes medios a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.7 y 0.8 a 600 nm y se determinó la actividad de β -galactosidasa. En barras azules se muestra la actividad obtenida en CN, en barras rojas la actividad en caldo LB y en barras verdes la actividad en MM. Se muestra el promedio de tres experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

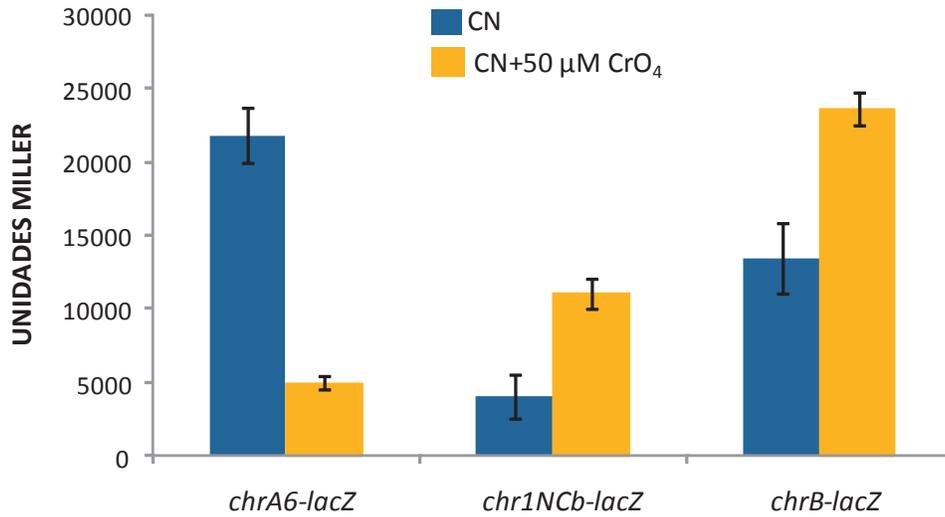


Figura 21. Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes *chr* en CN. Se crecieron los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.7 y 0.8 a 600 nm y se determinó la actividad de β-galactosidasa. En barras azules se muestra la actividad obtenida en CN, en barras amarillas la actividad en CN con 50 μM de cromato. Se muestra el promedio de tres experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

crecidos en CN.

La fusión *chrA6-lacZ* tuvo una actividad 4.4 veces mayor sin cromato que en presencia de 50 μ M de este ión, un comportamiento opuesto a lo presentaron las fusiones *chr1NCb-lacZ* y *chrB-lacZ* donde la actividad de LacZ fue mayor en presencia de cromato. La fusión *chr1NCb-lacZ* presentó una actividad de ~11,000 UM en presencia de cromato y ~4,000 UM sin cromato, lo cual representa 2.7 veces más de expresión en presencia de cromato. La fusión *chrB-lacZ* en medio con cromato tuvo una actividad 1.7 veces mayor, con ~23,000 UM, que en el medio sin adición del ion toxico, con ~13,500 UM. Este análisis indica que los promotores de los genes *chrB* y *chr1NCb* muestran mayor expresión en presencia de cromato, sugiriendo que se inducen por este ion. En cambio el promotor del gen *chrA6* mostró la mayor actividad en el medio sin cromato.

4.2 Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes *chr* (LB)

Enseguida se evaluó la presencia de cromato ahora en cultivos crecidos en medio LB. En la **Figura 22** se observan los resultados obtenidos; para la fusión *chrA6-lacZ* se obtuvo el doble de actividad cuando las bacterias se crecieron en cultivos sin cromato (20,000 UM) respecto al medio con 50 μ M de cromato con 10,000 UM. Mientras que las fusiones *chr1NCb-lacZ* y *chrB-lacZ* no mostraron una diferencia clara entre los cultivos en presencia y ausencia de cromato en el medio.

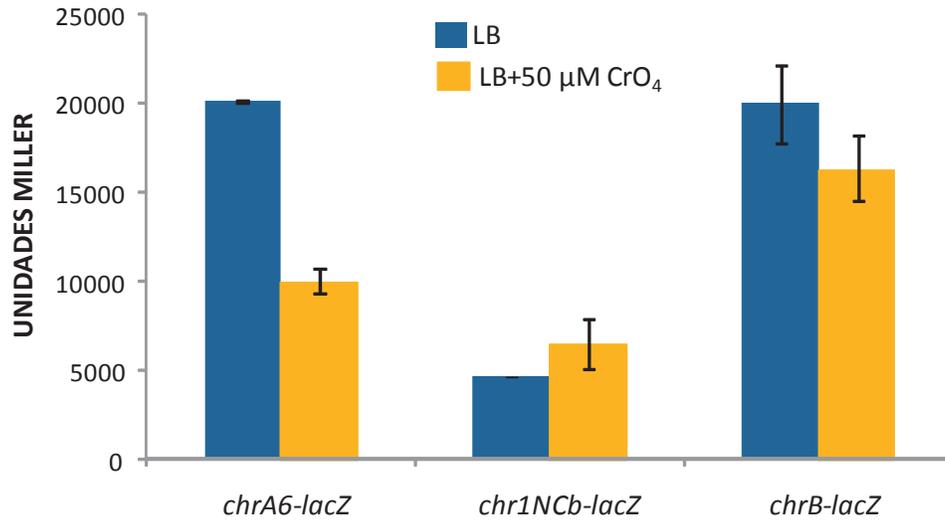


Figura 22. Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes *chr* en LB. Se crecieron los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.7 y 0.8 a 600 nm y se determinó la actividad de β -galactosidasa. En barras azules se muestra la actividad obtenida en LB, en barras amarillas la actividad en LB con 50 μM de cromato. Se muestra el promedio de tres experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

4.3 Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes *chr* (MM)

De la misma forma, se analizó el papel del cromato en la expresión en MM. En la **Figura 23** se muestran los resultados obtenidos; las tres fusiones: *chrA6-lacZ*, *chr1NCb-lacZ* y *chrB-lacZ*, no mostraron actividad diferencial significativa en presencia y ausencia de cromato en el medio.

De la misma manera que en medio LB, las fusiones no respondieron de manera diferencial al agregar al medio el ión tóxico.

5. Efecto de la temperatura sobre la expresión de los promotores de los genes *chr*

Para evaluar si la expresión de los genes *chr* se ve afectada por variaciones en la temperatura, se decidió analizar su comportamiento creciendo las bacterias con las fusiones transcripcionales a las temperaturas de 30°C y 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 24**. La fusión *chrA6-lacZ* mostró un cambio drástico en su expresión ya que a 37°C la actividad fue más de 20 veces mayor que la mostrada a 30°C, mostrando una actividad a 37°C de ~22,000 UM y de ~900 UM a 30°C. Aunque la fusión *chrB-lacZ* también mostró una mayor actividad a 37°C respecto a 30°C, ésta no fue tan notoria como la anterior (1.72 veces mayor actividad a 37°C que a 30°C). En cambio, la fusión *chr1NCb-lacZ* mostró mayor actividad a 30°C que a 37°C siendo su expresión 1.7 veces mayor a 30°C.

Estos resultados indican que la temperatura afecta la expresión de los genes *chr* de manera diferencial.

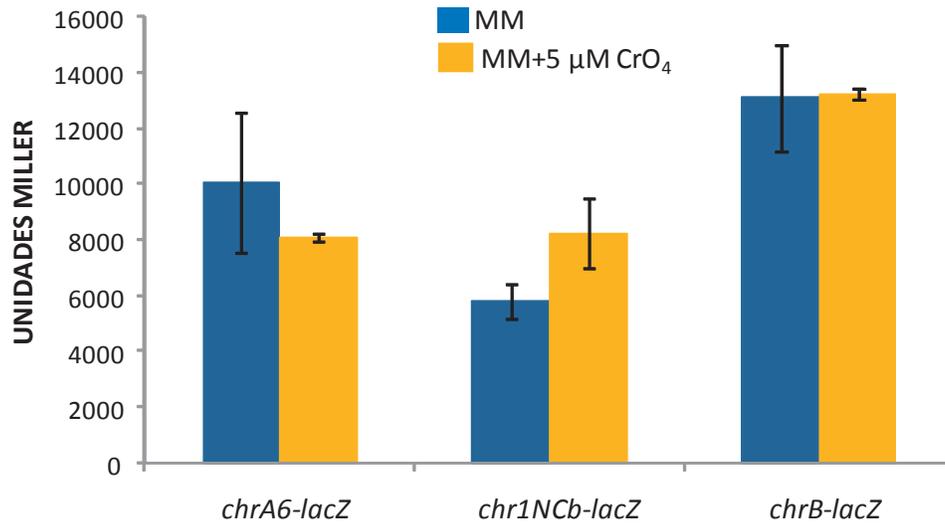


Figura 23. Efecto del cromato sobre la expresión de los promotores de los genes *chr* en MM. Se crecieron los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.7 y 0.8 a 600 nm y se determinó la actividad de β -galactosidasa. En barras azules se muestra la actividad obtenida en MM en barras amarillas la actividad en MM con 50 μM de cromato. Se muestra el promedio de tres experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

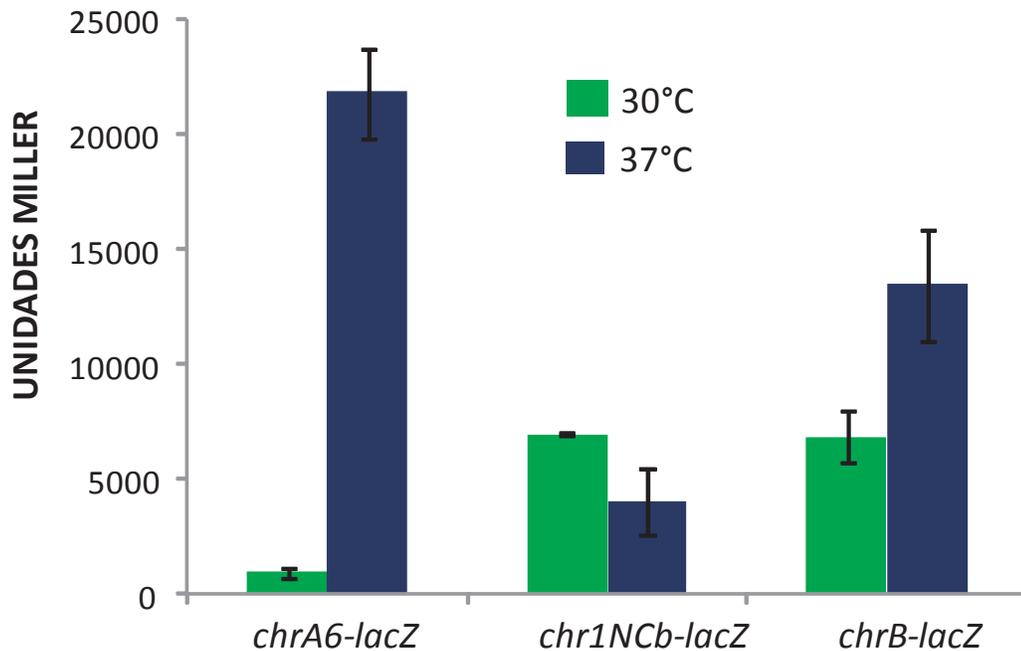


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes *chr*. Se crecieron los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas en CN hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.7 y 0.8 a 600 nm y se determinó la actividad de β -galactosidasa. En barras verdes se muestra la actividad obtenida en a 30°C, en barras azules la actividad a 37°C. Se muestra el promedio de tres experimentos y se indican las barras de desviación estándar.

En la **Tabla 4** se resumen los resultados de la actividad transcripcional de las fusiones *chr-lacZ*.

Tabla 4. Resumen de la actividad transcripcional de las fusiones *chr-lacZ* en diferentes medios de cultivo.

Cromato	Fusión Transcripcional					
	<i>chrA6-lacZ</i>		<i>chr1NCb-lacZ</i>		<i>chrB-lacZ</i>	
	-	+	-	+	-	+
CN	22,000	5,000	4,000	11,000	13,500	23,000
LB	20,000	10,000	4,500	6,500	20,000	16,500
MM	10,000	8,000	6,000	8,000	13,000	13,000

Valores redondeados de actividad enzimática expresados en Unidades Miller.

X. DISCUSIÓN

Algunas especies bacterianas que han estado expuestas a cromato han desarrollado mecanismos de resistencia a este ion, que pueden ser codificados por genes cromosómicos o plasmídicos (Cervantes y col., 2001). Los transportadores de membrana constituyen el mecanismo bacteriano de resistencia a cromato más estudiado (Cervantes y Campos–García, 2007). La resistencia a cromato es conferida por el transportador de membrana ChrA, proteína que ha sido identificada en diversas especies bacterianas, entre las más estudiadas están las presentes en *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y *Cupriavidus metallidurans* (Nies y col., 1990). Mediante un análisis filogenético Díaz-Pérez y col. (2007) encontraron bacterias que contienen en sus genomas varios homólogos CHR, entre ellas está la β -proteobacteria *B. xenovorans* LB400, la cual contiene cuatro homólogos LCHR ubicados en las subfamilias LCHR1 (dos homólogos, denominados ChrA1a y ChrA1b), LCHR2 y LCHR6, y dos homólogos SCHR (denominados Chr1NCa y Chr1NCb), ambos ubicados en la subfamilia SCHR1 (Chain y col., 2006).

B. xenovorans LB400 (Goris y col., 2004) es la bacteria que degrada bifenilos policlorados (PCB) más importante que se ha descubierto. Fue aislada de un sitio contaminado con PCB en el estado de Nueva York, EEUU (Bopp y col., 1986). El género *Burkholderia* habita diversos nichos desde el suelo hasta ambientes acuosos, asociados con plantas (Landers y col., 2000, Moulin y col., 2001 y Chen y col., 2003), hongos (Partida-Martinez y col., 2005), parásitos, animales, y humanos, de saprófitos a endosimbiontes,

de agentes de biocontrol (Coenye y col., 2003) a patógenos (Mahenthiralingam y col., 2005). Es común para la mayoría de las especies de *Burkholderia* tener un genoma grande, compuesto por varios cromosomas y plásmidos, así como la presencia de múltiples secuencias de inserción que confieren alta plasticidad genómica, lo cual explica la versatilidad del género (Lessie y col., 1996). Por lo tanto, es posible que los múltiples genes *chr* se expresen de manera diferencial, dependiendo de las condiciones ambientales o de cambios nutricionales a las que está expuesta la bacteria, confiriéndole con esto ventajas adaptativas para sobrevivir en ambientes contaminados con cromo.

León-Márquez y Díaz-Magaña en 2009, llevaron a cabo un análisis de éstos homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400 con el objetivo de evaluar si éstos son capaces de conferir resistencia a cromato y sus resultados sugirieron que los homólogos CHR probablemente se expresan de manera diferencial en un huésped heterólogo. Los resultados mostraron que los homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400 confieren resistencia a cromato bajo diferentes condiciones de cultivo cuando son cuando expresados en *Escherichia coli* a partir de vectores de alto (pUCP20) o bajo número de copias (pACYC184) **(Tabla 1)**.

Luna-Luna en 2010 analizó el patrón de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* en diferentes condiciones de cultivo bacteriano, mediante ensayos de RT-PCR a partir de RNA total de células de *B. xenovorans* crecidas en caldo nutritivo (CN) y medio mínimo M9 con alta (2 mM) o baja (0.04 mM) concentración de sulfato. En dicho trabajo se encontró que los genes *chr* de *B. xenovorans* se expresan diferencialmente dependiendo de

las concentraciones de sulfato y cromato presentes en el medio de cultivo. Se encontró que el sulfato reprime la expresión de los genes *chr* (*chrA1a*, *chrA1b*, *chrA2*, *chrA6*, *chr1NCa* y *chr1NCb*), mientras que el cromato induce la expresión de la mayoría de los genes *chr* (*chrA1a*, *chrA1b*, *chrA2*, *chrA6* y *chr1NCa*). Sin embargo, no se han analizado otras condiciones específicas de regulación de los promotores de los genes *chr* que lleve a comprender la razón por la cual *B. xenovorans* posee un gran número de homólogos para una misma probable función.

Existe poca información acerca de la regulación de la expresión de los genes de resistencia a cromato. En 2008 Branco y colaboradores encontraron que el transposón TnOtChr de la bacteria *Ochrobactrum tritici* 5bv11, la cual es capaz de tolerar concentraciones mayores a 50 mM de cromato, agrupa los genes de resistencia cromato *chrB*, *chrA*, *chrC* y *chrF*. Se encontró que los genes *chrB* y *chrA* son esenciales para la resistencia a cromato por *O. tritici*, no así *chrF* y *chrC*. Además se determinó que el promotor *chr* es fuertemente inducido por cromato o dicromato. En ese trabajo se propuso que la proteína ChrB actúa como un sensor de cromato que regula la expresión del operón *chrBACF* (Branco y col., 2008).

En *B. xenovorans* se encuentra un posible operón (*chrBA2FC*), ubicado en el megaplásmido, que codifica proteínas con una alta identidad con las codificadas en el transposón TnOTChr. Por esta razón se sugiere que el posible operón *chrBA2CF* tenga una función y regulación similar que el de TnOTChr.

En este trabajo se analizó el posible operón *chrBACF* por medio de tres fusiones transcripcionales usando el gen reportero *lacZ*, para determinar si

los genes *chrB* y *chrA2* se co-transcriben o si cada uno de ellos tiene su propio promotor. Las dos primeras fusiones contienen las probables regiones promotoras de los genes *chrB* (*chrB-lacZ*) y *chrA* (*chrA-lacZ*) y la tercera fusión abarcó desde la región promotora del gen *chrB* hasta los primeros 60 nucleótidos de la región codificante de *chrA* (*chrBA-lacZ*) (**Figura 12A**). Al analizar la actividad de LacZ en los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo cada una de las fusiones transcripcionales, se encontró que la expresión de *chrB-lacZ* fue 45 veces mayor que la expresión de *chrA-lacZ* (**Figura 12B**). Esto indica que la unidad transcripcional *chrB* posee su propio promotor, y que en cambio el gen *chrA* no contiene un promotor que controle la iniciación de su transcripción. Aunque la fusión *chrBA-lacZ* mostró una actividad relativamente alta (~9,000 UM), ésta fue un poco menor que la expresión de *chrB-lacZ* lo que sugiere que la expresión de *chrBA-lacZ*, también depende del promotor corriente arriba de *chrB*.

Se comparó la actividad transcripcional de *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* en medios de crecimiento distintos (**Figura 13**), se observó que en caldo nutritivo las condiciones nutricionales encontradas fueron las más óptimas para la transcripción de las fusiones, en especial para *chrB-lacZ*, comparada con los medios Luria y mínimo en los cuales no se refleja una actividad diferencial de β -galactosidasa.

Con el antecedente de que el gen *chrB* codifica a un posible regulador transcripcional que afecta la expresión de su propio promotor, y que es probablemente un sensor de cromato, se compararon las actividades de β -galactosidasa en ausencia y presencia de cromato para comprobar su papel en el operón. Se emplearon concentraciones de K_2CrO_4 sub-inhedoras para

el crecimiento de cultivos de *B. xenovorans* determinadas mediante curvas de inducción (Luna-Luna, 2010). En la **Figura 14** se muestra la actividad transcripcional de las fusiones *chrB-lacZ* y *chrBA-lacZ* crecidas en MM y MM + 5 μ M de cromato, concluyendo de ella que en presencia del ión, el gen *chrB* no modifica significativamente la expresión de su propio promotor y por lo tanto la actividad de β -galactosidasa.

Con todo lo anterior se deduce que los genes *chrB* y *chrA* se co-transcriben y que bajo las condiciones analizadas el gen *chrB* no tiene un claro papel de regulador transcripcional que dirija la expresión diferencial de éstos genes. La disminución en la actividad de *chrBA-lacZ* con respecto a *chrB-lacZ* puede deberse a la longitud del transcrito, ya que la primera es 1019 pb mayor con respecto a la segunda y la cantidad de transcrito puede ser menor y reflejar una menor actividad de la enzima β -galactosidasa.

Para evaluar la regulación de los promotores de los genes *chr* restantes presentes en el genoma de *B. xenovorans* y por consiguiente los niveles y condiciones óptimas de expresión transcripcional de los genes *chr* se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ* que abarcaron las regiones reguladoras de los genes *chrA1a*, *chr1NCa*, *chrA6*, *chr1NCb*, *chrA1b* y *chrB* (del operón *chrBA2CF*) (**Figura 15**). Las fusiones *chrA1a-lacZ* y *chr1NCa-lacZ* mostraron en todas las condiciones analizadas una actividad de *lacZ* baja, comparada con las otras tres fusiones que arrojaron una actividad diferencial mucho mayor (por ésta razón se omitieron de los resultados posteriores) (**Figura 16**), la fusión *chrA1b-lacZ* se eliminó de los ensayos, ya que dentro de su secuencia posee un sitio de restricción para la enzima *EcoRI*, lo cual interfirió en su ligación al vector pLP170.

Existen diversos mecanismos que ocasionan la variación en el nivel de la expresión de los genes, entre ellos se encuentran: la secuencia del promotor, los factores σ , ligandos relacionados directamente con la transcripción como por ejemplo el ATP, los factores de transcripción y la estructura plegada del cromosoma bacteriano; varios de ellos pueden modular la traducción en función de las condiciones ambientales (Browning y col., 2004), lo que indica que si bien las fusiones *chrA1a-lacZ* y *chr1NCa-lacZ* mostraron actividad muy baja en las condiciones analizadas, pueden presentar un mayor nivel de transcripción en otras condiciones de estrés o bien que aun cuando presenten bajos niveles de traducción de LacZ comparada con los de otros genes *chr*, pueden ser suficientes para contrarrestar los efectos del cromato, pudiendo ser transportadores eficaces, o que probablemente si la traducción es mayor, las proteínas codificadas pueden precipitar, ya que se sabe que cuando hay sobreexpresión de proteínas de membrana éstas pueden formar agregados y dejar de ser funcionales posiblemente también como consecuencia directa de la saturación de los mecanismos de translocación de proteínas a membranas citoplasmáticas.

La actividad de la mayoría de los promotores bacterianos dependen de múltiples señales ambientales y por lo tanto muchos promotores son controlados por dos o más factores de transcripción (Browning y col., 2004)

La regulación de un gen puede integrar múltiples señales. Un ejemplo de ello es *Azotobacter vinelandii*, bacteria Gram negativa quimiorganotrófica, la cual posee el sistema NifL-NifA que controla los genes que están involucrados en la fijación de nitrógeno. La transcripción de éstos genes dependen de más

de una señal, ya que están involucrados los niveles de oxígeno, carbono y nitrógeno disponibles en el medio ambiente (Little y col., 2000). En *E. coli* existe otro ejemplo de regulación de genes por más de una señal. En la regulación del promotor *lac*, están involucrados dos factores de transcripción: la Proteína Receptora de AMPc (CRP) y el represor Lac que a su vez es controlado por el azúcar alolactosa. Uno de los factores interpreta una señal metabólica global (CRP), mientras que el otro responde a una señal metabólica específica (Browning y col., 2004).

Con la finalidad de observar si hay variación en la expresión transcripcional de los genes *chr* de *B. xenovorans* durante las fases de crecimiento bacteriano, se realizaron cinéticas de actividad de LacZ de las fusiones con los genes que presentaron expresión diferencial: *chrA6*, *chr1NCb* y *chrB-lacZ*. Se observó un comportamiento similar en las tres fusiones: al llegar a la fase estacionaria, la actividad descendió, recuperándose horas después y manteniéndose casi constante hasta las 24 h (**Figuras 17, 18 y 19**). La reducción de los niveles de nutrientes es una señal que regula la entrada a fase estacionaria (Lazazzera, 2000), por lo tanto, los resultados indican que durante el proceso de cambio de fase de crecimiento, se alteran los patrones de la expresión génica de los homólogos *chrA6*, *chr1NCb* y *chrB*, probablemente debido a que las células detienen su metabolismo para permitir una mayor supervivencia celular ante la disminución de nutrientes.

Las variaciones en las condiciones nutricionales a las que está sometido un microorganismo están involucradas directamente en su desarrollo y actividad celular, ya que las bacterias incorporan sustancias del medio ambiente con la finalidad de transformarlas y poder realizar procesos metabólicos. Por esta

razón, se analizó si las condiciones nutricionales son un factor que determine la transcripción de los promotores de los genes *chrB*, *chrA6* y *chr1NCb*. De forma general se observó que los tres genes *chr* analizados se expresan diferencialmente en respuesta a las condiciones nutricionales, siendo más evidente en la fusión *chrA6-lacZ* que presentó el doble de actividad en los medios de crecimiento ricos en nutrientes que en el medio mínimo (**Figura 20**). Sin embargo, en la misma figura se observa que en condiciones de estrés nutricional, como las que causa el medio mínimo, el gen *chrB* presentó la mayor actividad transcripcional de los tres homólogos. Al ser este un medio que contiene la mínima cantidad de nutrientes posibles que permite el crecimiento del microorganismo, esto le puede otorgar a la bacteria una ventaja adaptativa ante ambientes hostiles ya que el estrés nutricional no afectó drásticamente la transcripción de éste gen.

Con frecuencia los genes de resistencia a agentes tóxicos responden ante la presencia de tal agente, *B. xenovorans* LB400 es una bacteria capaz de sobrevivir a concentraciones elevadas de cromato, probablemente debido a la presencia de los genes *chr*. Por esta razón se trataron los cultivos con este oxianión en tres medios de crecimiento distintos. Al realizar los ensayos se observó que en CN las fusiones *chr1NCb-lacZ* y *chrB-lacZ* mostraron un aumento en la actividad transcripcional en presencia de CrO_4 al compararla con los niveles obtenidos en los cultivos sin el oxianión; en cambio, el gen *chrA6*, se expresa 4.4 veces más cuando en el medio de crecimiento no hay presencia de cromo (**Figura 21**). En medio LB el gen *chrA6* mostró el mismo comportamiento, al mostrar mayor actividad de LacZ en ausencia que en presencia de cromato, en cambio los genes *chr1NCb-lacZ* y *chrB-lacZ* no

mostraron una actividad diferencial de LacZ (**Figura 22**). En medio mínimo, las tres fusiones no presentaron actividad transcripcional diferencial en presencia o ausencia de cromato, sin embargo, el gen *chrB* mostró la mayor actividad de las tres fusiones en ambos medios (~13,000 UM) (**Figura 23**). En los tres ensayos, se muestra una actividad diferencial de LacZ para los tres homólogos *chr*, lo que sugiere que en ciertas condiciones ambientales pueden respaldarse uno a otro, a fin de que siempre se esté expresando al menos un homólogo que realice la función de contrarrestar los efectos tóxicos del cromato, manteniendo la bacteria los niveles necesarios de transportadores *chr* para poder permanecer en ese ambiente.

La temperatura óptima para el crecimiento de una especie microbiana está relacionada con la temperatura del hábitat normal del organismo. La influencia de la temperatura sobre el crecimiento es realmente una medida de la influencia de este parámetro sobre la actividad enzimática de la célula y sobre los factores implicados en la transcripción que también son proteínas. Al ser la temperatura un factor que puede afectar el crecimiento bacteriano y por lo tanto su desarrollo a través de la modificación de la expresión genética en este trabajo se evaluaron los niveles de expresión de los genes *chrB*, *chrA6* y *chr1NCb* en dos diferentes temperaturas. El promotor del gen *chrA6* fue el que mostró la mayor diferencia entre actividades de LacZ a las temperaturas probadas. A 37°C el gen *chrA6* tuvo una actividad transcripcional 23 veces mayor actividad que a 30°C (**Figura 24**). Esta es una diferencia muy evidente en los niveles de transcripción, lo que indica una clara temperatura óptima de expresión de este gen y por lo tanto de los factores implicados en su transcripción. La fusión *chr1NCb-lacZ*

no mostró una clara actividad diferencial entre ambas temperaturas, siendo más evidente para la fusión *chrB-lacZ*, teniendo una expresión mayor a 37°C.

Cuando un organismo que posee varios miembros de una misma familia de genes, éstos le proporcionan una aparente redundancia funcional de la actividad de la proteína codificada en particular; lo anterior se explica a veces por la necesidad de la célula para tener sistemas de copia de seguridad como un sistema de protección frente a mutaciones que pudieran alterar o suprimir la función de algún homólogo, o bien por la necesidad de la bacteria para adaptarse a diferentes condiciones de estrés (Aslund y col., 1999). En este trabajo pudimos determinar que los homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400 mostraron una regulación diferencial al ser sometidos a diferentes condiciones de crecimiento. Con estos resultados podemos sugerir que, aunque una característica de la célula es que se basa en el principio máximo de economía, la regulación transcripcional de ciertos genes no obedecen directamente a esta regla, si no que mas bien su expresión es impulsada por la necesidad de supervivencia ante ambientes hostiles.

XI. CONCLUSION

En este trabajo se demostró que los genes *chrB*, *chrA6* y *chr1NCb* de *Burkholderia xenovorans* LB400 se regulan diferencialmente al ser sometidos a diferentes condiciones nutricionales y de temperatura.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez A. H., Moreno-Sánchez R. y Cervantes C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181:7398-7400.
2. Aslund F. y Beckwith J. (1999). The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181:1375-1379.
3. Bedard, D., L., Unterman, R., Bopp, L. H., Brennan, M. J., Haberl, M. L. y Johnson, C. (1986). Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:761-768.
4. Birnboim H. C. y Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
5. Bopp L. H. (1986). Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1:23-29.
6. Branco R., Chang A. P., Johnston T., Gurel V., Morais P. y Zhitkovich A. (2008). The chromate-inducible *chrBACF* operon from the

- transposable element Tn*OtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. J. Bacteriol. 190:6996-7003.
7. Browning D. F. y Busby S. J. W (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. Nature Reviews Microbiology 2:1-9.
 8. Cervantes C., Ohtake H., Chu L., Misra T. y Silver S. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. 172:287-291.
 9. 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.
 - 10 Cervantes C. y Campos-García J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria In: Nies DH, Silver S (eds) Molecular Microbiology of Heavy Metals. Springer-Verlag, Berlin, 407-402.
 - 11 Chain G. P. S., Deneff V. J., Konstantinidis K. T., Vergez L. M., Agullo L., Reyes L. V., Hauser L., Córdova M., Gómez L., González M., Land M., Lao V., Larimer F., LiPuma J. J., Mahenthiralingam E., Malfatti S. A., Marx C. J., Parnell J. J., Ramette A., Richardson P., Seeger M., Smith D., Spilker T., Sul W. J., Tsoi T. V., Ulrich L. E., Zhulin I. B. y

- Tiedje J. M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multireplicon, 9.73-Mpb genome shaped for versatility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:15280-15287.
- 12 Chen W. M., Moulin I., Bontemps C., Vandamme P., Bena G. y Boivin-Masson C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. J. Bacteriol. 185:7266-7272.
- 13 Coenye, T. y Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environ. Microbiol. 5:719-729.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 Enderle, P. J. y Farwell, M. A. (1998). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. Biotechniques 25: 954–958.

- 17 Forsberg A. J, Pavitt G. D. y Higgins C. F. (1994) Use of transcriptional fusions to monitor gene expression: a cautionary tale. *J. Bacteriol.* 176: 2128-2132.

- 18 Gillis, M., Tran Van, V., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T. y Fernández, MP. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 274-289.

- 19 Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen III, J.F., Tiedje, J.M. y Vandamme, P. (2004). Classification of the biphenyl-and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1667-1681.

- 20 Hawkins J. D. (1996). Gene structure and expression. CUP. Third Edition 4:58-63.

- 21 Helmann J. D. (2009). RNA polymerase: A nexus of gene regulation. *Methods* 47:1-5.

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

- 23 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.
- 24 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. Contam. Toxicol. 43:742-746.
- 25 Kitano H. (2004). Biological robustness. Mol. Syst. Biol. 5:826-837.
- 26 Landers P., Kerr K. G., Rowbotham T. J., Tipper J. L., Keig P. M., Ingham E. y Denton M. (2000). Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19:121-123.
- 27 Lazazzera B. A. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. Curr Opin Microbiol. 3:177:182.
- 28 León-Márquez Y. L. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de maestría. IIQB-UMSH.
- 29 Lessie T. G., Hendrickson W., Manning B. D. y Devereux R. (1996). Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. FEMS Microbiol. Lett. 144: 117-128.

- 30 Little R., Reyes-Ramírez F., Zhang Y., Heewijk C. y Dixon R. (2000). Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. *J. EMBO* 19:6041:6050.
- 31 Luna-Luna M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de maestría. IIQB-UMSH.
- 32 Mahenthiralingam E., Urban T. A. y Goldberg J. B. (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144-156.
- 33 Moulin L., Munive A., Dreyfus B. y Boivin Masson C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950.
- 34 Nies, D.H., Nies, A. y Silver S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
- 35 Nies D. H., Koch S., Wachi S., Peitzsch N. y Saier M. H. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.

- 36 Partida-Martinez L. P. y Hertweck C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437:884-888.
- 37 Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Hefin-Jones, T. y Mahenthiralingam, E. (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3917-3927.
- 38 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.
- 39 Potvin E., Sanschagrin F. y Levesque R. C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 32: 38–55.
- 40 Ramírez-Díaz M. I., Díaz-Pérez C., Vargas E., Riveros-Rosas H., Campos-García J. y Cervantes C. (2007). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321-332.
- 41 Schenborn E. y Groskreutz D. (1999). Reporter gene vectors and assays. Humana Press Inc. *Mol. Biotechnol.* 13: 29-44
- 42 Shupak, S.I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ. Health Perspect.* 92:7-11.

- 43 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.
- 44 Wood K. V. (1995). Marker proteins for gene expression. Promega Corporation, Madison, USA. 6:50-58.
- 45 Zhitkovich, A., Song, Y., Quievryn, G. y Voitkun, V. (2001). Nonoxidative mechanisms are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(IV) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry* 40:549-560.