



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Análisis funcional del regulador ChrS de
*Bacillus subtilis***

Tesis

Para Obtener el Grado de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

Luis Alfonso Verduzco Rosas

Asesor:

D.C. Carlos Cervantes Vega

Co-Asesores:

D.C. Ma. Esther Aguilar Barajas

D.C. Rafael Jiménez Mejía

Morelia Mich., Agosto 2012

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CROMO	1
2. INTERACCIONES BACTERIANAS CON EL CROMATO	1
A. Transporte de cromato a bacterias	1
B. Toxicidad del cromato	1
C. Resistencia bacteriana a cromato	2
3. LA SUPERFAMILIA CHR DE TRANSPORTADORES DE CROMATO	4
4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>chr</i>	7
5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA BACTERIANA	9
6. FAMILIA DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES Lrp	10
II. ANTECEDENTES	14
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. MEDIOS DE CULTIVO	23
2. CEPAS EMPLEADAS	23
3. PLÁSMIDOS EMPLEADOS	23

A. Plásmido pMAL-c2X	23
B. Plásmido pTrcHis-A	25
4. AISLAMIENTO DEL DNA PLASMÍDICO	25
5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	27
6. AISLAMIENTO DEL DNA DE GELES DE AGAROSA	27
7. PURIFICACIÓN DEL DNA TOTAL	27
8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	28
9. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS CON EL DNA	30
A. Restricción con endonucleasas	30
B. Ligación	30
10. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	30
A. Preparación de células competentes	30
B. Transformación	32
11. SECUENCIACIÓN	32
12. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE His-ChrS	32
13. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES	33
14. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)	33
A. Preparación del gel	33
B. Corrimiento electroforético	34
C. Tinción del gel	34
15. ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN (Western Blot)	35
16. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	35
17. DIÁLISIS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His-ChrS	36

18. ENSAYOS DE RETARDAMIENTO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) -----	36
19. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTES (PAGE) -----	37
A. Preparación del gel -----	37
B. Corrimiento electroforético -----	37
C. Tinción del gel -----	37
VIII. RESULTADOS -----	38
1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA ChrS -----	38
2. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DEL DNA PARA LA UNIÓN DE PROTEÍNAS Lrp -----	38
3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>chrS</i> DE <i>B. subtilis</i> 168 -----	40
4. CLONACIÓN DEL GEN <i>chrS</i> EN EL PLÁSMIDO pMAL-c2X -----	40
5. SUBCLONACIÓN DEL GEN <i>chrS</i> EN EL PLÁSMIDO pTrcHis-A -----	40
6. SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pTrcHis- <i>chrS</i> -----	44
7. SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His-ChrS -----	44
8. SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA His-ChrS -----	47
9. INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA His-ChrS -----	47
10. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA His-ChrS POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD -----	50
11. ENSAYOS DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) DE LAS REGIONES REGULADORAS DE LOS GENES <i>chr</i> Y ChrS -----	53
A. Interacción de la proteína ChrS y la región reguladora del gen <i>chr3N</i> -----	53
B. Interacción de la proteína ChrS y la región reguladora del gen <i>chrS</i> -----	53
IX. DISCUSIÓN -----	59
X. CONCLUSIÓN -----	70
XI. BIBLIOGRAFÍA -----	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia a cromato en bacterias	-----	3
Figura 2. Análisis filogenético de las proteínas de la superfamilia CHR	-----	5
Figura 3. Distribución y organización de las proteínas pertenecientes a la superfamilia CHR	-	6
Figura 4. Arreglos de los genes involucrados en la resistencia a cromato de distintos organismos	-----	8
Figura 5. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>E. coli</i> con los genes SCHR de <i>B. subtilis</i>	-	15
Figura 6. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>E. coli</i> con los genes <i>chrS-chr3N-chr3C</i> de <i>B. subtilis</i>	-----	17
Figura 7. Análisis de la expresión del gen <i>chr3N</i> de <i>B. subtilis</i>	-----	18
Figura 8. Esquema del vector pMAL-c2X	-----	24
Figura 9. Esquema del vector pTrcHis-A	-----	26
Figura 10. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la proteína ChrS	-----	39
Figura 11. Análisis la región reguladora del gen <i>chrS</i> de <i>B. subtilis</i> 168	-----	41
Figura 12. Amplificación del gen <i>chrS</i> de <i>B. subtilis</i> 168	-----	42
Figura 13. Caracterización del plásmido pMAL- <i>chrS</i>	-----	43
Figura 14. Caracterización del plásmido pTrcHis- <i>chrS</i>	-----	45
Figura 15. Secuencia del plásmido recombinante pTrcHis- <i>chrS</i>	-----	46
Figura 16. Inducción de la proteína His-ChrS a partir de extractos crudos de la cepa XL10-Gold (pTrcHis- <i>chrS</i>)	-----	48
Figura 17. Separación de extractos solubilizados de la cepa XL10-Gold (pTrcHis- <i>chrS</i>)	-----	49
Figura 18. Western Blot de extractos celulares de la cepa de XL10-Gold (pTrcHis- <i>chrS</i>)	----	51
Figura 19. Purificación de la proteína His-ChrS por cromatografía de afinidad	-----	52

Figura 20. Amplificación de las regiones reguladoras de los genes <i>chr</i> de <i>B. subtilis</i> 168	-----	54
Figura 21. Ensayo de interacción de la proteína His-ChrS y la región reguladora del gen		
<i>chr3N</i>	-----	55
Figura 22. Ensayo de interacción de la proteína His-ChrS y la región reguladora del gen		
<i>chrS</i>	-----	57
Figura 23. Unión específica de la proteína His-ChrS con la región reguladora del gen <i>chrS</i>	--	58
Figura 24. Modelo hipotético del mecanismo de regulación del operón <i>chrS-chr3N-chr3C</i>		
de <i>B. subtilis</i> 168	-----	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patrones de regulación por Lrp y el efecto de la leucina	12
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes <i>chr</i> de <i>B. subtilis</i>	29
Tabla 3. Condiciones utilizadas para la amplificación por PCR	31

RESUMEN

La superfamilia CHR de transportadores de cromato está compuesta por la familia de proteínas grandes LCHR y la familia SCHR de proteínas pequeñas. En el genoma de *Bacillus subtilis* 168 se localizan un par de genes que codifican las proteínas Chr3N y Chr3C, pertenecientes a la familia SCHR, que confieren resistencia a cromato en *Escherichia coli* únicamente cuando ambas proteínas se expresan. Río arriba del gen *chr3N* se encuentra el gen *chrS* que codifica una proteína que presenta homología con proteínas de la familia de reguladores transcripcionales Lrp. Previamente se ha encontrado que la clonación del gen *chrS* junto con los genes de resistencia a cromato *chr3NC* (*chrS-chr3N-chr3C*) disminuye el nivel de resistencia a cromato respecto al nivel conferido únicamente por el par de genes *chr3NC*. Adicionalmente se determinó que la presencia de *chrS* reprime la expresión de los genes *chr3NC*, mientras que el cromato induce dicha expresión. Para dilucidar el mecanismo de regulación de la proteína ChrS sobre los genes de resistencia a cromato, el objetivo de este trabajo fue determinar si el producto proteico del gen *chrS* se une a las regiones promotoras de los genes *chrS* y *chr3N* de *B. subtilis* 168. Inicialmente, mediante un análisis *in silico* se hizo una predicción de la probable estructura terciaria de ChrS, se identificaron un dominio amino que contiene el motivo de unión al DNA del tipo HTH, indispensable para llevar a cabo su función regulatoria, y un dominio carboxilo terminal de conformación $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ donde probablemente se lleva a cabo la interacción con su efector, dos estructuras típicas de las proteínas Lrp. Un análisis de las secuencias de las regiones reguladoras de los genes *chrS-chr3N-chr3C* identificó una secuencia consenso como un posible sitio de unión de ChrS, la cual se localizó en la región reguladora del gen *chrS*. El gen *chrS* se clonó en el vector pTrcHis-A, que adiciona una etiqueta de histidinas en el extremo amino, y se obtuvo el plásmido recombinante pTrcHis-*chrS*. Los resultados obtenidos de la secuenciación del fragmento clonado en el plásmido recombinante indicaron la correcta fusión de la región codificante del gen *chrS* en el vector de expresión pTrcHis-A. Para confirmar la presencia de la proteína recombinante, se realizó la técnica de Western Blot y se logró identificar His-ChrS. Empleando la etiqueta de Histidinas se logró la purificación de His-ChrS mediante cromatografía de afinidad con níquel en un solo paso. Se obtuvo His-ChrS con una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y un alto grado de pureza. Mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) se determinó que His-ChrS se une a la región reguladora del gen *chrS*, sin embargo, His-ChrS no se une a la región reguladora del gen *chr3N*. Se demostró que los genes *chrS-chr3N-chr3C* funcionan como operón. Se determinó la especificidad de unión de His-ChrS al realizar ensayos EMSA con mezclas de DNA de *chrS* y la región intergénica de los genes *chr3N-chr3C*, demostrando la unión de la proteína ChrS a la región reguladora de su propio gen. Este resultado confirma que ChrS regula de manera negativa la expresión de los genes de resistencia a cromato *chr3N-chr3C*.

I. INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CROMO

El cromo es un metal de transición de número atómico 24, peso atómico 52 g/mol, localizado en el grupo VI B de la tabla periódica y es miembro de la primera serie de los metales de transición. El cromo (Cr) es el séptimo elemento más abundante sobre la corteza terrestre. El amplio uso industrial del Cr ha causado que este metal sea considerado un contaminante ambiental debido a que elevadas concentraciones de diversos compuestos del Cr están presentes en agua, suelos y efluentes industriales (Kashim et al., 1989). En la naturaleza, el Cr presenta diversos estados de oxidación que van desde -2 hasta +6 (McGrath y Smith, 1990). Las formas más estables son el Cr(III) y el Cr(VI) (Cervantes et al., 2001). El Cr trivalente Cr(III) es relativamente inocuo debido a que es poco soluble en agua a pH fisiológico, en cambio el Cr hexavalente Cr(VI) es la especie más tóxica, éste es hidrosoluble a pH fisiológico y regularmente se encuentra en forma del oxianión cromato (CrO_4^{2-}); su toxicidad se debe a que estos compuestos atraviesan fácilmente las membranas biológicas (McGrath y Smith, 1990).

2. INTERACCIONES BACTERIANAS CON EL CROMATO

a) Transporte de cromato en bacterias

En diversas especies bacterianas se ha determinado que el transporte del cromato a través de las membranas biológicas ocurre mediante la vía de captación del sulfato (Nies et al., 1989). El cromato penetra a la célula por su similitud al ion esencial sulfato (SO_4^{2-}) (Bellatori, 2002). El cromato y el sulfato presentan estructura molecular tetraédrica, así como distancias de enlaces similares de 1.64 Å y 1.54 Å, respectivamente (Parde et al., 1966).

b) Toxicidad del cromato

Una vez dentro de la célula, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con la reducción del Cr(VI) al Cr(III), proceso que genera radicales libres y provoca estrés oxidativo (Kadiiska et al., 1994); de la misma manera, dentro de la célula el Cr(III) tiene la capacidad de unirse a los fosfatos del DNA ocasionando mutagénesis (Plaper et al., 2002) y a los grupos carboxilo y sulfhidrilo de las proteínas causando alteraciones en su estructura y actividad (Levis y Bianchi, 1982).

c) Resistencia bacteriana a cromato

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de diversos metales tóxicos (Cr, Cu, Pb, Cd, Ag) los cuales pueden ser codificados ya sea por genes cromosómicos o plasmídicos (Silver y Phung, 2005). En el caso del Cr, los mecanismos de resistencia codificados por genes cromosómicos incluyen la reducción extracelular del Cr(VI) lo que le impide atravesar las membranas biológicas, sistemas de reparación del DNA y sistemas de protección contra el estrés oxidativo (**Figura 1**). El mecanismo de resistencia codificado por genes plasmídicos es a través de transportadores de membrana que expulsan el cromato del citoplasma celular. Los primeros sistemas de expulsión de cromato se identificaron en los plásmidos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* y pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans* que codifican la proteína ChrA (Cervantes et al., 2001). La proteína ChrA de *P. aeruginosa* posee 416 aminoácidos (aa) de los cuales el 62% son hidrofóbicos (Cervantes y Silver, 1992). La proteína ChrA de *P. aeruginosa* posee 13 segmentos transmembranales conectados por seis asas periplásmicas y seis citoplásmicas, con su extremo amino terminal localizado en el citoplasma y su extremo carboxilo terminal localizado en el periplasma (Jiménez-Mejía et al., 2006). La proteína ChrA expulsa el cromato del citoplasma celular en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria (Pimentel et al., 2002).

Sistemas de expulsión similares a ChrA de *P. aeruginosa* se han identificado en la γ -proteobacteria

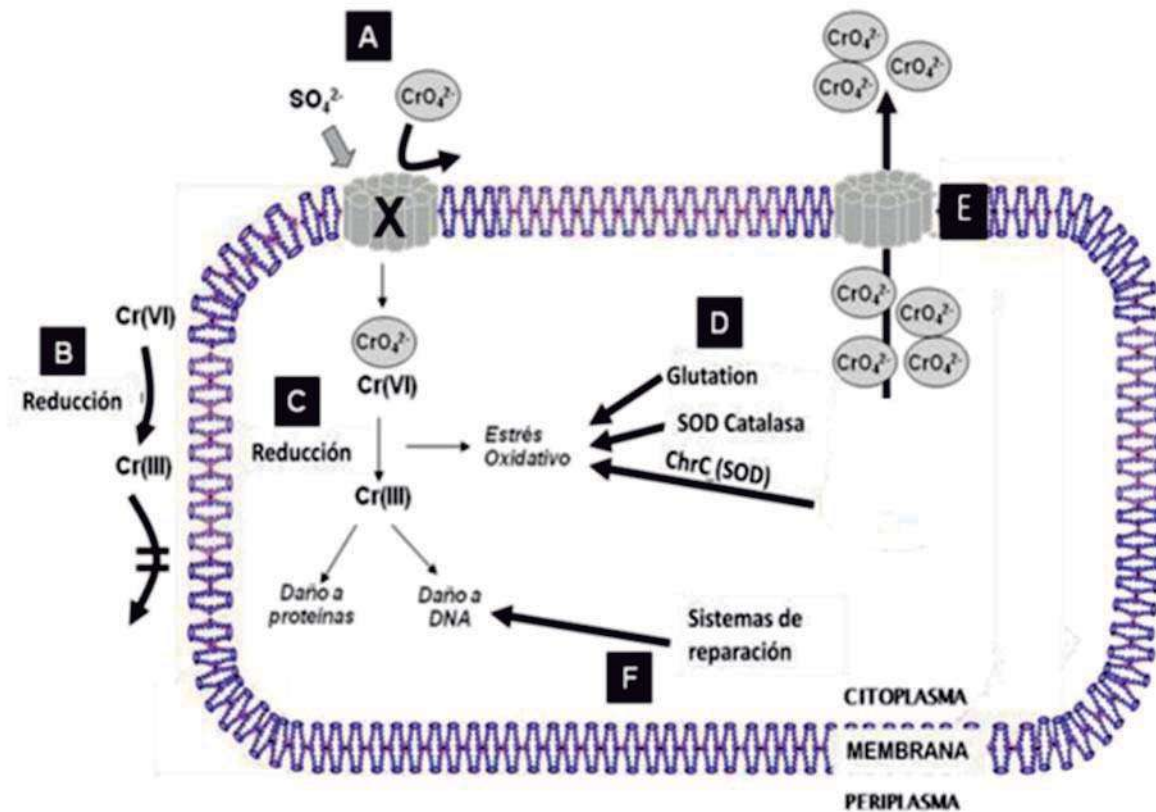


Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia a cromato en bacterias. Los mecanismos de daño se indican por flechas delgadas y los mecanismos de resistencia se indican por flechas gruesas. (A) Mutaciones en el transportador de sulfato (X), disminuyen la entrada del cromato. (B) Reducción extracelular del Cr(VI) a Cr(III) que no cruza la membrana. (C) Reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) que genera estrés oxidativo, daño al DNA y a proteínas. (D) Enzimas detoxificantes involucradas en la protección contra estrés oxidativo. (E) Sistemas de expulsión del cromato del citoplasma. (F) Sistemas de reparación de daño al DNA causado por cromato. Modificada de Ramírez-Díaz et al., 2008.

Shewanella sp. ANA-3 (Aguilar-Barajas et al., 2008), en el transposón TnOtChr de la α -proteobacteria *Ochrobactrum tritici* 5bvl1 (Branco et al., 2008), la bacteria Gram (+) *Arthrobacter* sp. FB24 (Henne et al., 2009), la β -proteobacteria *Burkholderia xenovorans* LB400 (León-Márquez, 2009), la bacteria Gram (+) *Bacillus subtilis* (Díaz-Magaña et al., 2009) y la cianobacteria *Synechococcus elongatus* (Aguilar-Barajas et al., 2011).

3. LA SUPERFAMILIA CHR DE TRANSPORTADORES DE CROMATO

Mediante un análisis filogenético de homólogos de la proteína ChrA se identificaron un total de 135 secuencias de proteínas no redundantes como miembros de la familia de transportadores de iones cromato CHR (**Figura 2**). De éstas, 128 pertenecen a bacterias, una a arqueas y seis a hongos (Díaz-Pérez et al., 2007). Sin embargo, debido al aumento en el número de genomas secuenciados, la superfamilia CHR actualmente está constituida por cientos de homólogos. La superfamilia CHR está compuesta por la familia LCHR de proteínas grandes, con un tamaño de 345-495 aa, y la familia SCHR de proteínas pequeñas, con un tamaño de 123-234 aa (Díaz-Pérez et al., 2007) (**Figura 3A**).

Las proteínas de cadena larga (LCHR) están constituidas por dos dominios homólogos, lo que sugiere que su origen fue a través de un evento de duplicación y posterior fusión de dos genes contiguos que codifican a las proteínas SCHR, por lo que probablemente tanto las proteínas de cadena larga como las de cadena corta provienen de un mismo gen que codificaba a una proteína SCHR ancestral (Díaz-Pérez et al., 2007) (**Figura 3B**).

Recientemente se han identificado miembros funcionales de la superfamilia CHR distribuidos a lo largo del árbol filogenético, pertenecientes a las subfamilias LCHR (Aguilar-Barajas et al., 2008; Branco et al., 2008; Henne et al., 2009) y SCHR (Díaz-Magaña et al., 2009; León-Márquez, 2009). Algunas bacterias poseen varios homólogos CHR en su genoma que confieren resistencia

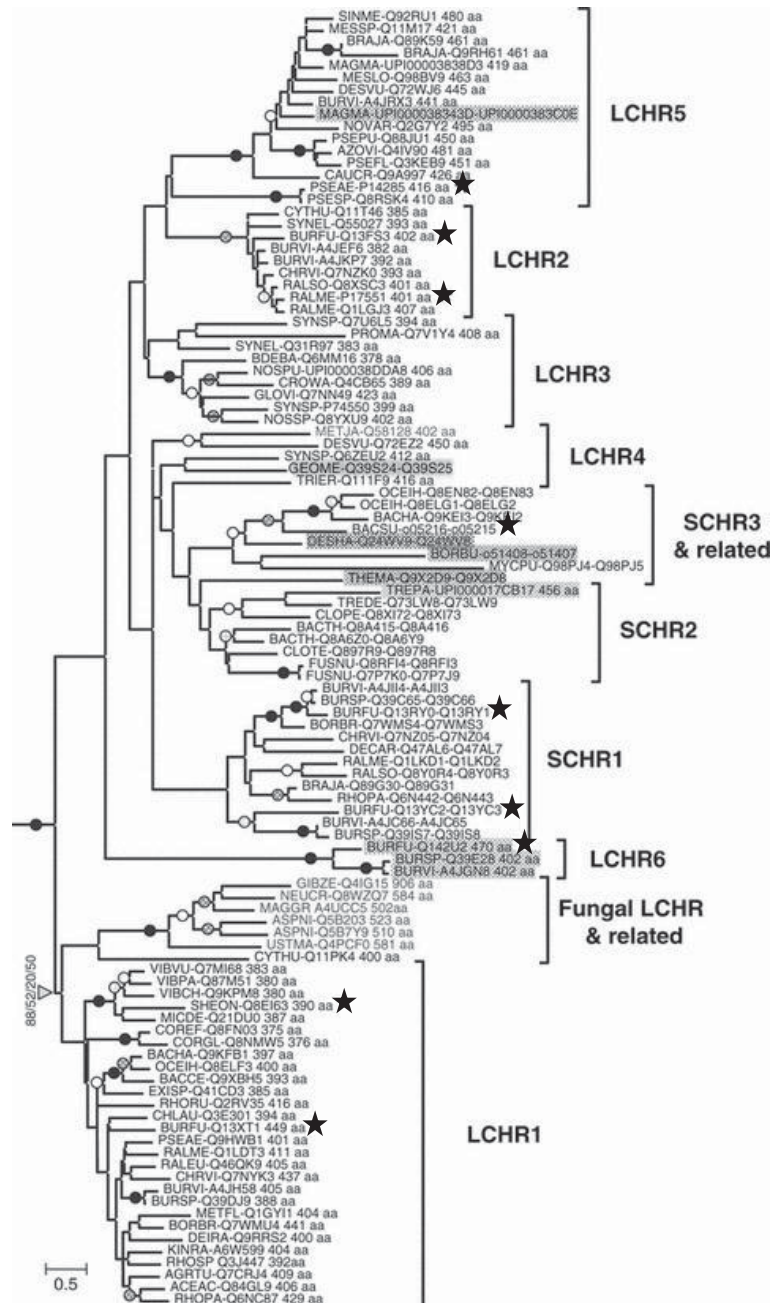


Figura 2. Análisis filogenético de las proteínas de la superfamilia CHR. Los nombres de las secuencias se indican por los nombres abreviados de las especies, seguidos del número de acceso de la base de datos Uniprot y del tamaño de la secuencia de la proteína (aa). Se indican con una estrella las proteínas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

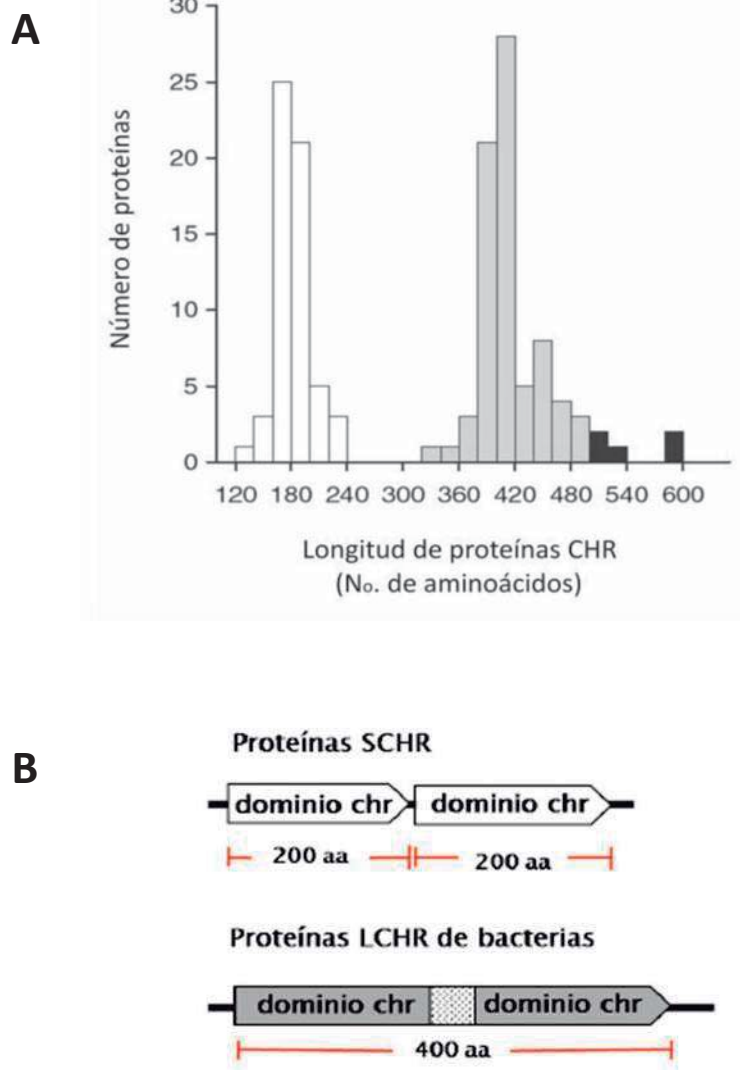


Figura 3. Distribución y organización de las proteínas pertenecientes a la superfamilia CHR. A) El primer grupo del histograma (barras en blanco) corresponde a las proteínas bacterianas de cadena corta o monodominio (SCHR); el segundo grupo (barras en gris) corresponde a las proteínas bacterianas de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

cromato; tal es el caso de *B. xenovorans* LB400 que posee en su genoma cuatro homólogos LCHR y dos SCHR (León-Márquez, 2009).

4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *chr*

En varios organismos se localizan genes aledaños al gen *chrA* que participan en la resistencia a cromato, generalmente porque funcionan como operones; uno de ellos es el gen *chrB* el cual es característico de la organización genética de los operones *chr* (Vasconcelos et al., 2011).

C. metallidurans CH34 es una bacteria aerobia, capaz de degradar xenobióticos en presencia de altas concentraciones de metales pesados. Tiene dos determinantes de resistencia a cromato: *chr1* localizado en el plásmido pMOL28 (genes *chrI*, *chrB₁*, *chrA₁*, *chrC*, *chrE*, *chrF₁*) y *chr2* localizado en el cromosoma (genes *chrB₂*, *chrA₂*, *chrF₂*), los cuales al expresarse en conjunto aumentan el nivel de resistencia a cromato (**Figura 4**) (Juhnke et al., 2002). La proteína ChrB ha sido propuesta como activador de los determinantes de resistencia a cromato en *C. metallidurans*. Se encontró que la función de las proteínas ChrB depende de las concentraciones de cromato y sulfato presentes (Juhnke et al., 2002).

O. tritici 5bvl1 es una bacteria capaz de reducir nitratos y utiliza una variedad de aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos como fuentes de carbono. En el genoma de *O. tritici* se identificó el transposón TnOtChr que contiene el grupo de genes *chrB*, *chrA*, *chrC*, y *chrF* (**Figura 4**), todos ellos relacionados con la resistencia a cromato. Se encontró que el promotor del operón *chr* se induce en presencia de cromato y dicromato (Branco et al., 2008). Aunque la función de la proteína ChrB en *O. tritici* 5bvl1 no es completamente clara, parece actuar como regulador del operón *chr* en respuesta a Cr(VI). Un análisis bioinformático adicional de la proteína ChrB sugiere la presencia de un probable motivo de unión al DNA Hélice-Vuelta-Hélice (HTH) en la región C-terminal de la proteína (Branco et al., 2008).

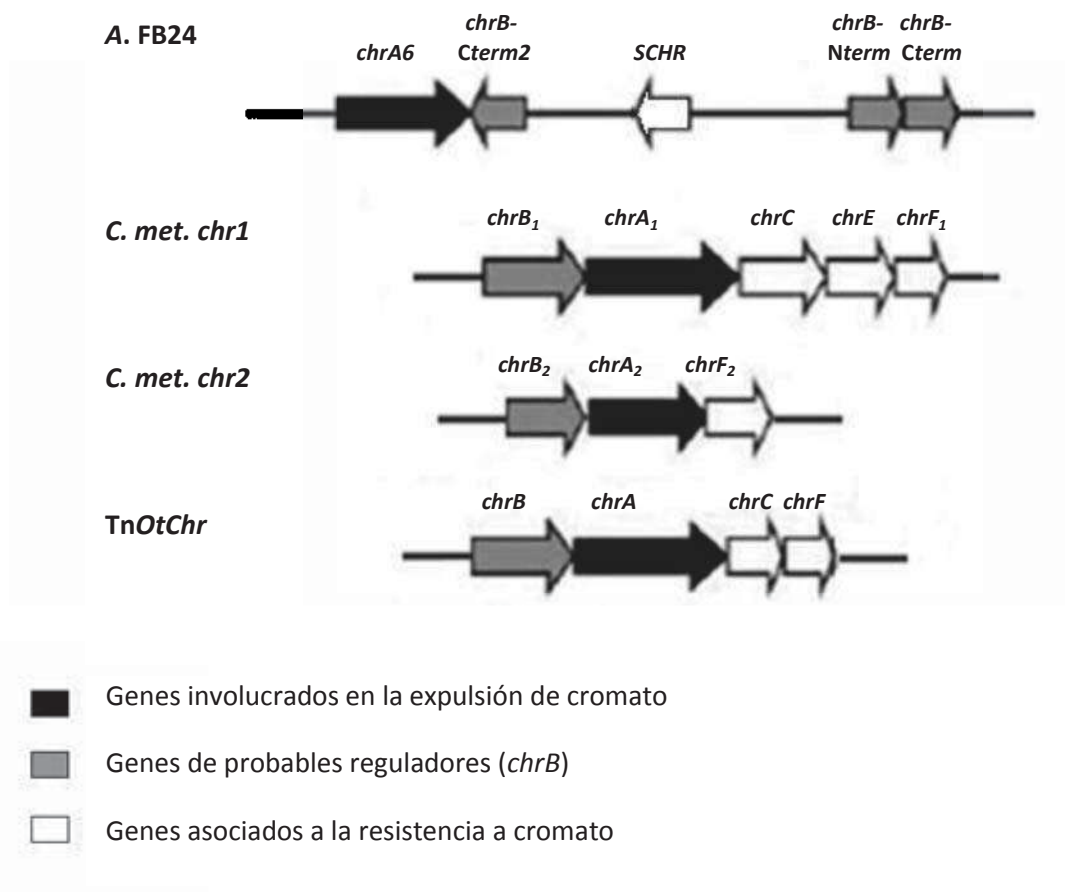


Figura 4. Arreglos de los genes involucrados en la resistencia a cromato de distintos organismos.

Los genes así como la dirección de la transcripción, se encuentran representados por flechas; el nombre de los genes se encuentra sobre cada flecha. A. FB24, *Arthrobacter* sp. FB24 CHR15; *C. met. chr1* y *chr2*, determinantes de resistencia a cromato 1 (plásmido pMOL28) y 2 (cromosomal) de *Cupriavidus metallidurans*; *TnOtChr*, transposón de *Ochrobactrum tritici* 5bv11. Modificada de Henne et al., 2009.

Arthrobacter sp. FB24 es una bacteria presente en suelos limpios o contaminados y presenta altos niveles de resistencia a una gran variedad de metales tóxicos. En su genoma se encontró un determinante de resistencia a cromato que consiste en ocho genes. Entre ellos dos marcos de lectura abiertos (*chrB-Nterm* y *chrB-Cterm2*) de tamaño reducido que en conjunto presentan homología con el gen *chrB* (**Figura 4**). La transcripción de los genes *chrB-Nterm* y *chrB-Cterm2* se eleva a niveles máximos en presencia de cromato, lo que sugiere que los productos de este par de genes pueden realizar una función similar a la proteína ChrB de otros organismos. Además de los genes relacionados con la resistencia a cromato descritos en otras bacterias, FB24 presenta tres genes que anteriormente no habían sido asociados a la resistencia a cromato en otras bacterias, que codifican una oxidorreductasa, una proteína con función desconocida y una lipoproteína (Henne et al., 2009).

5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA BACTERIANA

El mecanismo básico mediante el cual las bacterias controlan la transcripción de sus genes fue formulado por Jacob y Monod en 1961. Ellos propusieron que la expresión de los genes (transcripción) está regulada por las acciones negativas y positivas de proteínas de unión al DNA con especificidad de sitios, denominadas represores y activadores, respectivamente. Los represores se unen a sitios operadores y bloquean la iniciación de la transcripción, mientras que los activadores se unen al DNA y estimulan la iniciación de ese proceso. Las afinidades de estas proteínas por el DNA están influidas por la unión de ligandos de bajo peso molecular que pueden actuar como inductores o correpresores (Mathews et al., 2002).

Algunos factores transcripcionales funcionan estrictamente como activadores o como represores, mientras que otros pueden funcionar de ambas formas dependiendo de la región promotora que regula (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000). Cuando un conjunto de genes comparte la misma unidad de transcripción, se le conoce como operón. Un grupo de genes dispersos a lo largo del

genoma u operones regulados por la misma proteína en respuesta a un estímulo común se denomina regulón (Maas y Clark, 1964).

6. FAMILIA DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES Lrp

La familia de reguladores transcripcionales Lrp se encuentra ampliamente distribuida en procariotas, tanto en bacterias como arqueas. El miembro mejor estudiado de la familia Lrp (proteína reguladora en respuesta a leucina) es el de *Escherichia coli* (EcoLrp) (Thaw et al., 2006). En *E. coli*, Lrp se encuentra involucrada en la modulación de una gran variedad de funciones metabólicas, incluyendo el catabolismo y anabolismo de aminoácidos así como en la síntesis de pili (Brinkman et al., 2003). Aunque la proteína Lrp de *E. coli* es un regulador transcripcional global, la mayoría de los homólogos Lrp actúan como reguladores específicos (Brinkman et al., 2002).

El genoma de *E. coli* contiene más de 300 genes que codifican proteínas que se predice se unen a promotores ejerciendo efectos sobre la transcripción. La mayoría de estas proteínas tienen secuencias específicas de unión al DNA; algunas de estas proteínas controlan la transcripción de un gran número de genes, mientras que otras controlan solamente uno o dos genes. Se ha estimado que tan solo siete factores transcripcionales (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL y Lrp) controlan el 50% de todos los genes regulados en *E. coli* (Browning y Busby, 2004).

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

Los miembros de la familia Lrp son proteínas pequeñas de unión al DNA con masas moleculares de aproximadamente 15 kDa. Las proteínas Lrp contienen tres dominios funcionales: un dominio N-terminal con conformación hélice-vuelta-hélice (HTH) que tiene el sitio de unión al DNA, un

dominio intermedio que es el responsable de la activación de la transcripción y un dominio C-terminal (conformación $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) que es el encargado de responder a leucina (Ettema et al., 2002). Algunos reguladores transcripcionales procarióticos (e.g. CRP, LacI, BirA, AraC) responden a la interacción con sus efectores específicos con cambios estructurales que conducen a su funcionalidad (Harman, 2001). De igual forma, las proteínas Lrp responden a la interacción con su efector leucina ejerciendo regulación sobre algunos genes u operones, sin embargo se ha observado que regula la expresión de otros genes en ausencia de la leucina (Calvo y Mathews, 1994). Se ha observado que a menudo ocurre una autorregulación negativa de los genes *lrp* por la misma proteína y, en la mayoría de los casos, esto ocurre cuando la leucina es independiente del control por Lrp (Ernsting et al., 1992; Tani et al., 2002).

Se han reconocido seis patrones diferentes de regulación por Lrp, dependiendo de si actúa positiva o negativamente y de la manera en que la leucina afecta la expresión (**Tabla 1**). Entre estos patrones de regulación se ha observado interesantemente que cuando Lrp reprime la expresión de los genes que afecta, en la mayoría de los casos el gen afectado es el propio *lrp*, es decir, ocurre una autorregulación (Brinkman et al., 2003).

La observación de que una gran variedad de proteínas son reguladas por Lrp de forma dependiente o independiente a leucina plantea la cuestión de cómo se modula el efecto de Lrp en estas proteínas. Si esta regulación es en efecto modulada en respuesta a la alteración de las condiciones fisiológicas, la actividad de la proteína Lrp puede ser modulada, ya sea por metabolitos no identificados o por la interacción con otras proteínas reguladoras, cuya expresión o actividad es modulada en respuesta a las cambiantes condiciones fisiológicas (Ernsting et al., 1992).

Un análisis de la secuencia del genoma de *B. subtilis* 168 mostró un número inesperado de homólogos Lrp (LrpA, LrpB, LrpC, AzlB, YezC, YwrC y YugG), que muestran un grado de identidad

Tabla 1. Patrones de regulación por Lrp y el efecto de la leucina.

Efecto de leucina sobre Lrp	Ejemplo	Referencia
Activación por Lrp		
La leucina antagoniza el efecto	<i>ilvHI</i>	DeFelice et al., 1982
La leucina potencializa el efecto	<i>fimB</i> y <i>fimE</i>	Gally et al., 1993
Sin efecto de la leucina	<i>papBA</i>	Braaten et al., 1992
Represión por Lrp		
La leucina antagoniza el efecto	<i>sdaA</i>	Lin et al., 1990
La leucina potencializa el efecto	<i>livJ</i> , <i>livK</i> y <i>HMGF</i>	Haney et al., 1992
Sin efecto de la leucina	<i>Lrp</i>	Ernsting et al., 1992

Modificada de Calvo y Mathews, 1994.

con la proteína Lrp de *E. coli* entre 25 y 34% (Beloin et al., 2000). La redundancia de los genes *lrp* en *B. subtilis* y la información disponible de cuatro proteínas (LrpA, LrpB, AzlB y LrpC) podría indicar que tal vez actúan cooperativamente en diferentes situaciones que permiten a *B. subtilis* adaptarse a cambios en la disponibilidad de nutrientes o de otros parámetros de crecimiento celular.

II. ANTECEDENTES

La función de las proteínas de la familia de proteínas grandes LCHR se ha estudiado ampliamente, sin embargo, hasta hace poco no se contaba con reportes acerca de la función de las proteínas pequeñas SCHR. *B. subtilis* 168 posee en su cromosoma el par de genes *ywrB* y *ywrA* (renombrado *chr3N* y *chr3C*, respectivamente) que codifican proteínas pertenecientes a la subfamilia SCHR3 (Díaz-Pérez et al., 2007). Para probar su funcionalidad, los genes *chr3N* y *chr3C* se clonaron en pareja y por separado en el vector pACYC184 y se expresaron en la cepa *E. coli* W3110. Se observó que la cepa W3110 (pAChr3NC) con el par de genes clonados presentó un claro fenotipo de resistencia a cromato, en comparación con el control sensible. En contraste, cuando se clonaron los genes *chr* por separado las cepas presentaron un fenotipo de sensibilidad a cromato (**Figura 5**). La transcripción del par de genes *chr3N* y *chr3C* ocurre vía un RNAm bicistrónico generado a partir de un promotor río arriba del gen *chr3N*, sugiriendo que estos genes forman parte de un operón (Díaz-Magaña et al., 2009). En este trabajo se demostró por primera vez que las proteínas pequeñas de la familia SCHR confieren resistencia a cromato; se ha propuesto que estas proteínas forman heterodímeros en la membrana y juntos proveen el canal de expulsión de cromato (Díaz-Magaña et al., 2009).

Río arriba del gen *chr3N* se encuentra el gen *ywrC*, que se predice codifica una proteína que tiene homología con proteínas de la familia de reguladores transcripcionales Lrp. En un trabajo previo se propuso que el gen *ywrC* (renombrado *chrS*) forma parte de un operón en conjunto con los genes *chr3N* y *chr3C*, y que es un posible regulador de la expresión de estos genes (Jacobo-Arreola, 2010).

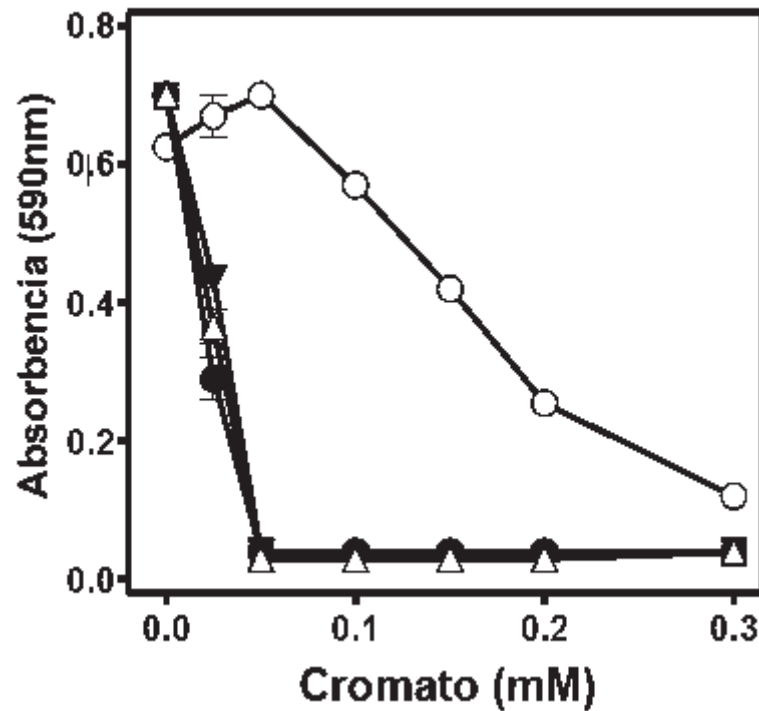


Figura 5.- Susceptibilidad a cromato de las cepas de *E. coli* con los genes SCHR de *B. subtilis*. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 con las concentraciones de cromato indicadas y se incubaron 18 h a 37°C con agitación constante. La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Símbolos: (●), *E. coli* W3110 (pACYC184) con el vector vacío; (○), W3110 (pAChr3N-C) con la pareja de genes *chr3N-chr3C*; (△), W3110 (pAChr3N) con el gen *chr3N* y (▲), W3110 (pAChr3C) con el gen *chr3C*. Modificada de Díaz-Magaña et al., 2009.

En el análisis de la secuencia del gen *chrS* se identificaron las cajas consenso -35 y -10, se identificó una región de unión al ribosoma (RBS) AGCAGG río arriba del codón de inicio (TTG) y se identificó además el codón de paro (TAA). La presencia de estas secuencias sugiere que el gen *chrS* se puede expresar en *B. subtilis*. Se identificó además en la proteína ChrS, una posible región de unión al DNA la cual se ubica en la región reguladora del gen *chrS* (Jacobo-Arreola, 2010).

Para determinar la función de ChrS en la resistencia a cromato, se clonó el gen *chrS* en conjunto con los genes *chr3N* y *chr3C* en el vector pACYC184 y se expresaron en *E. coli* W3110. La cepa W3110 (pAChrS-Chr3NC), que expresa los tres genes, presentó una clara disminución del nivel de resistencia a cromato, en comparación con la cepa que expresa solamente los genes *chr3N-chr3C*, W3110 (pAChr3NC) (**Figura 6**). Este resultado sugirió que el gen *chrS* reprime la expresión de los genes *chr3N-chr3C* lo cual se ve reflejado claramente en el fenotipo de sensibilidad a cromato mostrado en la cepa W3110 (pAChrS-Chr3NC) (Jacobo-Arreola, 2010).

Para analizar la expresión transcripcional de los genes *chr3N-chr3C* en presencia del gen *chrS*, se realizaron ensayos de RT-PCR (Transcripción reversa-PCR). Se evaluó además la expresión en presencia de cromato. Para el ensayo de RT-PCR se realizó aislamiento de RNA de las cepas W3110 (pAChrS-Chr3NC) y W3110 (pAChr3NC) crecidas con y sin cromato y se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican una región interna del gen *chr3N*. Los productos amplificados por RT-PCR empleando el RNA total de las cepas se sometieron a corrimiento electroforético y posterior análisis densitométrico. La presencia del gen *chrS* disminuyó el nivel de expresión de los genes *chr3N-chr3C* (**Figura 7A**), lo que sugiere que el gen *chrS* regula la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C* de forma negativa. Se observó además que al aumentar la concentración de cromato, la expresión de los genes *chr3NC* aumentó hasta alcanzar un nivel similar a la cepa que no expresa el gen *chrS* (**Figura 7B**). Estos resultados sugieren que el cromato revierte los efectos de ChrS, permitiendo que los genes *chr3NC* se expresen y esto probablemente causa que las

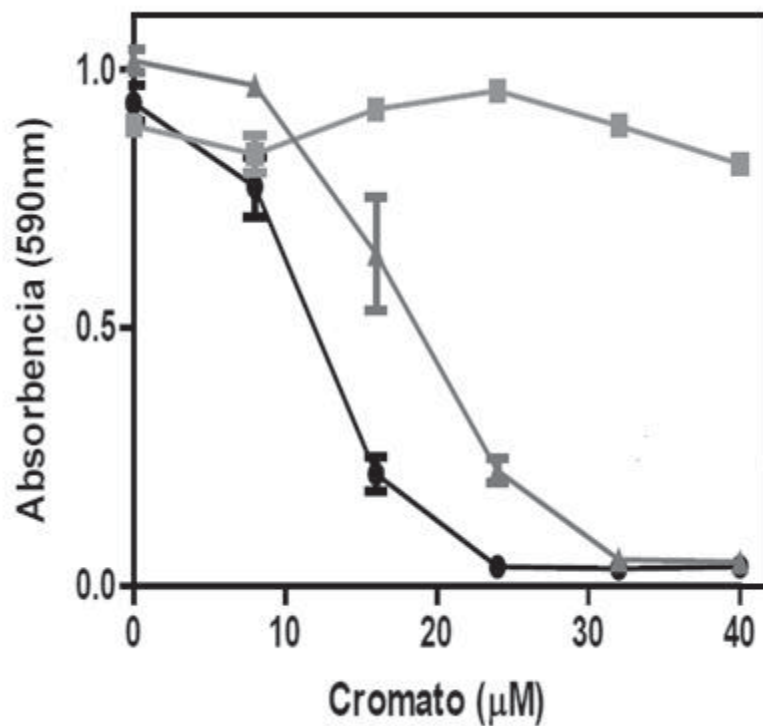


Figura 6.- Susceptibilidad a cromato de las cepas de *E. coli* con los genes *chrS-chr3N-chr3C* de *B. subtilis*. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 con las concentraciones de cromato indicadas. Los cultivos se incubaron 22 h a 37°C con agitación constante. La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Símbolos: (●), *E. coli* W3110 (pACYC184); (▲), W3110 (pAChrS-chr3NC); (■), W3110 (pAChr3NC). Modificada de Jacobo-Arreola, 2010.

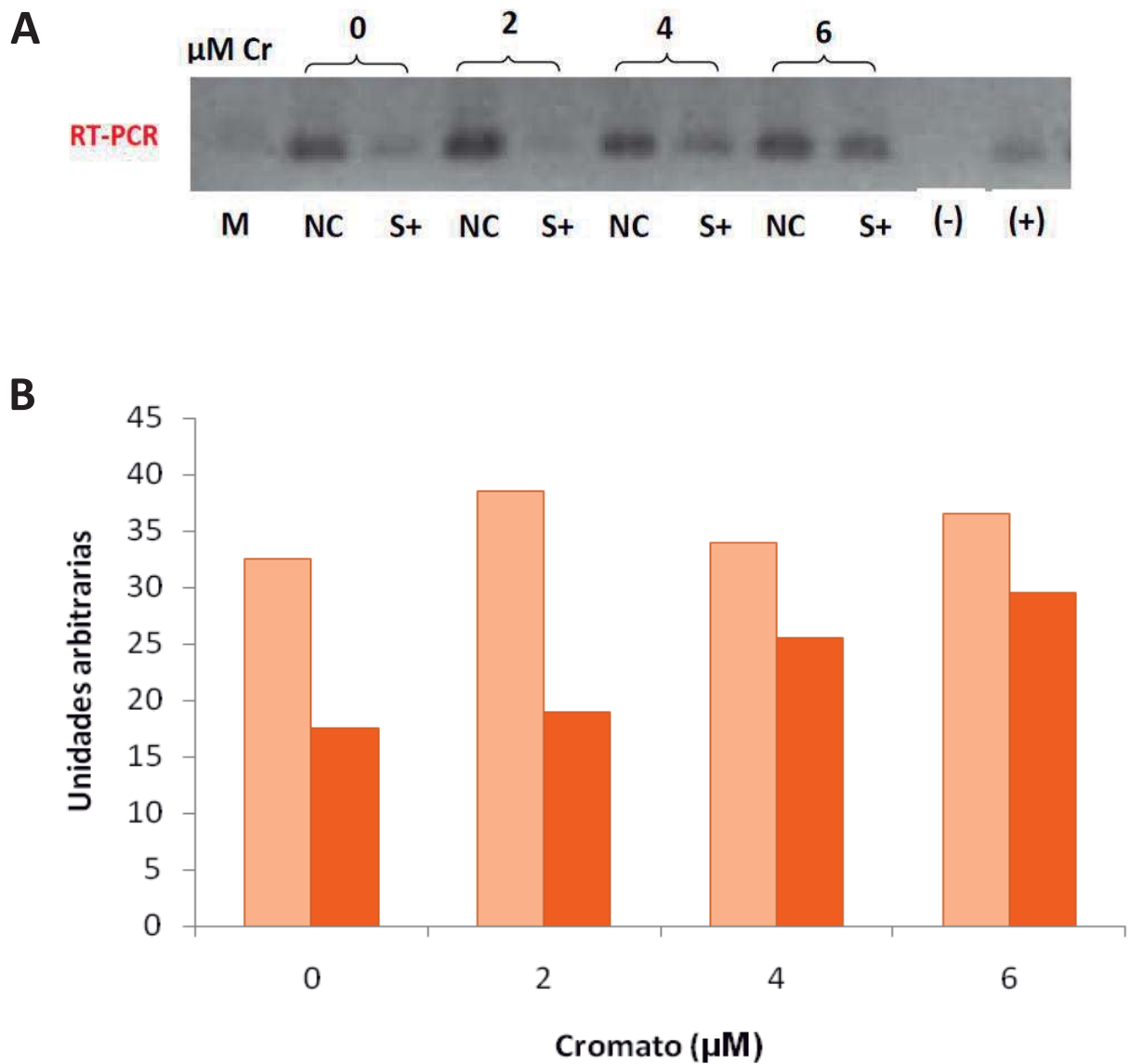


Figura 7.- Análisis de la expresión del gen *chr3N* de *B. subtilis*. **A)** Ensayos de RT-PCR. M marcador de peso molecular 1Kb; NC, *E. coli* (pAChr3N-C) y S+, *E. coli* (pAChrS-chr3NC); - control negativo; + control positivo. En la parte superior se muestran las concentraciones de cromato empleadas. **B)** Análisis densitométrico de los datos del ensayo mostrado en A (Jacobo-Arreola, 2010).

proteínas generadas cumplan su función en la resistencia a cromato aún en presencia del represor *chrS* (Jacobo-Arreola, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

Los genes *chr3NC* de *B. subtilis* 168 confieren resistencia a cromato cuando se expresan en *E. coli*; río arriba de estos genes se encuentra el gen *chrS* que codifica una probable proteína reguladora de la familia Lrp. La presencia de *chrS* disminuye el nivel de resistencia a cromato y la expresión de los genes *chr3NC*. Aunque se ha propuesto que ChrS actúa como un regulador negativo, no se ha determinado su mecanismo de regulación. Para ello es importante demostrar la interacción de la proteína ChrS con las regiones reguladoras de los genes *chrS* y/o *chr3N*.

IV. HIPÓTESIS

La proteína ChrS se une a las regiones reguladoras de los genes *chrS* y *chr3N*.

V. OBJETIVOS

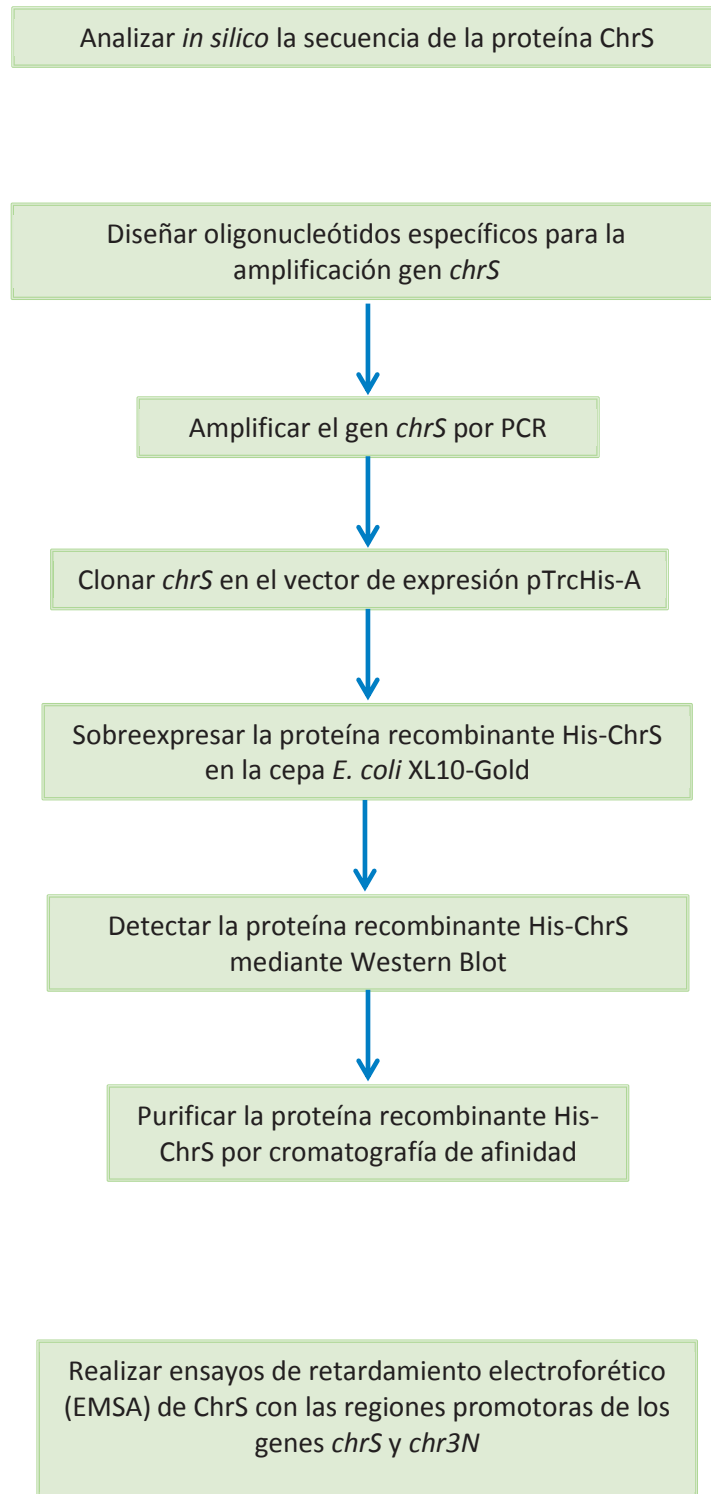
OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína ChrS de *B. subtilis* 168 se une a las regiones reguladoras de los genes *chrS* y *chr3N*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Clonar y sobreexpresar la proteína ChrS de *B. subtilis* 168
- 2.- Purificar la proteína ChrS
- 3.- Analizar si ChrS se une a las regiones reguladoras de los genes *chrS* y *chr3N*

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MEDIOS DE CULTIVO

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

Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.

Agar Luria Bertani (AL): al CL se le agregó 1.5% de agar bacteriológico.

Medio 2 x YT (2XYT): NaCl 0.5%, peptona de caseína 1.6% y extracto de levadura 1%.

2.- CEPAS EMPLEADAS

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

E. coli XL10 Gold. *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]* (Stratagene®).

E. coli JM101. *supE, thi-1 Δ (lac-proAB) [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]* (Yanisch-Perron et al., 1985).

3.- PLÁSMIDOS EMPLEADOS

- A. Se utilizó el vector **pMAL-c2X (Figura 8)** para la recuperación de los fragmentos amplificados por PCR utilizando los sitios de restricción que contiene. El vector pMAL-c2X provee un sistema de fusión y purificación de proteínas. El plásmido recombinante expresa la proteína de interés fusionada a una proteína de unión a maltosa que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.

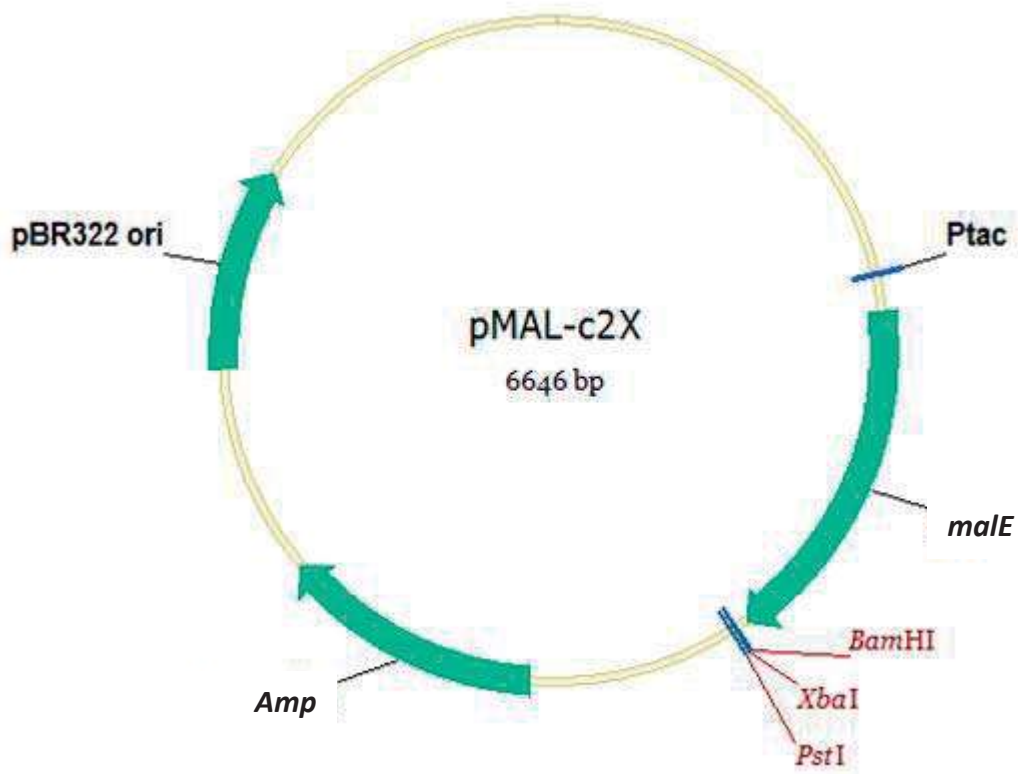


Figura 8. Esquema del vector pMAL-c2X. Tiene el gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin), el origen de replicación para *E. coli* pBR322, el gen *malE* que codifica una proteína de unión a maltosa y el promotor inducible Ptac. Se indican los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI, *Xba*I y *Pst*I (Modificada de New England Biolabs).

- B. Se utilizó el vector **pTrcHis A (Figura 9)**, que posee una secuencia que codifica para seis residuos de histidinas (6xHis) que se fusionan en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. La etiqueta 6xHis fusionada permite la detección mediante Western Blot así como la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad. El vector contiene el promotor inducible *trc* que permite una elevada expresión de la proteína recombinante. Para regular la expresión, el vector cuenta con el gen *lacI^q* que codifica el represor Lac. Este sistema es inducible por Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

4.- AISLAMIENTO DEL DNA PLASMÍDICO

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

Un cultivo bacteriano crecido en CL durante 18 h a 37°C con agitación constante se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 μ l de solución STE [Sacarosa 50 mM, Tris-HCl (hidroximetilaminometano-ácido clorhídrico) 25 mM pH 8.0 y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM pH 8.0] y se le adicionaron 20 μ l de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C por 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 300 μ l de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1%, se agitó suavemente y se mantuvo en hielo. Se le adicionó 250 μ l de una solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8, se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm y posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 μ l de la mezcla fenol/cloroformo 1:1, se mezcló moderadamente procediendo a centrifugar durante 10 min a 13,000 rpm, recuperándose la fase acuosa superior a la que se le agregó 500 μ l de cloroformo se mezcló suavemente procediendo a

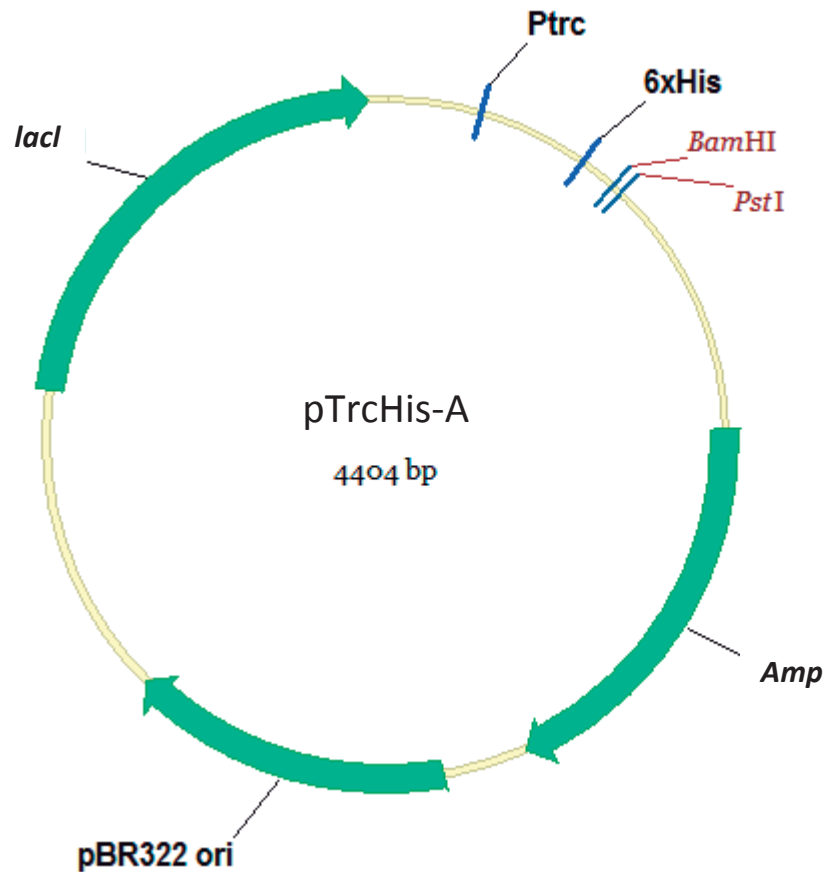


Figura 9. Esquema del vector pTrcHis-A. Contiene una secuencia que codifica seis histidinas (6xHis) que se fusionan al extremo amino de la proteína recombinante. El plásmido tiene el gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin), el origen de replicación para *E. coli* pBR322, el represor del operón *lac* (*lacI*) y el promotor inducible *Ptrc*. Se indican los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Pst*I (Modificada de Invitrogen).

centrifugar durante 3 min a 13,000 rpm; se transfirió la fase superior a otro tubo y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío. Se mantuvo durante 20 min a -80°C o 1 hora a -20°C. Se centrifugó durante 15 min temperatura ambiente a 13,000 rpm y la pastilla se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 3 min entre cada lavado. Se secó la pastilla a 65°C y se resuspendió en 45 µl de agua HPLC estéril. Se adicionó 5 µl de RNasa (a concentración de 2 mg/ml), se incubó a 37°C durante 30 min y se inactivó a 65°C por 15 min. Las muestras se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%.

5.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El DNA aislado se sometió a un corrimiento electroforético, para lo cual se preparó un gel de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo amortiguador. Una muestra del DNA se mezcló con amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5%, sacarosa 40%) y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus Corporation modelo EC452) y se sometió a una corriente constante de 120 voltios durante 30-45 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 10 min. Las bandas de DNA teñidas se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc.). Como marcador de tamaño molecular de DNA se utilizó el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

6.- AISLAMIENTO DEL DNA DE GELES DE AGAROSA

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

7.- PURIFICACIÓN DEL DNA TOTAL

Se recuperó la pastilla celular de un cultivo crecido toda la noche, se centrifugó 2 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución TE (Tris-HCl 50 mM pH 8 y EDTA 20 mM pH 8) y se centrifugó nuevamente. Se adicionó 450 µl de solución TE 50/20 y se resuspendió. Se agregó 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló en vortex y se incubó 30 min a 37°C. Se adicionaron 25 µl de pronasa (Pronasa E o Proteinasa K 20 mg/ml), se mezcló y se incubó 15 min a 37°C. Se agregaron 50 µl de SDS al 10%, se mezcló en vortex e incubó 15 min a 37°C. Se incubó la solución de CTAB/NaCl (bromuro de cetiltrimetilamonio/cloruro de sodio) a 65°C. Se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M, se mezcló vigorosamente en vortex y se incubó a 65°C por 5 min. Se agregaron 80 µl de solución CTAB/NaCl mezclando en vortex, se incubó 10 min a 65°C. Se adicionó 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex hasta homogenizar y se centrifugó 5 min a 10,000 rpm. Se transfirió la fase acuosa y se agregó 500 µl de fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 1 ml de etanol absoluto. Se mantuvo 1 hora a -20°C o 20 minutos a -80°C, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min y la pastilla se lavó 3 veces con etanol al 70%. Se secó la pastilla y se resuspendió en 45 µl de agua HPLC o buffer TE (Tris-EDTA), se agregaron 5 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 15 min. Se inactivó la RNasa a 65°C durante 10 min. Se corrieron 2-5 µl en un gel de agarosa al 1%.

8.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia de las regiones aledañas a los genes que se pretenden amplificar (**Tabla 2**). Se hizo una mezcla de DNA cromosómico de *B. subtilis* 168 (~100 ng), oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 20 picomoles, 12.5 µl de la mezcla de reacción Master Mix que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un amortiguador de reacción a concentraciones optimizadas. La mezcla de reacción se llevó a un

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes *chr* de *B. subtilis*.

Nombre	Secuencia 5' $\longrightarrow$ 3'	Orientación	Región a amplificar
<i>chrS</i> -FW	AGGTG <u>GGATCCT</u> TGAGTCATGAATATCAA ^A	Directo	Región codificante del gen <i>chrS</i>
<i>chrS</i> -RW	CATTT <u>CTAGA</u> AATTGACCGCTTC ^B	Reverso	
<i>chr3NC</i> -FW	CAATTGTTGCAGGTA <u>AAGCTT</u> GGTG ^C	Directo	Región intergénica de <i>chr3N</i> y <i>chr3C</i>
<i>chr3NC</i> -RW	GAGAGT <u>CTAGAG</u> TATCTGTTTACGAC ^B	Reverso	
<i>PchrS</i> -FW	CGTTGCCTCCCTTAT <u>CTAGA</u> ATGC ^B	Directo	Región promotora del gen <i>chrS</i> (<i>PchrS</i>)
<i>PchrS</i> -RW	TGAACGGCG <u>GATCCT</u> GACAAATCGACTCTT ^A	Reverso	
<i>Pchr3N</i> -FW	GCTCTTA <u>AAGCTT</u> GAGGAAGAGC ^C	Directo	Región promotora del gen <i>chr3N</i>
<i>Pchr3N</i> -RW	CATTT <u>CTAGA</u> AATTGACCGCTTC ^B	Reverso	

Se subrayan los sitios de restricción para las enzimas ^A *Bam*HI, ^B *Xba*I y ^C *Hind*III introducidos en la secuencia de oligonucleótidos.

volumen final de 25 μ l. El proceso se realizó empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cycle utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 3**.

9.- TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA

A. Restricción con endonucleasas

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

B. Ligación

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

10.- TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

A. Preparación de células competentes

De un cultivo de la cepa de *E. coli* XL10 Gold crecido durante toda la noche se tomaron 4 ml para inocular 250 ml de CL contenidos en un matraz de 1 L y se incubó a 37°C con agitación constante hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente se mantuvo el cultivo en hielo durante 20 min y se distribuyeron alícuotas en tubos para posteriormente centrifugar durante 10 min a 8,000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó dos veces con agua estéril fría y se centrifugó entre cada lavado en las condiciones antes descritas. Después del último lavado la pastilla se resuspendió en agua estéril más glicerol al 20%. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 0.2 ml en tubos

Tabla 3.- Condiciones utilizadas para la amplificación por PCR.

Fragmento	Desnaturalización inicial	Condiciones de amplificación (30 ciclos)			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
<i>chrS</i>	94 °C/5 min	94 °C/40 seg	55 °C/30 seg	72 °C/45 seg	72 °C/10 min
<i>chr3NC</i>			50 °C/40 seg	72 °C/30 seg	
<i>PchrS</i>			53 °C/40 seg	72 °C/40 seg	
<i>Pchr3N</i>			53 °C/40 seg	72 °C/40 seg	

Eppendorf de 1.5 ml. Estas células se utilizaron para la transformación o bien fueron almacenadas a -80°C (Sambrook et al., 1989).

B. Transformación

Se utilizaron de 3-5 μl de una mezcla de ligación de DNA, la cual se adicionó a 100 μl de células competentes. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación estéril previamente enfriada en hielo para después ser colocada en un electroporador 2510 Eppendorf al cual se le dio un pulso de 2.4 KV. Inmediatamente se le adicionó 2 ml de CL y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación constante. Se tomaron 100 μl de la mezcla previamente concentrada y se plaqueó en cajas con agar LB adicionado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina para seleccionar las clonas.

11.- SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación del plásmido recombinante pTrCHis-ChrS, se empleó el oligonucleótido pTrCHisFow (Invitrogen), que se localiza río arriba de los nucleótidos que codifican la etiqueta de histidinas. La secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio) del Cinvestav Irapuato.

12.- INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE His-ChrS

Se inocularon 2 matraces con 100 ml de medio 2XYT adicionado de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a una dilución de 1:50 con un cultivo de la cepa XL10 Gold (pTrCHis-ChrS) crecido en LB toda la noche a 37°C con agitación constante. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 590 nm y se adicionó a un matraz 0.5 mM de IPTG como inductor. Se tomaron muestras cada hora del cultivo inducido y no inducido.

Posteriormente las células se centrifugaron 1 min a 12,000 rpm para obtener la pastilla celular. Las pastillas se resuspendieron en 100 μl del amortiguador de carga (Glicerol 12.5%, SDS 1%, β -mercaptoetanol 0.35 M, Tris-HCl 25 mM pH 6.8 y Azul de bromofenol 0.005%) y se calentaron a 95

°C por 5 min. Las proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE).

13.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES

Los cultivos que se obtuvieron del ensayo de inducción fueron procesados de la siguiente manera: se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento dos veces con agua estéril fría. Las pastillas se resuspendieron en buffer PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM pH 8.0), se adicionó 1 mM de inhibidor de proteasas PMSF (Floururo de Fenilmetilsulfonil), lisozima a concentración final de 10 mg/ml y se incubó 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se agregó Tritón X-100 a una concentración final de 1% y se mantuvo en hielo por 1 h. Posteriormente las muestras se sonicaron hasta claridad por 10 periodos de 30 s seguido de 30 s de descanso. Finalmente, se centrifugaron 15 min a 7,500 rpm a 4 °C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del sedimento (fracción membranal). Ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE 15%.

14.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

A. Preparación del gel.

Para la formación de los geles de acrilamida se usó acrilamida para la polimerización y bis-acrilamida como agente entrecruzador. El TEMED y el presulfato de amonio se emplearon como catalizadores, el primero usado como iniciador de la polimerización y el segundo como propagador de esta. El detergente SDS actúa como agente desnaturalizante de proteínas. El amortiguador Tris-HCl permite un ambiente óptimo para el desplazamiento de las proteínas desnaturalizadas.

Los geles de poliacrilamida al 15% se prepararon de la siguiente manera:

Gel separador

Acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%	2.5 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.2 ml
SDS 10%	50 µl
Persulfato de amonio 10%	100 µl
TEMED	10 µl
Agua destilada	1.25 ml

Gel concentrador

Acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%	0.35 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	0.33 ml
SDS 10%	20 µl
Persulfato de amonio 10%	50 µl
TEMED	10 µl
Agua destilada	1.2 ml

B. Corrimiento electroforético

El corrimiento electroforético de las proteínas se realizó por un periodo de aproximadamente 1 h a 20 mA. Se utilizó el amortiguador de corrida Tris-glicina 1X (Tris 2.5 mM, Glicina 19.2 mM, SDS 1%). El corrimiento se realizó en la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell de Bio-Rad.

C. Tinción del gel

Para la visualización de las proteínas se empleó azul de Coomasie que se une a los grupos amino de las proteínas, metanol y ácido acético que permiten la fijación de las proteínas en el gel. Para la tinción el gel se colocó en una solución de teñido [0.25 g de azul brillante de Coomassie, 90 ml de

una mezcla de metanol-agua (1:1) y 10 ml de ácido acético glacial] por 10 minutos. Por último, el gel se incubó en solución de desteñido (metanol 10%, ácido acético glacial 10% y H₂O destilada cbp 1 L) por 60 min a temperatura ambiente.

15.- ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN (Western Blot)

Después del corrimiento electroforético, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL, empleando una cámara de transferencia electroforética Mini Trans-Blot® de Bio-Rad. Se utilizó el amortiguador Towbin (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% y SDS 0.1%). La transferencia se realizó por 60 min a 350 mA. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de leche descremada (Blotting Grade Blocker Non-Fat Milk, Bio-Rad) al 5% en amortiguador TBS-Tween [50 µl de Tween 20 (0.05%) en 100 ml de TBS (Tris 20 mM y NaCl 1.5 M pH 7.5)] durante 1 h. Se eliminó la solución bloqueadora y la membrana se lavó 3 veces con 10 ml de amortiguador TBS-Tween incubando 10 min en cada lavado. Se adicionó el níquel activado HisProbe-HRP (Thermo) en TBS-Tween a una dilución 1:1000 y se incubó una hora en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavó la membrana 4 veces con 10 ml de TBS-Tween incubando 10 min con agitación suave. La detección se realizó con el Kit Super Signal® West Pico (Thermo) siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente sobre la membrana se colocó una película de rayos X (Kodak) por 1 min y la película se procesó con una solución de revelado (Kodak).

16.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A partir de un cultivo de XL10 Gold crecido toda la noche se inocularon 250 ml de medio 2XYT con una dilución 1:50, el cultivo se incubó hasta una densidad óptica de 0.5 a 590 nm, se adicionó 0.5 mM de IPTG, y la incubación continuó por 4 h a 37°C con agitación constante. La extracción de proteínas solubles se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente. La purificación de la

proteína His-ChrS se realizó empleando la fracción soluble. Se adicionó 1 ml de resina Ni-NTA (complejo agarosa-nitriloacético-níquel) a una columna de cromatografía, se lavó con 30 ml de agua estéril y se equilibró con 30 ml del amortiguador PBS. La fracción soluble se pasó por la columna y posteriormente se lavó con 50 ml del amortiguador de lavado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, NaCl 1 M, Imidazol 20 mM, Glicerol 10%, pH 7.5), La proteína se eluyó con 5 ml del amortiguador de elución ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 300 mM y Glicerol 10 % pH 7.5) y se recuperaron fracciones de 500 μl . Se tomaron alícuotas en cada paso y se analizaron por SDS-PAGE.

17.- DIÁLISIS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His-ChrS

Las fracciones eluidas enriquecidas con la proteína ChrS se pasaron a una membrana de celulosa (Dialysis Tubing Cellulose de Sigma) y se selló por ambos lados. La membrana se colocó en 500 ml del amortiguador de diálisis (Tris-HCl 20 mM, β -Mercaptoetanol 10 mM y Glicerol 20%) y se dejó en agitación toda la noche a 4 °C. Finalmente las muestras se almacenaron a -80 °C.

18.- ENSAYOS DE RETARDAMIENTO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA).

Para la realización de los ensayos EMSA se siguió el siguiente método: los fragmentos de DNA se amplificaron por PCR a partir del DNA cromosomal de *B. subtilis*. Los fragmentos de DNA se purificaron y se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína His-ChrS en amortiguador de unión [Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), β -Mercaptoetanol 10 mM, KCl 50 mM, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, Dithiothreitol (DTT) 1 mM, Albúmina de suero bovino (BSA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Glicerol 20%]. La interacción se realizó incubando a 25°C por 30 min y posteriormente los complejos DNA-proteína se analizaron en un gel nativo de poliacrilamida 6% (PAGE).

19.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES

(PAGE)

A. Preparación del gel

Los geles de poliacrilamida al 6% se prepararon de la siguiente manera:

Acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%	1.5 ml
TBE 10X	0.375 ml
Persulfato de amonio 10%	60 µl
TEMED	10 µl
Agua destilada	5.625 ml

B. Corrimiento electroforético

El corrimiento electroforético de los complejos DNA-proteína se realizó por un periodo de 3-4 h a 70 V. Se utilizó el amortiguador de corrida TBE 0.5X (Tris 20 mM, Ácido Bórico 20 mM, EDTA 0.5 mM). El corrimiento se realizó en la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell de Bio-Rad.

C. Tinción del gel

Para la visualización del DNA el gel se colocó en una solución de tñido (0.001% de bromuro de etidio) por 5 min. Las bandas de DNA teñidas se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc.).

VIII. RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA ChrS

Con la finalidad de encontrar regiones conservadas de unión al DNA en los reguladores transcripcionales Lrp, inicialmente se identificó una región de la proteína ChrS como posible motivo de unión al DNA. Para la predicción del motivo de unión al DNA se utilizó el programa Helix-Turn-Helix Motif Prediction, el cual mostró un score de 4.29, que sugiere una probabilidad de aproximadamente el 90% de que ChrS contenga el motivo del tipo HTH (**Figura 10A**). Posteriormente se utilizó el programa Swiss Model para analizar la secuencia de la proteína ChrS y predecir su estructura terciaria. Swiss Model cuenta con una base de datos de secuencias de proteínas con su estructura determinada por cristalografía de rayos X, lo cual permite identificar proteínas homólogas y predecir la estructura de la proteína de interés. Para la predicción de la estructura de la proteína ChrS se usó como molde la estructura cristalizada del regulador transcripcional Lrp de la arquea *Pyrococcus furiosus*. Se localizaron en el modelo predicho de ChrS los dominios conservados en los reguladores Lrp, el extremo amino presenta un motivo de unión al DNA del tipo Hélice-Vuelta-Hélice (HTH), así como la presencia de un dímero α - β barril en el extremo carboxilo, dos dominios típicos en las proteínas de la familia Lrp (**Figura 10B**). Este análisis indica que ChrS posiblemente interactúa con alguna región del DNA debido a la presencia del dominio de unión al DNA HTH.

2. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DEL DNA PARA LA UNIÓN DE PROTEÍNAS Lrp

Con la intención de identificar regiones conservadas para la unión de proteínas del tipo Lrp, se analizaron las regiones reguladoras de los genes *chrS* y *chr3N* que se extienden desde 300 pb antes a 100 pb después del codón de inicio. Para ello se empleó la secuencia consenso de

A

```

M S H E Y Q I P N L V L D E T D K Q I L T I L H E E G
R I S Y T D L G K R V D L S R V A V Q A R I N Q L I E
A G V I E K F T A V I N P A K I G I H V S V F F N V E
V E P Q F L E E V A L K L E E E P A V T S L Y H M T G
P S K L H M H G I F T N D Q E M E E F L T K R L Y P L
R G V V S V D C Q M L I K R Y K S R M G M K L

```

B

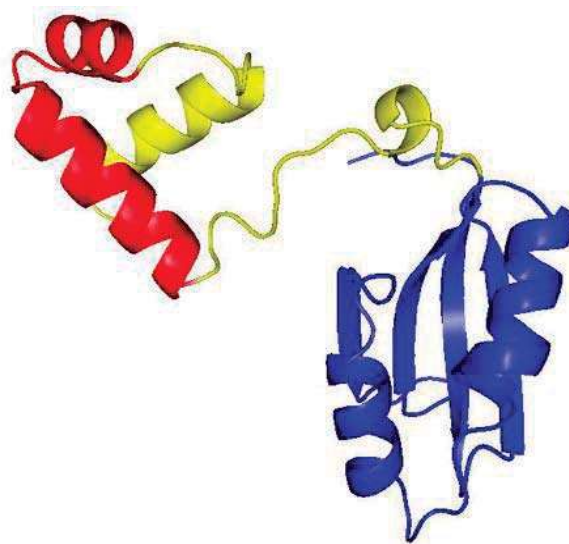


Figura 10. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína ChrS. A) En rojo se indica el posible motivo de unión al DNA HTH predicho en el programa Helix-Turn-Helix Motif Prediction. B) Posible estructura terciaria de ChrS; se muestra en rojo el posible motivo de unión al DNA (HTH), en azul el posible dímero α - β barril y en amarillo las regiones involucradas en la modificación alostérica de la proteína. El modelo se construyó utilizando el programa Swiss Model.

swissmodel.expasy.org

unión (tatt-tg---TTTAT-ctg-atttat-g-) determinada con base en datos experimentales de proteínas Lrp (Shultzaberger y Schneider, 1999). Se identificó un posible sitio de unión para ChrS (tatacgtaactTTTATgataaaatgattgc) que se ubica en la región reguladora del gen *chrS* (**Figura 11**), lo que indica que posiblemente los efectos en la regulación de la transcripción por ChrS ocurren mediante un proceso de autorregulación.

3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *chrS* DE *B. subtilis* 168

Para realizar la clonación del gen *chrS* previamente se amplificó por PCR, para lo cual se empleó la pareja de oligonucleótidos *chrS*-FW y *chrS*-RW (**Tabla 2**) y las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos (**Tabla 3**). Como se esquematiza en la **Figura 12A**, se amplificó la región codificante incluyendo el codón de inicio y el codón de paro del gen *chrS*. El producto amplificado se sometió a corrimiento electroforético y se obtuvo una banda del tamaño esperado de aproximadamente 650 pb (**Figura 12B**).

4. CLONACIÓN DEL GEN *chrS* EN EL PLÁSMIDO pMAL-c2X.

Para recuperar y posteriormente subclonar el gen *chrS*, el fragmento obtenido por PCR se sometió a restricción con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I y se ligó en el plásmido pMAL-c2X digerido con las mismas enzimas. El plásmido recombinante obtenido pMAL-*chrS* (**Figura 13A**) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL10-Gold. El plásmido pMAL-*chrS* se caracterizó mediante restricción con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I; se liberaron bandas de aproximadamente 6.6 kb, correspondiente al vector linearizado y 650 pb, correspondiente al gen *chrS*, lo que indicó que la clonación del gen *chrS* fue correcta (**Figura 13B**).

5. SUBCLONACIÓN DEL GEN *chrS* EN EL PLÁSMIDO pTrcHis-A

Para la sobreexpresión y purificación de la proteína ChrS, el gen *chrS* se subclonó en el vector de expresión pTrcHis-A que adiciona una etiqueta de histidinas en el extremo amino de la proteína

A

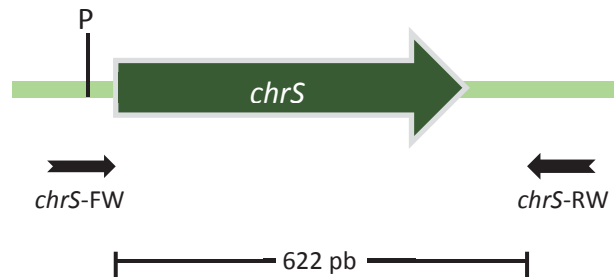
Secuencia consenso	tatt-tg----TTTAT-ctg-atttat-g-
Secuencia <i>chrS</i>	tatacgtaactTTTATgataaaatgattgc

B

	-35		-10	
aataataagatat	tttcgca	ttcatttcgaaaacaaatgaaaaattattat	ttc	tatacgtaac
				L S H E Y
tTTTATgataaaatgattgc	taaaaggctacgaaagcaggtggagcaat	tg	agtc	atgaat
Q I P N L V L D E T D K Q I L T I L H E E G				
aaatccccaac	cttg	tacttgatgagactgataa	caaattctcacgatt	ttgcatgaaagaag

Figura 11. Análisis la región reguladora del gen *chrS* de *B. subtilis* 168. A) Alineamiento de la secuencia consenso de las proteínas Lrp y la secuencia identificada en la región reguladora del gen *chrS*. La secuencia consenso indica en mayúscula los nucleótidos que se conservan al 100%, en minúsculas del 50 al 80% y en guiones menos del 40%. **B)** Análisis de la región -250 pb a +80 pb respecto al codón de inicio del gen *chrS*. En negro se indica la secuencia del gen *chrS*, en rojo se indica la secuencia consenso identificada, en gris se muestra la posible región promotora y subrayadas las cajas -35 y -10. Se muestra en verde el codón de inicio y en azul la traducción del fragmento de ChrS.

A



B

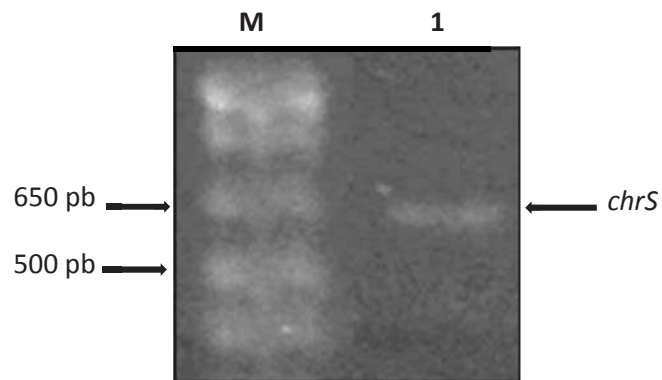


Figura 12. Amplificación del gen *chrS* de *B. subtilis* 168. **A)** Representación del gen *chrS*. La flecha indica la dirección de la transcripción; se indica la posición del promotor (P). En la parte inferior las flechas muestran la dirección y la localización de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR; también se indica el tamaño predicho del fragmento amplificado. **B)** Fotografía de un gel de agarosa que muestra en el carril M el marcador de peso molecular (1 kb); el carril 1 representa el producto de PCR del gen *chrS*.

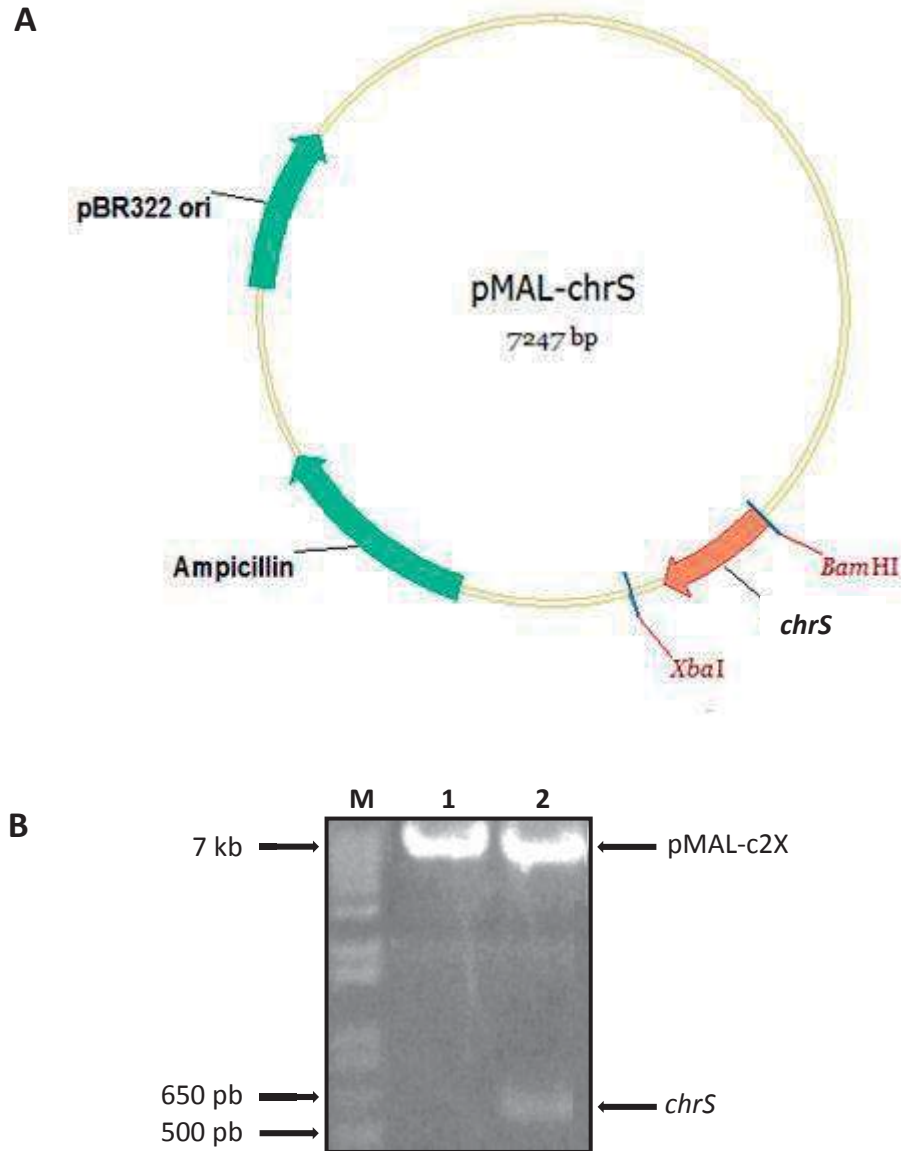


Figura 13. Caracterización del plásmido pMAL-*chrS*. A) Esquema del plásmido recombinante pMAL-*chrS*. Se muestra el gen *chrS*, los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI, *Xba*I y *Pst*I, el gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin), y el origen de replicación para *E. coli*, pBR322. B) Fotografía del gel de agarosa. Carril M, marcador de peso molecular (1 kb); carril 1, plásmido pMAL-*chrS* digerido con la enzima *Bam*HI; carril 2, plásmido pMAL-*chrS* digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I.

recombinante. El plásmido pMAL-*chrS* se sometió a restricción con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I para obtener el fragmento con el gen *chrS*, se purificó y se ligó en el vector pTrcHis-A digerido con las mismas enzimas. El plásmido recombinante obtenido denominado pTrcHis-*chrS* (**Figura 14A**) se empleó para transformar células competentes de *E. coli* XL10-Gold. La presencia y tamaño del inserto se verificó por digestión con las enzimas de *Bam*HI y *Pst*I, se liberaron bandas de 4.4 kb correspondiente al vector linearizado y de 630 pb correspondiente al gen *chrS*, indicando que la subclonación se llevó a cabo correctamente (**Figura 14B**).

6. SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pTrcHis-*chrS*

Para comprobar la clonación en fase de la secuencia correspondiente al marco de lectura del gen *chrS* y la secuencia codificante de las seis histidinas adicionadas por el plásmido pTrcHis-A, se secuenció la región de interés del plásmido recombinante. Se utilizó el oligonucleótido pTrcHis-Fow que se ubica río arriba del codón de inicio del plásmido pTrcHis-A. Se identificó en la secuencia obtenida el codón de inicio del plásmido recombinante, los codones que codifican las seis histidinas y la región codificante del gen *chrS*. A partir del alineamiento de la secuencia del plásmido recombinante y el gen *chrS*, se corroboró la clonación en fase de la región codificante del gen *chrS* en el plásmido pTrcHis-A (**Figura 15**)

7. SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His-ChrS

Con el propósito de obtener cantidades adecuadas de la proteína His-ChrS para su purificación, se establecieron las condiciones óptimas para su sobreexpresión. Para ello se utilizó la cepa de *E. coli* XL10-Gold con el plásmido pTrcHis-*chrS*, se variaron las concentraciones del inductor (0.5-1.0 mM de IPTG), el tiempo de inducción (1-4 h) y la temperatura de incubación (30-37 °C). Las condiciones en las que se observó la sobreexpresión de His-ChrS fueron a partir de cultivos en fase exponencial

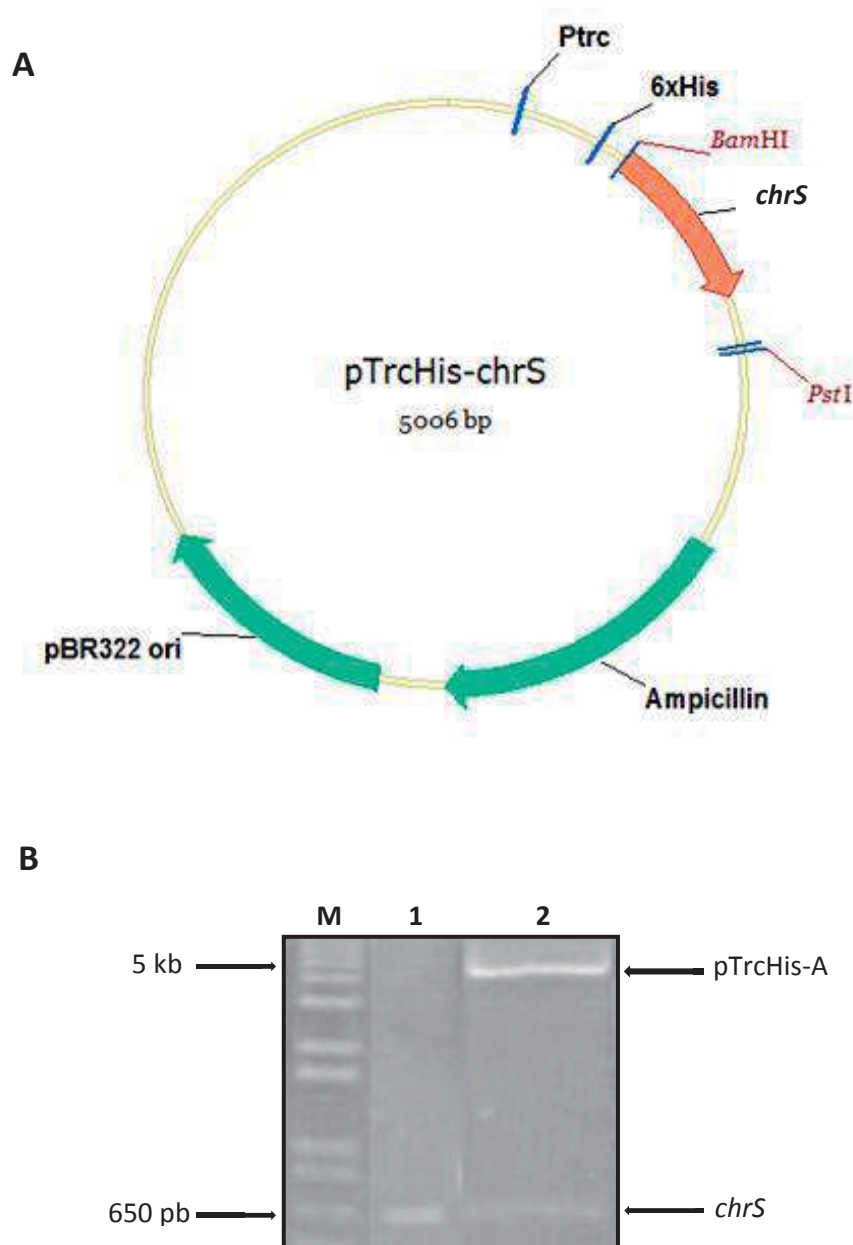


Figura 14. Caracterización del plásmido pTrcHis-chrS. **A)** Esquema del plásmido recombinante pTrcHis-chrS. Se muestra el gen *chrS*, los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Pst*I, el gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin), el origen de replicación para *E. coli* pBR322, el promotor inducible (*Ptrc*) y la etiqueta de histidinas. **B)** Fotografía del gel de agarosa. Carril M, marcador de peso molecular (1 kb); carril 1, gen *chrS* amplificado por PCR; carril 2, plásmido pTrcHis-chrS digerido con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I.

```

      M G G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q
pTrcHis-chrS ATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA 60
chrS

      M G R T L Y D D D D K D R W G S M S H E
pTrcHis-chrS ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCTTCAGTCATGAA 120
chrS                                     TTGAGTCATGAA 12
                                     *****

      Y Q I P N L V L D E T D K Q I L T I L H
pTrcHis-chrS TATCAAATCCCAACCTTGACTTGATGAGACTGATAAACAAATTCTCAGATTTTGCAT 180
chrS TATCAAATCCCAACCTTGACTTGATGAGACTGATAAACAAATTCTCAGATTTTGCAT 72
      *****

      E E G R I S Y T D L G K R V D L S R V A
pTrcHis-chrS GAAGAAGGCAGAATTTCTTATACGATCTTGGCAAAGAGTCGATTGTGACGGGTCGCC 240
chrS GAAGAAGGCAGAATTTCTTATACGATCTTGGCAAAGAGTCGATTGTGACGGGTCGCC 132
      *****

      V Q A R I N Q L I E A G V I E K F T A V
pTrcHis-chrS GTTCAGGCCCGTATCAACCAATTAATTGAAGCCGGTGTATTGAAAAATTACCGGTGTC 300
chrS GTTCAGGCCCGTATCAACCAATTAATTGAAGCCGGTGTATTGAAAAATTACCGGTGTC 192
      *****

      I N P A K I G I H V S V F F N V E V E P
pTrcHis-chrS ATCAATCCCGCTAAAATCGGCATCCATGTTTCCGTGTTTTCAATGTCGAGGTAGAACCG 360
chrS ATCAATCCCGCTAAAATCGGCATCCATGTTTCCGTGTTTTCAATGTCGAGGTAGAACCG 252
      *****

      Q F L E E V A L K L E E P A V T S L Y
pTrcHis-chrS CAATTTTGAAGAGGTCGCTCTTAAGCTTGAGGAAGAGCCTGCGGTACACAGCCTTAT 420
chrS CAATTTTGAAGAGGTCGCTCTTAAGCTTGAGGAAGAGCCTGCGGTACACAGCCTTAT 312
      *****

      H M T G P S K L H M H G I F T N D Q E M
pTrcHis-chrS CACATGACAGGCCCGAGCAAGCTGCATATGCATGGGATCTTTACCAACGATCAAGAAATG 480
chrS CACATGACAGGCCCGAGCAAGCTGCATATGCATGGGATCTTTACCAACGATCAAGAAATG 372
      *****

      E E F L T K R L Y P L R G V V S V D C Q
pTrcHis-chrS GAAGAATTCTTAACAAAACGGCTGTATCCATTGCGAGGCGTCGTCAGTGTGATTGCCAG 540
chrS GAAGAATTCTTAACAAAACGGCTGTATCCATTGCGAGGCGTCGTCAGTGTGATTGCCAG 432
      *****

      M L I K R Y K S R M G M K L
pTrcHis-chrS ATGCTGATCAAACGATACAAAAGCCGTATGGGAATGAAGCTGTAAAGGAGAGAAACAAAT 600
chrS ATGCTGATCAAACGATACAAAAGCCGTATGGGAATGAAGCTGTAA----- 477
      *****

```

Figura 15. Secuencia del plásmido recombinante pTrcHis-chrS. Alineamiento de la secuencia del gen *chrS* del plásmido pTrcHis-chrS y la secuencia del gen *chrS* obtenida de la base de datos del genoma de *B. subtilis* 168. En la parte superior del alineamiento se indica la traducción de la proteína ChrS. Sombreado en negro se muestra la secuencia que codifica para la seis histidinas (6xCAT), en gris oscuro el codón de inicio del gen *chrS* (TTG) y en gris claro el codón de paro del gen *chrS* (TAA). Nucleótidos conservados (*), espacios vacíos (-).

inducidos con 1.0 mM de IPTG a una temperatura de 37°C. Se tomaron muestras cada hora después de adicionar el inductor, se lisaron las células y se analizaron los extractos crudos por SDS-PAGE. En el gel de poliacrilamida se observó una banda de aproximadamente 25 kDa, correspondiente al tamaño predicho para la proteína His-ChrS, cuya intensidad aumentó a medida que aumentó el tiempo de inducción (**Figura 16**).

8. SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA His-ChrS

Con el propósito de obtener cantidad suficiente de la proteína His-ChrS en forma soluble para su posterior purificación, se realizó la separación de las fracciones membranales y las fracciones solubles de las muestras. Bajo las condiciones de inducción descritas anteriormente no se observó la presencia de la proteína His-ChrS en la fracción soluble, por lo que se variaron las condiciones de sobreexpresión. Las condiciones óptimas para la solubilización de la proteína His-ChrS fueron las siguientes: inducción de cultivos en fase exponencial con 0.5 mM de IPTG durante 3 h a 37°C. Posteriormente las mezclas se trataron con lisozima y Triton X-100 como se describe en Materiales y Métodos, se separaron las fracciones solubles y membranales y se analizaron en SDS-PAGE al 15%. En la fracción soluble se observó la presencia de una banda correspondiente al tamaño de la proteína sobreexpresada. Aun cuando no se logró solubilizar por completo la proteína His-ChrS, se obtuvo la cantidad suficiente para realizar la purificación de la proteína His-ChrS (**Figura 17**).

9. INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA His-ChrS

Para confirmar que la proteína sobreexpresada fuera en efecto His-ChrS, se realizó su inmunodetección (Western Blot). Para ello se empleó el reactivo His-Probe que interactúa con la etiqueta de histidinas fusionada a la proteína de interés. Se realizó la técnica como se indica en Materiales y Métodos. La **figura 18A** muestra la fotografía del SDS-PAGE 15% utilizado como

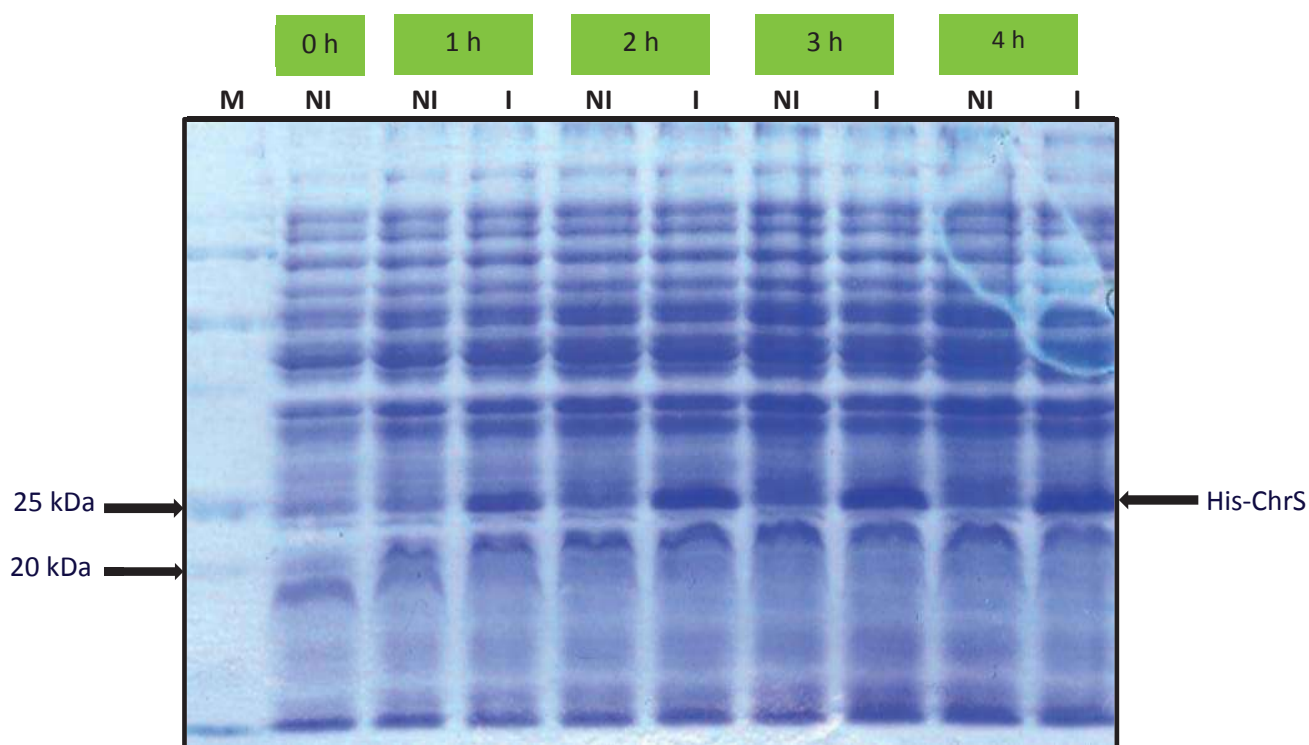


Figura 16. Inducción de la proteína His-ChrS a partir de extractos crudos de la cepa *E. coli* XL10-Gold (pTrcHis-chrS). Electroforesis en SDS-PAGE 15%. Las cepas se crecieron a una densidad óptica de 0.5 a 590 nm, se agregó 1mM de IPTG y finalmente se lisaron en amortiguador de carga. M, marcador de peso molecular; NI, extractos crudos de cepas XL10-Gold (pTrcHis-chrS) no inducidas; I, extractos crudos de las cepas XL10-Gold (pTrcHis-chrS) inducidas. En la parte superior se indican los tiempos a los que se indujeron las muestras. Se muestra el tamaño de las bandas del marcador y la banda correspondiente a la proteína sobreexpresada.

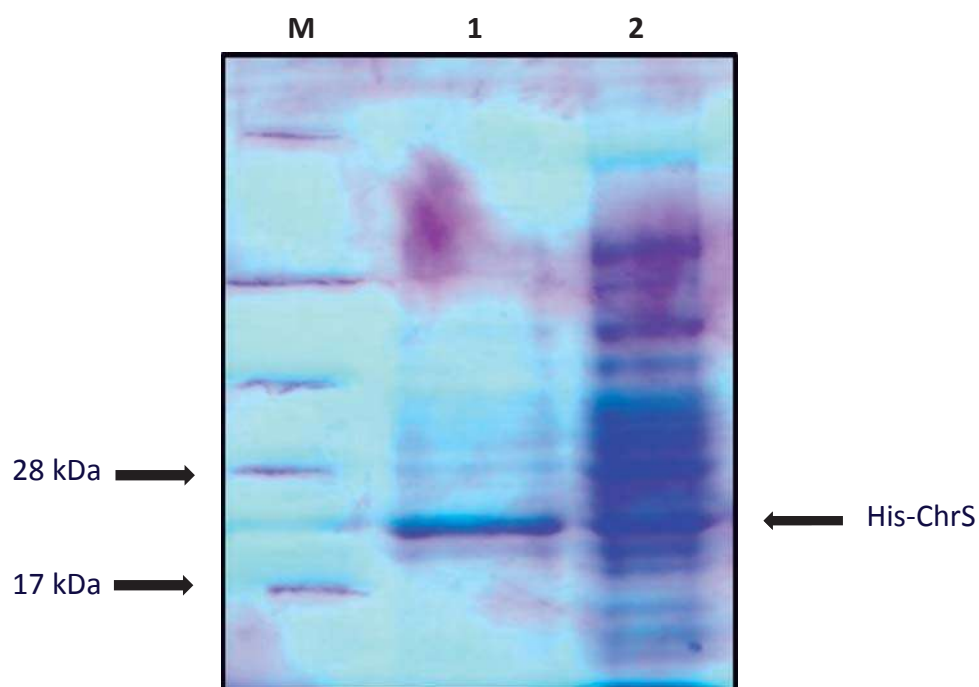


Figura 17. Separación de los extractos solubilizados de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS). Los cultivos inducidos se trataron con Triton X-100, se sonicaron y centrifugaron para separar la fracción soluble y membranal. Las muestras se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE 15%. M, marcador de peso molecular; carril 1, fracción soluble de la cepa inducida; carril 2, fracción membranal de la cepa inducida. Se señala con flechas el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular, así como la banda correspondiente a la proteína sobreexpresada.

control, en el se observa la presencia de una banda correspondiente a la proteína His-ChrS sobreexpresada con peso aproximado de 25 kDa. Después del revelado de las películas de rayos X se buscó la presencia bandas con tamaño que correspondiera con el de la proteína His-ChrS (23 kDa). En la **figura 18B** se observa la aparición de bandas de intensidad diferencial con tamaño cercano a los 25 kDa que indicó la presencia de la proteína His-ChrS. Para determinar que las señales observadas corresponden a la proteína His-ChrS, se analizaron las fracciones soluble y membranal de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-A) inducida la cual no expresa la proteína ChrS; como se muestra en los carriles C(-)FS y C(-)FM de la **Figura 18B** donde, como era de esperarse, no se observó señal alguna. Finalmente se comprobó que la banda observada corresponde a la proteína His-ChrS. En el cultivo XL10-Gold (pTrcHis-chrS) no inducido se observó una banda de intensidad menor (**Figura 18B**, ECNI). De igual forma, se observó señal de mayor intensidad en las fracciones membranal y soluble de la muestra inducida (**Figura 18B**, FMI-FSI), y aunque en la fracción soluble la concentración de His-ChrS es menor, se considera cantidad suficiente para realizar la purificación de His-ChrS.

10. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA His-ChrS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

A partir de un cultivo inducido por 3 h con 0.5 mM de IPTG de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS), se obtuvo la fracción soluble mediante las condiciones descritas anteriormente, y se hizo pasar a través de una columna de cromatografía empaquetada con la resina de Ni-NTA, en la cual se llevó a cabo la interacción con la región de polihistidinas de la proteína His-ChrS. Posteriormente se realizaron lavados con cantidades crecientes de imidazol para la eliminación de proteínas con interacciones inespecíficas. Finalmente la columna se eluyó con una concentración elevada de imidazol para asegurar la elución total de la proteína de la resina y las fracciones obtenidas se analizaron en SDS-PAGE. En las fracciones colectadas se obtuvo una elevada concentración de la proteína His-ChrS, así como un alto grado de pureza de His-ChrS (**Figura 19**). Para evitar posibles

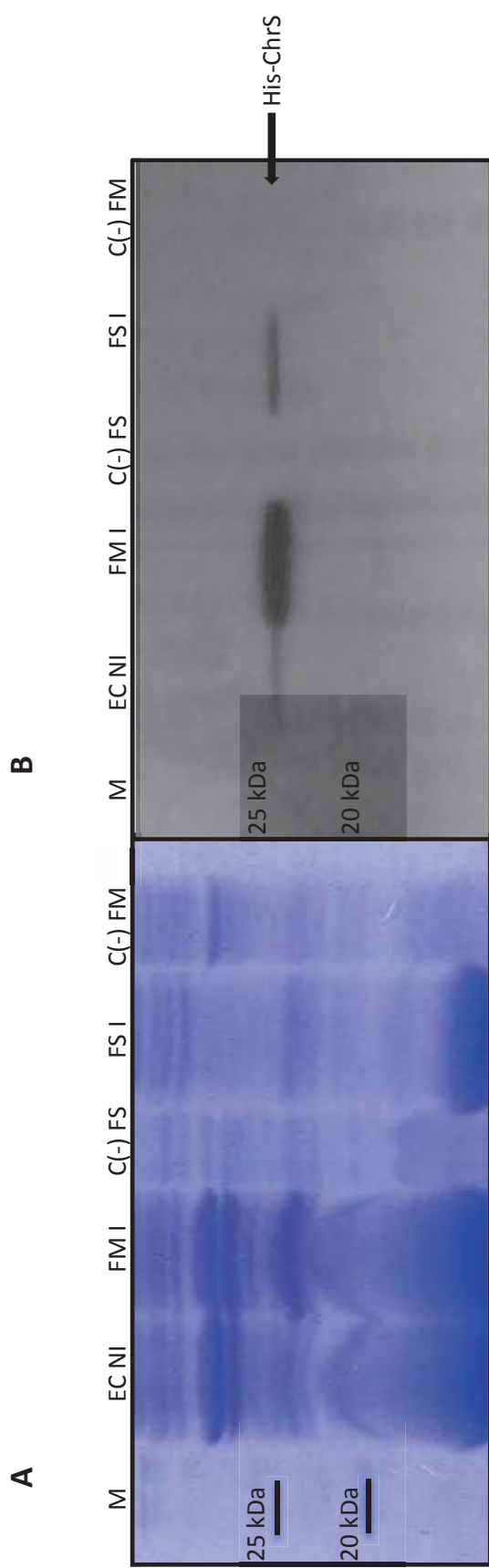


Figura 18. Western Blot de extractos celulares de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS). Identificación de la etiqueta de Histidinas en muestras no inducidas e inducidas con 0.5 mM de IPTG. **A)** SDS-PAGE 15%. **B)** Autorradiografía. EC NI, extractos celulares de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS) no inducida; FM I, Fracción membranal de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS) inducida; C(-) FS, fracción soluble de la cepa XL10-Gold (pTrcHis A); FS I, fracción soluble de la cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS) inducida; C(-) FM, fracción membranal de la cepa XL10-Gold (pTrchis-A). Se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular en SDS-PAGE así como el peso molecular estimado en la película de rayos X.



Figura 19. Purificación de la proteína His-ChrS por cromatografía de afinidad. La cepa XL10-Gold (pTrcHis-chrS) se creció a una densidad óptica de 0.5 a 590 nm, se indujo 3 h con 0.5 mM de IPTG. Las muestras se trataron con Triton X-100 (1%), se sonicaron y centrifugaron. El extracto obtenido se empleó para la purificación de His-ChrS. La imagen muestra una electroforesis en SDS-PAGE 15% con las fracciones recuperadas durante la purificación. M, marcador de peso molecular; FM, fracción membranal del cultivo inducido; L, fracción del primer lavado; E1-E5, fracciones eluidas. Las flechas indican el tamaño del marcador y las bandas correspondientes a His-ChrS.

efectos no deseados por la presencia de concentraciones elevadas de imidazol, las fracciones obtenidas con His-ChrS se dializaron en un amortiguador que aseguró la estabilidad de la proteína.

11. ENSAYOS DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) DE LAS REGIONES REGULADORAS DE LOS GENES *chr* Y *ChrS*

Para probar la unión de la proteína His-ChrS en las regiones reguladoras de los genes *chrS* y *chr3N* la proteína purificada fue usada en ensayos de cambios en el corrimiento electroforético (EMSA). La probable región reguladora de cada gen se amplificó por PCR desde aproximadamente 300 pb antes del codón de inicio hasta aproximadamente 100 pb después del codón de inicio utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 2**) bajo las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos (**Tabla 3**). Como es esquematiza en la **Figura 20A**, se obtuvieron fragmentos de 420 pb y de *PchrS* de 330 pb de *pchr3N*, los cuales posteriormente fueron purificados (**Figura 20B**).

Para determinar la interacción entre los fragmentos de DNA y la proteína purificada, se incubaron diferentes mezclas con una concentración estándar de DNA (100 ng) y concentraciones crecientes de proteína purificada (0.5- 2.5 µg) en el amortiguador de unión. Posteriormente las mezclas se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturalizantes.

A) Interacción de la proteína ChrS y la region reguladora del gen *chr3N*

Inicialmente se realizaron ensayos de interacción entre la proteína His-ChrS y la región reguladora del gen *chr3N* (*Pchr3N*). Aun cuando se modificaron diversos constituyentes del amortiguador de unión, así como las temperaturas de unión y los tiempos de incubación, en ninguno de los casos se observó una interacción entre ChrS y *Pchr3N* (**Figura 21**).

B) Interacción de la proteína ChrS y la region reguladora del gen *chrS*

Se realizaron ensayos de interacción entre la proteína ChrS purificada y la región reguladora del gen *chrS* (*PchrS*). Se modificaron diversos constituyentes del amortiguador de unión, así como las temperaturas y tiempos de incubación, y finalmente se obtuvieron los resultados esperados bajos

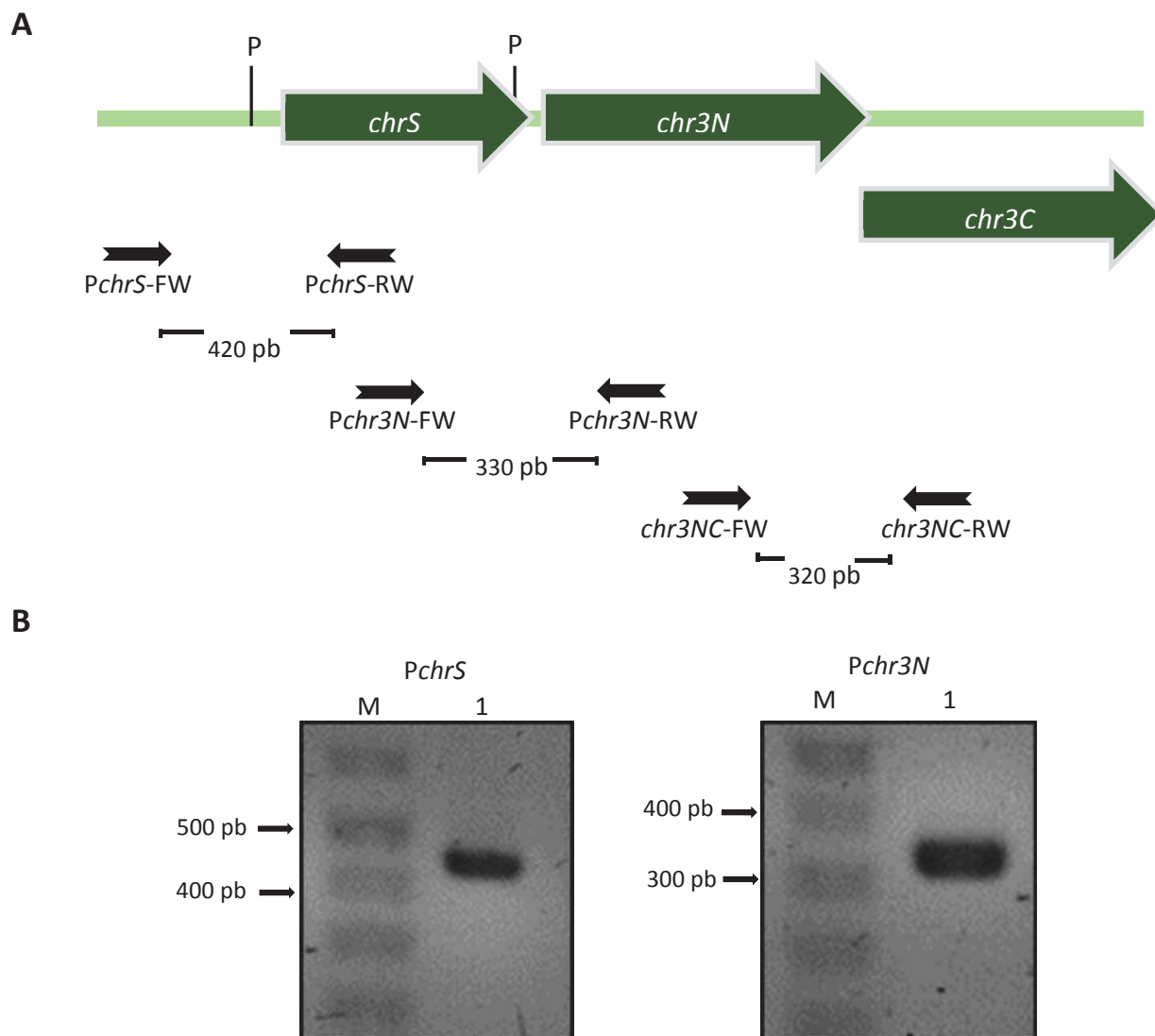


Figura 20. Amplificación de las regiones reguladoras de los genes *chr* de *B. subtilis* 168. **A)** Se indican con flechas grandes los genes y la dirección de la transcripción; con flechas de color negro se señala la posición y dirección de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR, así como el tamaño del fragmento predicho para la amplificación. Se indican los promotores (P). **B)** Fotografías de los geles de agarosa que muestra los productos amplificados por PCR. Se indica en el carril 1 el producto de PCR (*PchrS* y *Pchr3N*); el carril M representa el marcador de peso molecular de 1Kb.

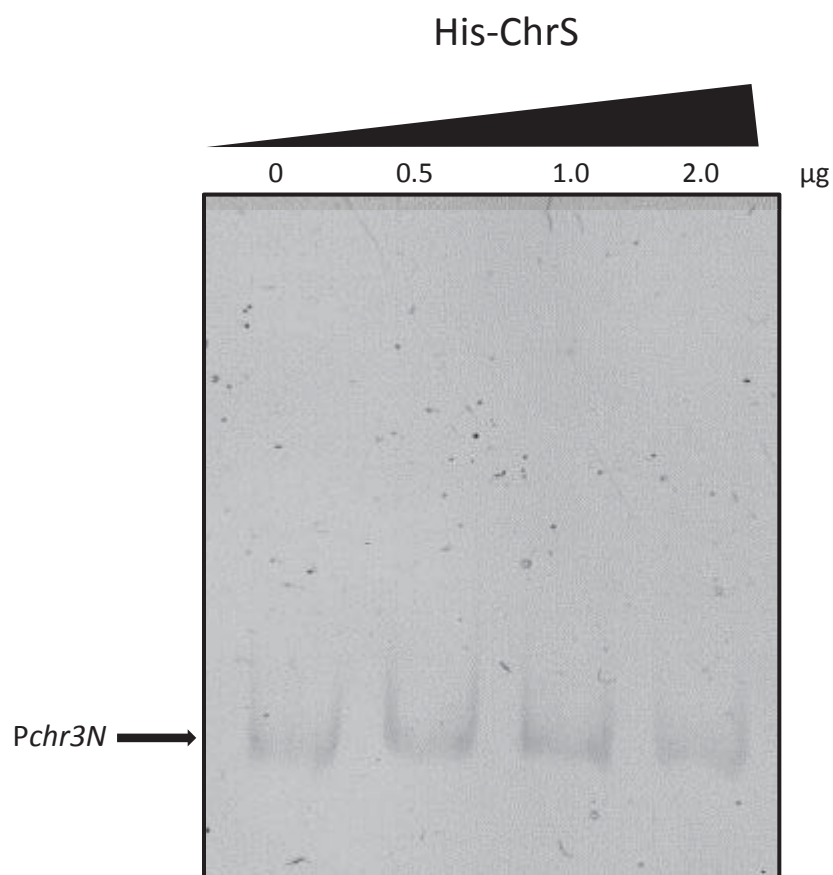


Figura 21. Ensayo de interacción de la proteína His-ChrS y la región reguladora del gen *chr3N*. Las mezclas de His-ChrS y DNA (*Pchr3N*), se incubaron en amortiguador de unión por 30 min a 25°C y posteriormente se analizaron en PAGE. En la parte superior se indican las concentraciones crecientes de His-ChrS purificada adicionada a 100 ng de DNA de la región reguladora de *Pchr3N*. La imagen muestra la fotografía de un gel de acrilamida al 6%. La flecha indica la banda correspondiente al fragmento de DNA *Pchr3N*.

las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos. Como se esquematiza en la **Figura 22**, hubo una clara disminución de intensidad de la banda correspondiente al DNA (*PchrS*) y se observó la aparición simultánea de una banda de mayor tamaño correspondiente al complejo ChrS-*PchrS* cuya intensidad aumenta a medida que se incrementó la concentración de His-ChrS. De esta manera se determinó la unión de la proteína ChrS a la región reguladora del gen *chrS*.

Para descartar una unión inespecífica de ChrS con la región reguladora del gen *chrS* (*PchrS*), se amplificó por PCR un fragmento de DNA de 320 pb que comprende la región intergénica del gen *chr3N* y del gen *chr3C* (*chr3NC*) (**Figura 20A**). El ensayo EMSA se realizó bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, empleando una concentración mayor del fragmento *chr3NC* (150 ng), mientras la concentración estándar de *PchrS* (100 ng) y se analizó en PAGE 6%. Como se esquematiza en la **figura 23**, en la parte superior del gel se observa la aparición de una banda cuya intensidad aumenta a medida que la concentración de His-ChrS adicionada fué mayor. En la parte inferior del gel se observan las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA adicionados, en la parte más baja la banda del fragmento correspondiente a la región intergénica *chr3NC* (320 pb) que muestra una intensidad igual en todos los carriles. Como era de esperarse, la banda correspondiente a *PchrS* (420 pb) presentó una clara disminución de intensidad a medida que se incrementó la concentración de His-ChrS, la cual fue acompañado con la aparición de la banda de mayor tamaño que corresponde al complejo ChrS-*PchrS*. Estos resultados demuestran la especificidad de unión de la proteína ChrS a la región reguladora del gen *chrS* (*PchrS*).

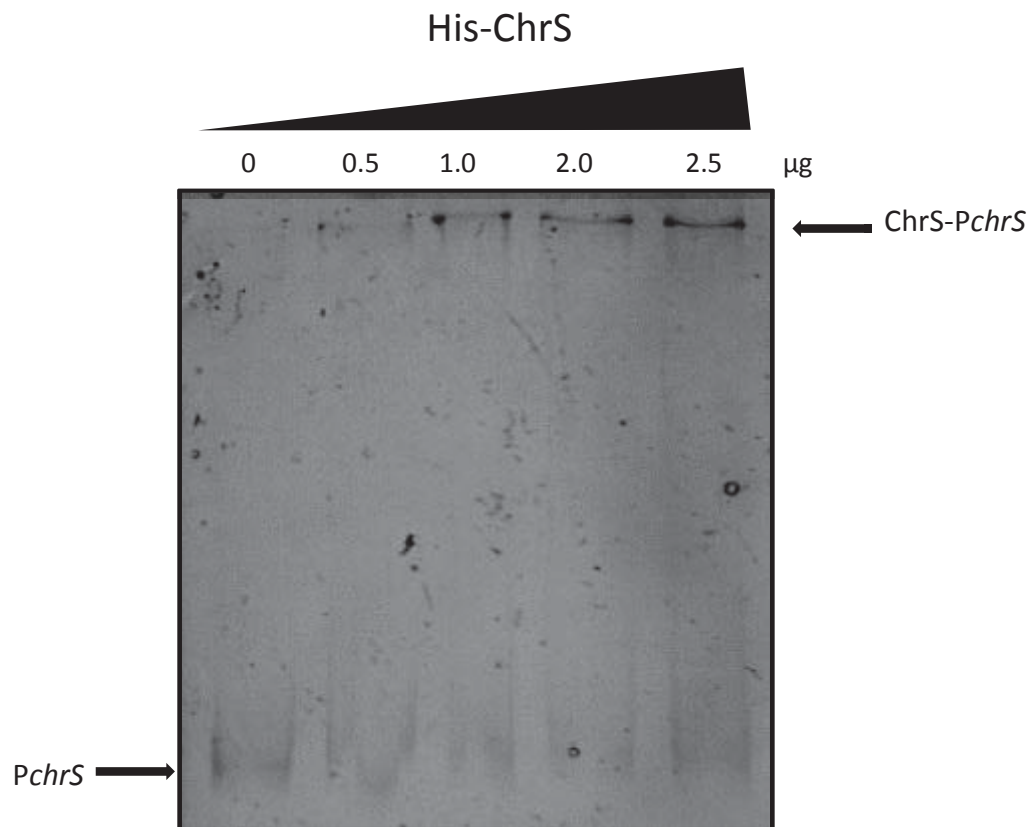


Figura 22. Ensayo de interacción de la proteína His-ChrS y la región reguladora del gen *chrS*. Se incubaron mezclas de His-ChrS y DNA (*PchrS*) en buffer de unión por 30 min a 25°C y posteriormente se analizaron en PAGE. En la parte superior, se indican las concentraciones crecientes de His-ChrS purificada adicionada al de DNA de la región reguladora de *PchrS*. La imagen muestra la fotografía de un gel de acrilamida al 6%. Las flechas indican la banda correspondiente al fragmento de DNA *PchrS* y el correspondiente al complejo ChrS-*PchrS*.

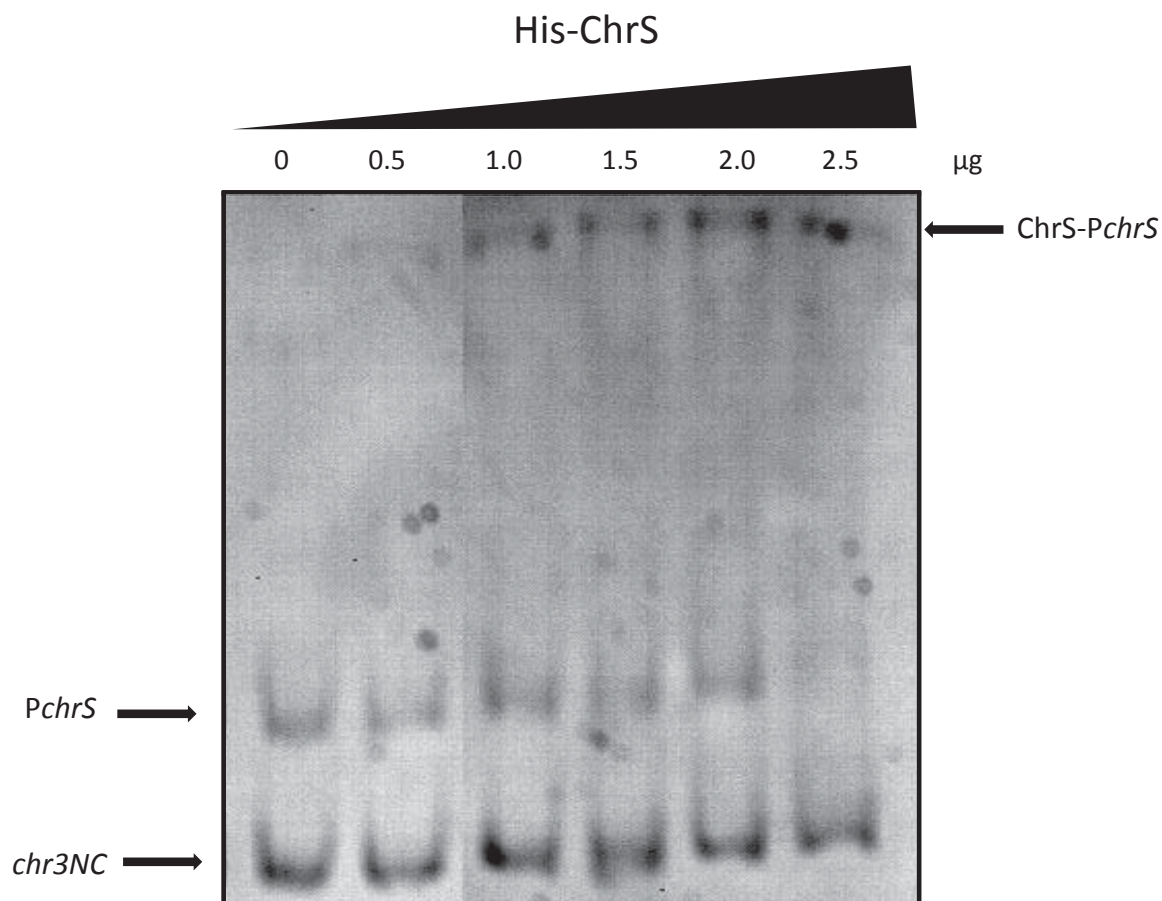


Figura 23. Unión específica de la proteína His-ChrS con la región reguladora del gen *chrS*. Se incubaron mezclas de His-ChrS y DNA (*chr3NC* y *PchrS*) en buffer de unión por 30 min a 25°C y posteriormente se analizaron en PAGE. En la parte superior, se indican las concentraciones crecientes de ChrS purificada adicionada al de DNA de la región reguladora de *PchrS* (100 µg) y al fragmento *chr3NC* (150 µg). La imagen muestra la fotografía de un gel de acrilamida al 6%. Las flechas indican las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA *PchrS*, *chr3NC*, y la correspondiente al complejo ChrS-*PchrS*.

IX. DISCUSIÓN

La superfamilia CHR de transportadores de cromato está compuesta por la familia de proteínas grandes LCHR y la familia SCHR de proteínas pequeñas. En el genoma de *B. subtilis* 168 se localizó un par de genes que codifican las proteínas Chr3N y Chr3C pertenecientes a la familia SCHR. El par de proteínas SCHR confieren resistencia a cromato en *E. coli* únicamente cuando ambas se expresan por lo que se propuso que ambas proteínas forman un heterodímero en la membrana para formar el canal de expulsión de cromato (Díaz-Magaña et al., 2009). Este fue el primer reporte acerca de la funcionalidad de proteínas de la familia SCHR. Se observó además que la transcripción del par de genes *chr3N* y *chr3C* ocurre vía un RNAm bicistrónico generado a partir de un promotor río arriba del gen *chr3N*, sugiriendo que estos genes forman parte de un operón (Díaz-Magaña et al., 2009).

Las bacterias *C. metallidurans* (Juhnke et al., 2002), *O. tritici* (Branco et al., 2008) y *Arthrobacter* sp. FB24 (Henne et al., 2009) presentan diversos genes aledaños al gen *chrA* involucrados en la resistencia a cromato, actuando ya sea disminuyendo los daños ocasionados por especies reactivas de oxígeno, como reguladores transcripcionales o como genes accesorios que en conjunto aumentan la expresión de los genes *chr*. Se ha propuesto que estos grupos de genes también funcionan como operones;

Río arriba del gen *chr3N* se encuentra el gen *chrS* que codifica una proteína que presenta homología con proteínas de la familia de reguladores transcripcionales Lrp. Se propuso que el gen *chrS* forma parte de un operón en conjunto con los genes *chr3N* y *chr3C* y que codifica un posible regulador de la expresión de estos genes (Jacobo-Arreola, 2010).

Las proteínas Lrp se encuentran ampliamente distribuidas en procariotas. El miembro mejor estudiado de la familia es la proteína Lrp de *E. coli* (Thaw et al., 2006), que se encuentra

involucrada en la modulación de una gran variedad de funciones metabólicas así como en la síntesis de pili (Brinkman et al., 2003). Se ha descrito ampliamente a Lrp de *E. coli* como un regulador transcripcional global, sin embargo, la mayoría de las proteínas Lrp en otras especies actúan como reguladores específicos (Brinkman et al., 2002).

Las proteínas Lrp son moléculas de unión al DNA y cuentan con tres dominios funcionales: una región del N-terminal que contiene el sitio de unión al DNA, un dominio intermedio que responde a la activación de la transcripción y una región en el C-terminal que interactúa con el efector leucina (Ettema et al., 2002). Una característica particular de las proteínas Lrp es la diversidad de patrones de regulación que presenta, ya que puede activar o reprimir la expresión genética y aunque en la mayoría de los casos es dependiente de leucina, hay varios reportes en donde su actividad es independiente de ésta (Calvo y Matthews, 1994).

En *B. subtilis* 168 se encuentran siete parálogos Lrp, uno de ellos (AzlB) actúa como regulador de la expresión de proteínas involucradas en el transporte de aminoácidos de cadena ramificada (Belitsky et al., 1997). Aunque no se sabe mucho acerca de la función del resto de estas proteínas, su redundancia sugiere que actúan cooperativamente bajo diferentes situaciones que permiten a *B. subtilis* habitar en una gran diversidad de condiciones ambientales (López-Torrejón et al., 2006).

El análisis de la secuencia del gen *chrS* fue el primer dato sobre la posible funcionalidad de la proteína ChrS. Se identificaron las cajas consenso -35 y -10, una región de unión al ribosoma (RBS) AGCAGG río arriba del codón de inicio (TTG) y se identificó además el codón de paro (TAA). La presencia de estas señales sugiere que el gen *chrS* se puede expresar en *B. subtilis* (Jacobo-Arreola, 2010). Río abajo del gen *chrS* no se identificó un terminador transcripcional; sin embargo, la presencia de un terminador en el extremo 3' del gen *chr3C* (Díaz-Magaña et al., 2009) sugiere que *chrS* en conjunto con *chr3N* y *chr3C* pueden constituir un operón. De esta forma, el

terminador de *chr3C* puede tener la función de terminar la transcripción del operón *chrS-chr3N-chr3C* (Jacobo-Arreola, 2010).

Inicialmente se analizó el papel de la proteína ChrS clonando el gen *chrS* junto con los genes de resistencia a cromato *chr3N-chr3C* (*chrS-chr3NC*), e interesantemente se observó una clara disminución en el nivel de resistencia a cromato, respecto a la conferida únicamente por el par de genes *chr3NC* (Jacobo-Arreola, 2010). Se sugirió en un inicio que la presencia de la proteína ChrS reprime la expresión de los genes *chr3N-chr3C* y para confirmarlo se realizaron ensayos de RT-PCR. La presencia del gen *chrS* ocasionó la disminución en la expresión de los genes *chr3N-chr3C*, lo cual confirmó que efectivamente el gen *chrS* regula la expresión de los genes *chr* de forma negativa (Jacobo-Arreola, 2010). Interesantemente, se determinó que a medida que aumenta la concentración de cromato la expresión de los genes *chr* de la cepa con los genes *chrS-chr3NC* aumentó hasta alcanzar un nivel similar a la cepa que carece del gen *chrS*. Estos resultados iniciales sugieron que el cromato actúa como un inductor, permitiendo que los genes *chr* se expresen y que probablemente las proteínas generadas cumplan su función en la resistencia a cromato aún en presencia del represor *chrS* (Jacobo-Arreola, 2010). Se demostró que el producto proteico del gen *chrS* de *B. subtilis* 168, predicho como un regulador transcripcional de la familia Lrp, regula de manera negativa la expresión de los genes *chr3N* y *chr3C* (Jacobo-Arreola, 2010). Para dilucidar el mecanismo de regulación de la proteína ChrS sobre los genes de resistencia a cromato, el objetivo de este trabajo fue determinar si el producto proteico del gen *chrS* se une a las regiones promotoras de los genes *chrS* y *chr3N* de *B. subtilis*.

Debido a que algunas proteínas de la familia Lrp se han cristalizado y se ha determinado su estructura, el primer paso en este trabajo fue el análisis de la secuencia de la proteína ChrS para determinar su posible estructura así como para identificar probables motivos conservados. En su probable estructura terciaria se identificó la formación de un motivo de unión al DNA del tipo HTH

(Figura 10), el cual consta de dos hélices alfa con la misma orientación que se encuentran conectadas con una pequeña secuencia de aminoácidos que forma un giro (Acosta-Viana y Zavala-Castro, 1996); este dominio es indispensable para que lleve a cabo la interacción con el DNA. De igual forma, se identificó la formación del dominio carboxilo terminal de conformación $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (Figura 10). En las proteínas Lrp el dominio $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ se encuentra fusionado al dominio HTH y está implicado en la modulación alostérica de la proteína, ya que es requerido para responder a leucina (Ettema et al., 2002). El hecho de identificar dominios típicos de un regulador Lrp en la proteína ChrS apoya en gran medida la sugerencia del posible papel de ChrS como regulador la expresión de los genes *chr3NC* mediante su unión a regiones específicas de ellos.

Las proteínas Lrp reconocen sitios específicos de unión al DNA; durante un análisis bioinformático realizado por Shultzaberger y Schneider (1999) se determinaron secuencias consenso de unión de las proteínas Lrp con base en las secuencias de las regiones de DNA identificadas mediante ensayos de huella dactilar (Footprinting). Se identificó una región de 30 nucleótidos que presenta una secuencia central (TTTAT) que se conserva al 100 % en las secuencias analizadas; el resto de los nucleótidos presentan una conservación del 40 al 70 % (Figura 11A). Por esta razón se buscó en las regiones reguladoras de los genes *chrS-chr3N-chr3C* esta secuencia consenso. En el análisis de las regiones reguladoras solamente se identificó una región como un posible sitio de unión de ChrS (tatacgtaactTTTATgataaaatgattgc), la cual interesantemente se localizó en la región reguladora del gen *chrS* (Figura 11), lo que sugiere que posiblemente ChrS se autorregula. La presencia del sitio de unión al DNA cerca de la región promotora del gen *chrS* sugiere el posible control sobre la expresión de los genes aledaños *chr3NC*, así como la posible organización de los tres genes *chr* como un operón.

Para determinar si ChrS es un regulador transcripcional que controla la expresión de los genes *chr3NC*, el primer paso fue la obtención de la proteína ChrS en forma pura para posteriormente

analizar si se une a alguna región reguladora de los genes *chrS* y *chr3NC*. Inicialmente se realizó la amplificación de la región codificante del gen *chrS* mediante PCR, y posteriormente se clonó en el vector pMAL-c2X; se utilizó este vector para recuperar el fragmento de DNA por sus sitios de restricción. Después se subclonó el gen *chrS* en el vector pTrcHis-A y se obtuvo el plásmido recombinante pTrcHis-chrS (**Figura 14**). Los resultados obtenidos en la secuenciación del plásmido recombinante indicaron la correcta fusión de la región codificante del gen *chrS* en el vector de expresión pTrcHis-A (**Figura 15**). Fue de gran importancia en este trabajo la obtención de la correcta fusión del gen *chrS* en el vector pTrcHis-A, ya que a partir de este plásmido se pretendía obtener una cantidad elevada de la proteína de interés, debido a que este vector contiene el promotor inducible pTrc, que permite una eficiente sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Egon et al., 1983). Adicionalmente, el vector pTrcHis-A cuenta con una región de DNA que codifica para seis histidinas que se ubica río arriba del fragmento de DNA insertado, lo que permite la obtención de proteínas con una etiqueta de histidinas fusionadas en el extremo amino. En la proteína recombinante, los seis residuos de histidina funcionan como un pequeño dominio de unión al níquel, lo que permite una fácil purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad en un solo paso.

Un paso importante fue la sobreexpresión de la proteína His-ChrS, ya que se debe encontrar la cepa huésped y las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo una adecuada expresión. La sobreproducción de proteínas puede tener como consecuencia una conformación defectuosa de éstas y por consiguiente la tendencia a ser degradadas, además de que puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión, lo que dificulta su purificación. A partir de cultivos crecidos hasta una densidad óptica de 0.5 a 590 nm, posterior adición de IPTG e incubación de 1-4 h, se logró la sobreexpresión de una proteína del tamaño esperado (**Figura 16**). La proteína ChrS tiene un peso de 18 kDa, sin embargo, el vector pTrcHis-A adiciona una región de 36 aminoácidos en el extremo

amino de la proteína recombinante (incluye la región polihistidinas), para dar un peso final de la proteína His-ChrS de 23 kDa (**Figura 16**). Por lo que se corroboró que la banda sobreexpresada corresponde a la proteína recombinante His-ChrS.

Para asegurar la presencia de la proteína His-ChrS se utilizó un método de alta sensibilidad para la detección de proteínas fusionadas a una etiqueta de histidinas (Western Blot), mediante el reactivo His-Probe. Este reactivo es la enzima peroxidasa de rábano (HRP) acoplada a níquel, el cual se une de manera específica a la región polihistidinas y mediante una reacción quimioluminiscente por la HRP se detecta la proteína recombinante en cantidades muy pequeñas (nanogramos o picogramos). De esta manera se logró identificar una banda diferencial en las distintas fracciones celulares analizadas (**figura 18**), lo que confirmó la presencia de la proteína His-ChrS.

La etiqueta de histidinas fusionada permite además la purificación de la proteína recombinante mediante la técnica de cromatografía de afinidad usando metales inmovilizados. Los métodos convencionales de purificación de proteínas generalmente son lentos, comprenden varias etapas y los rendimientos obtenidos son escasos o nulos. Se basan en diferencias de tamaño, carga eléctrica u otras propiedades físico-químicas, que a menudo no son suficientemente significativas para lograr la separación (Cases y Hens, 1994). En este caso, el empleo de una propiedad específica de interacción reversible para la separación, ha permitido el desarrollo y el amplio uso de la cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad se basa en la presencia de una fase estacionaria donde los ligandos de afinidad están enlazados químicamente en soportes sólidos adecuados que tendrán la función de retener a los analitos de manera reversible y selectiva (Cases y Hens, 1994). El níquel unido a un soporte inmóvil mediante enlaces coordinados se utilizó como ligando de afinidad. El níquel tiene la capacidad de interactuar formando quelatos con el grupo imidazol de las histidinas; la región polihistidina se unirá específicamente con este metal. Por

último, las proteínas son eluidas utilizando una solución con una concentración elevada de imidazol, para recuperar la proteína de forma pura.

Para lograr la purificación de la proteína His-ChrS de forma exitosa, se establecieron los amortiguadores y pH adecuados, así como los tiempos y temperaturas al dializar la proteína recombinante, con el fin de evitar una posible desnaturalización o inactivación de la proteína, ya que para los posteriores análisis es necesaria la proteína purificada en su forma funcional. De esta manera se logró la purificación de His-ChrS, la **figura 19** muestra que la purificación se llevó a cabo correctamente; se obtuvo His-ChrS en concentración elevada (0.5 µg/µl), así como un alto grado de pureza.

Para determinar si la proteína ChrS se une a las regiones reguladoras de los genes *chrS* y *chr3N*, se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), un método ampliamente utilizado para determinar interacciones DNA-Proteína o RNA-Proteína. Este método puede determinar si una proteína es capaz de unirse a una secuencia determinada de DNA o RNA y en algunas ocasiones puede indicar si más de una molécula proteica está involucrada en el complejo formado (Garner y Revzin, 1981). Un fragmento de DNA tiene un desplazamiento electroforético determinado por su tamaño y carga, sin embargo, cuando se forma el complejo DNA-Proteína, estas propiedades cambian, ocasionando que haya un retardo en el corrimiento electroforético (Garner y Revzin, 1981). Aunque los ensayos EMSA son ampliamente utilizados para analizar la interacción DNA-Proteína de los reguladores transcripcionales en general, en el caso particular de las proteínas Lrp (AzlB, Lrs14, y Lrp) los ensayos EMSA han sido reportados un como método confirmativo de su funcionalidad como reguladores transcripcionales (Belitzky et al., 1997; Napoli et al., 1999; McFarland y Dorman, 2008).

Para realizar los ensayos EMSA, se eligió inicialmente la región reguladora del gen *chr3N* (**Figura 20**) debido a que la presencia de la proteína ChrS provoca una disminución drástica en el nivel de

resistencia a cromato conferida por los genes *chr3NC*, así como el nivel de expresión de los mismos genes (Jacobo-Arreola, 2010). Además, aun cuando diversos datos sugieren fuertemente que los genes *chrS-chr3N-chr3C* forman un operón, se identificó un promotor funcional río arriba del gen *chr3N* (Díaz-Magaña et al., 2009). Posiblemente el gen regulador se uniría río arriba de la región operadora (*Pchr3N*) para de esta forma llevar a cabo el control de la expresión de los genes *chr3NC* mediante el bloqueo de la región reguladora de los genes de resistencia a cromato. De igual forma se eligió la región reguladora del gen *chrS* (*PchrS*) (**Figura 20**) debido al antecedente de que las proteínas Lrp tienen la capacidad de autorregularse de manera independiente de la leucina (Ernsting et al., 1992; Tani et al., 2002).

Inicialmente se realizaron EMSA's entre His-ChrS y *Pchr3N*, sin embargo, aun variando diversos componentes del buffer de unión, la concentración de los mismos y la temperatura de incubación, no se logró observar interacción alguna entre ChrS y la región reguladora del gen *chr3N* (**Figura 21**).

Posteriormente se realizaron ensayos EMSA entre His-ChrS y *PchrS*. Los resultados obtenidos mostraron un cambio en la migración de la banda correspondiente a *PchrS*, a medida que se aumenta la concentración de His-ChrS disminuye la intensidad de esta banda e interesantemente, aparece una banda adicional en la parte superior del gel, posiblemente por la formación del complejo DNA-Proteína entre ChrS y la región reguladora del gen que la codifica (ChrS-*PchrS*) (**Figura 22**), como era de esperarse según los antecedentes ya mencionados.

En *B. subtilis* se ha reportado un caso similar de autorregulación; el gen que codifica la proteína AzlB, perteneciente a la familia Lrp, se encuentra formando parte del operón *azlBCDEF*, que codifica proteínas involucradas en el transporte de aminoácidos de cadena ramificada. AzlB regula de manera negativa la expresión de este operón uniéndose a la región promotora del gen *azlB* (Belitsky et al., 1997).

En la interacción ChrS-*PchrS* el drástico retardo observado se debe posiblemente a la formación de un estado multimérico de la proteína ChrS, teniendo como resultado la formación de un complejo multiproteico unido a la región reguladora del gen *chrS* y no solo una interacción con una proteína monomérica. Se sabe que los diferentes homólogos de la familia de reguladores Lrp presentan un estado multimérico que incluye dímeros, tetrámeros, octámeros y hexadecámeros (Brinkman et al., 2003). Esto lo apoya fuertemente el hecho de que la proteína LrpA de *P. furiosus* tiene un mecanismo de control similar a ChrS, ya que se autorregula, e interesadamente se ha encontrado que esta proteína tiene la capacidad de formar octámeros (Brinkman et al., 2000).

Adicionalmente, se descartó la posibilidad de que la interacción ChrS-*PchrS* fuera inespecífica, es decir, que ChrS pudiera unirse con cualquier otra región de DNA. Esto se observó inicialmente al no llevarse a cabo la unión entre la proteína ChrS y la región reguladora *Pchr3N*. Posteriormente se confirmó la especificidad de ChrS por la región reguladora *PchrS* en ensayos EMSA. Para esto, se realizaron mezclas de fragmentos de DNA de *PchrS* y del fragmento inespecífico *chr3NC* con His-ChrS. Los resultados mostraron nuevamente la aparición de una banda cuya intensidad aumenta a medida que la concentración de His-ChrS fué mayor (**Figura 23**); sin embargo, se observó además que las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA del fragmento *chr3NC* no presentaron cambio alguno, es decir, la cantidad de His-ChrS adicionada no muestra efecto sobre la región *chr3NC* (**Figura 23**); interesadamente la banda correspondiente a *PchrS* disminuyó de intensidad a medida que se incrementó la concentración de His-ChrS, lo cual fue acompañado con la aparición de la banda de mayor tamaño correspondiente al complejo ChrS-*PchrS* (**Figura 23**).

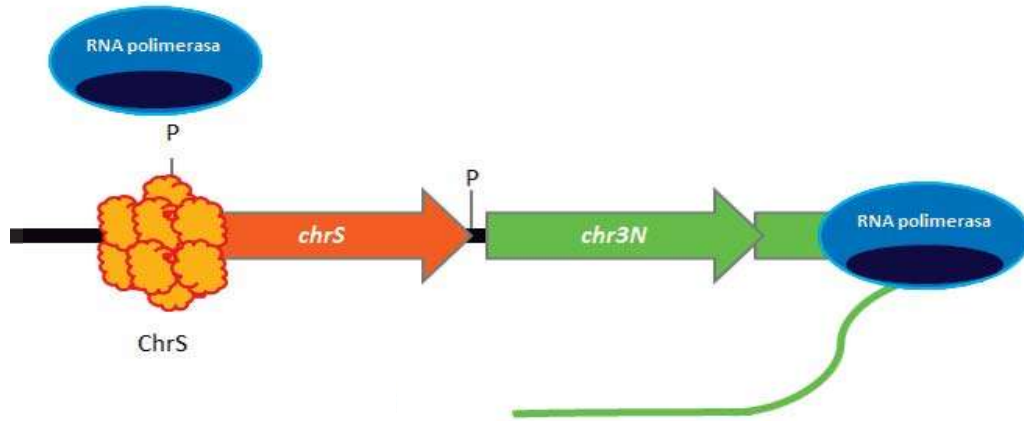
Con estos resultados se confirmó la función de ChrS como regulador de la expresión genética de los genes de resistencia a cromato *chr3N-chr3C* mediante la unión de la proteína ChrS a la región reguladora del gen *chrS*.

En este trabajo se demuestra por primera ocasión la presencia de un regulador transcripcional de proteínas transportadoras de cromato de la familia SCHR. En las especies bacterianas *C. metallidurans* (Juhnke et al., 2002), *O. tritici* 5bvl1 (Branco et al., 2008) y *Arthrobacter* sp. FB24 (Henne et al., 2009) se ha propuesto a la proteína ChrB como regulador de la expresión del gen *chrA*, que codifica el transportador de cromato ChrA, sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado que ChrB interactúe directamente con alguna región reguladora de los genes que posiblemente controla (Vasconcelos et al., 2011).

En el análisis de la secuencia del gen *chrS* no se localizó un posible terminador transcripcional, sin embargo, en un trabajo previo se determinó la presencia de un terminador transcripcional en el extremo 3' del gen *chr3C*, lo que sugiere que el gen *chrS* en conjunto con los genes *chr3N* y *chr3C* se transcriben como un mRNA policistrónico (Díaz-Magaña et al., 2009).

Por lo tanto, en el modelo del mecanismo de regulación propuesto en este trabajo (**Figura 24A**), se sugiere que el control de la expresión de este operón se lleva a cabo mediante la unión de ChrS como octamero a la región reguladora del gen *chrS*. Es importante mencionar dos aspectos importantes a partir de los resultados antes mencionados: en primer lugar, los genes de resistencia a cromato se expresan a partir de un promotor ubicado en el gen *chr3N* cuando no se encuentra presente el gen *chrS* (Díaz-Magaña et al., 2009); en segundo lugar, se ha observado que la presencia del gen *chrS* provoca una disminución drástica del nivel de expresión de los genes de resistencia a cromato aunque no hay una inhibición total de ésta (Jacobo-Arreola, 2010), lo cual indica la funcionalidad del promotor de *chr3N* así como su expresión constitutiva (**Figura 24A**). El hecho de que el cromato revierta los efectos de la proteína ChrS sugiere fuertemente que se deba a una interacción entre el oxianión y ChrS. Como mecanismo de defensa ante la especie tóxica

A



B

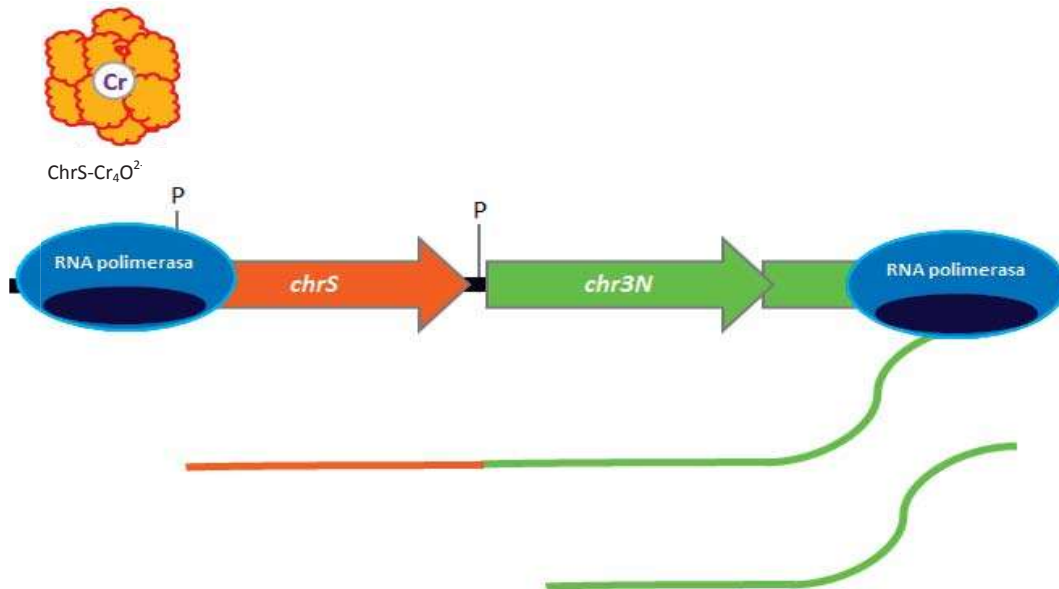


Figura 24. Modelo hipotético del mecanismo de regulación del operón *chrS-chr3N-chr3C* de *B. subtilis* 168. Las flechas grandes muestran el operón *chrS-chr3N-chr3C* y se indica la localización de los promotores (P), la RNA polimerasa y la proteína ChrS. **A)** Regulación por la proteína ChrS en ausencia de cromato. Se propone que ChrS como octámero disminuye la expresión de los genes *chr3N-chr3C* uniéndose a la región reguladora del gen *chrS*. Se indica la expresión constitutiva de los genes *chr3N-chr3C* a partir del promotor del gen *chr3N*. **B)** Efecto del cromato sobre la proteína ChrS. El cromato promueve un cambio conformacional del complejo ChrS, de esta forma separa a ChrS de la región reguladora y se provoca un aumento de expresión de los genes *chr3N-chr3C*.

Se propone que como mecanismo de defensa ante la especie tóxica, el cromato dentro de la célula actúa como activador de la expresión de los genes de resistencia a cromato, quizá mediante su interacción con ChrS, lo que probablemente mediante un cambio conformacional despega a la proteína de la región reguladora del gen *chrS* (**Figura 24B**). Por lo tanto, el nivel de expresión de los genes *chr3N-chr3C* será dependiente de la concentración de cromato en la célula.

A la fecha no se tienen reportes acerca de una posible respuesta de los reguladores Lrp a moléculas inorgánicas, como es el caso particular del cromato. En este trabajo se demostró por primera vez que una proteína de la familia Lrp (ChrS) participa en la regulación de genes involucrados en el transporte de cromato.

X. CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró la unión de la proteína ChrS a la región reguladora de su propio gen (*PchrS*). Este resultado confirma que ChrS regula de manera negativa la expresión de los genes de resistencia a cromato *chr3N-chr3C*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Viana K. Y.** y Zavala-Castro J. E. (1996). Proteínas de unión a DNA. Rev. Biomed. 7:163-172.
- Aguilar-Barajas E.,** Jerónimo-Rodríguez P., Ramírez-Díaz M. I., Rensing C. y Cervantes C. (2011). The ChrA homologue from a sulfur-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid pANL confers chromate resistance. World J. Microbiol. Biotechnol. 28:865-869.
- Aguilar-Barajas E.,** Paluscio E., Cervantes C. y Rensing C. (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 285:97-100.
- Belitsky B. R.,** Gustafsson M. C., Sonenshein A. L. y Von Wachenfeldt C. (1997). An *lrp*-like gene of *Bacillus subtilis* involved in branched-chain amino acid transport. J. Bacteriol. 179:5448-5457.
- Bellatori N.** (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. Environ. Health Perspect. 110:689-694
- Beloin C.,** Exley R., Mahé A. L., Zouine M., Cubasch S. y Le Hégarat F. (2000). Characterization of LrpC DNA-binding properties and regulation of *Bacillus subtilis* *lrpC* gene expression. J. Bacteriol. 182:4414-4424.
- Birnboim H. C.** y Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
- Braaten B. A.,** Platko J. V., van der Woude M. W., Simons B. H., de Graaf F. K., Calvo J. M., y Low D. A. (1992). Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4250-4254.
- Branco R.,** Chung A.P. y Morais P.V. (2008). Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. BMC Microbiol. 8:95.

- Brinkman A. B.,** Bell S. D., Lebbing R. J., de Vos W. M. y van der Oost J. (2002). The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. J. Biol. Chem. 16:29537-29549.
- Brinkman A. B.,** Dahlke I., Tuininga J. E., Lammers T., Dumay V., de Heus E., Lebbink J. H., Thomm M., de Vos W. M. y van der Oost J. (2000) An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autorregulated. J. Biol. Chem. 275:38160-38169.
- Brinkman A. B.,** Thijs J.G. Ettema, de Vos W. M. y van der Oost J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. J. Mol. Biol. 48:287–294.
- Browning D. F.** y Busby S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. Nat. Rev. Microbiol. 2:57-65.
- Calvo M.** y Matthews G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 58:466-490.
- Cases M.** y Hens A. (1994). Técnicas analíticas de separación. Reverte (Ed). pp. 595-560. Barcelona, España.
- Cervantes C.** y Silver S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid 27:65-67.
- Cervantes C.,** Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J. C. y Moreno-Sánchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol.Rev. 25:335-347.
- DeFelice M.,** Lago C. T., Squires C. H. y Calvo J. M. (1982). Acetohydroxy acid synthase isoenzymes of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium*. Ann. Microbiol. 133:251-256.
- Díaz-Magaña A.,** Aguilar-Barajas E., Moreno-Sánchez R., Ramírez-Díaz M. I., Riveros-Rosas H., Vargas E. y Cervantes C. (2009). Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 191:5441–5445.

- Díaz-Pérez C.**, Cervantes C., Campos-García J., Julián-Sánchez A. y Riveros-Rosas H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274:6215–6227.
- Egon A.**, Brosius J., y Ptashne M. (1983). Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25:167-178
- Ernsting B. R.**, Atkinson M. R., Ninfa A. J. y Matthews R. G. (1992). Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:1109-1118.
- Ettema T. J.**, Brinkman A. B., Tani T. H., Rafferty J. B. y van der Oost, J. (2002). A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 277:37464–37468.
- Gally D. L.**, Bogan J. A., Eisenstein B. L, y Blomfield L. C. (1993). Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J. Bacteriol.* 175:6186-6193.
- Garner M. M.** y Revzin A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: Application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 9:3047–3060.
- Haney S. A.**, Platko J. V., Oxender D. L., y Calvo J. M. (1992). Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174:108-115.
- Harman J. G.** (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1547:1–17.
- Henne K. L.**, Nakatsu C. H., Thompson D. K. y Konopka A. E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiol.* 9:199.

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

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

Jacobo-Arreola S. (2010). Análisis de la función del gen *ywrC* de *Bacillus subtilis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

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

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

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

Khasim D. I, Kumar N. V. y Hussain R. C. (1989). Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43:742-746.

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

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

Lin R. T., D'Ari R., y Newman E. B. (1990). The leucine regulon of *Escherichia coli* K-12: a mutation in *rbLU* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* 172:4529-4535.

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

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

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

McFarland K. A. y Dorman C. J. (2008). Autoregulated expression of the gene coding for the leucine-responsive protein, Lrp, a global regulator in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 154:2008-2016.

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

Napoli A., van der Oost J., Sensen C. W., Charlebois R. L., Rossi M y Ciaramella M. (1999). An Lrp-Like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. J. Bacteriol. 181:1474-1480.

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

Pardee A. B., Prestidge L. S., Whipple M. B. y Dreyfuss J. (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 241:3962-3969.

Pérez-Rueda E., y Collado-Vides J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res. 28:1838–1847.

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

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

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

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

Shultzaberger R. K. y Schneider T. D. (1999). Using sequence logos and information analysis of Lrp DNA binding sites to investigate discrepancies between natural selection and SELEX. *Nucleic Acids Res.* 27:882-887.

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.

Tani T. H., Khodursky A., Blumenthal R. M., Brown P. O. y Matthews R. G. (2002). Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13471–13476.

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

Vasconcelos Morais P., Branco R. y Francisco R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bvl1 a strain highly resistant. *Biometals* 24:401-410.

Yanisch-Perron C., Vieira J. y Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vector and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33:103-119.