



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Químico Farmacobiología

**Análisis de la función del operón *arsRacr3C* de
Burkholderia xenovorans LB400**

Tesis

Para obtener el título de Químico-Farmacobióloga

Presenta:

p. Q.F.B. María Guadalupe Salgado Lora

Asesor:

D.C. Carlos Cervantes Vega

Co-asesora:

M.C. Martha Patricia Chávez Moctezuma

Morelia, Michoacán

Marzo de 2017

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

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON UNA BECA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

Agradecimientos

Al D.C. Carlos Cervantes Vega:

Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, apoyo y enseñanzas.

A mi coasesora la M.C. Martha Patricia Chávez Moctezuma:

Por su paciencia y ayuda incondicional, por todas sus enseñanzas y dedicación en la realización del presente trabajo.

A la D.C. Martha Isela Ramírez Díaz:

Por darme la oportunidad de integrarme al laboratorio, por su ayuda y consejos.

A mis revisores de tesis:

M.C. Luz Elena Arévalo León, Q.F.B. Virginia Campos Cabrera, Q.F.B. Ricardo Vega Tavera, Q.F.B. Juan Manuel Barajas Magallón y Q.F.B. Rodrigo Díaz Balcázar, por su ayuda en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio:

Karen, Víctor, Nalle, Cesar y David, por todas sus enseñanzas y apoyo.

A mis amigos

Por su apoyo, consejos y ayuda incondicional.

Dedicatoria

A Dios:

Por todas las bendiciones que he recibido y por siempre permanecer a mi lado.

A mi mamá:

Por apoyarme en todo momento, por ser una gran madre y ayudarme a seguir adelante y por ser un ejemplo a seguir.

A mi hermana:

Por apoyarme en los momentos más difíciles.

Índice

Índice.....	4
Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I.- INTRODUCCIÓN	10
1.- Arsénico	10
2.- Ciclo global del arsénico	12
3.- Toxicidad del arsénico	13
3.1 Mecanismo de toxicidad del arsenato	15
3.2 Mecanismo de toxicidad del arsenito	17
4.- Mecanismo bacteriano de resistencia a arsénico.....	19
5.- Género <i>Burkholderia</i>	26
5.1.- <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	26
II.- ANTECEDENTES	31
III.- JUSTIFICACIÓN	37
IV.- HIPÓTESIS.....	38
V.- OBJETIVO GENERAL	38
VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	39
VII.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1.- Reactivos y medios de cultivo	40
2.-Cepas empleadas	40
3.- Vectores.....	41
4.-Diseño de oligonucleótidos	41

5.- Obtención de DNA total	45
6.- Análisis de plásmidos	45
6.1.- Aislamiento de DNA plasmídico	45
7.- Electroforesis en geles de agarosa	47
8.- Reacción en cadena de la polimerasa	48
9.- Aislamiento de DNA de geles de agarosa	48
10.- Tratamientos enzimáticos	49
10.1.-Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt.....	49
10.2.-Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20	49
10.3.- Restricción con endonucleasas	49
11.- Transformación por electroporación	50
11.1.- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> JM101	50
11.2.- Transformación.....	50
12.-Pruebas de susceptibilidad a arsénico en medio líquido.....	51
VIII.- RESULTADOS	52
1.- Pruebas de susceptibilidad a arsénico de <i>B. xenovorans</i> LB400 en medio líquido	52
2.- Análisis in silico del operón <i>arsRacr3C</i>	52
3.- Clonación en el vector pJET 1.2/Blunt	54
4.-Subclonación del operón <i>arsRacr3C</i> en el vector pUCP20	58
5.- Pruebas de susceptibilidad a arsénico de las transformantes con el operón <i>arsRacr3C</i>	58
IX.- DISCUSIÓN	62
X.- CONCLUSIÓN	73
XI.- REFERENCIAS	74

Índice de figuras

Figura 1 .- Ciclo del arsénico.	14
Figura 2.- Mecanismo de toxicidad del arsenato.....	16
Figura 3.- Mecanismo de toxicidad del arsenito.	18
Figura 4.- Operón <i>ars</i> sencillo.	21
Figura 5.- Mecanismo bacteriano de resistencia a arsénico.	25
Figura 6.- Esquema de los replicones que forman el genoma de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	28
Figura 7.- Susceptibilidad a cromato de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.	32
Figura 8.- Expresión relativa de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400 durante la fase exponencial.	33
Figura 9.- Susceptibilidad a cromato de las mutantes <i>chrA2::Gm</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.	35
Figura 10.- Esquema de los genes <i>ars</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.	36
Figura 11.- Mapa del vector pJET 1.2/Blunt.....	42
Figura 12.- Mapa del vector de expresión binaria pUCP20.....	43
Figura 13.- Esquema del operón <i>arsRacr3C</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	44
Figura 14.- Pruebas de susceptibilidad a arsenato y arsenito.	53
Figura 15.- Probable región promotora del operón <i>arsRacr3CH</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400..	55
Figura 16.- Amplificación por PCR del operón <i>arsRacr3C</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.	56
Figura 17.- Clonación del operón <i>arsRacr3C</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400 en el vector pJET.....	57
Figura 18.- Subclonación del operón <i>arsRacr3C</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400 en el vector pUCP20.....	59
Figura 19.- Pruebas de susceptibilidad a arsenito y arsenato de <i>E. coli</i> JM101.....	61

Índice de tablas

Tabla 1.- Distribución de operones ars en diversas especies bacterianas	22
Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para amplificar los genes del operón <i>arsRacr3C</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400	46

RESUMEN

La presencia de arsénico (As) en la atmósfera terrestre desde el origen de la vida ocasionó una presión selectiva en los microorganismos, viéndose obligados a adquirir o modificar genes que les permitieran vivir en un ambiente hostil. El determinante más importante de resistencia a compuestos derivados de arsénico es sin duda el operón *ars* el cual se encuentra presente en distintas especies bacterianas que a la fecha se encuentran ampliamente estudiadas. No es el caso de *Burkholderia xenovorans* LB400, una bacteria con un genoma relativamente grande, ya que posee 9,043 genes distribuidos en tres replicones: Cromosoma 1, Cromosoma 2 y Megaplásmido. *B. xenovorans* puede degradar bifenilos policlorados y se ha estudiado ampliamente en nuestro equipo de trabajo por sus genes *chr* que tienen el potencial de conferirle resistencia a compuestos de cromo. Los genes *chr* de LB400 presentes en los replicones adaptativos son los principales responsables de conferir el fenotipo de resistencia a cromo en esta bacteria, siendo el gen *chrA2* del Megaplásmido el que confiere un mayor nivel de resistencia a este ion, *chrA2* es el único gen *chr* que se encuentra codificado en un operón. Debido a las características de esta bacteria, se realizó una búsqueda de genes *ars* en el genoma de LB400, encontrando 14 genes relacionados con la resistencia a arsénico, entre los cuales está un grupo de genes que forman un operón. El objetivo de este trabajo es evaluar la función del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400 en relación a la resistencia a oxidaciones de arsénico. Primeramente, se determinó el nivel de resistencia a arsénico de LB400, encontrando que es resistente a arsenato y arsenito en comparación con un control sensible *E. coli* JM101. Posteriormente se realizó una búsqueda de secuencias promotoras en el grupo de genes *arsRacr3C*, encontrando un posible promotor río arriba del gen *arsR*. Se procedió a la amplificación por PCR del operón *arsRacr3C*, a la subsecuente clonación en el vector pUCP20 y la transferencia del plásmido recombinante a *E. coli* JM101 para evaluar el fenotipo de resistencia. Se encontró que el operón *arsRacr3C* de LB400 brinda un fenotipo de resistencia a la transformante de *E. coli* (pUC_arsRacr3C), con un nivel de bajo a moderado a los compuestos de arsénico, en el huésped heterólogo. ARSENICO, RESISTENCIA, GENOMA, AMBIENTES CONTAMINADOS

ABSTRACT

The presence of Arsenic (As) in the terrestrial atmosphere has caused a selective pressure on microorganisms since the origin of life, because they were forced to acquire or modify genes that allowed them to live in a hostile environment. The most important determinant of resistance to compounds derived from arsenic is the *ars* operon, which is present in different bacterial species, that to date have been widely studied. It is not the case of *Burkholderia xenovorans* LB400, a bacterium with a relatively large genome, it possesses 9,043 genes distributed in three replicons: Chromosome 1, Chromosome 2 and a Megaplasmid. *B. xenovorans* LB400 can degrade polychlorinated biphenyls and has been extensively studied in our group by their *chr* genes that have the potential to confer resistance to chromium compounds. The *chr* genes of LB400 present in adaptive replicons are responsible for conferring the chromate resistance phenotype however, the responsible to confer a higher level of resistance to this ion is the *chrA2* gene from the Megaplasmid; this is the only *chr* gene encoded in an operon. Due to the characteristics of this bacterium, we performed a search for *ars* genes in the LB400 genome, finding 14 genes related to resistance to As, among which is a group of genes that form an operon. The objective of this work is to evaluate the function of the *arsRacr3C* operon of *B. xenovorans* LB400 in relation to the resistance to arsenic oxyanions. Firstly, the level of arsenic resistance of LB400 was determined and the results demonstrated that it is more resistant to arsenate and arsenite than the control *E. coli* JM101 strain. A search for promoter upstream sequences was then performed in the *arsRacr3C* gene cluster, finding a possible promoter of the *arsR* gene. PCR amplification of the *arsRacr3C* operon, its subsequent cloning into the pUCP20 vector and the transfer of the recombinant plasmid to *E. coli* JM101 was performed to evaluate the resistance phenotype. The operon *arsRacr3C* of LB400 was found to provide a phenotype of the JM101 (pUC_arsRacr3C) transformant with a low to moderate level of resistance to arsenic compounds in the heterologous host.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- Arsénico

El arsénico (As) es un elemento químico que fue aislado por primera vez en el año 1250 por el sacerdote Alberto Magno, considerado uno de los científicos, teólogos y filósofos más importantes de la Edad Media (Castillo, 1996; Rosen, 1999). Es el vigésimo elemento más abundante en la corteza terrestre y se distribuye de manera no uniforme por todo el planeta (Rangel y col., 2015).

El arsénico pertenece al grupo de los metaloides, término que se utiliza frecuentemente para describir a los elementos químicos que exhiben características físicas y propiedades químicas intermedias entre metales y no metales. En el grupo de los metaloides se incluyen los elementos boro (B), silicio (Si), germanio (Ge), arsénico (As), antimonio (Sb) y telurio (Te); el papel biológico de estos elementos varía desde esencial a tóxico, así como su abundancia en la naturaleza es variable (Bienert y col., 2007; Mukhopadhyay y col., 2014). El As se localiza en la familia VA de la tabla periódica; en esta familia también se incluyen el nitrógeno, fósforo, antimonio y bismuto. Es el trigésimo tercer elemento y tiene un peso atómico de 74.92 g/mol (Rosen, 1999).

El arsénico se encuentra en diferentes formas químicas en el ambiente, tiene cuatro estados de oxidación +5, +3, 0, y -3, representados por arsenato As (V), arsenito As (III), arsénico elemental As (0) y arsina (-3) (Zhu y col., 2014). Sin embargo, se encuentra principalmente en sus formas inorgánicas en forma de oxianiones

arsenato AsO_4^{-3} y arsenito As(OH)_3 , considerado este último como la forma más móvil y tóxica (Achour y col., 2007; Zhao y col., 2015).

Se considera que los compuestos de arsénico han sido abundantes en niveles cercanos a tóxicos en el medio ambiente desde el origen de la vida (Mukhopadhyay y col., 2002). Las principales fuentes de contaminación y de exposición ocupacional de arsénico son la combustión de carbón y la industria fundidora de metales, así como la industria de los semiconductores. Cantidades menores se emplean en la producción de artículos de vidrio y cerámica, así como en aditivos alimenticios para animales y en algunos procesos farmacéuticos (Cervantes y col., 1994).

A pesar de que la mayoría de los usos del arsénico en la industria y la agricultura se han descontinuado, su uso en diversas actividades dejó un rastro de contaminación (Páez-Espino y col., 2009). Es por ello que la contaminación por arsénico, especialmente de los suelos y aguas subterráneas, se ha convertido en un problema ambiental a nivel mundial (Li y col., 2014). El arsénico se encuentra presente en el suelo en concentraciones variables que van desde 0.1 a más de 1000 ppm; en el polvo atmosférico se encuentra en un rango de 50-400 ppm. En el agua de mar, la media de la concentración de arsénico es de 2.6 ppb y en agua dulce aproximadamente de 0.4 ppb (Mukhopadhyay y col., 2002). Sin embargo, algunos lugares presentan altos niveles de contaminación por arsénico en aguas subterráneas; tal es el caso del país asiático de Bangladesh donde ocurrió el mayor envenenamiento de una población del que haya registro en la historia, ya que las concentraciones de arsénico en aguas de pozos subterráneos supera considerablemente los límites recomendados por la Organización Mundial de la

Salud (OMS) (Zhu y col., 2014). Debido a su toxicidad, la OMS ha monitoreado los niveles de arsénico y a la fecha, el límite recomendado por la OMS y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) para la concentración de arsénico en agua potable es de 10 $\mu\text{g/l}$ considerando perjudicial para el ser humano una concentración mayor a la establecida. La exposición crónica al arsénico a través del agua potable se ha correlacionado con el aumento de la incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón, piel, hígado, vejiga, y riñón (Mukholpadhyay y col., 2002; Recio-Vega y col., 2015).

Cuando hay mayor presencia geológica natural de arsénico, se pueden encontrar altos niveles de arsénico en aguas subterráneas, tal es el caso de la comarca lagunera en México, en los estados de Coahuila y Durango, una de las regiones más importantes para la agricultura y la ganadería en el país donde se reportan altas concentraciones de arsénico en aguas subterráneas; es por ello que los niveles permisibles de arsénico en agua para uso y consumo humano se encuentran establecidos en la Norma Oficial Mexicana 127 (NOM-127-SSA1-1994). Dicha norma fue modificada en el año 2000, siendo 25 $\mu\text{g/l}$ el límite permisible de arsénico en agua potable de abastecimientos públicos y privados; sin embargo, es una concentración elevada comparada con la concentración establecida por la OMS y la EPA (Rangel y col., 2015).

2.- Ciclo global del arsénico

En la naturaleza existen minerales que contiene altas concentraciones de arsénico, por ejemplo, arsenopirita, realgar y oropimente; estos minerales pudieron haberse formado en condiciones de altas temperaturas en la corteza terrestre y ahora se

encuentran formando parte de la litósfera (capa sólida superficial de la tierra) (Zhuy col., 2014).

El desgaste de las rocas, las actividades volcánicas, la minería, la excavación de pozos para la obtención de agua y la fundición de metales liberan el arsénico de la litósfera a los ambientes terrestres y acuáticos. Esto pone al arsénico a disposición de los microorganismos que habitan en estos ambientes, los cuales llevan a cabo reacciones de óxido reducción, formando parte fundamental del ciclo global del arsénico (**Figura 1**) (Zhuy col., 2014). El As(V) es el principal componente de arsénico en agua de mar, el cual es reducido a As(III) y éste posteriormente puede ser oxidado a As(0). El arsénico de los ambientes acuáticos es tomado por organismos marinos, desde el fitoplancton, algas, crustáceos y peces, convirtiéndolo en pequeños compuestos orgánicos o bien puede ser convertido a formas orgánicas de almacenamiento que son después secretadas al ambiente (Mukhopadhyay y col., 2002; Zhuy col., 2014).

El principal organoarsenical aislado de organismos marinos es la arsenobetaina, que es degradada por el metabolismo microbiano a ácido metilarsónico y arsénico inorgánico, el cual puede ser volatilizado y posteriormente por acción del aire y la lluvia regresa a los ambientes terrestres y acuáticos completando así el ciclo biológico del arsénico (Mukhopadhyay y col., 2002)

3.- Toxicidad del arsénico

La biodisponibilidad y las propiedades toxicológicas de arsénico son altamente dependientes de su forma química y de su estado de oxidación, siendo el arsenito

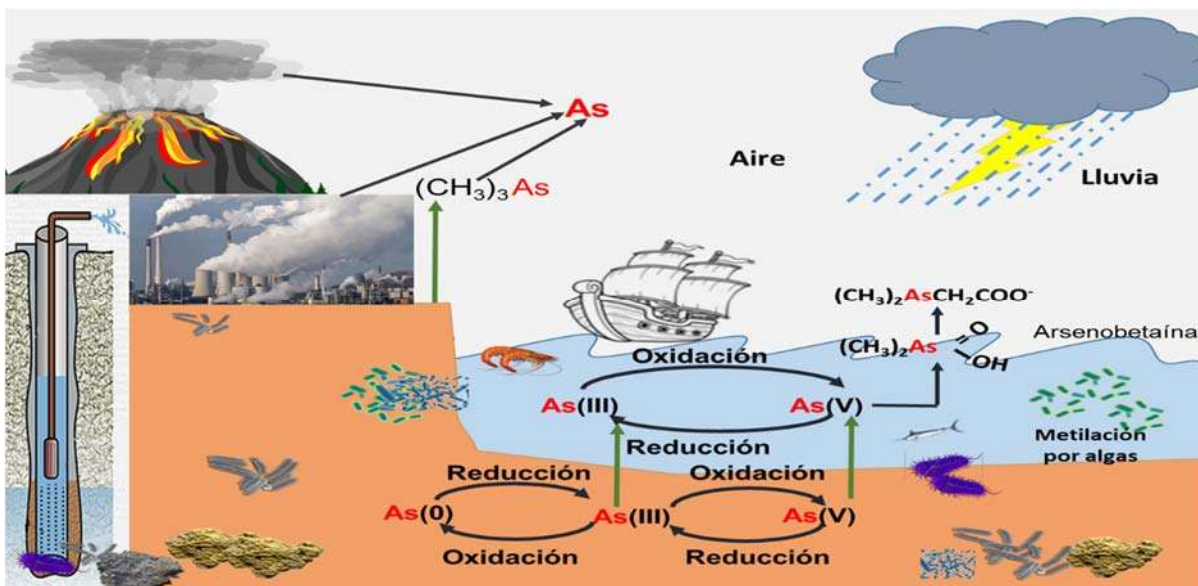


Figura 1 .- Ciclo del arsénico. El arsénico se encuentra en la naturaleza formando parte de algunos minerales localizados en la litósfera; por medio de actividades naturales o antropogénicas el arsénico es removido de sus fuentes naturales y es dispersado ampliamente en ambientes terrestres y acuáticos, poniéndolo a disposición de los microorganismos que habitan en estos ambientes. Entre ellos se encuentran las bacterias las cuales llevan a cabo reacciones de óxido-reducción del arsénico, procesos de alta importancia en el ciclo del metaloide ya que permite la movilización de este elemento por el medio ambiente (modificado de Mukhopadhyay y col., 2002).

70 veces más tóxico que las especies metiladas y 10 veces más tóxico que el arsenato (Chen y col., 2015; Rangel y col., 2015).

A su vez, los efectos biológicos del arsénico lo hacen un ingrediente útil para ser usado en herbicidas y pesticidas; además, sus sales fueron empleadas como venenos a lo largo de la historia; se ha considerado que podría ser la causa de la muerte del emperador Napoleón Bonaparte (Rosen, 1999).

3.1 Mecanismo de toxicidad del arsenato

El As (V) es tóxico debido a su estructura química que lo hace ser un análogo no funcional del fosfato (**Figura 2A**); puede formar ésteres similares a los ésteres de fosfato, entrando a las células a través de los transportadores de membrana que usualmente transportan fosfato. Esto incluye a los transportadores de fosfato inorgánico (Pit), con una fuerte preferencia hacia este sistema, o bien pueden entrar a la célula por el transportador específico de fosfato (Pst), en menor cantidad (**Figura 2B**) (Bienert y col., 2007; Zhao y col., 2015).

Esto altera la correcta asimilación del mismo y afecta así todas aquellas reacciones que requieren fosforilación ya que puede unirse al ADP formando ADP-As, el cual es muy inestable, ya que los ésteres de arsenato son menos estables que los formados por el fosfato; debido a que la longitud de enlace entre el P-O es más corta, aproximadamente 1.5 Å en comparación de la longitud del enlace entre As-O que es de aproximadamente 2.0 Å, los enlaces más largos se hidrolizan más fácilmente, proceso llamado arsenolisis (Thomas., 2010; Zhu y col., 2014). Es por ello que se producen desajustes en el metabolismo energético (**Figura 2C**), de

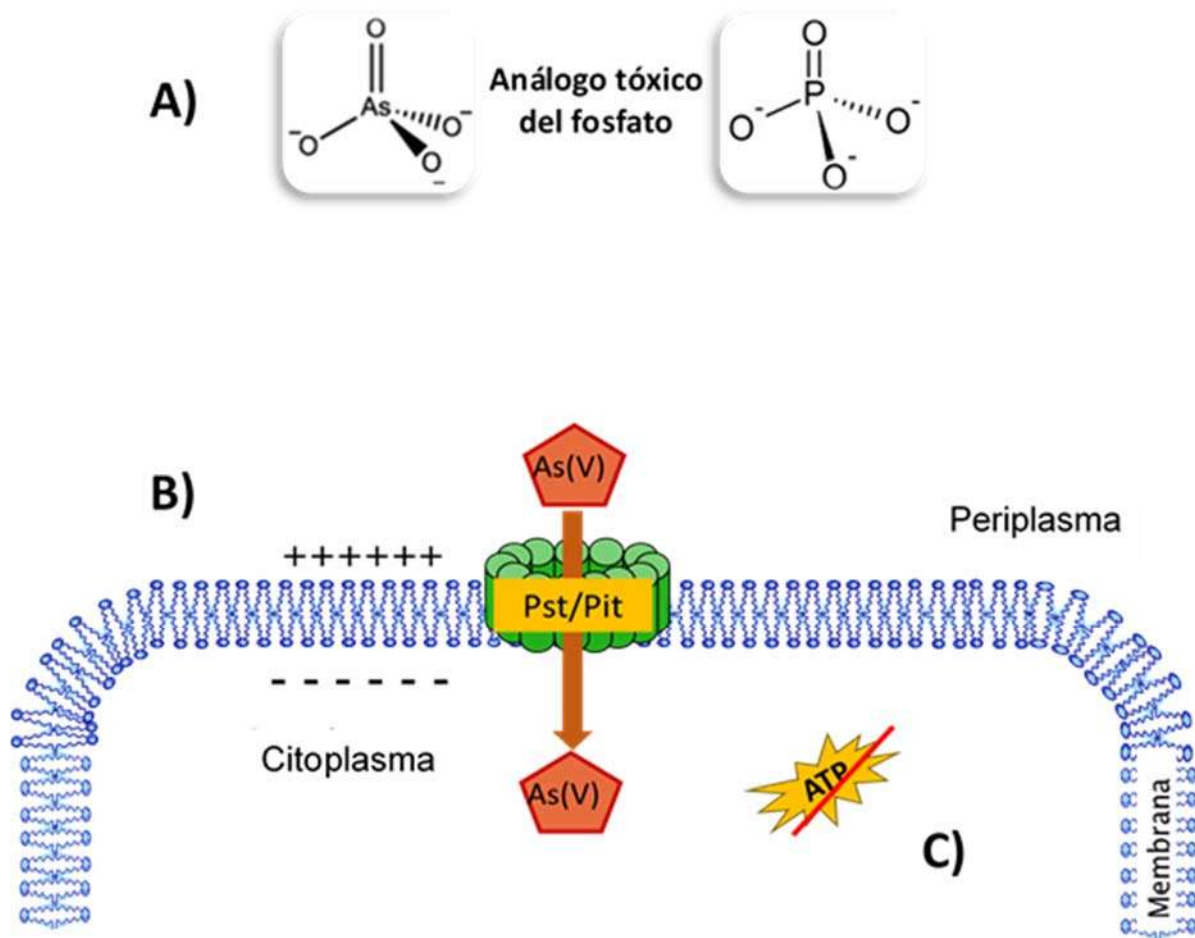


Figura 2.- Mecanismo de toxicidad del arsenato. **(A)** El As (V) es tóxico debido a su estructura que lo hace ser un análogo no funcional del fosfato. **(B)** Ingresa a la célula a través de los transportadores de fosfato Pst/ Pit. **(C)** Una vez en el citoplasma celular, afecta las reacciones que requieren fosforilación, provocando desajustes en el metabolismo energético.

esta manera se inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos afectando gravemente a las células (Achour y col., 2007; Aguilar-Barajas y col., 2010).

3.2 Mecanismo de toxicidad del arsenito

El As (III) penetra a la célula a través de las acuagliceroporinas GlpF, familia de transportadores que permiten el transporte de agua y pequeños solutos como el glicerol y urea por un mecanismo independiente de energía; en solución, GlpF reconoce al As (III) como un imitador molecular inorgánico del glicerol (**Figura 3A**) permitiendo su paso a la célula (**Figura 3B**) (Mukhopadhyay y col., 2014).

El As (III) es el principalmente responsable de los efectos biológicos del arsénico debido a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo en residuos de cisteínas (**Figura 3C**), los cuales son esenciales para la estructura y función de numerosas proteínas y enzimas (Bienert y col., 2007; Bhattacharjee y col., 2008).

Por otra parte, el arsenito también conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno por su unión al glutatión reducido (**Figura 3D**); de esta forma evita que las células sean capaces de regular su estado intracelular redox lo que puede conducir a la formación de cáncer en mamíferos (Bhattacharjee y col., 2008; Zhu y col., 2014).

Los arsenicales orgánicos fueron los primeros agentes antimicrobianos sintetizados específicamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Rosen, 1999).

De hecho, el Dr. Paul Ehrlich merecedor del Premio Nobel de Medicina en 1908 por sus aportes en el campo de la inmunología (Chuaire y Cediél, 2008), llevó a cabo la

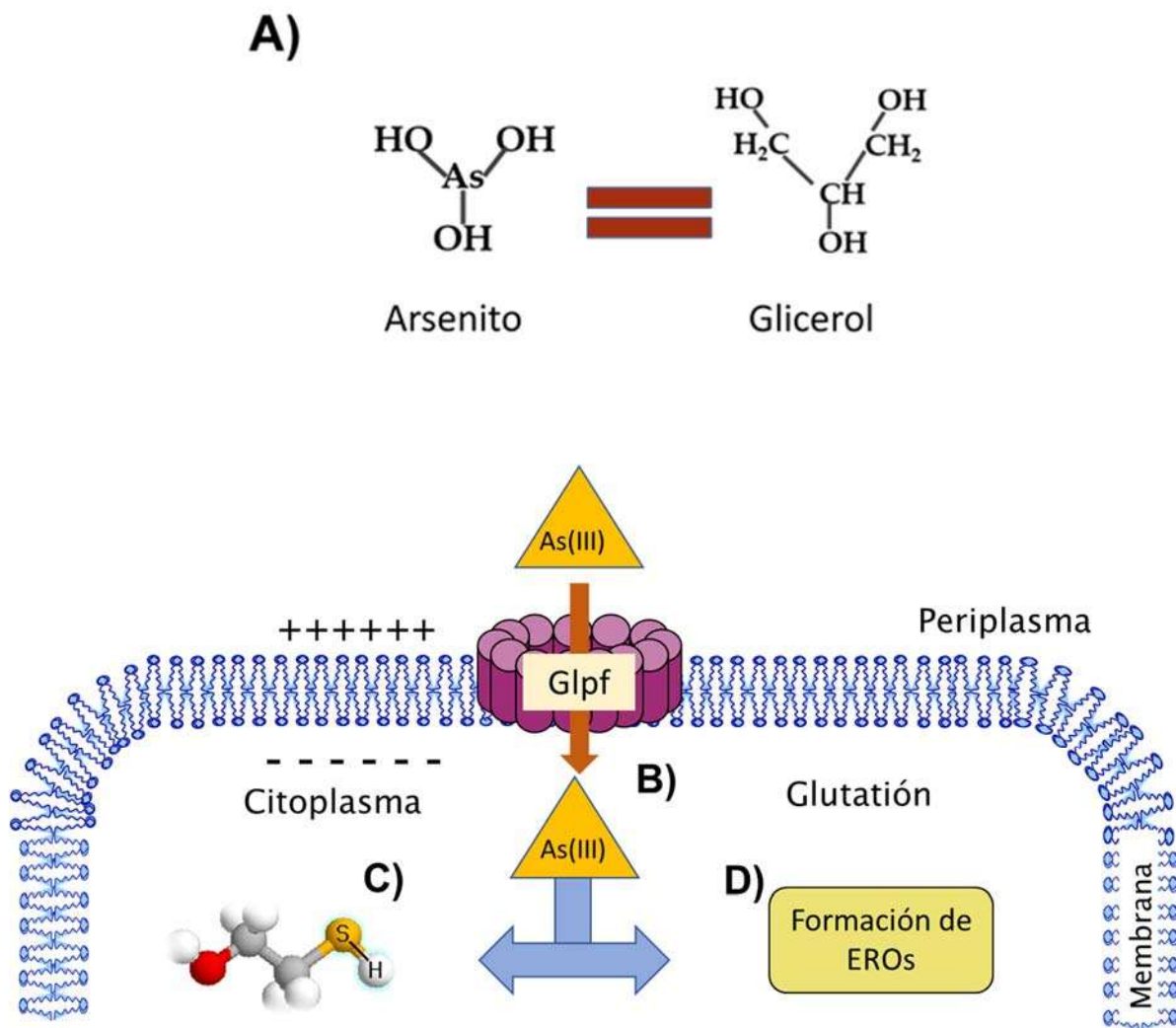


Figura 3.- Mecanismo de toxicidad del arsenito. **(A)** En solución, el arsenito se comporta como un imitador molecular inorgánico del glicerol. **(B)** Ingresa a la célula a través de las acuagliceroporinas GlpF. **(C)** El arsenito tiene una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína. **(D)** Por otra parte, su unión al glutatión conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), evitando que la célula sea capaz de regular su estado intracelular redox.

síntesis del compuesto arsenical Salvarsán, denominado "la bala de plata", desarrollado para el tratamiento de la sífilis y la enfermedad del sueño. El Salvarsán fue comercializado en el año de 1910 y su uso continuó hasta la aparición de la penicilina como antimicrobiano. La clave para que los compuestos de arsénico sean tóxicos o benéficos está en la dosis con los que estos se administren (Rosen, 1999; Mukhopadhyay y col., 2002).

4.- Mecanismo bacteriano de resistencia a arsénico

El ambiente de la tierra primitiva carecía de oxígeno libre por lo cual se piensa que la vida en esta etapa se desarrolló en un ambiente hostil rico en arsenito; por lo tanto, las primeras formas de vida debieron desarrollar mecanismos que les permitieran subsistir en ese ambiente hostil. Con el paso del tiempo, la atmósfera primitiva se convirtió en oxidante pasando la mayoría del As(III) a su forma oxidada As(V), representando un nuevo reto para los organismos propiciando la evolución de sistemas de resistencia para arsenato y arsenito (Zhu y col., 2014). Es por ello que los microorganismos juegan un papel importante en el ciclo global del arsénico, **(Figura 1)** ya que han desarrollado múltiples sistemas de resistencia para adaptarse a ambientes contaminados con oxianiones de arsénico (Mukhopadhyay y col., 2002).

El operón *ars* constituye el sistema más ubicuo e importante de la tolerancia a arsénico en bacterias, estando presente en plásmidos y cromosomas de especies Gram-positivas y Gram-negativas (Páez-Espino y col.2009). Existen distintos tipos de configuraciones genéticas dentro de los operones de resistencia a arsénico, pero siempre se encuentran presentes los genes del operón *ars* sencillo el cual se

muestra en la **Figura 4**, el gen *arsR* codifica una proteína represora la cual se une a la región reguladora del operón, para regular así la expresión de los genes adyacentes; los operones *ars* en su gran mayoría son inducidos por As(III) (**Figura 4A**) (Diorio y col., 1995; Li y col., 2014). Una vez que el inductor entra en contacto con la proteína represora, se genera en ella un cambio conformacional provocando que esta se separe de la región reguladora (**Figura 4B**) para permitir así la transcripción de los genes adyacentes. Los genes *arsB* o *acr3* codifican proteínas transportadoras de membrana cuya función es expulsar el As(III) de la célula, el gen *arsC* codifica una enzima que reduce As(V) en As(III) para permitir así su expulsión de la célula y evitar el daño celular (Achour y col., 2006).

Sin embargo, los genes que se muestran en la **Figura 4** no son los únicos que conforman un operón de resistencia a arsénico; se han analizado múltiples sistemas de resistencia a arsénico en diversas especies bacterianas como se ejemplifica en la **Tabla 1**. Se ha encontrado que algunos microorganismos presentan genes adicionales que les confieren un mayor nivel de resistencia a diversas especies de arsénico, o bien pueden presentar duplicaciones y translocaciones de los genes, pero siempre están presentes los genes que conforman el operón *ars* sencillo *arsRBC* (Zhao y col., 2015).

Los primeros operones de resistencia a arsénico caracterizados fueron los codificados en los plásmidos R773 de *Escherichia coli*, *arsRADBC*, y en el plásmido pl258 de *Staphylococcus aureus*, *arsRBC* (Chen y col., 1986; Ji y Silver, 1992).

Estos sistemas median la expulsión de arsénico fuera de las células llevando a cabo la destoxificación del metaloide. ArsD es una proteína chaperona que actúa como

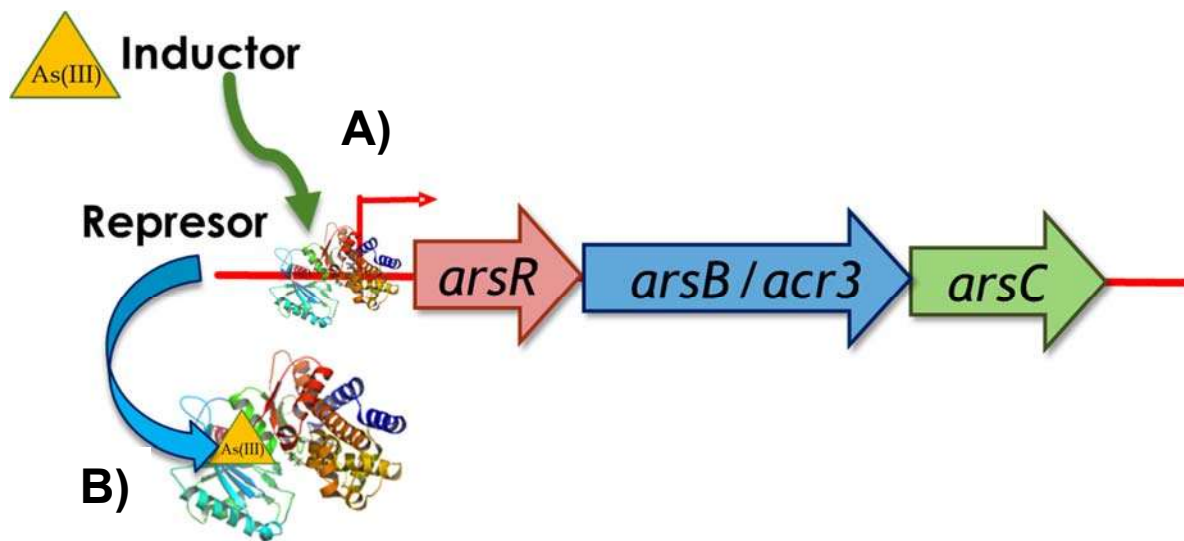
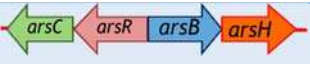
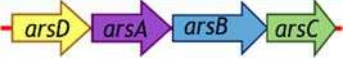
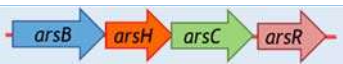
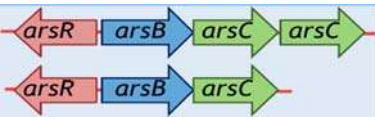
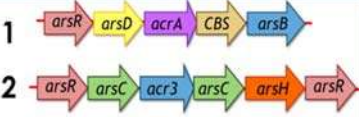
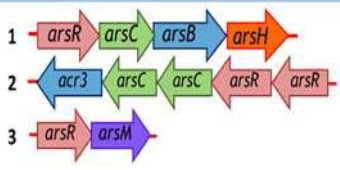


Figura 4.- Operón *ars* sencillo. Se encuentra ejemplificado en forma de flecha el gen *arsR* que codifica una proteína que funciona como un regulador transcripcional; el gen *arsB* o *acr3* codifica transportadores de membrana que están involucrados en la expulsión de arsenito de la célula; y el gen *arsC* que codifica la enzima arsenato reductasa. El sistema es inducido por la presencia de As(III) (Modificado de Li y col., 2014).

Tabla 1.- Distribución de operones *ars* en diversas especies bacterianas

Especie	Genes <i>ars</i>	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		Chen y col., 1986
<i>Staphylococcus aureus</i>		Ji y Silver. 1992
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>		Butcher y col., 2000
<i>Shewanella sp.</i>		Saltikov y col., 2003
<i>Synechocystis sp.</i>		López-Maury y col., 2003
<i>Halobacterium sp.</i>		Wang y col., 2004
<i>Corynebacterium Glutamicum</i>		Mateos y col., 2006
<i>Ochrobactrum tritici</i>		Branco y col., 2008
<i>Campylobacter jejuni</i>		Wang y col., 2009
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>		Zhao y col., 2015

P, operones plásmidicos; Los diagramas muestran la organización de los operones *ars* para cada especie indicada. Código de colores del operón *ars* básico: *arsR* en rojo, *arsB/acr3* en azul y *arsC* verde; en colores diferentes se ejemplifican otros genes *ars* encontrados en diversas especies bacterianas.

segundo regulador para controlar los niveles superiores de la expresión de los genes *ars*; ArsD ayuda a la bomba ArsAB transfiriendo los metaloides trivalentes As(III) o Sb(III) a la subunidad ArsA del transportador incrementando así su afinidad. ArsD constituye un homodímero con tres pares de cisteínas relevantes Cys12, Cys13 y Cys18 en cada monómero (Ajees y col., 2011). ArsA es una ATPasa que se asocia a ArsB para proporcionarle energía convirtiendo a ArsB en una bomba de expulsión acoplada a ATP; ArsA y ArsB forman un complejo que no se puede disociar fácilmente; se cree que la evolución de ArsA-ArsB se dio en respuesta a la exposición a altos niveles de arsénico, permitiendo así una mejor expulsión tanto de arsenito como de antimonito (Rosen, 1999; Li y col., 2014).

ArsB y Acr3 son proteínas transportadoras de membrana; ambas llevan a cabo la expulsión de arsenito y parecen ser producto de evoluciones independientes (Rosen, 1999). Sin embargo, ArsB también permite la expulsión de antimonito y posee 12 segmentos transmembrana; fue caracterizada en los plásmidos R773 y pl258 de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. ArsB utiliza el potencial de membrana de la célula para impulsar el flujo de salida de los iones de arsenito intracelular cuando no se encuentra unida a ArsA (Diorio y col., 1995 Achour y col., 2007). Los transportadores de membrana tipo Acr3 presentan 10 segmentos transmembrana y son específicos para la expulsión de As(III); se encuentran presentes en bacterias, arqueas, eucariotas unicelulares y hongos. Acr3 se identificó por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Markowska y col., 2015). Ahora bien, los genes *arsC*, que codifican arsenato reductasas, se pueden dividir principalmente en dos familias. Las proteínas ArsC de la familia del plásmido R773 de *E. coli* que

utilizan glutarredoxina como agente reductor mientras que, las proteínas codificadas por los genes *arsC* de pI258 de *S. aureus* utilizan tiorredoxina como agente reductor. Las secuencias de aminoácidos de las dos familias tienen menos del 20% de identidad entre sí (Li y Krumholz, 2007).

Recientemente, se han estudiado nuevos genes que están implicados en la resistencia a compuestos de arsénico orgánico y que no se encuentran formando parte del operón *ars* sencillo; tal es el caso del gen *arsH* el cual codifica la proteína ArsH que es una oxidasa organoarsenical que oxida compuestos arsenicales metilados y aromáticos trivalentes a especies pentavalentes reduciendo su toxicidad (Chen y col., 2015).

En la **figura 5** se ejemplifican de manera general los procesos para la resistencia a arsénico mediante un operón *arsRBC*, en donde As(III) y As(V) ingresan a la célula mediante los canales descritos anteriormente; por acción de la proteína ArsC, el As(V) es reducido a As(III) para su posterior expulsión por las proteínas de membrana ArsB o Acr3. Esto permite la detoxificación del metaloide impidiendo el daño tóxico a la célula.

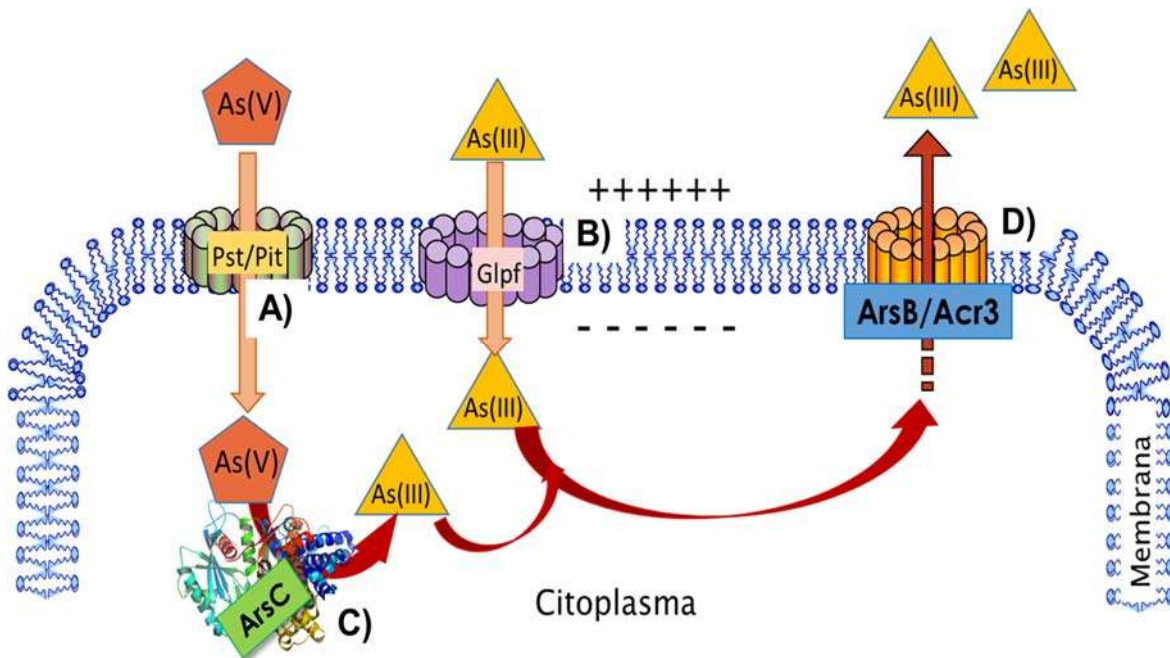


Figura 5.- Mecanismo bacteriano de resistencia a arsénico. (A) El arsenato (representado en forma de pentágono) entra a la célula a través de los transportadores de fosfato Pst y Pit. **(B)** El arsenito (representado en forma de triángulo) ingresa a la célula por medio de las acuagliceroporinas Glpf. **(C)** Una vez en el interior de las células, el arsenato es reducido a arsenito por la proteína ArsC. **(D)** Posteriormente, el As(III) , generado por ArsC o el que ingresó por medio de las porinas, es expulsado de la célula a través de las proteínas de membrana ArsB o Acr3.

5.- Género *Burkholderia*

El género *Burkholderia* es un grupo de especies de bacterias que habitan en una amplia variedad de ambientes; este género se puede separar en dos distintos grupos: uno que consiste en su mayor parte de los patógenos de humanos, plantas, y animales, incluyendo varios patógenos oportunistas, y un segundo grupo mucho más grande de especies que comprenden las que forman asociaciones benéficas con plantas y especies benéficas para el ambiente que son conocidos principalmente por no ser patógenos (Estrada-de los Santos y col., 2016).

Este género fue nombrado en honor al bacteriólogo norteamericano W.H. Burkholder, que fue el descubridor *Burkholderia cepacia* agente etiológico de la piel agria de la cebolla y el primero en relacionar a estas bacterias con enfermedades de las plantas (Burkholder, 1948).

Las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* son bacilos rectos Gram-negativos, no fermentadores, con uno o varios flagelos polares. Producen catalasa y la actividad de oxidasa varía entre las especies; todas las especies pueden crecer con los siguientes sustratos como fuente única de carbono: glucosa, glicerol, inositol, galactosa, sorbitol y manitol (Gillis y col., 1995). Las cepas crecen en agar nutritivo a 28°C, pero no crecen en presencia de una concentración mayor a 1.5 % (w/v) de NaCl (Goris y col., 2004).

5.1.- *Burkholderia xenovorans* LB400

Varias cepas de *Burkholderia* han ganado interés debido a su capacidad de degradar compuestos xenobióticos, tales como aromáticos halogenados. Uno de

los ejemplos mejor estudiados es *Burkholderia xenovorans* LB400, una cepa aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados (PCB) en Moreau, Nueva York, EEUU por ingenieros de la compañía General Electric (Bedard y col., 1986).

B. xenovorans LB400 (anteriormente *Pseudomonas* sp. LB400, *Burkholderia* sp. LB400, *B. fungorum* LB400) es un bacilo Gram-negativo, presenta movilidad y es capaz de fijar nitrógeno (Bedard y col., 1986). El genoma de *B. xenovorans* LB400 tiene un tamaño de 9.73 megapares de bases (Mpb), que contiene 9043 genes distribuidos a lo largo de tres replicones, los cuales fueron designados como cromosoma 1 (4.90 Mpb), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y un megaplásmido (1.47 Mpb) **(Figura 6)**. El cromosoma 1 es considerado el cromosoma central debido a que concentra funciones celulares importantes, incluyendo genes relacionados con funciones esenciales; por ejemplo, los relacionados con la replicación de DNA, la división celular y el metabolismo de nucleótidos. El replicón de 3.36 Mpb se definió como cromosoma 2 debido a la presencia de tres operones con genes ribosomales y varios RNAs de transferencia, así como funciones celulares centrales involucradas en la replicación del DNA y el metabolismo de aminoácidos (Chain y col., 2006). El megaplásmido, por otra parte, no contiene tRNAs ni alguna función esencial y no se encuentra en otras cepas de la misma especie. El porcentaje de G-C del megaplásmido es 1% más bajo que el de los dos cromosomas, y, junto con los porcentajes de G-C y la alta proporción de secuencias de inserción, este replicón parece ser un mosaico de material genético foráneo (Chain y col., 2006).

Además de que *B. xenovorans* LB400 presenta un porcentaje de redundancia de genes de 17.6% (1581 genes), hasta la fecha, este porcentaje de redundancia

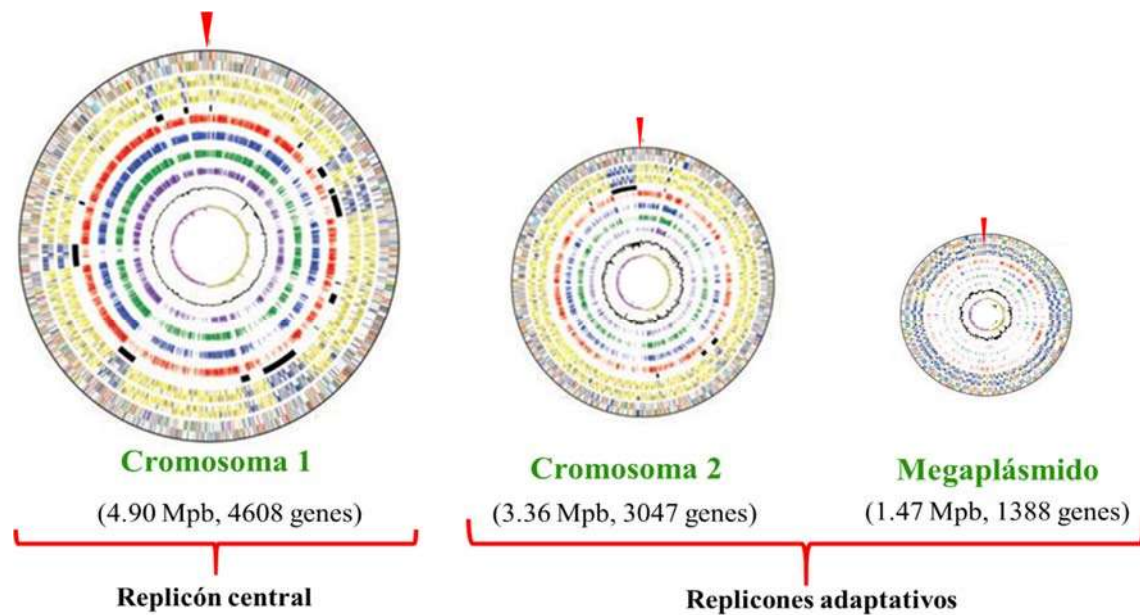


Figura 6.- Esquema de los replicones que forman el genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400. Se indica el nombre de cada replicón, así como su tamaño y el número de genes que contiene. El cromosoma 1 se considera el replicón central ya que concentra funciones celulares importantes; el cromosoma 2 y el megaplásmido son considerados replicones adaptativos ya que no involucran ninguna función esencial para LB400, sin embargo, son los que le permiten habitar ambientes contaminados.

génica y funcional, representa el más alto porcentaje existente entre los genomas de bacterias de vida libre, donde el promedio de redundancia génica es 7.6% (Chain y col., 2006). La redundancia génica se entiende como la presencia de múltiples genes (parálogos), que aparentemente codifican para una misma función dentro del genoma de un organismo y que posiblemente la inactivación de uno de estos genes tenga poco o ningún efecto sobre el fenotipo (Marx y col., 2004).

La lista de parálogos en el genoma de LB400 está enriquecida en genes relacionados a transporte (230 parálogos), transducción de señales (164 parálogos), elementos móviles (112 parálogos), proteínas de membrana (66 parálogos) y metabolismo secundario, incluyendo 120 deshidrogenasas, 32 di-oxigenasas y 13 mono-oxigenasas (Chain y col., 2006). El alto número de parálogos entre proteínas transportadoras se correlaciona con la gran proporción de genes de *B. xenovorans* LB400 dedicados a esta función. Existen más de 180 sistemas de expulsión, que incluye 89 bombas de expulsión de drogas, 18 sistemas de secreción proteica, 21 bombas de expulsión de metales pesados y 18 sistemas de transporte de aminoácidos (Chain y col., 2006).

La segunda clase de proteínas que tiene un gran número de parálogos es la transducción de señales. Se ha propuesto que el número de redes de transducción de señales aumenta desproporcionalmente con el tamaño del genoma. El 9% del genoma de *B. xenovorans* está dedicado a la transducción de señales y utiliza casi la totalidad de dominios sensores y reguladores encontrados en la transducción de señales procariotas (Chain y col., 2006). Las proteínas de transducción de señales de un componente y un módulo regulatorio son el mecanismo dominante de

transducción de señales en esta bacteria; la mayoría de éstos son sistemas citoplasmáticos solubles, lo que indica que detecta la mayoría de las señales ambientales intracelularmente, después de que han sido transportadas a la célula. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes son menos abundantes (Chain y col., 2006). La extraordinaria capacidad de sensado de *B. xenovorans* se enfatiza por el hecho de que *Rhodococcus* sp., un microorganismo con un nicho y un tamaño de genomas similares, posee 25% menos de sistemas de transporte y menos de la mitad de sistemas de transducción de señales (McLeod y col., 2006).

II.- ANTECEDENTES

A partir del análisis realizado por Díaz-Pérez y col. en el año 2007 sobre la superfamilia CHR, se encontró que *B. xenovorans* LB400 contiene en su genoma cuatro homólogos de la familia LCHR (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6) y dos homólogos de la familia SCHR (Chr1NCa y Chr1NCb). León-Márquez en 2009 determinó, mediante pruebas de susceptibilidad a cromato, que *B. xenovorans* LB400 presenta un mayor nivel de resistencia a este ion comparado con cepas de referencia (**Figura 7**), sugiriendo que los homólogos CHR presentes en LB400 son responsables de dicha resistencia. Así mismo, se determinó que los homólogos CHR de *B. xenovorans* confieren resistencia a cromato cuando se transfieren a cepas de *E. coli*, aunque de manera diferencial, dependiendo de las condiciones de sulfato en el medio (Acosta-Navarrete y col., 2014). Mediante ensayos de RT-PCR, partiendo de RNA total de *B. xenovorans* LB400, crecida en medio mínimo en diferentes condiciones de sulfato y en presencia o ausencia de cromato, se encontró que los genes *chr* presentan diferentes niveles de expresión entre sí, pero no con cambios significativos en sus niveles de expresión en las diferentes concentraciones de sulfato; por ello se concluyó que el sulfato no regula la expresión de los genes *chr* (Acosta-Navarrete y col., 2014). Adicionalmente se encontró que la expresión del gen *chrA2*, del megaplásmido, el cual forma parte de un operón *chrBACF*, es el único que es inducido por cromato (**Figura 8**). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo Reyes-Gallegos en 2015 determinó que los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 que se encuentran presentes en los replicones adaptativos, (*chrA1b* y *chr1NCb*, del cromosoma 2, y *chrA2*, del megaplásmido) son los principales

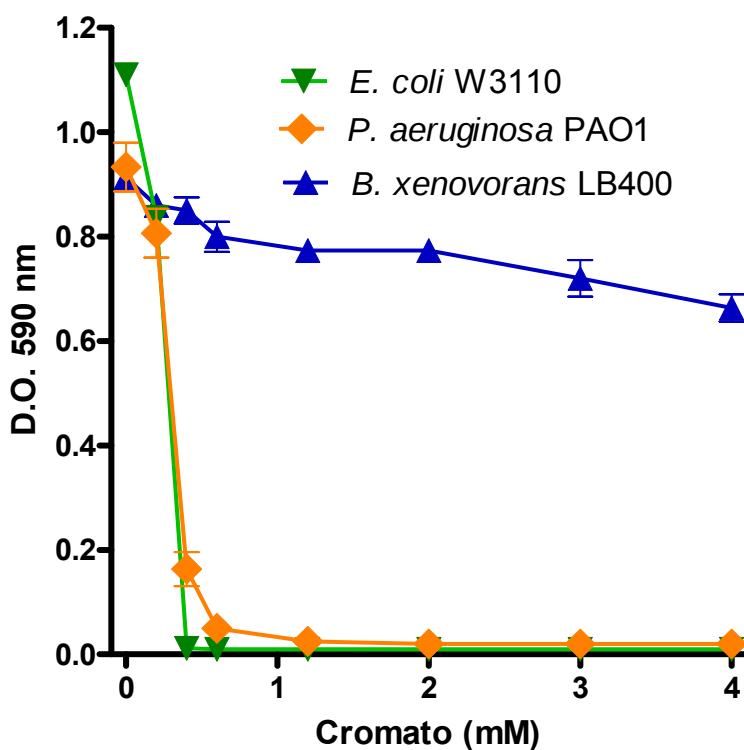


Figura 7.- Susceptibilidad a cromato de *Burkholderia xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 24 h con agitación constante a 30°C, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbencia a 590 nm. Como cepas de referencia se utilizaron *Escherichia coli* W3110 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Tomado de León-Márquez y col., 2011).

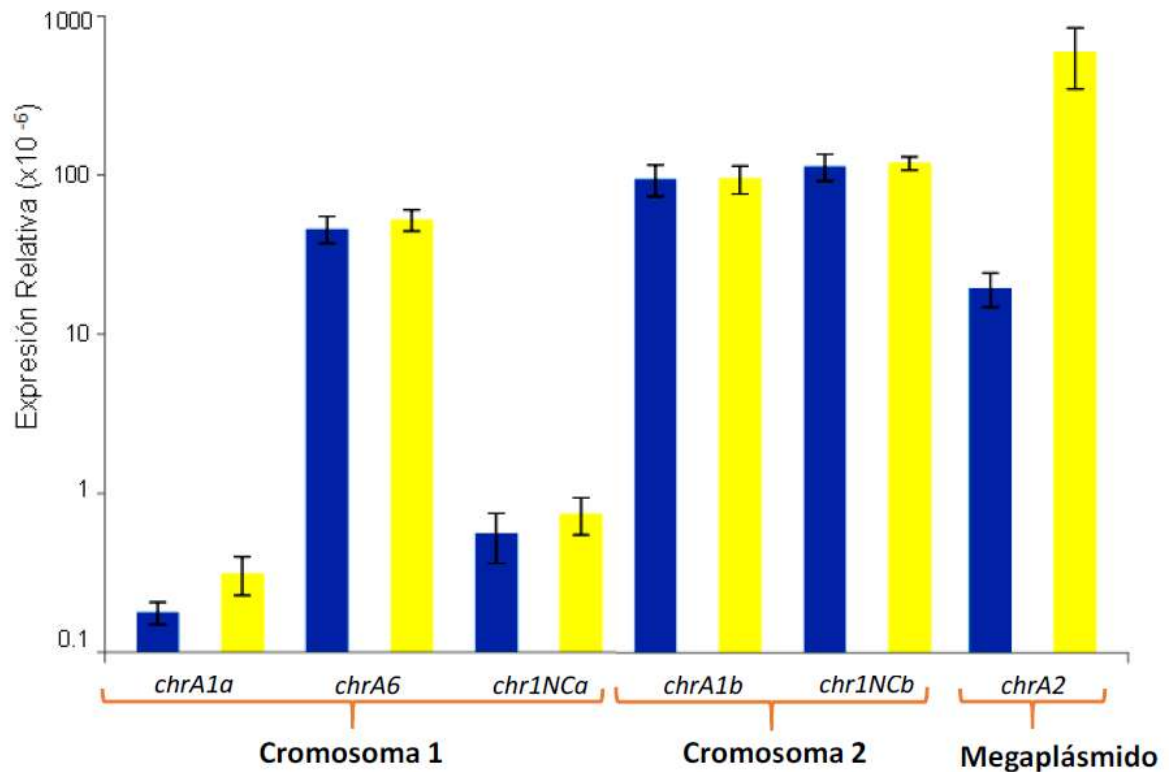


Figura 8.- Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 durante la fase exponencial. Se crecieron los cultivos en medio K1m con 50 μM de sulfato, a una absorbencia de 0.6, en ausencia (barras azules) y presencia de 2 μM de cromato (barras amarillas). En el eje de las X se indican los genes *chr* y su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*. La expresión del gen 16S RNAr se usó como normalizador. Modificado de Acosta-Navarrete y col. 2014.

responsables de conferir el fenotipo de resistencia a cromato en esta bacteria. En este trabajo se realizó la interrupción de gen *chrA2* con un cassette de resistencia a gentamicina (Gm) mediante la obtención de dos mutantes (*chrA2::Gm-1* y *chrA2::Gm-2*). Posteriormente se determinó que el gen *chrA2* presente en el megaplásmido es el que confiere mayor nivel de resistencia a cromato (**Figura 9**).

Como se mencionó anteriormente, *B. xenovorans* LB400 fue aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados y estudios realizados en nuestro equipo de trabajo demostraron que presenta resistencia a cromato, por lo cual se pensó que puede poseer genes que le confieren resistencia a otros compuestos tóxicos. Reyes Gallegos en 2016 realizó una búsqueda preliminar de genes de resistencia a arsénico, encontrando genes *ars* posiblemente relacionados con la resistencia a este elemento los cuales se encuentran distribuidos entre los cromosomas 1 y 2 (**Figura 10**). Cuatro de estos genes están agrupados formando un operón *arsRacr3CH*. Serrato-Gamiño en 2016, como parte de su trabajo de maestría, realizó un análisis de secuencias tipo BLAST con los genes encontrados de manera preliminar, para compararlas con las secuencias de la base de datos y determinar el grado de identidad con otras proteínas. Se encontró que la proteína ArsB3 que se encuentra codificada en el operón presenta una identidad mayor con la proteína transportadora de arsenito Acr3 de *Bacillus subtilis* en comparación con las proteínas transportadoras de As(III) ArsB de *E. coli* y *S. aureus*. Sin embargo, se desconoce si el grupo de genes que forman el operón *arsRacr3CH* son funcionales. por lo cual es de nuestro interés determinar si el operón *arsRacr3CH* es el encargado de conferir la resistencia a arsénico en LB400.

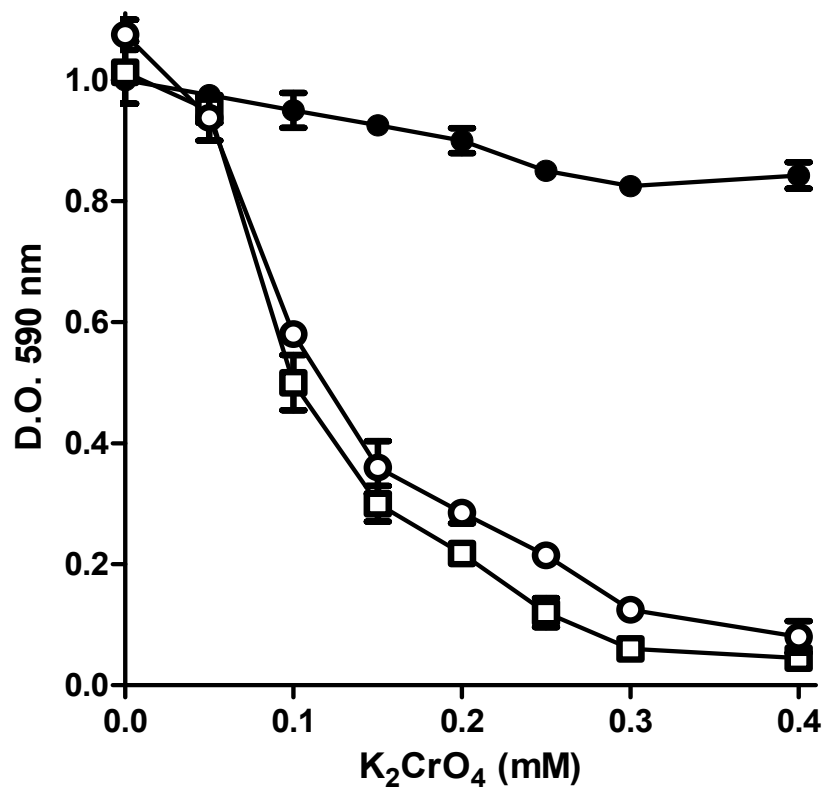


Figura 9.- Susceptibilidad a cromato de las mutantes *chrA2::Gm* de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. *B. xenovorans* LB400 (●), *chrA2::Gm-1* (○), *chrA2::Gm-2* (□). n=6. (Tomado de Reyes-Gallegos, 2015).

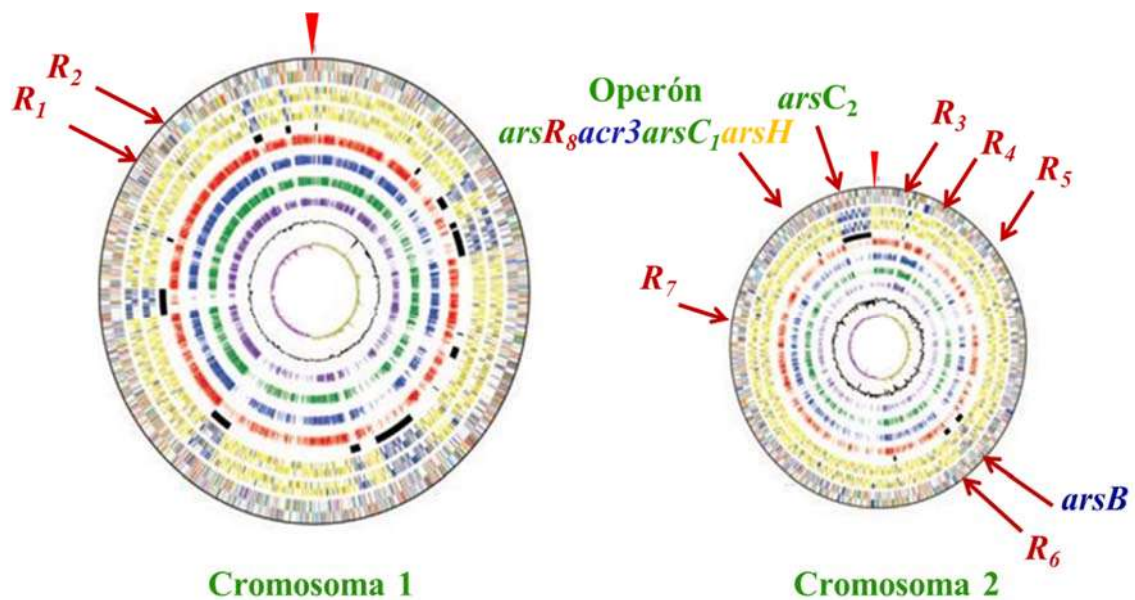


Figura 10.- Esquema de los genes *ars* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el acomodo de los genes *ars* en el genoma de *B. xenovorans* LB400. Únicamente se muestran los cromosomas 1 y 2 de LB400 ya que en el análisis de secuencias del megaplásmido no se encontró ningún gen *ars* adicional a los encontrados previamente (Tomado de Serrato-Gamiño, 2017).

III.- JUSTIFICACIÓN

La bacteria *Burkholderia xenovorans* LB400 posee un genoma relativamente grande, formado por tres replicones. El genoma contiene numerosos genes adaptativos que le permiten a la bacteria colonizar ambientes perturbados con hidrocarburos o con derivados tóxicos de elementos como cromo y arsénico. De manera preliminar, encontramos que LB400 presenta en su genoma múltiples genes *ars* probablemente relacionados con la resistencia a arsénico. Estos genes incluyen el operón *arsRacr3C*, presente en el cromosoma 2, con el potencial de conferir resistencia a los oxianiones de As. El estudio de la función de este operón es importante para entender las interacciones de LB400 con ambientes contaminados con derivados del arsénico.

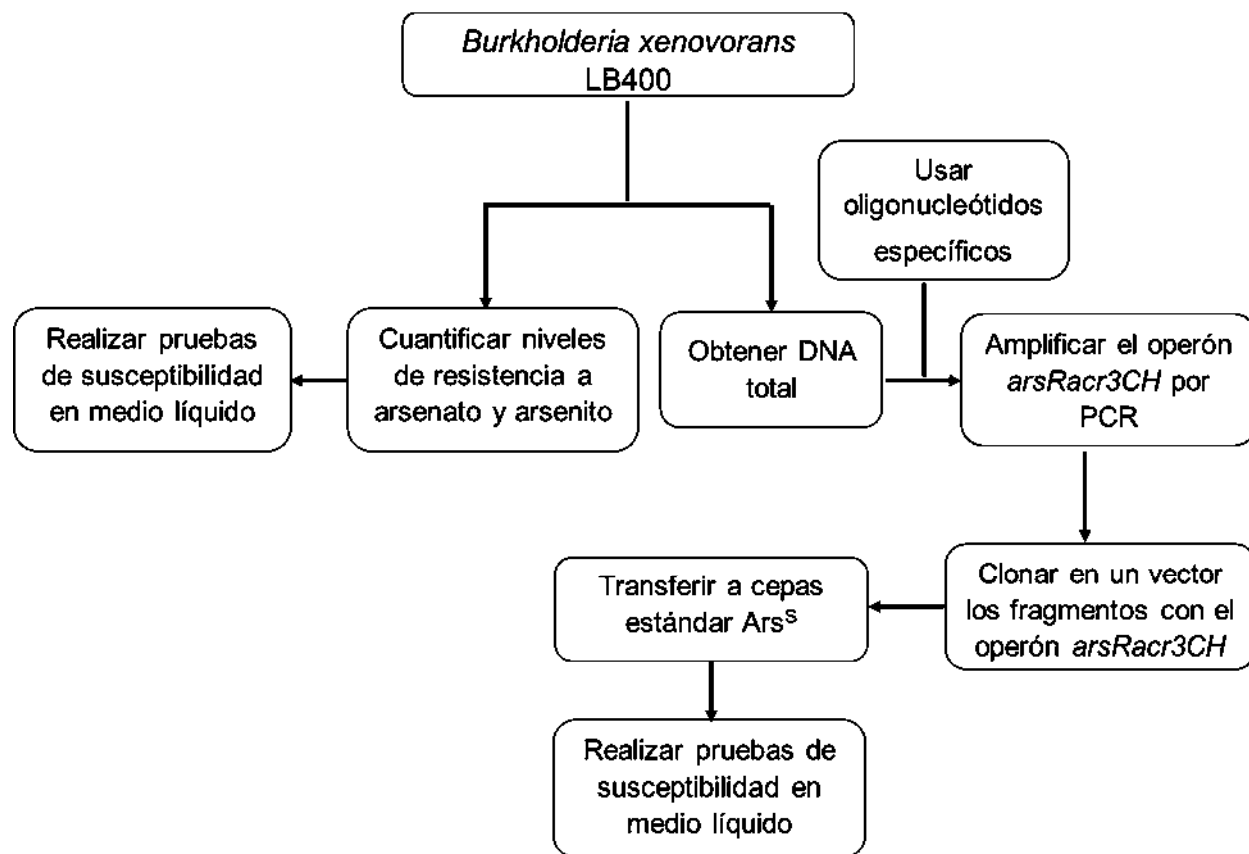
IV.- HIPÓTESIS

El operón *arsRacr3C* presente en el genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400 confiere resistencia a arsénico.

V.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400 en relación a la resistencia a oxianiones de arsénico.

VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



VII.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Reactivos y medios de cultivo

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

- ❖ Caldo nutritivo (CN): Extracto de carne 3.0 g, peptona de carne 5.0 g y agua destilada cbp 1 litro. Se utilizó para crecimiento de bacterias y para realizar pruebas de susceptibilidad a arsénico en medio líquido.
- ❖ Agar nutritivo: La misma preparación del caldo y se le agregaron 15 g/l de agar bacteriológico. Se utilizó para el crecimiento de *B. xenovorans* LB400 y *E. coli* JM101.
- ❖ Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%. Se empleó para crecimiento de bacterias para el aislamiento de DNA.
- ❖ Agar Luria Bertani (AL): Al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico. Se utilizó para crecer las bacterias luego de la transformación y para la resiembra de las mismas.

2.-Cepas empleadas

- ❖ *Burkholderia xenovorans* LB400 (Goris y col. 2004). Ceba que se empleó como control positivo de resistencia a arsénico y como donadora del DNA del operón *arsRacr3C*. Esta cepa fue donada por el Dr. Jesús Caballero Mellado † del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

La cepa de *E. coli* empleada como control sensible en las pruebas de susceptibilidad a arsénico y como cepa receptora en la transformación del plásmido recombinante fue la siguiente:

❖ JM101. supE, thi-1 Δ (lac-proAB) [F', traD36, proAB, laqIqZ Δ M15] (Yanisch-Perron y col. 1985).

3.- Vectores

Los vectores que se utilizaron son los siguientes:

- ❖ pJET 1.2/Blunt (Fermentas), para la recuperación de productos de PCR, con un número de copias de 500 a 700 (**Figura 11**).
- ❖ pUCP20. Vector que contiene un gen de resistencia a ampicilina y orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas* (West y col., 1994). En *E. coli* presenta un número de copias de alrededor de 500 y en *P. aeruginosa* 20 copias (**Figura 12**).

4.-Diseño de oligonucleótidos

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes que conforman el operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400 en la base de datos del NCBI para diseñar los oligonucleótidos a utilizar en los ensayos de PCR de acuerdo al esquema en la (**Figura 13**), de forma que se incluyeran las posibles secuencias promotoras y terminadoras del conjunto de genes. Para su diseño se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.1.

Los oligonucleótidos se diseñaron con un tamaño de 24 nucleótidos y con un porcentaje de G-C muy cercano entre el oligonucleótido directo y reverso y que

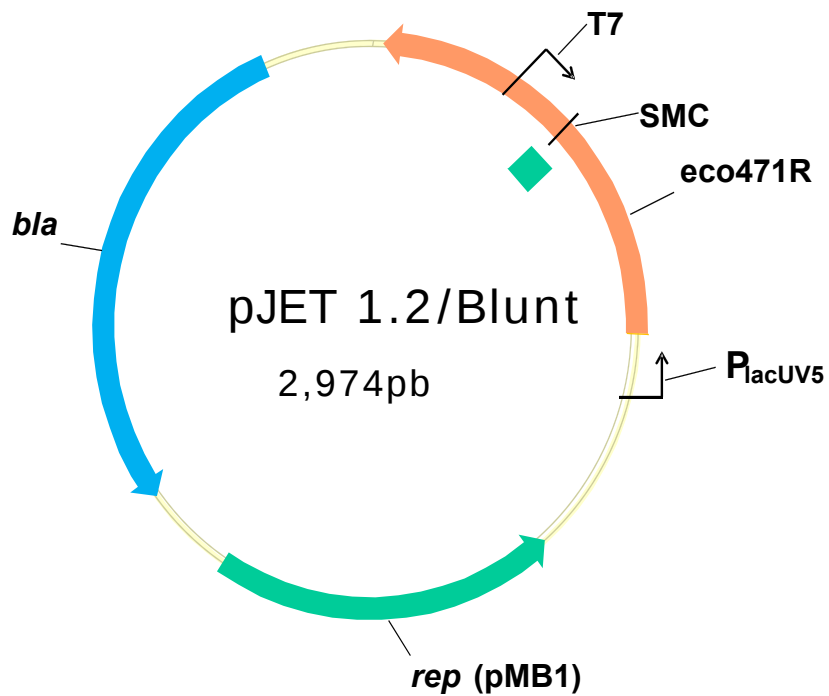


Figura 11.- Mapa del vector pJET 1.2/Blunt. El vector contiene el gen *bla* de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para *E. coli* rep (pMB1), el gen letal *eco471R* que permite la selección positiva de las transformantes con el inserto en el vector. También contiene el promotor T7 para la transcripción *in vitro* del inserto y el promotor PlacUV5 para la expresión del gen *eco471R* a un nivel suficiente para permitir la selección positiva y un sitio múltiple de clonación (SMC) (Fermentas).

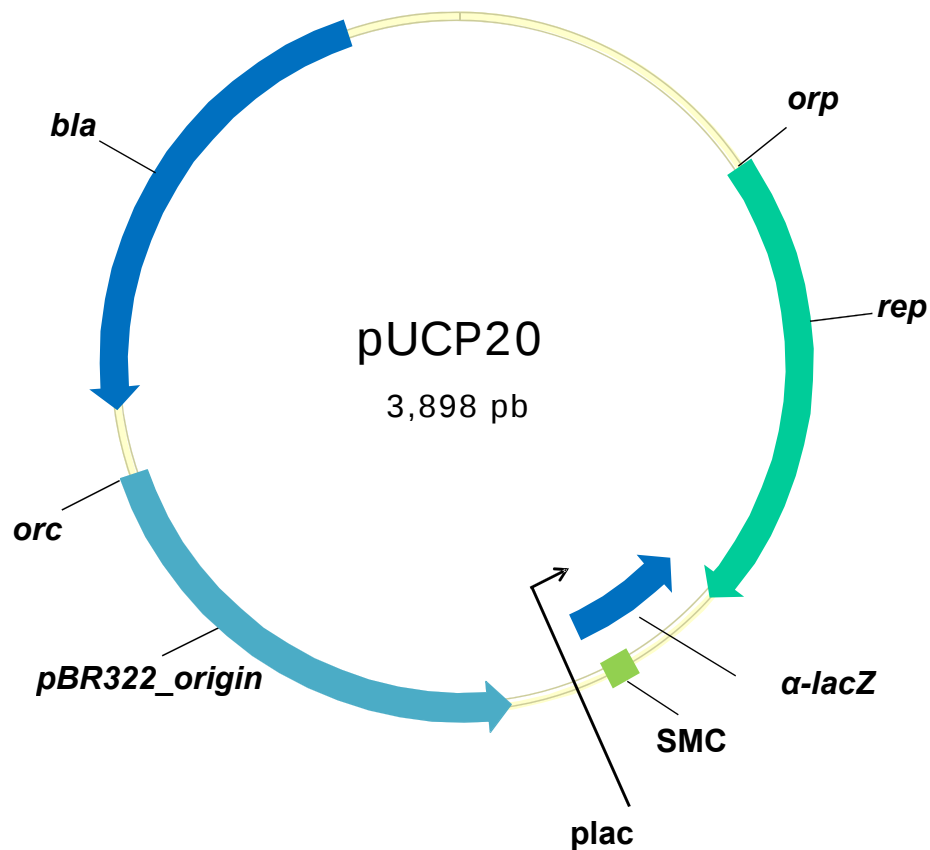


Figura 12.- Mapa del vector de expresión binaria pUCP20. El vector contiene el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 (*pBR322_origin*) y *P. aeruginosa* (*orp*); el gen *rep*, que codifica una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; α -*lacZ*, parte del gen que codifica la región amino terminal de la β -galactosidasa; el promotor *plac* y un sitio múltiple de clonación (SMC) (West y col., 1994).

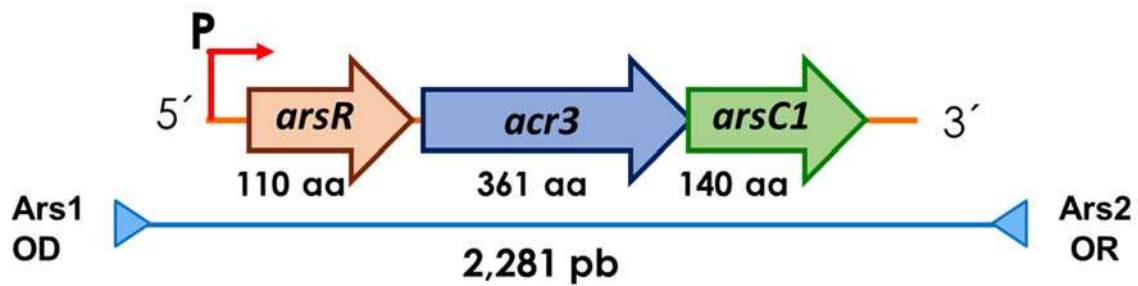


Figura 13.- Esquema del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400. Con flechas grandes se señala la dirección de la transcripción de los genes, su nombre correspondiente, así como el tamaño (aminoácidos, aa) del producto proteico predicho. Con flecha roja se indica la posible región promotora (P). En la parte inferior se indica la ubicación de los oligonucleótidos empleados para amplificar el operón y el tamaño en pares de bases (pb) del producto de amplificación esperado.

hubiera una G o C en cada uno de los extremos de los oligonucleótidos diseñados. El oligonucleótido directo se diseñó con un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI y el oligonucleótido reverso con un sitio para la enzima *Hind*III, dichos sitios de corte se utilizaron posteriormente en la subclonación del operón *arsRacr3C* (**Tabla 2**).

5.- Obtención de DNA total

Se obtuvo el DNA total de *B. xenovorans* LB400 mediante lisis por calentamiento de acuerdo al protocolo siguiente: se creció un cultivo de dicha cepa en caldo nutritivo por 30°C/24 h, con agitación constante. Se transfirieron 100 µl del cultivo a un tubo eppendorf, se centrifugó durante 3 min a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 50 µl de H₂O ultra pura estéril; posteriormente se incubó a 95°C durante 10 min y se colocó durante 5 min en hielo; se centrifugó de la misma manera y se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf estéril, desechando la pastilla.

6.- Análisis de plásmidos

6.1.- Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó mediante lisis alcalina por el método de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1989, descrito a continuación: Se creció un cultivo bacteriano en CL durante 18 h a 37°C con agitación constante de 220 rpm, se distribuyó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 2 min a 12, 000 rpm a temperatura ambiente. Enseguida se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µl de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8 y EDTA 10 mM, pH 8.0). Enseguida se le adicionaron 20 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para amplificar los genes del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans LB400*

Oligonucleótido	Secuencia	Enzima de restricción
Ars 1 Directo	5' GAT GCT <u>GGA TCC</u> TTA TCA GCA GAC 3'	<i>Bam</i> HI
Ars 2 Reverso	5' CTC GTT GCA <u>A AGC TTC</u> CTC ATA CAG 3'	<i>Hind</i> III

Se indica en negritas y subrayado el sitio de restricción adicionado, con las enzimas que se muestran en la columna de la derecha.

5 min. Posteriormente se agregaron 300 µl de la solución de lisis recién preparada de NaOH (hidróxido de sodio) 0.2N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1% [para 1ml: NaOH 2N:100µl; SDS 10%:100µl; y 800µl de agua destilada], se agitó suavemente y se colocó en hielo durante 10 min. Luego se adicionaron 200 µl de una solución de acetato de potasio 5M (acetato de potasio 5M y ácido acético glacial pH 4.8), se mezcló ligeramente y se colocó en hielo durante 10 min. Se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 µl de la mezcla fenol/cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa superior a la que se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mantuvo durante 20 min a -80°C. Se centrifugó durante 15 min a 12,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento 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 50 µl de agua desionizada estéril o agua HPLC. Se agregaron 5 µl de RNasa y se incubó a 37°C durante 30 min, posteriormente se inactivó durante 15 min a 65°C. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa (1%).

7.- Electroforesis en geles de agarosa

El DNA aislado se sometió a un corrimiento electroforético. Para ello se preparó un gel de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 1 mM). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, que contenía el mismo amortiguador. Una muestra de 5µl de DNA plasmídico se mezcló

con 2 µl de amortiguador de carga [azul de bromofenol al 0.05%: EDTA 0.1 M, pH 8.0; SDS 0.5%; sacarosa 40%] y se descargó en los orificios del gel.

La cámara se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus Corporation modelo EC452) y se sometió a un voltaje constante de 125 voltios durante ~30-40 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 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 se utilizó el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

8.- Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación del operón *arsRacr3C* por PCR, se utilizó DNA total de *B. xenovorans* LB400 como molde. La mezcla de reacción contiene 0.5 µl de DNA, 1 µl de oligonucleótidos (10 pmol/µl), 2.5µl de agua HPLC y 5µl de la mezcla de reacción Super Mix II (Promega) que contiene la enzima Taq polimerasa, cloruro de magnesio MgCl₂ y dNTPs a concentraciones optimizadas para obtener un volumen final de 10µl. Para este proceso se empleó un termociclador de gradiente MultiGene (Labnet international, Inc). Para las reacciones de PCR se usaron las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C/ 5min (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95°C/30 seg (desnaturalización), 55°C/30 seg (alineamiento), 72°C/3 min (extensión) y un ciclo final de 72°C/5 min.

9.- Aislamiento de DNA de geles de agarosa

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

se verificó en un gel de agarosa al 1% (p/v) comparando con el marcador de tamaño molecular de 1 kb.

10.- Tratamientos enzimáticos

Para realizar las técnicas de ligación del DNA y posterior clonación en un vector, el DNA fue sometido a diferentes tratamientos enzimáticos, los cuales se describen a continuación:

10.1.-Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt

Los productos de PCR se ligaron en el vector pJET 1.2/Blunt manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) empleando el kit comercial CloneJET™ PCR Cloning kit (Fermentas) siguiendo las indicaciones del proveedor.

10.2.-Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20

Los fragmentos de DNA purificados se ligaron con el vector pUCP20 manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando una unidad de la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.

10.3.- Restricción con endonucleasas

El DNA purificado se digirió utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por cada µg de DNA y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en geles de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

11.- Transformación por electroporación

11.1.- Preparación de células competentes de *E. coli* JM101

Para realizar la preparación de células competentes a emplear se realizó el siguiente protocolo: De un cultivo de la cepa de *E. coli* JM101 crecido en CL durante toda la noche se tomaron 4 ml para inocular 250 ml de CL contenidos en un matraz de 1L y se incubó durante 3 h a 37°C con agitación constante hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente se dejó el cultivo en hielo durante 20 min y se distribuyó en alícuotas en tubos para centrifugar durante 10 min a 6,000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó dos veces por resuspensión con agua estéril fría y se centrifugó entre cada lavado en las condiciones antes descritas. Después del último lavado la pastilla se resuspendió en agua estéril con glicerol al 20%. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 250µl en tubos de eppendorf de 1.5 ml. Estas células se utilizaron para la transformación o bien fueron almacenadas a - 80°C.

11.2.- Transformación

La transformación con DNA de los plásmidos recombinantes se realizó mediante el método de electroporación, que se describe a continuación:

Se utilizaron de 3-5 µl de una mezcla de ligación de DNA, la cual se adicionó a 100 µl de células competentes en un tubo eppendorf. La mezcla se situó entre los electrodos de una celda de electroporación fría. Se ajustó el micropulso a 1800 V, la celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador 2510 y se dio un pulso de 4-5 milisegundos. Inmediatamente la mezcla se transfirió a un tubo con 2 ml de CL precalentado y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación constante. Se tomaron 100

µl de la mezcla previamente concentrada y se distribuyó en cajas de AL con ampicilina (100 µg/ml).

12.-Pruebas de susceptibilidad a arsénico en medio líquido

De un cultivo de 4 ml de caldo nutritivo crecido durante la noche, a 30°C para las pruebas con LB400 y a 37°C para las pruebas en *E. coli*, se tomaron 40µl para inocular tubos de 4 ml con caldo nutritivo, adicionando concentraciones crecientes de arsenato de sodio o arsenito de sodio. Como control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo sin arsénico. Los tubos se incubaron durante 24 h a 30°C o 37°C respectivamente con agitación constante a 220 rpm y la susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm de los cultivos en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

VIII.- RESULTADOS

1.- Pruebas de susceptibilidad a arsénico de *B. xenovorans* LB400 en medio líquido

Con la finalidad de evaluar si los genes *ars* de *B. xenovorans* LB400 encontrados de manera preliminar son funcionales en la resistencia a arsénico, se realizaron pruebas de susceptibilidad a los oxianiones de arsénico empleando arsenito de sodio y arsenato de sodio; se empleó como control sensible a la cepa *E. coli* JM101, la cual, aunque tiene un operón *ars* que es funcional, se comporta de forma sensible a concentraciones bajas de los compuestos de arsénico. Como se puede observar en la **Figura 14A**, la cepa JM101 se inhibió a bajas concentraciones de arsenito, mostrando claramente que la cepa en estudio LB400 es más resistente, ya que crece a concentraciones más elevadas de este oxianión en comparación con JM101.

En la **Figura 14B** se observa el resultado de las pruebas de susceptibilidad a arsenato; se puede apreciar claramente que LB400 es más resistente ya que su crecimiento se mantiene a concentraciones elevadas de este oxianión. Por el contrario, JM101 se inhibe desde las primeras concentraciones utilizadas.

2.- Análisis *in silico* del operón *arsRacr3C*

Para determinar si el grupo de genes *ars* encontrados mediante el análisis preliminar se encuentran formando un operón, se realizó la búsqueda de regiones conservadas de elementos genéticos de regulación. Se identificaron elementos genéticos solamente de una región consenso -35 y -10 de un probable promotor tipo

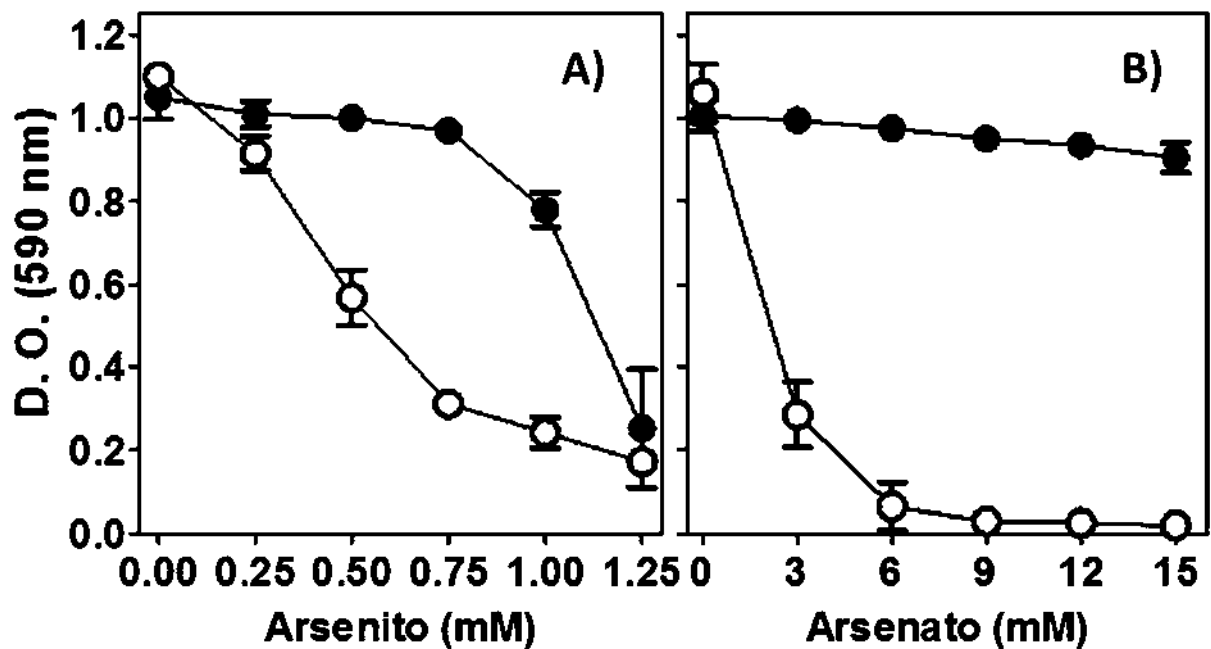


Figura 14.- Pruebas de susceptibilidad a arsenato y arsenito. Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 30°C y agitación constante a las concentraciones de arsenato y arsenito indicadas; después de ese tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. Cepas utilizadas, *E. coli* JM101(○) empleada como control sensible y *B. xenovorans* LB400 (■). Se muestran las barras de error estándar de la media n=5.

sigma 70 río arriba del gen *arsR* (**Figura 15**). No se encontraron secuencias promotoras en los genes adyacentes. Adicional a esto se observó que las regiones codificantes de los genes *acr3* y *arsC* se encuentran sobrepuestas por 4 nucleótidos. Lo que indica que muy probablemente el grupo de genes encontrados forman un operón.

Para evaluar el papel del operón *arsRacr3C* en la resistencia a arsénico, este grupo de genes se amplificó por PCR mediante las condiciones descritas en materiales y métodos, empleando los oligonucleótidos diseñados que se muestran en la **Tabla 1**. El producto amplificado se sometió a corrimiento electroforético observándose una banda de amplificación de aproximadamente 2.2 kb (**Figura 16**), que corresponde al tamaño esperado.

3.- Clonación en el vector pJET 1.2/Blunt

El fragmento de DNA del operón *arsRacr3C* amplificado por PCR se clonó en el vector pJET 1.2/blunt y el plásmido recombinante pJET_*arsRacr3C* (**Figura 17A**) se empleó para transformar las células competentes de *E. coli* JM101, como se describe en materiales y métodos. La presencia y el tamaño del inserto fueron verificados por digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, con las cuales se liberó una banda de aproximadamente 2.7 kb correspondiente al vector pJET linearizado y una banda de ~2.2 kb correspondiente al inserto del operón *arsRacr3C* (**Figura 17 B**). pJET tiene un sitio de corte para la enzima *Hind*III fuera

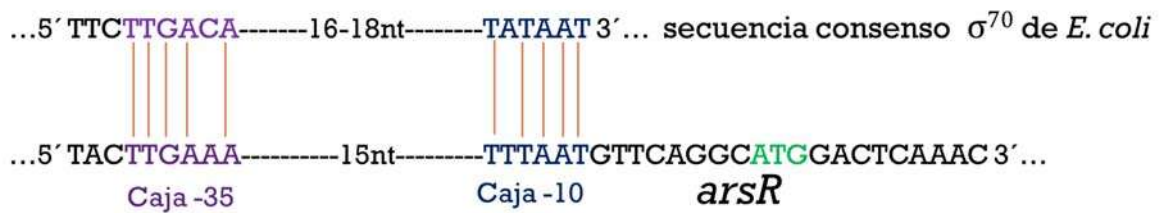


Figura 15.- Probable región promotora del operón *arsRacr3CH* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra parte de la secuencia río arriba del gen *arsR* donde se localizó la secuencia de la posible región promotora. Se muestra la comparación de la secuencia encontrada en el gen *arsR* de *B. xenovorans* LB400 con la secuencia consenso σ^{70} de *E. coli*, identificando las cajas -35 y -10 mostradas en el esquema. En color verde se indica el codón ATG que da inicio a la traducción.

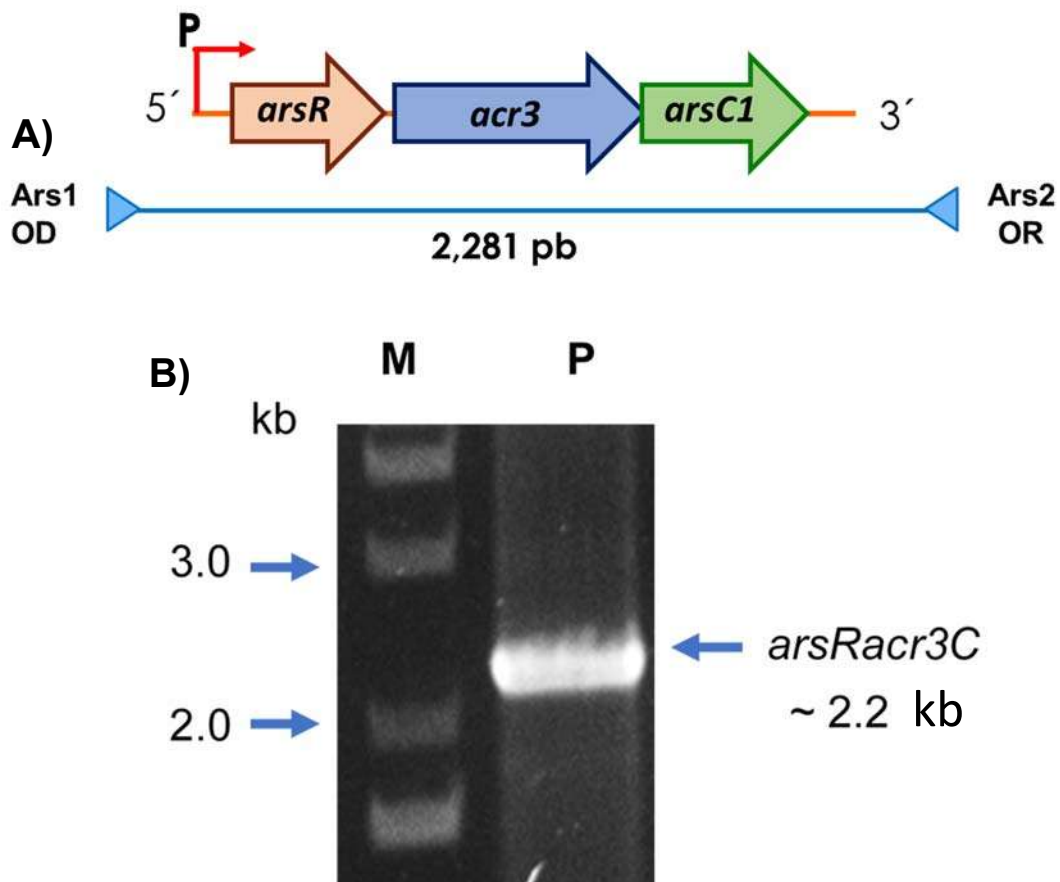


Figura 16.- Amplificación por PCR del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400. A) Esquema que representa el fragmento esperado (en pb) del operón *arsRacr3C*. **B)** Fotografía del gel de agarosa que muestra el fragmento del operón *arsRacr3C* amplificado por PCR. **M**, marcador de tamaño molecular (1 kb); **P**, producto de PCR. A la izquierda se indican los tamaños de las bandas del marcador utilizadas como referencia y a la derecha se indica el tamaño de la amplificación.

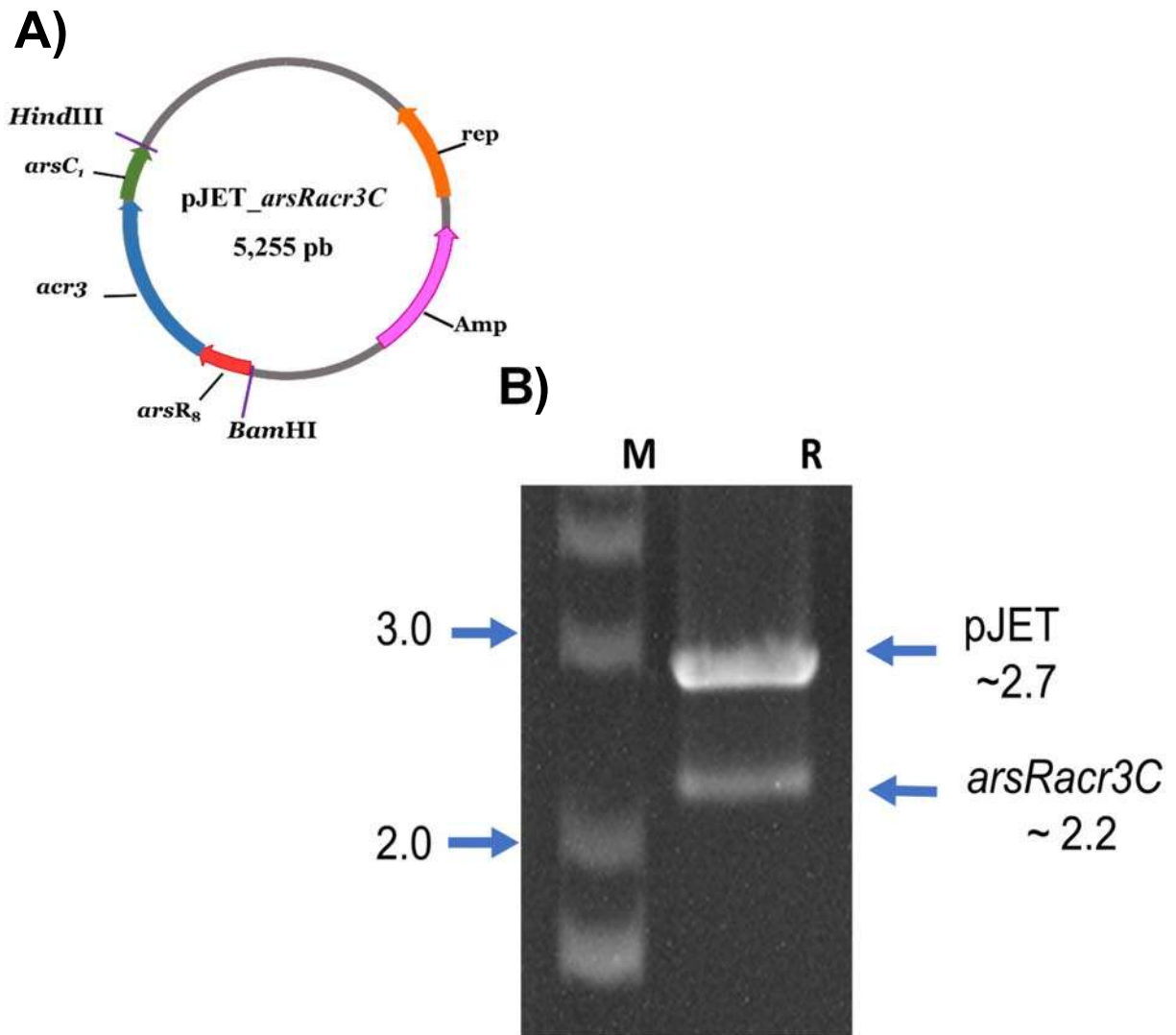


Figura 17.- Clonación del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400 en el vector pJET. A) Mapa genético del plásmido recombinante pJET_arsRacr3C. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. **B)** Caracterización del plásmido recombinante. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan dos bandas de los tamaños esperados; la superior correspondiente al vector pJET (~2.7 kb) e inferior correspondiente al operón *ars* (~2.2 kb). **M**, marcador de tamaño molecular de (1kb); **R**, producto de restricción con las enzimas *Bam*HI/ *Hind*III.

del sitio de clonación múltiple, a una distancia de 253 pb, por lo cual en el tratamiento con endonucleasas ese fragmento se pierde, sin alterar la funcionalidad.

4.-Subclonación del operón *arsRacr3C* en el vector pUCP20

Con la finalidad de determinar la funcionalidad del operón *arsRacr3C* en *E. coli* JM101, se realizó la subclonación del operón *arsRacr3C* en el vector de expresión binaria pUCP20. Para ello se realizó la digestión del plásmido pJET_*arsRacr3C* con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, liberando el inserto para de esta manera poder dirigir la ligación de los genes en el vector pUCP20 el cual se digirió con las mismas enzimas, de acuerdo al método descrito en Materiales y Métodos. Se obtuvo el plásmido recombinante pUC_*arsRacr3C* (**Figura 18 A**), el cual se empleó para transformar células competentes de *E. coli* JM101. La caracterización de este plásmido se realizó con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, con las cuales se liberó el vector pUC20 linearizado (~3.9 kb) y el inserto correspondiente al operón *arsRacr3C* (~2.2 kb) (**Figura 18 B**).

5.- Pruebas de susceptibilidad a arsénico de las transformantes con el operón *arsRacr3C*

Una vez que se caracterizó la transformante JM101 (pUC_*arsRacr3C*), se analizó su susceptibilidad a arsénico para evaluar si el operón *ars* está relacionado con el fenotipo de resistencia a este metaloide en *B. xenovorans* LB400. Para ello se realizaron ensayos de susceptibilidad a arsenito y arsenato en medio líquido, utilizando como control sensible el fondo genético *E. coli* JM101 (pUCP20). Los resultados obtenidos mostraron que la cepa JM101 (pUC_*arsRacr3C*) que posee el

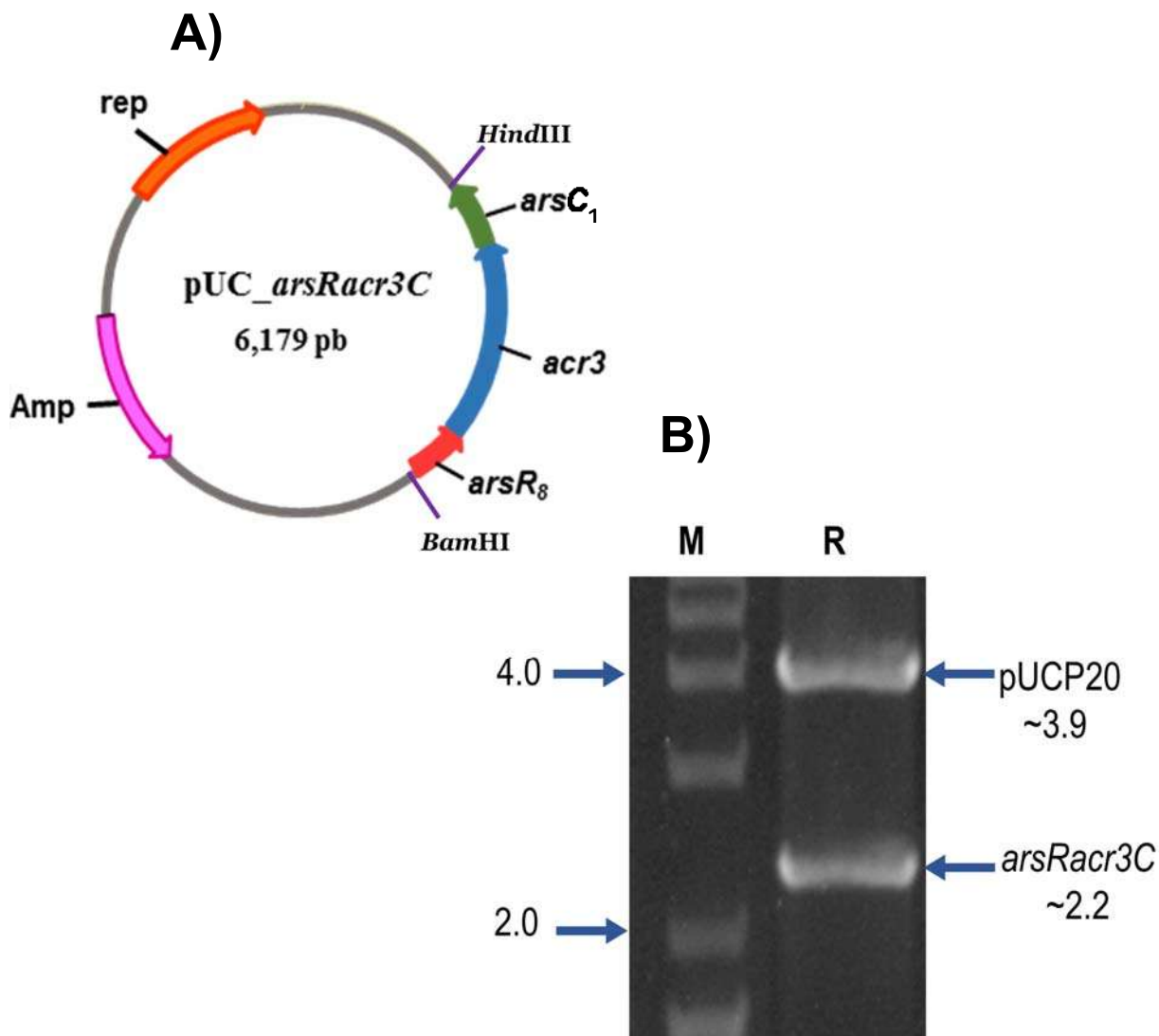


Figura 18.- Subclonación del operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400 en el vector pUCP20. A) Mapa genético del plásmido recombinante pUCP20_*arsRacr3C*. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. **B)** Caracterización del plásmido recombinante pUCP20_*arsRacr3C*. Se muestra fotografía del gel de agarosa, donde se observan dos bandas de los tamaños esperados; superior correspondiente al vector pUCP20 (~3.9 kb) e inferior correspondiente al operón *ars* (~2.2 kb). **M**, marcador de tamaño molecular de (1kb); **R**, producto de restricción con las enzimas *Bam*HI/ *Hind*III.

operón clonado, presenta resistencia a arsenato y arsenito (**Figura 19**). Como se puede observar en la **Figura 19A**, el nivel de resistencia de la cepa que contiene el operón es superior en comparación con la cepa utilizada como control ya que crece a concentraciones más elevadas de este oxianión. En la **Figura 19B** se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad a arsenato; la transformante *E. coli* (pUC_arsRacr3C) presentó un crecimiento mayor comparado con el control sensible, por lo cual la cepa transformante se puede considerar resistente a arsenato. La resistencia observada en la cepa transformante está directamente relacionada con la presencia de los genes del operón *arsRacr3C* de LB400.

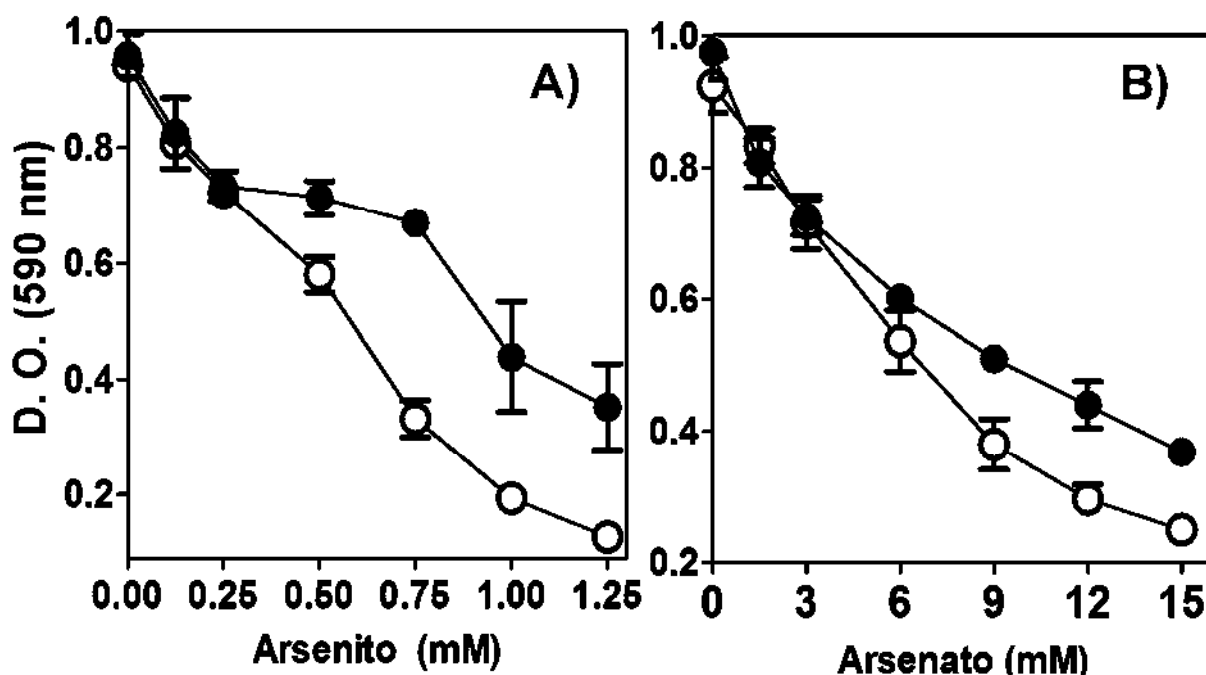


Figura 19.- Pruebas de susceptibilidad a arsenito y arsenato de *E. coli* JM101 transformada con el plásmido pUC_arsRacr3C. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo (CN) por 24 h a 37°C y agitación constante, a las concentraciones de arsenito de sodio y arsenato de sodio indicadas, *E. coli* JM101 (pUCP20) (○) empleada como control sensible y *E. coli* JM101 (pUC_arsRacr3C) (●). Se muestran las barras de error estándar de la media n=3.

IX.- DISCUSIÓN

Se considera que la presencia de arsénico en el medio ambiente es tan antigua como la formación de la tierra, por lo que los mecanismos de resistencia a los derivados tóxicos de este metaloide probablemente aparecieron desde las primeras formas de vida existentes (Oremland y col., 2009). Posiblemente sin los genes que conforman estos mecanismos la aparición de la vida como se conoce hoy en día en nuestro planeta no hubiese sido posible; estos sistemas de resistencia se encuentran distribuidos ampliamente en todas las formas de vida estudiadas (Zhu y col., 2014).

El sistema más representativo de resistencia a arsénico, y por lo tanto el más estudiado, es el operón bacteriano *ars* (Páez-Espino y col., 2009). Este sistema presenta diversos cambios y modificaciones en su estructura, pero siempre estando presentes los genes elementales que proporcionan la resistencia a arsénico; estos genes son *arsR*, *arsC* y *arsB/acr3* (**Figura 4**), los cuales se encargan de regular los sistemas de resistencia, así como reducir y expulsar compuestos de arsénico, respectivamente (Li y col., 2014). Como se mencionó anteriormente, los genes *ars* se encuentran ampliamente distribuidos en plásmidos y cromosomas; como ejemplo se pueden mencionar los reportados en la **Tabla 1**.

Mediante análisis filogenéticos se han reportado algunos genes *ars* presentes en cepas del genero *Burkholderia*, aunque no han sido analizados a nivel molecular (Li y col., 2014). Sin embargo, no se han reportado genes *ars* en la cepa en estudio, *B. xenovorans* LB400, la cual es una bacteria muy interesante ya que fue aislada de un ambiente contaminado. Además, posee un genoma relativamente grande en

comparación con otras bacterias como *E. coli* la cual tiene un genoma de 4.6 Mpb y *P. aeruginosa* cuyo genoma es de 6.2 Mpb solo por mencionar algunas (Madigan y col., 2009). El genoma de LB400 es de 9.73 Mpb distribuidos en tres replicones y presenta una redundancia de genes del 17.6% (porcentaje alto, comparado con el promedio de redundancia génica en bacterias el cual es de 7.6%) (Marx y col., 2004; Chain y col., 2006). En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado a LB400 por sus múltiples genes relacionados con la resistencia a cromato (Acosta-Navarrete y col., 2014; Reyes-Gallegos y col., 2016).

León-Márquez en 2009 demostró que la cepa LB400 es resistente a cromato, además de que los genes *chr* confieren resistencia a cromato cuando son transferidos a cepas de *E. coli*. Acosta-Navarrete en 2014 evaluó la expresión de los genes *chr* mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real, encontrando que dichos genes presentan diferentes niveles de expresión entre sí. Adicionalmente, se determinó que *chrA2* presente en el operón *chrBACF* fue el único que aumentó su nivel de expresión cuando se adicionó cromato al medio de cultivo; por ello se sugirió que el gen *chrA2* es el principal responsable de la resistencia a cromato en *B. xenovorans* LB400 (Acosta-Navarrete y col., 2014). Reyes-Gallegos en 2016 realizó la interrupción del gen *chrA2*, encontrando que la resistencia a cromato en LB400 se vio significativamente disminuida. Por ello se concluyó que el gen *chrA2* es el principal responsable de la resistencia a cromato en esta bacteria (Reyes-Gallegos y col., 2016). Debido al alto porcentaje de redundancia genética que presenta LB400, esta bacteria puede colonizar diversos ambientes perturbados con

compuestos tóxicos como los bifenilos policlorados (Chain y col., 2006) o bien con compuestos de cromo (Acosta-Navarrete y col., 2014; Reyes-Gallegos y col., 2016).

Es por ello que se pensó que también podría contener en su genoma genes relacionados con la resistencia a arsénico; para ello, Reyes-Gallegos en 2016 realizó una búsqueda preliminar de genes *ars* encontrando un total de 14 genes probablemente relacionados con dicha resistencia (**Figura 10**). Entre estos se encuentra un conjunto de genes que forman un probable operón, *arsRacr3CH*, el cual podría conferir resistencia a compuestos de arsénico, como se ha reportado en numerosos estudios de operones *ars* (**Tabla 1**).

Posteriormente, Serrato-Gamiño en 2017 realizó un análisis BLAST para corroborar los genes encontrados de manera preliminar y analizar el genoma de LB400 en búsqueda de genes *ars* adicionales relacionados con el fenotipo de resistencia en LB400. Sin embargo, no se identificaron nuevos genes *ars* adicionales a los ya reportados; por el contrario, se reorganizaron los encontrados previamente ya que la proteína codificada por el gen que inicialmente se denominó *arsB1* presente en el cromosoma 1 (*orfA1054*) no presentó un porcentaje de identidad significativo con las proteínas con las que fue comparada, por lo cual se descartó dicho gen. Así mismo, el gen que inicialmente se denominó *arsB2* (*orf B0303*), el cual se encuentra formando parte del posible operón, se encontró que forma parte de la familia de los transportadores de arsenito tipo *acr3*, así que se le reasignó dicho nombre. Finalmente quedaron 13 genes distribuidos entre el cromosoma 1 y 2; ocho genes *arsR*, un gen *acr3*, un gen *arsB*, dos genes *arsC* y un gen *arsH* (**Figura 10**), los

cuales probablemente se encuentran relacionados con el fenotipo de resistencia a arsénico de LB400.

Entre los genes *ars* identificados se encuentra el posible operón *arsRacr3CH*, formado por los genes: *arsR* (*orf B0304*), *acr3* (*orf B0303*), *arsC* (*orf B0302*) y *arsH* (*orf B0301*), todos localizados en el cromosoma 2. Se piensa que este grupo de genes adyacentes se encuentran formando un operón ya que el gen *arsR* puede codificar un regulador transcripcional que podría regular a los genes contiguos, además de que los genes *acr3* y *acrC* se encuentran traslapados por cuatro nucleótidos; por otra parte, los genes *arsC* y *arsH* se encuentran traslapados por un nucleótido. Por estas características la expresión de este grupo de genes podría estar regulada por el producto del gen *arsR*.

Para el presente trabajo, el gen *arsH* presente en el probable operón se descartó ya que se presentaron algunos problemas en el momento de cortar y purificar la banda que se obtuvo de la restricción enzimática del plásmido pJET_*arsRacr3CH*, para posteriormente realizar la subclonación en el vector pUCP20. Esto ocurrió probablemente debido a que el tamaño del vector pJET es de ~2.7 kb y el tamaño del inserto correspondiente al operón *arsRacr3CH* es de ~2.9 kb, por lo que no se lograron separar las bandas en el gel de agarosa lo suficiente como para realizar el corte del fragmento correspondiente al operón *arsRacr3CH*. Además, se ha reportado que el gen *arsH* está relacionado con la resistencia a organoarsenicales, ya que codifica para una metilarsenito oxidasa (Chen y col., 2015; Yang y Rosen, 2016); por lo tanto, el hecho de que se encuentre ausente en la construcción

pUC_arsRacr3C probablemente no influye en el nivel resistencia que puede proporcionar el operón *arsRacr3C* frente a compuestos inorgánicos de arsénico.

Antes que nada, para determinar si la cepa LB400 presenta resistencia a arsénico, se realizaron pruebas de susceptibilidad en medio líquido. Primeramente, se buscaron las concentraciones de los oxianiones de arsénico, arsenato de sodio y arsenito de sodio que se utilizarían para dichas pruebas, así como una cepa que presentara un fenotipo de sensibilidad a dichos oxianiones (arsenato de sodio y arsenito de sodio) para utilizarla de referencia y ver el nivel de resistencia de LB400 a los oxianiones de arsénico; de las cepas del laboratorio disponibles se seleccionó la que presentó mayor sensibilidad (resultados no mostrados).

Se determinó utilizar como control sensible a la cepa *E. coli* JM101 ya que a pesar de que posee un operón sencillo *arsRBC*, se comporta de manera sensible en concentraciones bajas de ambos oxianiones. Se observó que *B. xenovorans* LB400 presenta un fenotipo de resistencia en comparación con la cepa utilizada como control. En la **Figura 14A** se muestra el resultado obtenido de las pruebas de susceptibilidad a arsenito y se aprecia claramente como la cepa control JM101 presentó disminución en su crecimiento desde las concentraciones más bajas (0.25 mM a 0.5 mM) del oxianión; por el contrario, LB400 mantiene su crecimiento a concentraciones más elevadas de dicho oxianión (1.0 mM). En la **Figura 14B** se muestra el resultado de las pruebas de susceptibilidad a arsenato, donde se observa claramente el fenotipo de sensibilidad de JM101 ya que su crecimiento se inhibe desde la concentración más baja utilizada (3 mM); por el contrario, la cepa LB400 mantiene su crecimiento sin presentar inhibición inclusive a la concentración más

elevada del oxianión utilizado que fue (15 mM). Con esto se concluye que la cepa LB400 es resistente tanto a arsenito como a arsenato, probablemente por los genes *ars*. Adicional a esto se observó que el As(III) es aproximadamente 10 veces más tóxico en comparación con As(V), lo cual ya se ha observado con anterioridad (Rangel y col., 2014;) .

Para que un grupo o conjunto de genes bacterianos sea considerado como operón, en su mayoría deben estar regulados bajo un mismo promotor, en ausencia de un represor o en presencia de un inductor (Yaniv, 2011). La identificación de genes que se agrupan en operones en genomas bacterianos puede ampliar nuestro conocimiento acerca de la regulación génica y la función que dichos genes desempeñan (Hodgman, 2000). Por lo cual se realizó un análisis *in silico* para la búsqueda de probables secuencias promotoras en los genes del operón *arsRacr3C* encontrando sólo una probable región promotora río arriba del gen *arsR* (**Figura 15**). Se encontró que dicho promotor presenta similitud con las secuencias consenso reconocidas por el factor $\sigma 70$ de *E. coli*, el cual es un factor ampliamente estudiado ya que se encarga de dirigir el inicio de la transcripción durante la fase de crecimiento constitutivo **y del metabolismo primario**, es decir sin condiciones de estrés en el medio (Terrance y Burgess, 1998).

El promotor encontrado tiene un alto grado de conservación con los reconocidos por $\sigma 70$ ya que presenta 5 nucleótidos idénticos en las cajas -35 y -10, así como un nucleótido de diferencia en el total de nucleótidos correspondientes a la región espaciadora de ambas cajas. Esto indica que probablemente el grupo de genes *arsRacr3C* se encuentran regulados por el promotor encontrado. Sin embargo, para

corroborar que el grupo de genes que se piensa están formando un operón están regulados bajo el promotor encontrado, se deberán realizar ensayos de RT-PCR para determinar si dichos genes se expresan a través de un RNAm policistrónico como lo reportado por (Acosta-Navarrete y col., 2014) donde se determinó que el operón *chrBACF* relacionado con la resistencia a cromato se expresa a través de un RNA policistrónico.

Para evaluar el papel del operón *arsRacr3C* en la resistencia a arsénico, primero se realizó su amplificación por PCR, empleando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 2**. Posteriormente se realizó la clonación del fragmento amplificado en el vector pJET 1.2 Blunt (**Figura 17A**), el cual se utiliza para la recuperación de productos de PCR. Después se realizó la subclonación del operón *arsRacr3C* en el vector pUCP20, el cual es un vector de expresión (**Figura 18A**). Después de llevar a cabo la caracterización del plásmido recombinante, éste se transfirió a la cepa de *E. coli* JM101, para evaluar el fenotipo de resistencia que confiere dicho operón. Para ello se realizaron pruebas de susceptibilidad en medio líquido, empleando caldo nutritivo y concentraciones crecientes de arsenito y arsenato.

En la **Figura 19A** se muestra el resultado de las pruebas de susceptibilidad a arsenito, observando un fenotipo de resistencia en la cepa transformante *E. coli* JM101 (pUC_arsRacr3C), ya que su crecimiento no se ve inhibido a concentraciones altas de este oxianión (1.25 mM) en comparación con la cepa JM101 (pUCP20) (cepa con el vector vacío) que presenta una disminución de su crecimiento desde las concentraciones más bajas (0.25 mM a 0.5 mM) hasta llegar a su inhibición total. En la **Figura 19B** se muestra el resultado de las pruebas de

susceptibilidad a arsenato, observando un fenotipo de resistencia moderada por parte de la cepa transformante *E. coli* JM101 (pUC_arsRacr3C), ya que presenta crecimiento mayor y logra mantenerse a niveles altos de arsenato (15 mM), en comparación con el control JM101 (pUCP20). La resistencia de la cepa JM101 a ambos oxianiones de arsénico se puede atribuir sin lugar a dudas a la presencia del operón *arsRacr3C* de LB400.

El nivel de resistencia a arsénico conferido por el operón *arsRacr3C* de *B. xenovorans* LB400 en *E. coli* JM101 (**Figura 19**) fue menor al observado en el ensayo de susceptibilidad de LB400 (**Figura 14**), por lo que se puede sugerir que los genes *ars* presentes en el genoma de LB400, que no se encuentran formando parte del operón, pueden estar implicados en conferir un mayor nivel de resistencia a oxianiones de arsénico. Ya que LB400 posee en su genoma un gen *arsB* que codifica una proteína transportadora de As(III) y otro gen *arsC* el cual codifica una arsenato reductasa citoplasmática; dichos genes se encuentran de forma individual en el cromosoma 2. Adicional a estos, se encuentran siete genes *arsR* independientes al codificado en el operón *arsRacr3C*; dichos genes podrían codificar posibles reguladores transcripcionales y podrían funcionar bajo condiciones diferentes de crecimiento.

Se han reportado cepas bacterianas con más de un operón *ars* o bien con genes relacionados con la resistencia a arsénico que no se encuentran formando parte de operones (Mateos y col., 2008; Zhao y col., 2015). Estos genes pueden presentar diferentes niveles de expresión de acuerdo al nivel de arsénico en el medio de cultivo, o bien participan de manera conjunta para proporcionar un elevado nivel de

resistencia, como se ha reportado en *Rhodopseudomonas palustris* cepa que fue aislada de un ambiente contaminado con derivados de arsénico (Zhao y col., 2015). Esta cepa ha sido ampliamente estudiada por su versatilidad metabólica, que la hace ser una bacteria útil en el tratamiento de aguas residuales, biorremediación, producción de hidrógeno y generación de electricidad (Zhao y col., 2015). O bien en el caso de *Ochrobactrum tritici* cepa aislada del suelo (Branco y col., 2009) se ha reportado su resistencia a compuestos de arsénico, debido a la presencia de múltiples genes *ars* los cuales se encuentran formando operones; se ha descrito la presencia de los genes *arsB* y *acr3* mostrando fenotipos diferentes en cuanto a la resistencia conferida a los compuestos de arsénico probados: *arsB* parece desempeñar un papel crucial en la resistencia a concentraciones elevadas de arsénico, mientras que *acr3* confiere resistencia pero a concentraciones bajas de arsénico (Branco y col., 2009).

En el presente estudio, el operón *arsRacr3C* de LB400 presenta el gen *acr3*, y no el gen *arsB* por esta razón posiblemente se observa un fenotipo de resistencia a arsénico moderado (**Figura 19**). El fenotipo de resistencia a arsénico en LB400 podría estar complementado por la proteína ArsB que se encuentra codificada en el cromosoma 2 ya que podría estar involucrada en una expulsión más eficiente de As(III). Al igual que la presencia de una proteína ArsC adicional, podría estar implicada en un nivel de reducción de As(V) más eficiente y por ello conferir un nivel de resistencia a arsénico mayor en LB400. Por otra parte, la presencia de múltiples genes *arsR*, de los cuales hasta el momento no se ha estudiado su función o bajo qué condiciones se expresan dichos genes de tal manera que podrían tener un

efecto sobre el nivel de resistencia a arsénico en LB400. Por lo cual resulta interesante hacer un estudio más amplio sobre los genes *ars* adicionales a los encontrados en el operón, así como probar la funcionalidad del operón *arsRacr3C* en una cepa arsénico sensible del género *Burkholderia*, para evaluar la funcionalidad del mismo, y observar el nivel de resistencia a arsénico que presenta en un huésped de su mismo género o bien realizar la interrupción del operón *arsRacr3C* en LB400 y evaluar el fenotipo de resistencia que se obtiene en la mutante con el operón deletado.

Sin embargo, el operón *arsRacr3C* al ser transferido a un huésped heterólogo como lo es *E. coli* JM101, es funcional, observándose un fenotipo de resistencia superior al de la cepa utilizada como control. Este hallazgo es de relevancia ya que se demostró que los genes *ars* encontrados en una cepa del género de *Burkholderia* son funcionales y confieren resistencia a compuestos de arsénico.

Los resultados obtenidos son importantes al tratarse de una bacteria como LB400, que posee un genoma relativamente grande y que fue aislada de un ambiente contaminado con bifenilos policlorados, por lo cual posee la capacidad de degradar dichos compuestos (Chain y col., 2006). Por otra parte LB400, tiene una redundancia de genes bastante elevada 17.6% y el promedio de redundancia génica en bacterias es de 7.6%; dicha redundancia está directamente relacionada con la capacidad de adaptación de una bacteria a ambientes contaminados con diversas sustancias tóxicas (Marx y col., 2004; Chain y col., 2006). En el caso de LB400, resulta interesante evaluar el fenotipo de resistencia que presenta a otros compuestos tóxicos entre ellos cromo y arsénico; en el caso de la resistencia a

cromato ésta ya fue demostrada por Acosta-Navarrete y col., (2014) y Reyes-Gallegos y col., (2016). Por ello ahora resulta importante estudiar con detalle el papel de los genes *ars* encontrados para evaluar su funcionalidad con respecto a sustancias tóxicas derivadas del arsénico y poder comprender mejor las interacciones de LB400 en ambientes que presentan contaminantes tóxicos derivados de este metaloide.

X.- CONCLUSIÓN

Los genes *ars* presentes en el operón *arsRacr3C* del cromosoma 2 de *B. xenovorans* LB400 confieren resistencia a los oxianiones de arsénico en un huésped heterólogo, sugiriendo que la arsenato reductasa y el transportador de membrana son funcionales en la cepa receptora.

XI.- REFERENCIAS

1. Achour, A. R., Bauda, P. y Billard, P. (2006). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol.* 158: 128-137.
2. Acosta-Navarrete, Y. M., León-Márquez Y. L., Salinas-Herrera, K., Jácome-Galarza, I. E., Meza-Carmen, V., Ramírez-Díaz, M. I., y Cervantes, C. (2014). Expression of the six chromate ion transporter homologues of *Burkholderia xenovorans* LB400. *Microbiology* 160: 287-295.
3. Aguilar-Barajas E., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas. H y Cervantes, C. (2010) Heavy metal resistance en Pseudomonads. In: Ramos J, Filloux A (Eds.). *Pseudomonas*, Volumen 6, Springer, pp. 255-282.
4. Ajees, A. A., Yang, J. y Rosen, B. P. (2011). The ArsD As(III) metallochaperone. *Biometals* 24: 391-399.
5. Bedard, D., L., Unterman, R., Bopp, L., Brennan, MJ., Haberl, M.L. y Johnson, C. (1986). Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinate biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 761-768.
6. Bhattacharjee, H., Mukhopadhyay, R., Thiagarajan, S., y Rosen, B. P. (2008). Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids. *J. Biol.* 7: 33.
7. Bienert, G. P., Schüssler, M. D. y Jahn, T. P. (2007). Metalloids: essential, beneficial or toxic? major intrinsic proteins sort it out. *Trends Biochem. Sci.* 33: 20-26.
8. 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* SCII24^T. *BMC Microbiology* 8: 95.
9. Burkholder, W. H. (1948). Bacteria as plant pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2:389-412.
10. Butcher, B. G., Deane, S. M. y Rawlings, D. E. (2000). The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1826-1833.
11. Cai, J., Salmon, K. y DuBow, M. S. (1998). A chromosomal *ars* operon

- homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. Microbiology 144: 2705-2713.
12. Castillo, M. (1996). La ciencia de los filósofos. Universidad de Sevilla. 91-106.
 13. Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J. L., Silver, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. Rev. Latinoam. Microbiol. 15: 355-367.
 14. Chain, P.S.G., Denef, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulló, L., Latorre-Reyes, V., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthalingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J. J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Jun Sul, W., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B. y Tiedje, J.M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:15280-15287.
 15. Chen, J., Bhattacharjee, H. y Rosen, B.P. (2015). ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. Mol. Microbiol. 96: 1042-1052.
 16. Chuaire, L. y Cediell, J. F. (2008). Paul Ehrlich: de las balas mágicas a la quimioterapia. Colombia Médica 39: 291-295.
 17. Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R. y DuBow., M. S. (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 177: 2050-2056.
 18. Estrada-de los Santos, P., Rojas-Rojas, F.U., Tapia-García, E. Y., Vásquez-Murrieta, M. S. y Hirsch, A. M. (2015). To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. Ann. Microbiol. 66: 1303-1314.
 19. Gillis, M., Tran Van, V., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T. y Fernández, M. P. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 274-289.
 20. Hodgman, T. C. (2000). A historical perspective on gene/protein functional

- assignment. *Bioinformatics* 16:10-15.
21. Ji, G. y Silver, S. (1992). Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. *J. Bacteriol.* 174: 3684-3694.
 22. León-Marquez Y. L., Ramírez-Díaz M. I. y Cervantes, C. (2011) Clonación y expresión funcional de proteínas bacterianas de la familia LCHR. *Ciencia Nicolaita* 53: 36-47.
 23. Li, X., y Krumholz, L. R. (2007). Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* Gene. *J. Bacteriol.* 189: 3705-3711.
 24. Li, X., Zhang, L. y Wang, G. (2014). Genomic evidence reveals the extreme diversity and wide distribution of the arsenic-related genes in *Burkholderiales*. *PLOS ONE* 9: 1-11.
 25. Lin, Y. F., Yang, J. y Rosen, B. P. (2007). ArsD: an As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39: 453-458.
 26. López-Maury, L., Florencio, F. J. y Reyes, J. C. (2003). Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 185: 5363-5371.
 27. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Paul, D. V. y Clark, D. P. (2009). *Brock Biología de los Microorganismos*. 12ª edición. Prentice-Hall. Madrid. 13: 379-403.
 28. Markowska, K., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migocka, M., Wawrzycka, D. y Wysocki, R. (2015). Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H⁺ antiporter. *Mol. Microbiol.* 98: 162-174.
 29. Marx, C. J., Miller, J. A., Chistoserdova, L., y Lidstrom, M. E. (2004). Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungorum* LB400. *J. Bacteriol.* 186: 2173-2178.
 30. Mateos L. M., Ordóñez. E., Letek. M. y Gil. M. A. (2006). *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int. Microbiol.* 9: 207-215.

31. Mukhopadhyay, R., Bhattacharjee, H. y Rosen, B.P. (2014). Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 1583-1591.
32. Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T. y Silver, S. (2002). Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 311-325.
33. Oremland, R. S., Saltikov, C. W., Wolfe-Simon, F. y Stolz. J. F. (2009) Arsenic in the evolution of earth and extraterrestrial ecosystems. *Geomicrobiol. J.* 26:522-536.
34. Páez-Espino, D., Tamames, J., De Lorenzo, V. y Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *BioMetals* 22: 117-130.
35. Rangel, M. E. A., Montañez, H. L. E., Luévanos, M. P. y Balagurusamy, N. (2015) Impact of arsenic on the environment and its microbial transformation. *Terra Latinoamericana* 33: 103-118.
36. Recio-Vega, R., Gonzalez-Cortes, T., Olivas-Calderon, E., Lantz, R. C., Gandolfi, A. J., y Gonzalez-De Alba, C. (2015). In utero and early childhood exposure to arsenic decreases lung function in children. *J. App. Toxicol.* 35: 358-366.
37. Rosen, B. P. (1999). Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* 7: 207-212.
38. Saltikov, C. W., Cifuentes, A., Venkateswaran, K. y Newman, D. K. (2003). The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2800-2809.
39. Terrance M. A. y Burgess R. R. (1998). Localization of a $\sigma 70$ Binding Site on the N Terminus of the *Escherichia coli* RNA Polymerase β' Subunit*. *J. Biol. Chem.* 273: 31381- 31387.
40. Thomas D. J. (2010). Arsenolysis and thiol-dependent arsenate reduction. *Toxicol. Sci.* 117: 249-252.

41. Wang, G., Kennedy, S. P., Fasiludeen, S., Rensing, C. y DasSarma, S. (2004). Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. J. Bacteriol. 186: 3187-3194.
42. Wang, L., Chen, S., Xiao, X., Huang, X., You, D., Zhou, X. y Deng, Z. (2006). *arsRBOCT* arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3738-3742.
43. Yaniv M. (2011). The 50th anniversary of the publication of the operon theory in the Journal of Molecular Biology: past, present and future. J. Mol. Biol. 409: 1-6.
44. Zhao, C., Zhang, Y., Chan, Z., Chen, S. y Yang. S. (2015). Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. Front. Microbiol. 6: 1-8.
45. Zhu, Y-G., Yoshinaga, M., Zhao, F. J. y Rosen, B. P. (2014). Earth abides arsenic biotransformations. Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 42: 443-467.