

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Tesis

**Análisis de la Expresión de los Genes *chr*
de *Burkholderia xenovorans* LB400**

Para obtener el grado de maestro en

Biología Experimental

Presenta

Q.F.B. Maurino Luna Luna

Asesor: D.C. Carlos Cervantes Vega

Morelia, Mich., Noviembre 2010

AGRADECIMIENTOS

Al DC. Carlos Cervantes Vega:

Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y ser un ejemplo de disciplina y dedicación.

A mis sinodales:

Jesús Campos García, Joel López Meza, Gustavo Santoyo Pizano y Martha Isela Ramírez Díaz por sus valiosos comentarios para el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio:

MC. Eréndira, Selene, María Esther, Amada, Yhoana, Rene, Luis, Gustavo, Paulina, Milagros, Lupita por todo su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A Karina:

Por todo el trabajo que con gran dedicación realizó bajo mi supervisión y que fue muy importante para la culminación del proyecto. Espero te haya sido de provecho para tu aprendizaje.

DEDICATORIA

A mis padres:

Maurino y Teresa por regalarme la vida y hacerme una persona de bien.

A mis hermanos:

Manuel, Tomas, Antonio, Cristobal, Joaquín, Cristina, Teresa y Adriana por su apoyo incondicional y por estar siempre cuando los necesito.

A mis sobrinos:

Roberto, Cruz, Cristina y Jesús porque son la luz que ha iluminado nuestra familia.

A mis cuñados:

Lupe, Teresa y Cesar por formar parte de nuestra familia.

A Paula:

Por todo el amor, consejos, paciencia y el apoyo que me has brindado, eres un pilar importante en mi vida. Gracias por todo flaca.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Propiedades químicas del cromo.....	1
2. Propiedades biológicas del cromato.....	1
a) Transporte de cromato en bacterias.....	1
b) Efectos tóxicos del cromo(VI).....	3
3. Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato.....	3
a) Expulsión transmembranal de cromato.....	3
4. Superfamilia CHR.....	4
5. <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	7
6. Redundancia génica y funcional.....	9
II. ANTECEDENTES.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVO GENERAL.....	15
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	16
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. Reactivos y medios de cultivo.....	17
2. Cepas empleadas.....	17
3. Plásmidos empleados.....	18

4. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes de interés.....	18
5. Purificación de DNA total.....	18
6. Amplificación por PCR.....	20
7. Aislamiento de DNA plasmídico.....	20
8. Electroforesis en geles de agarosa.....	21
9. Aislamiento de DNA de geles de agarosa.....	21
10. Tratamientos enzimáticos del DNA.....	21
a) Restricción con endonucleasas.....	21
b) Ligaciones.....	22
11. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación.....	22
a) Preparación de células competentes.....	22
b) Transformación.....	23
c) Pruebas de susceptibilidad a cromato.....	23
12. Inducción de la resistencia a cromato.....	23
13. Aislamiento de RNA.....	23
a) Tratamiento enzimático con DNasa.....	24
b) Transcripción reversa-PCR (RT-PCR).....	24
c) PCR.....	24
IX. RESULTADOS.....	27
1. Inducción de la resistencia a cromato de <i>B. xenovorans</i>	27
2. Amplificación por PCR de los genes <i>chr</i> □□ <i>Ca</i> y <i>chrA</i> □ <i>b</i>	27
3. Clonación de los genes <i>chr</i> □□ <i>Ca</i> y <i>chrA</i> □ <i>b</i> en pJET1.2.....	27

4.	Subclonación de <i>chr</i> Ca y <i>chrA</i> b en los vectores pAC-C184 y pUCP20.....	30
5.	Pruebas de susceptibilidad a cromato.....	30
6.	Análisis de expresión de los homólogos <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> L400.....	33
	a) Aislamiento de RNA total.....	37
	b) RT-PCR.....	37
	• A partir de cultivos de <i>B. xenovorans</i> crecidos en caldo nutritivo.....	37
	• A partir de cultivos de <i>B. xenovorans</i> crecidos en 9 con 2 m de sulfato.....	40
	• A partir de cultivos de <i>B. xenovorans</i> crecidos en 9 con 0.04 m de sulfato.....	42
X.	DISCUSION.....	47
XI.	CONCLUSIONES.....	66
XII.	BIBLIOGRAFIA.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte de cromatoxicidad y resistencia en células bacterianas.....	2
Figura 2. Árbol filogenético de la superfamilia de proteínas C ₁ R.....	5
Figura 3. Distribución y organización de proteínas de la superfamilia C ₁ R.....	6
Figura 4. Susceptibilidad a cromato de <i>Burkholderia xenovorans</i> L ₄₀₀	13
Figura 5. Inducción de resistencia a cromato de <i>B. xenovorans</i> L ₄₀₀	28
Figura 6. Amplificación por PCR de los homólogos <i>chr</i> _{Ca} y <i>chrA</i> _b de <i>B. xenovorans</i>	29
Figura 7. Digestión de los plásmidos recombinantes pUc _r 1NCa y pUc _r A1b.....	31
Figura 8. Susceptibilidad a cromato de <i>E. coli</i> 3110 (pAc _r 1NCa).....	32
Figura 9. Susceptibilidad a cromato de <i>E. coli</i> 3110 (pUc _r 1NCa).....	34
Figura 10. Susceptibilidad a cromato de <i>E. coli</i> 3110 (p _c _r A1 _c).....	35
Figura 11. Susceptibilidad a cromato de <i>E. coli</i> 3110 (pAc _r A1b).....	36
Figura 12. Aislamiento del RNA total.....	38
Figura 13. Expresión de los homólogos <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> L ₄₀₀ a partir de cultivos crecidos en caldo nutritivo.....	39

Figura 14. Expresión de los homólogos <i>chr</i> de cultivos de <i>B. xenovorans</i> L400 en 9 (2 m de sulfato) en fase logarítmica.....	41
Figura 15. Expresión de los homólogos <i>chr</i> de cultivos de <i>B. xenovorans</i> en 9 (2 m de sulfato) en fase estacionaria.....	43
Figura 16. Expresión de los homólogos <i>chr</i> de cultivos de <i>B. xenovorans</i> en 9 (0.04 m de sulfato) en fase logarítmica.....	44
Figura 17. Expresión de los homólogos <i>chr</i> de cultivos de <i>B. xenovorans</i> en 9 (0.04 m de sulfato) en fase estacionaria.....	45
Figura 18. Modelo hipotético de regulación de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i>	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Redundancia génica en miembros de la superfamilia C ₁ R.....	8
Tabla 2. Susceptibilidad a cromato de los genes <i>chr</i> de <i>Burkholderia xenovorans</i> L400 en <i>Escherichia coli</i>	14
Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación de los homólogos <i>chrCa</i> y <i>chrAb</i>	15
Tabla 4. Oligonucleótidos para evaluar la expresión de los homólogos <i>chr</i>	25
Tabla 5. Efecto del cromato sobre la expresión de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> crecido en pH 9 con 2 mM de sulfato.....	77
Tabla 6. Efecto del cromato sobre la expresión de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> crecida en pH 9 con 0.04 mM de sulfato.....	61
Tabla 7. Efecto del sulfato sobre la expresión de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i>	3

RESUMEN

Se han identificado microorganismos que en su genoma contienen más de un homólogo de la superfamilia de transportadores de cromato CHR. Entre estos se encuentra la bacteria Gram (-) *Burkholderia xenovorans* LB400, con dos homólogos SCHR (Chr1NCa y Chr1NCb) y cuatro homólogos LCHR (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6). Recientemente en nuestro grupo de trabajo se han estudiado cuatro homólogos CHR de *B. xenovorans*, tres de la familia LCHR y uno de la familia SCHR. Se encontró que estos homólogos confieren resistencia a cromato cuando se expresan en *Escherichia coli*, aunque en diferentes condiciones de cultivo. El objetivo de este trabajo fue determinar el patrón de expresión de los genes que codifican los homólogos CHR. Para ello se utilizaron ensayos de RT-PCR a partir de RNA total de células de *B. xenovorans* crecidas en caldo nutritivo (CN), medio mínimo M9 con alta (2 mM) y baja (0.04 mM) concentración de sulfato. Cuando los cultivos se crecieron en CN, a excepción del gen *chrA6*, que no se expresó, los demás genes mostraron señal de expresión y para la mayoría ésta aumentó en presencia de cromato. Cuando los cultivos se crecieron en alto sulfato hasta la fase logarítmica de crecimiento, todos los genes *chr* se expresaron y además respondieron a la exposición de cromato. Al igual que en fase logarítmica, en fase estacionaria todos los genes mostraron expresión, sin embargo, en esta condición los genes *chr1NCa* no presentaron un aumento en su expresión por la adición de cromato. En condiciones de bajo sulfato, a excepción de *chrA6* que no se expresó, en ambas fases de crecimiento todos los genes *chr* mostraron un aumento en su nivel de expresión con respecto a los ensayos en alto sulfato y el cromato provocó cambios nulos o moderados en la expresión. Se concluyó que los genes *chr* se expresan en diferente nivel y que el sulfato reprime la expresión de algunos de los genes *chr* de *B. xenovorans*, mientras que el cromato induce la expresión de la mayoría de estos genes.

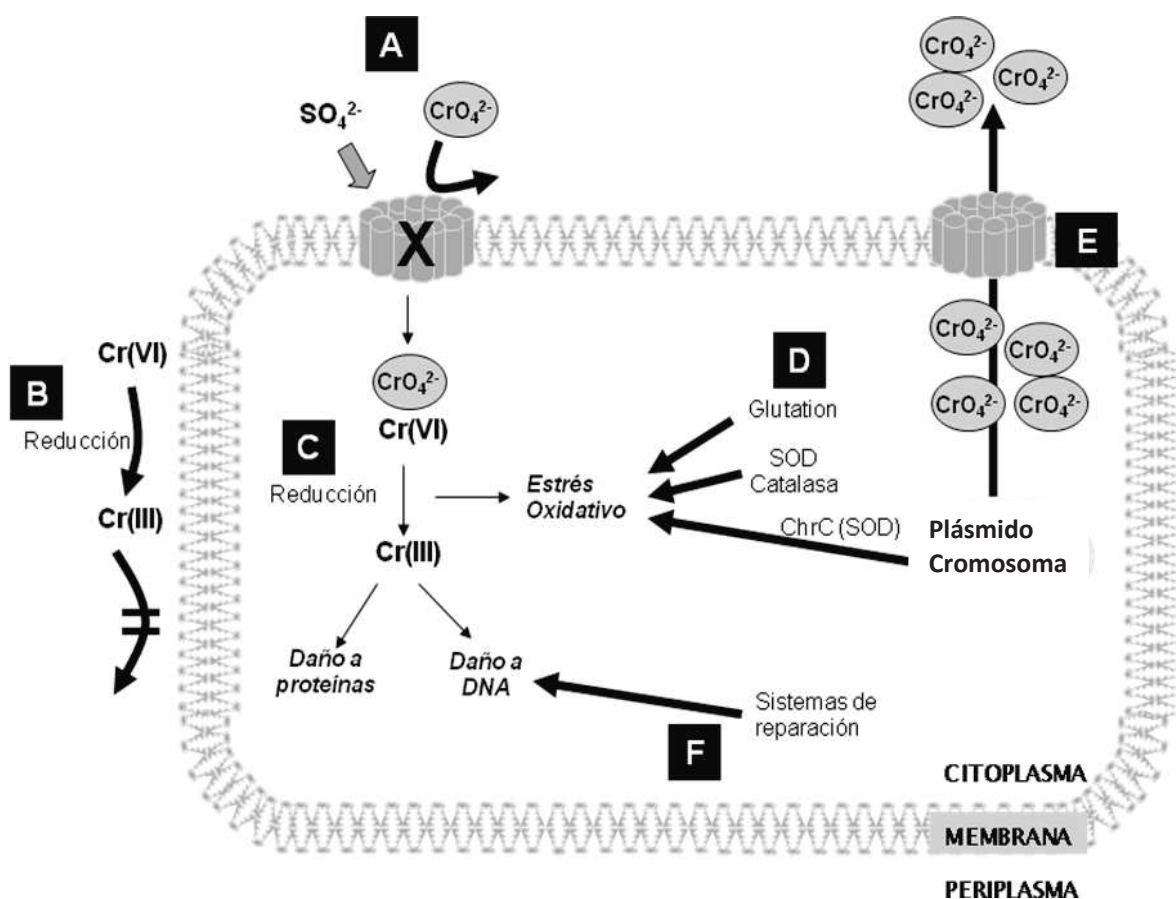
1. INTRODUCCIÓN

El cromo (Cr) es el séptimo elemento más abundante sobre la tierra y aunque se encuentra en los estados de oxidación de Cr(III) a Cr(VI), las formas trivalente Cr(III) y hexavalente Cr(VI) son las más estables y abundantes (Cervantes y col. 2001). El Cr(VI) es un agente oxidante fuerte, comúnmente presente en solución como los oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), dependiendo del pH. El Cr(VI) existe como un anión que puede persistir en el agua por largos períodos y es considerado como un contaminante importante en los sitios de desecho (Riley y col. 1992).

Los derivados del Cr(III) son menos móviles y existen en el ambiente principalmente formando complejos estables con ligandos orgánicos e inorgánicos (Clayd y Terry 2000). Además, el Cr(III) es menos tóxico debido a que es menos soluble a pH fisiológico. A pH neutro, el Cr(III) tiende a precipitarse como hidróxido $\text{Cr}(\text{OH})_3$ u óxido hidratado $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ehrlich 2002).

El uso generalizado del Cr en diversos procesos industriales lo ha convertido en un serio contaminante de aire, suelo, y agua (Khasim y col. 1999).

Se ha demostrado en una variedad de especies bacterianas que el cromato atraviesa las membranas biológicas activamente por medio de la ruta de captura del sulfato, lo cual refleja la analogía química entre estos dos oxianiones (SO_4^{2-} y CrO_4^{2-}). El Cr(III) atraviesa la membrana celular con baja eficiencia debido a que forma compuestos insolubles



Los mecanismos de daño y resistencia se indican con flechas delgadas y gruesas, respectivamente. (A) La ruta de captura de sulfato codificado en el cromosoma es utilizada por el cromato para entrar a la célula cuando se muta el transportador de sulfato (X) el transporte de cromato disminuye. (B) Reducción extracelular de Cr(VI) a Cr(III) , el cual no atraviesa la membrana. (C) La reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) genera estrés oxidativo así como daño a DNA y proteínas. (D) Enzimas detoxificantes están involucradas en la protección contra estrés oxidativo, minimizando los efectos tóxicos de cromato. (E) Transportadores codificados en plásmidos y cromosomas pueden expulsar cromato del citoplasma. (F) Los sistemas de reparación participan en la protección del daño generado por derivados de Cr (Ramírez-Quirós y col. 2003)

(Cary 1982)(Mannan 88). Dentro de la célula, el $\text{Cr}(\text{VI})$ es rápidamente reducido a $\text{Cr}(\text{III})$, por la acción de diferentes actividades enzimáticas o no enzimáticas el $\text{Cr}(\text{III})$ generado puede entonces ejercer diversos efectos tóxicos en el citoplasma (Mannan 88) (Cervantes y col. 2001).

4.1.2. Mecanismos de resistencia a $\text{Cr}(\text{VI})$ en bacterias

En bacterias, a nivel extracelular, el $\text{Cr}(\text{VI})$ es altamente tóxico debido a que ingresa rápidamente al citoplasma donde puede ejercer sus efectos tóxicos (Long y Trevors 1990, Matz y Salem 1990). En el citoplasma, la toxicidad del Cr está relacionada a los procesos de reducción de $\text{Cr}(\text{VI})$ a estados de oxidación más bajos, $\text{Cr}(\text{III})$ y $\text{Cr}(\text{IV})$, en los cuales se forman radicales libres (Mannan 88). El daño oxidativo al DNA es probablemente responsable de los efectos genotóxicos causados por cromato.

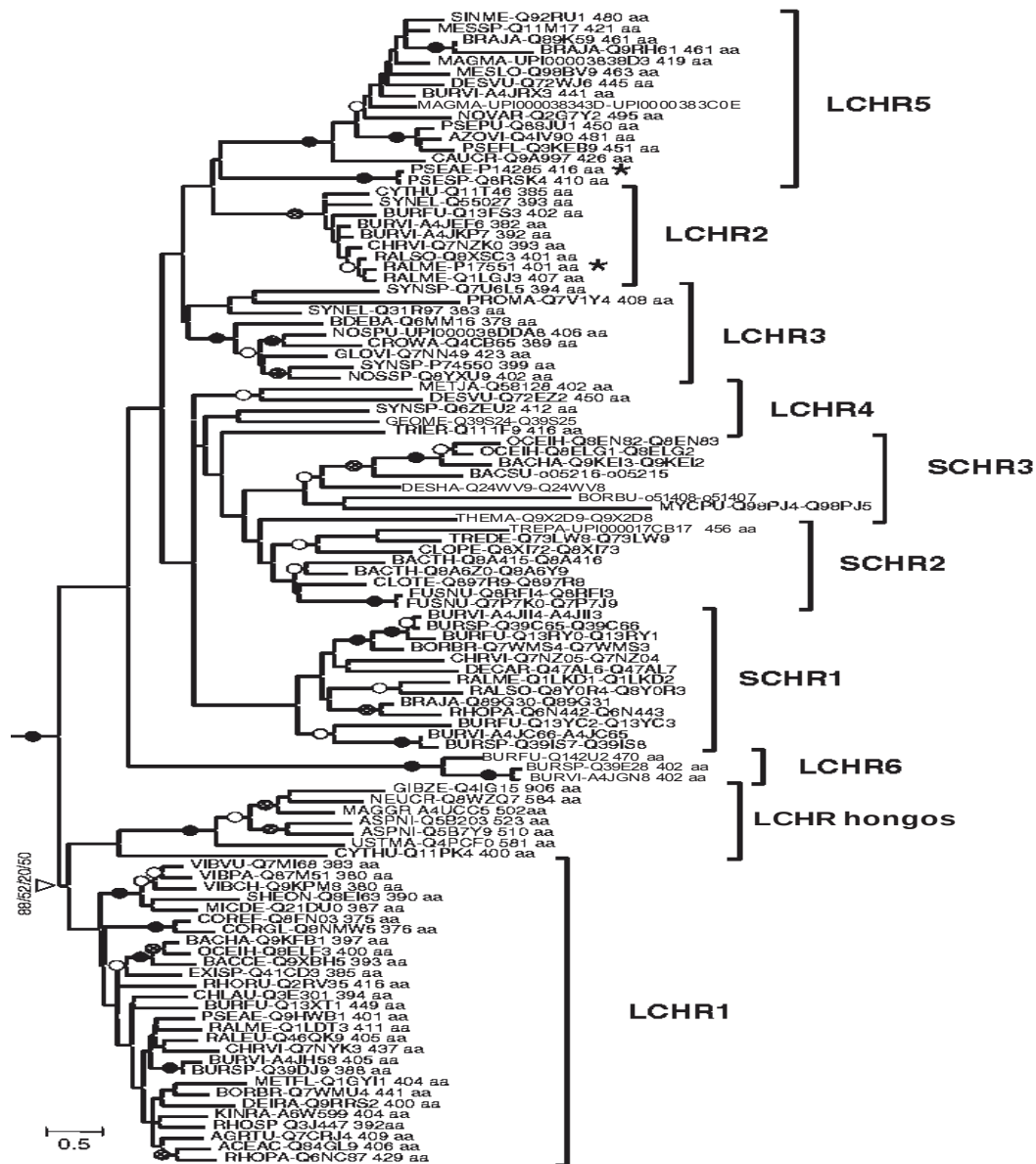
4.1.3. Mecanismos de resistencia a $\text{Cr}(\text{VI})$ en bacterias

Se ha reportado una gran variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato, y los mecanismos de resistencia a este ion pueden ser codificados por genes plasmídicos o cromosómicos (Nies y col. 1990, Cervantes y Campos-García 2000). Usualmente, los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales directamente median la expulsión del ion cromato del citoplasma celular (Mannan 88). Por otro lado, los sistemas de resistencia codificados por cromosomas están generalmente relacionados con estrategias tales como reducción específica o inespecífica de $\text{Cr}(\text{VI})$, destoxificación de radicales libres, reparación de daño al DNA (Mannan 88), y procesos asociados con la homeostasis de azufre y hierro (Ramírez-Íñaz y col. 2000).

4.1.4. Efectos de $\text{Cr}(\text{VI})$ en bacterias

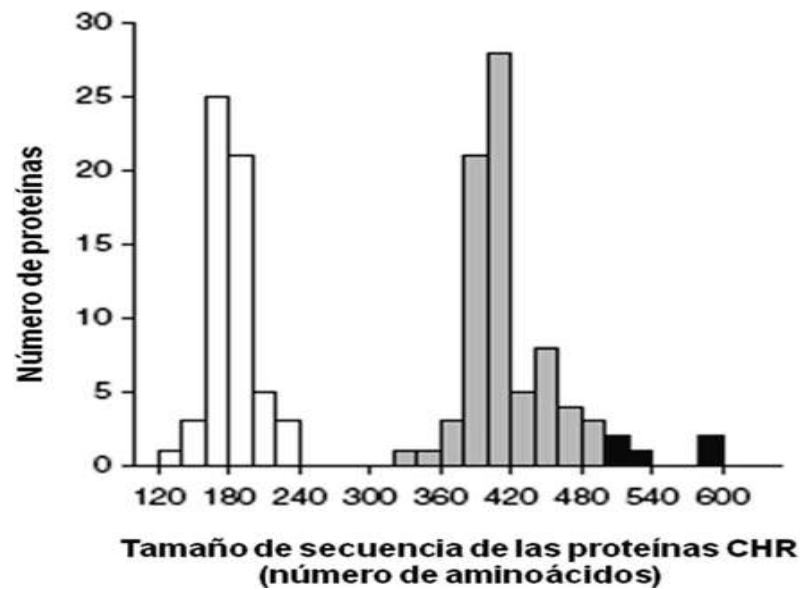
La expulsión de cromato es un mecanismo conferido por la proteína ChrA. ChrA es codificada por los plásmidos pM0 de *Seudoanaba aeruginosa* (Cervantes y col. 1990) y pML2 de *Cuatriavidus eallidurans* (antes *Alcaligenes eutrophus* y *alsonia eallidurans*) (Nies y col. 1990). ChrA de *A. aeruginosa*, de 416 aminoácidos, muestra una topología de 11 segmentos transmembranales (STMs) (Jiménez-Mejía y col. 2006). ChrA expulsa el cromato a partir de citoplasma utilizando la fuerza protón motriz (Alvarez y col. 1999; Pimentel y col. 2002).

Díaz-Pérez y col. (2003) identificaron 13 secuencias de proteínas miembros de la superfamilia CHR. De éstas, 12 proteínas pertenecen a bacterias, una a arquea y seis a hongos (Figura 1). No se encontraron proteínas de esta superfamilia en animales o plantas, aunque se identificaron secuencias de proteínas homólogas CHR en el protozoario *Paramecium aurelia* y el alga verde *Scenedesmus lucinarius* (Díaz-Pérez y col. 2003). La amplia distribución (arquea, bacteria y eucaria) sugiere un origen antiguo para la superfamilia CHR. Se encontraron dos grupos de proteínas CHR (Díaz-Pérez y col. 2003): proteínas bacterianas monodominio con una longitud de ~200 aminoácidos, llamadas CHR de cadena corta (SCHR) y proteínas bacterianas bidominio con una longitud de ~400 aminoácidos, llamadas CHR de cadena larga (LCHR) (Figura 2). La distribución en la longitud de secuencias de las proteínas CHR en SCHR monodominio y LCHR bidominio, ambas con dominios homólogos, sugiere que las proteínas CHR surgieron por un evento de duplicación génica en tándem (Figura 2). Es importante mencionar que los organismos con el número más grande de diferentes proteínas CHR codificadas en sus genomas pertenecen a las β -proteobacterias. Por ejemplo, la bacteria resistente a cromato *Cupriavidus metallidurans*



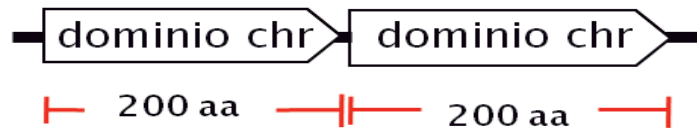
Las proteínas se agrupan en dos familias denominadas LCHR y SCHR. La familia LCHR se divide en seis subfamilias bacterianas y una de hongos. La familia SCHR se divide en tres subfamilias. Con asteriscos se indican las ChrA de los plásmidos pM0 y pM2 que se ubican en las subfamilias LCHR2 y LCHR, respectivamente, y que hasta el 2000 eran las únicas cuya función se había estudiado. En letra azul se indica la única proteína de arquea ubicada en la subfamilia LCHR4 (Modificada de Díaz-Pérez y col. 2000)

□□



Proteínas SCHR

□□



Proteínas LCHR de bacterias



□□□□□ □ □□□□□□□□□ □ □□□□□□□□□ □□ □□□□□□□ □□ □□ □□□□□□□ □□□ □□R□

Análisis de distribución de las proteínas CHR. A) Las barras blancas indican las proteínas bacterianas SCHR. En barras grises se indican las proteínas bacterianas LCHR. Las barras negras indican las proteínas LCHR de hongos. B) Representación esquemática de los dominios de las proteínas SCHR y LCHR bacterianas (modificada de Díaz-Pérez y col. 200□).

posee tres LCHRs y un par de SCHRs, *Burkholderia vietnamiensis* G4 posee cinco LCHRs y dos pares de SCHRs, *Burkholderia xenovorans* LB400 posee cuatro LCHRs y dos pares de SCHRs y *Burkholderia sp.* posee dos LCHRs y dos pares de SCHRs (Gómez-Pérez y col. 2004) (Gómez et al.).

Burkholderia xenovorans

B. xenovorans cepa LB400 (Goris y col. 2004) (anteriormente *Pseudomonas sp.* LB400, *Burkholderia sp.* LB400, *Burkholderia unguis* LB400) es la bacteria que degrada bifenilos policlorados (PCB) más importante que se ha descubierto. Se aisló de un sitio contaminado con PCB en el estado de Nebraska (Bopp y col. 1996) y ha sido objeto de más de 10 estudios relacionados con la biodegradación de PCBs.

La diversidad del género *Burkholderia* es ejemplificada por la alta diversidad de nichos ecológicos ocupados por las diferentes especies, oscilando del suelo a ambientes acuáticos, asociados con plantas, hongos, parásitos, animales, y humanos, de saprófitos a endosimbiontes, de agentes de biocontrol a patógenos (Landers y col. 2000; Moulin y col. 2001; Coenye y col. 2002; Chen y col. 2002; Partida-Martínez y col. 2002; Mahenthiralingam y col. 2003). Es común para la mayoría de las especies de *Burkholderia* tener un genoma grande, compuesto por varios cromosomas y plásmidos así como la presencia de múltiples secuencias de inserción que confieren alta plasticidad genómica, lo cual explica la versatilidad del género (Lessie y col. 1996).

El genoma de LB400 tiene un tamaño de 9.4 Mpb, que contiene aproximadamente 9,000 secuencias codificantes distribuidas en tres replicones circulares que se han designado cromosoma 1 (4.90 Mpb), cromosoma 2 (1.6 Mpb) y megaplásmido (1.4 Mpb) (Chain y col. 2006). El replicón de 1.6 Mpb se definió como cromosoma 2 y no como un megaplásmido debido a la presencia de tres operones con genes ribosomales y

Redundancia génica en miembros de la superfamilia CHR

LCHR ^a	Parejas SCHR ^a	Total de homólogos ^b	No. de especies bacterianas	Ejemplos
1	1	1	2	
1	1	1	2	
1	1	1	1	
1	1	1	1	
1	1	1	1	
1	1	1	1	
1	1	1	1	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
1	1	1	1	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS
1	1	1	1	<i>Burkholderia</i> sp. 383
1	1	1	1	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
1	1	1	1	<i>Burkholderia xenovorans</i>
1	1	1	1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>

^a. Se indica el número de homólogos LCHR o parejas SCHR encontrados en los genomas bacterianos analizados. ^b. Se muestra la suma de los homólogos LCHR y SCHR.

varios tRNAs, así como funciones celulares centrales involucradas en la replicación del DNA. El DNA primasa (*dnaG*), DNA polimerasa (*Pol*), un factor de elongación asociado (*PolB*) y metabolismo de aminoácidos (Chain y col. 2006).

El megaplásmido, por otro lado, no contiene tRNAs ni alguna función esencial y está mayoritariamente ausente en otras cepas de la misma especie. El porcentaje de GC del megaplásmido es 1% más bajo que el de los dos cromosomas, y, junto con los porcentajes de GC y la alta proporción de secuencias de inserción, este replicón parece ser un mosaico de material genético foráneo (Chain y col. 2006).

El replicón grande (4.9 Mpb) lleva las funciones celulares centrales (ej. la maquinaria traduccional, replicación del DNA, división celular y metabolismo de nucleótidos) y se considera el cromosoma central. El cromosoma pequeño tiene una ruta funcional hacia metabolismo energético, metabolismo secundario, transporte y metabolismo de iones inorgánicos, metabolismo y transporte de aminoácidos. El megaplásmido lleva a cabo funciones altamente especializadas específicas de la cepa (Chain y col. 2006).

4.1.2. Redundancia funcional

La existencia de muchos genes parálogos dentro de un organismo puede reflejar una historia de duplicación génica y dominios conservados en esos organismos. Múltiples copias de miembros de tales familias de genes proporcionan una redundancia funcional aparente de actividades proteicas específicas y algunas veces se explican por la necesidad de la célula para adaptarse a diferentes condiciones de estrés (Aslund y col. 1999).

Es importante entender los papeles fisiológicos específicos de genes que a primera vista, parecen ser redundantes. Estos genes son llamados áreas grises del genoma (Aslund y col. 1999). Un ejemplo se presenta en la familia de proteínas tiorredoxina. Mediante

análisis de secuencias y haciendo estudios genéticos y bioquímicos, se han descubierto nueve genes en *Escherichia coli* que codifican proteínas similares a tiorredoxina o proteínas que incluyen un dominio tiorredoxina. Cuando se encuentran varios genes que codifican proteínas con funciones aparentemente idénticas, estos genes son descritos como redundantes (Aslund y col. 1999).

La redundancia génica y funcional parece ser un tema importante en genomas bacterianos grandes. Se encontró que 10% de las secuencias codificantes (16% de todos los genes) tienen un parálogo dentro del genoma de *B. xenovorans* LB400 y no un ortólogo en 260 secuencias de genomas completos analizados (Chain y col. 2006). Hasta la fecha, este porcentaje de redundancia génica y funcional representa el más alto existente entre los genomas de bacterias de vida libre, donde el promedio de redundancia génica es 6%. La lista de parálogos en el genoma de LB400 está enriquecida en genes relacionados a transporte (20 parálogos), transducción de señales (164 parálogos), elementos móviles (112 parálogos), proteínas de membrana (66 parálogos) y metabolismo secundario, incluyendo 120 deshidrogenasas, 2 di-oxigenasas y 1 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 100 sistemas de expulsión, que incluye 9 bombas de expulsión de drogas, 1 sistema de secreción proteica, 21 bombas de expulsión de metales pesados y 1 sistema de transporte de aminoácidos (Chain y col. 2006).

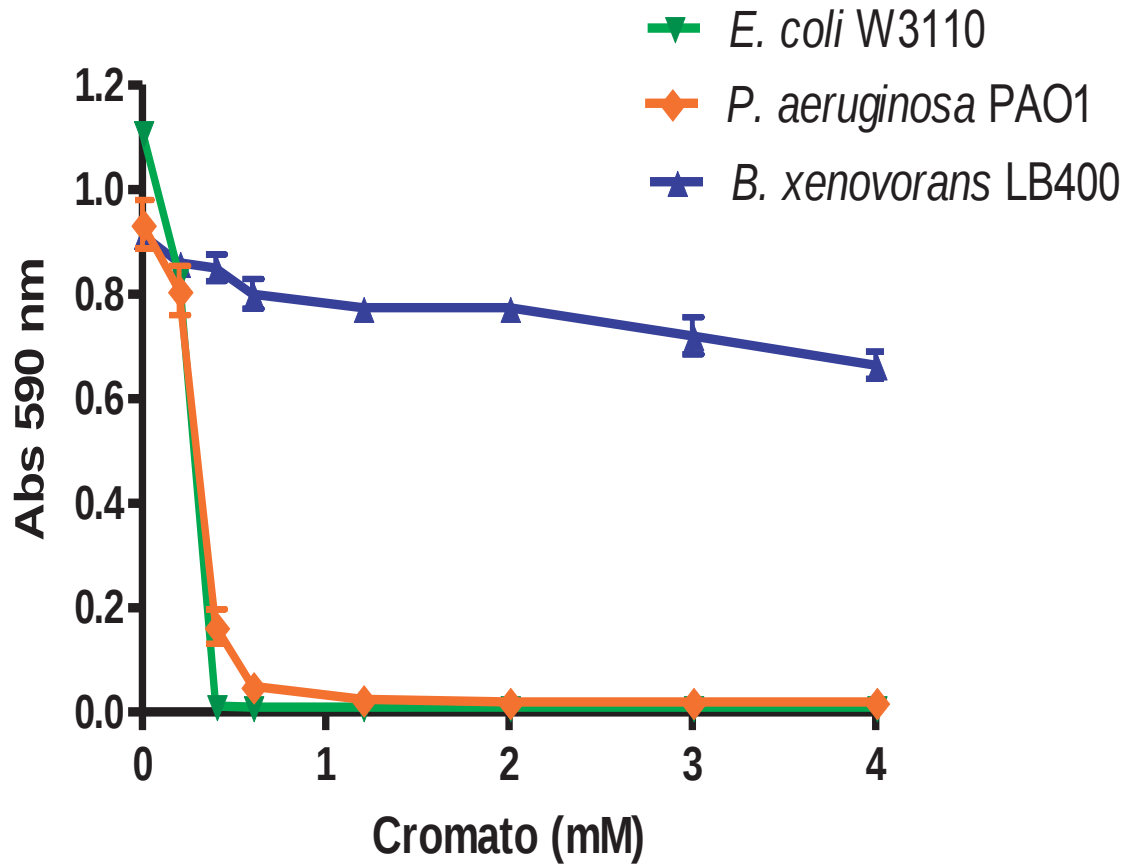
La segunda clase de proteínas que tiene un gran número de parálogos es la transducción de señales. Se ha propuesto que el número de redes de transducción de señales aumenta desproporcionalmente con el tamaño del genoma. El 9% del genoma de *B. xenovorans*

está dedicado a la transducción de señales y utiliza casi la totalidad de dominios sensores y reguladores encontrados en la transducción de señales procariotas. 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 *Mycobacterium tuberculosis*, un microorganismo con un nicho y un tamaño de genomas similares, posee 200 menos de sistemas de transporte y menos de la mitad de sistemas de transducción de señales (McLeod y col. 2006)

CONCLUSIONES

A partir del análisis realizado por Díaz-Pérez y col. (2008) 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). Se encontró además que *B. xenovorans* LB400 confiere un mayor nivel de resistencia a cromato comparado con cepas de referencia (ATCC 25269), sugiriendo que los homólogos CHR presentes en LB400 son responsables de dicha resistencia. Recientemente en nuestro laboratorio León-Márquez (2009) determinó que los homólogos ChrA1a, ChrA2 y ChrA6 de *B. xenovorans* confieren un fenotipo de resistencia a cromato cuando se clonaron en vectores de alto (pCP20) o bajo número de copias (pACC14), se transfirieron a *E. coli* y las pruebas se realizaron en caldo nutritivo o medio mínimo (DM). También en nuestro grupo de trabajo, Díaz-Magaña y col. (2009) determinaron que el homólogo Chr1NCb de *B. xenovorans* confiere resistencia a cromato cuando se expresa en *E. coli* (DM). De estos resultados concluyeron que los genes *chr* probablemente se expresan bajo diferentes condiciones de cultivo en *E. coli*.

Además se sabe que el ión esencial sulfato afecta la expresión de algunos homólogos *chr* como los de *C. allidurans* (Lühn y col. 2002). Se encontró que los genes *chrA1* y *chrA2* se inducen por cromato de manera más notoria sólo en un medio mínimo con altas concentraciones de sulfato (10 mM) (Lühn y col. 2002). Estos datos sugieren que algunos genes *chr* se regulan de manera diferencial, respondiendo su expresión a diferentes factores externos.



El experimento se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de León. Los cultivos se crecieron 24 h con agitación constante en caldo nutritivo a 30°C, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbencia a 590 nm. Como cepas sensibles se utilizó *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* W3110 (León-Márquez, 2009).

Tabla 1. Susceptibilidad a cromato conferida por los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400 en *Escherichia coli*

	Cromato		M	
	Cromato		Cromato	
		U		U
<i>chrA1a</i> *	S	S	R	S
<i>chrA6</i> *	S	R	S	S
<i>chr1NCa</i>	N	N	N	N
<i>chrA1b</i>	N	N	N	N
<i>chr1NCb</i> **	S	S	R	R
<i>chrA2</i> *	S	R	S	R

^a. Se indica el nombre de los homólogos *chr*. R= Resistente S= Sensible N= Fenotipo no determinado (León-Márquez, 2009; Iáñez-Magaña, 2009).

RESUMEN

Aunque varios homólogos *chr* de *Burkholderia xenovorans* confieren resistencia a cromato bajo condiciones de crecimiento específicas cuando se transfieren a *Escherichia coli*, no se conoce cómo es su expresión en *B. xenovorans*.

INTRODUCCIÓN

Los genes homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400 se expresan bajo diferentes condiciones de crecimiento en esta bacteria.

OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

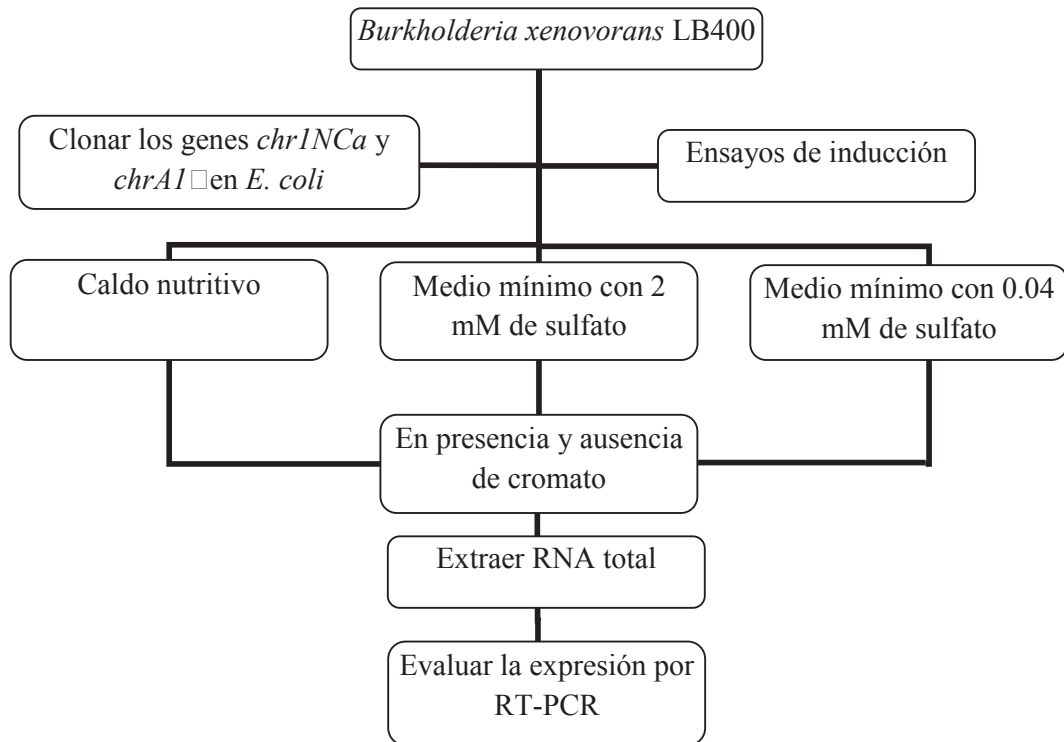
Determinar los niveles de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 bajo diferentes condiciones de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Determinar la expresión de los genes *chr* en *B. xenovorans* en diferentes medios de cultivo.

2.- Determinar el papel del sulfato y del cromato sobre la expresión de los genes *chr* en *B. xenovorans*.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y medios de cultivo

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

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

Plasmidos y cepas bacterianas

Para este trabajo se usó la cepa

- *Burkholderia xenovorans* LB400 (Goris y col. 2004).

Esta cepa fue donada por el Dr. César Caballero Mellado[†] del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

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

- M101. *su*⁺E, *hcr*-1 Δ (*lac*⁺*ro*AB) [F', *r*₆, *ro*AB, *lac*^qZΔM15] (Yanisch-Perron y col. 1982)
- L1-Blue. *end* A1, *r*A96, *hcr*-1, *hsd*R1⁺*su*⁺E44 *rec*A1 *lac* [F' *ro*AB *lac*^qZΔM15 Tn10 (Tc)] (Stratagene).
- p110. *+*, *cr*A, *cr*B in (*rrn*⁺*Ern*E) (Hayashi y col. 2006).

Diagrama de un vector de clonación:

- pET 1.2 (Mermentas), para la recuperación de los productos de PCR, con un número de copias de 100 a 1000.
- pCP20. Contiene un gen de resistencia a ampicilina y orígenes de replicación para *E. coli* y *S. aureus* (Est y col. 1994). En *E. coli* presenta un número de copias de alrededor de 100 y en *S. aureus*, 20 copias.
- pAC104. Es un vector de clonación de *E. coli*, con alrededor de 1 copia por célula y genes de resistencia a cloranfenicol y tetraciclina (Sambrook y col. 1994).

Diagrama de un vector de clonación:

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los homólogos *chrINC* y *chrAI* en la base de datos del NCBI para diseñar los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de ambos genes. Los oligonucleótidos se diseñaron siguiendo los siguientes criterios: un número de nucleótidos entre 20-25, se eligió una región de baja homología a secuencias de otros genes *chr* de *B. xenovorans*, un porcentaje de GC muy cercano entre el oligonucleótido directo y reverso y que hubiera siempre una G o C en los extremos de los oligonucleótidos diseñados. Se analizó que no formaran estructuras secundarias en la misma secuencias de los oligonucleótidos. Para el diseño se utilizó el programa OligoAnalyzer 1. En la Tabla 1 se muestran los oligonucleótidos diseñados.

Diagrama de un vector de clonación:

Primeros y segundos oligonucleótidos para la amplificación de los homólogos *chr1NCa* y *chrA1*

Oligonucleótido ^a	Secuencia (5'-3') ^b	Enzima de restricción
BxeSCHR1a	CCGTCA <u>GGGGG</u> GACCATTTC	BamHI
BxeRSCHR1a	GTCGAC <u>GGGGG</u> GGGCACCAG	NotI
BxeLCHR1b	C <u>GGGGG</u> CGGCCCAATTCAGTCAC	BamHI
BxeRLCHR1b	CTCC <u>GGGGG</u> CAAGGTGGGTAAAC	PaeI

a. Se indica el nombre abreviado del organismo, la orientación directa (D), reverso (R), y la subfamilia a la que pertenece la proteína CHR. b. Se indica en negritas y subrayado el sitio de restricción para utilizarse en la subclonación.

Para el aislamiento de RNA total se usó una modificación del método de Ausubel y col. (1998). Se recuperó la pastilla celular de un cultivo crecido toda la noche, se centrifugó (Tris-HCl y EDTA) 0.20 y se resuspendió. Se agregaron 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se vortexeó y se incubó 10 min a 37°C. Se adicionaron 20 µl de pronasa (pronasa E o proteinasa 20 mg/ml), se vortexeó y se incubó 10 min a 37°C. Se agregaron 10 µl de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10%, se vortexeó e incubó 10 min a 37°C. Se dejó la solución de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)-NaCl a 6°C. Se adicionaron 100 µl de NaCl 0.5M, se mezcló vigorosamente en vortex y se incubó a 6°C por 5 minutos. Se agregaron 10 µl de solución CTAB-NaCl y se mezcló, se incubó 10 min a 6°C. Se adicionó 100 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se homogenizó y se centrifugó 5 min a 10000 rpm. Se transfirió la fase acuosa y se agregó 100 µl de fenol saturado-cloroformo-álcohol isoamílico (24:24:1), se agitó y centrifugó 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 1 ml de etanol absoluto. Se incubó 1 hora a -20°C o 20 minutos a -80°C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se lavó la pastilla 3 veces con etanol al 70%. Se secó la pastilla y se resuspendió en 40 µl de agua HPLC o buffer TE, se agregaron 10 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 10 min. Se inactivó la RNasa a 60°C durante 10 min. Se corrieron 2-5 µl en un gel de agarosa (1%).

4.4.4. Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR de los genes homólogos *chrINCa* y *chrAI* se utilizó RNA total de *B. xenovorans* como molde. Se usaron las siguientes condiciones de PCR: 94°C 2 min (desnaturalización inicial), 94°C 30 seg (desnaturalización), 55-60°C 30 seg (alineamiento), 72°C 1.5 min (extensión) 72°C 10 min (extensión final). La muestra se sometió a 30 ciclos.

4.4.5. Electroforesis en gel de agarosa

4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó empleando el método de lisis alcalina (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979; Sh-Horowitz y Burke, 1981).

4.1.2. Electroforesis de DNA en gel 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 (ácido etilendiaminotetraacético) 0.001 M]. El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. Una muestra del DNA se mezcló con 2 μ l de amortiguador de carga [azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.1%, sacarosa 40%] y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus Corporation modelo EC402) y se sometió a un voltaje constante de 120 voltios durante 1 h. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 10 min. Las bandas de DNA teñidas se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (UV-Products Inc.). Como marcador de tamaño molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *ind*.

4.1.3. Purificación de DNA de gel

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.

4.1.4. Preparación de DNA de fagos

4.1.5. Preparación de DNA de plásmidos

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

Fig. 1. Diagrama de un gel de agarosa.

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

Fig. 2. Diagrama de un cultivo de *E. coli* en caldo LB.

Fig. 3. Diagrama de un cultivo de *E. coli* en caldo LB.

Se un cultivo de la cepa de *E. coli* M101 crecido en caldo LB durante toda la noche se tomaron 4 ml para inocular 200 ml de CL contenidos en un matraz de 1L y se incubó durante 6 h a 37°C con agitación constante hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 90 nm. Posteriormente se dejó el cultivo en hielo durante 20 min y se distribuyeron alícuotas en tubos para centrifugar durante 10 min a 9000rpm a 4°C. La pastilla se lavó dos veces por resuspensión con agua estéril fría y se centrifugó entre cada lavado con las condiciones antes descritas. Después del último lavado la pastilla se resuspendió en agua estéril más glicerol al 20%. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 0.2 ml en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Estas células se utilizaron para la transformación o bien fueron almacenadas a -80°C.

Preparación de células competentes

Se utilizaron de 100 μ l de una mezcla de ligación de DNA, la cual se adicionó a 100 μ l de células competentes. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación previamente enfriada en hielo para después ser colocada en un electroporador 200 de Eppendorf al cual se le dio un pulso de 2.4 kV. Inmediatamente después se le adicionó 2 ml de LB precalentado y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación constante. Se tomaron 100 μ l de la mezcla previamente concentrada y se distribuyó en cajas de AL con ampicilina (100 μ g/ml).

Preparación de tubos de cultivo con cromato de potasio

Se prepararon tubos con 4 ml de CN o M9 con concentraciones variables de cromato de potasio (Merck). A cada tubo se le agregaron 40 μ l de un cultivo crecido durante 20 h a 37°C con agitación constante. Como control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo que no contenía cromato. Los tubos inoculados se incubaron por un periodo de 20 h a 37°C con agitación constante. La susceptibilidad se midió directamente en función de la absorbencia de los cultivos (crecimiento celular) a 590 nm en un espectrofotómetro Genesys 20.

Preparación de tubos de cultivo con medio de cultivo fresco

Se creció un cultivo de *B. xenovorans* 1 h a 37°C con agitación constante en CN o M9, posteriormente se distribuyó en tres tubos con medio de cultivo fresco. Control de crecimiento sin adiciones, inducido con cromato al tiempo cero y no inducido. Se incubaron a 37°C con agitación constante. A las 2 h de incubación se agregó la concentración tóxica de cromato. Se determinó el crecimiento bacteriano a intervalos mediante la absorbencia a 590 nm.

Preparación de tubos de cultivo con medio de cultivo fresco y RNase

El cultivo se resuspendió en 1 ml de reactivo TRIzol (Ambion), se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 100 µl de cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C, entonces se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se adicionaron 100 µl de isopropanol, se agitó y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol al 70% por ml y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se removió el etanol y se secó la pastilla de RNA. Se disolvió la pastilla en 20 µl de agua DEPC (dietilpirocarbonato).

4.2.2. Purificación de RNA total

El RNA total fue tratado con RQ1 RNase-free DNase (Promega) utilizando una unidad por µg de RNA. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 10 min. Posteriormente se adicionó 1 µl de solución de paro y se procedió a incubar a 65°C durante 5 min para inactivar la DNase. Las muestras se almacenaron a -80°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.0%.

4.2.3. Reacción de transcripción inversa (RT-PCR)

El RT-PCR fue realizado con el RNA total aislado y con el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) de dos pasos, siguiendo las instrucciones del proveedor.

4.2.4. Amplificación

El cDNA generado se utilizó como molde para la amplificación de los genes *chr* de *B. xenovorans*. En la Tabla 4 se muestran los oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de los genes homólogos *chr* de *B. xenovorans*. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR. 95°C 1 min (desnaturalización inicial), 95°C 30 seg (desnaturalización), 64-68°C 30 seg (alineamiento), 72°C 1 min (extensión) 72°C 10 min

Se utilizaron oligonucleótidos para evaluar la expresión de los homólogos chr

Gen	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
BxeDLCHR1	CTGTCGGATGCGAACTCGCTTC	283
BxeRLCHR1	CGGTAGAACGACGCAAACAGCTCG	
BxeDLCHR2	GTCAGCACCTGGAAGCTCTCTAC	348
BxeRLCHR2	GTACTCCTTGACCACTCCGC	
BxeDLCHR6	GCTCAATCACTTCAGCGTGGTGCTG	397
BxeRLCHR6	GAATAGCGTCTTGAGCACCGGC	
BxeDSCHR1b	CCGACAAATTCACCGACCTGCTG	260
BxeRSCHR1b	CACGGCCATCGAGATCAACAG	
BxeDSCHR1a	GTGGTGACGCAAAGAGGCTG	289
BxeRSCHR1a	GAAAGCCCACCGAAGCGGTCATG	
BxeDLCHR1b	CTGAAGCTGGTTGCCGTTACTGTC	375
BxeRLCHR1b	GAGTGCACCCGAGCGATAAAAG	
Bxeno-F^b	TCCGGAAAGAAATCCTCTGCC	580
Bxeno-R^b	TCCACCTCTCAGCAGACTTCC	

^a. Se indica el nombre abreviado del organismo, la orientación: directo (D), reverso (R) y la subfamilia a la que pertenece la proteína CHR.

^b. Oligo para el rRNA 16S.

(expansión final), las muestras se sometieron a 35 ciclos.

En todos los ensayos se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen *rRNA* 16S que se expresa de manera constitutiva y que se utilizó como control positivo de expresión (longitud real y col. 1000) (**Tabla 4**). Como control negativo se procesó una muestra de PCR utilizando como molde RNA total tratado con DNasa.

RESULTADOS

1 Inducción de la resistencia a cromato de *B. xenovorans*

Para determinar si una exposición previa a cromato de *B. xenovorans* induce su resistencia a cromato, se realizaron ensayos de inducción de cultivos en CN y en H_2O . Para esto se crecieron los cultivos por 1 día y se distribuyeron en tres tubos con medio fresco: Control sin adiciones, inducido al tiempo cero con una concentración subinhibitoria de 10^{-5} M (CN) o 10^{-5} M (H_2O) de cromato y no inducido. Se incubaron y a las 24 h los cultivos inducidos y no inducidos se les adicionó la concentración tóxica 10^{-4} M (CN) o 6×10^{-4} M (H_2O) de cromato. Se encontró que los cultivos inducidos aunque mostraron cierta inhibición, tuvieron un crecimiento similar al control sin adiciones, mientras que los cultivos no inducidos mostraron una inhibición clara tanto en CN (Figura 5A) como en H_2O (Figura 5B). Se concluyó que una exposición previa a cromato de *B. xenovorans* induce su resistencia a cromato en ambos medios de cultivo.

2 Amplificación por PCR de los genes *chr1NCa* y *chrA1b*

Para evaluar si los seis homólogos *chr* de *B. xenovorans* conferían resistencia a cromato, los genes *chr1NCa* y *chrA1b* que no se habían analizado previamente, se clonaron y transfirieron a *E. coli*. Utilizando DNA total de *B. xenovorans* como molde, estos genes se amplificaron por PCR y los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa. Para ambos genes se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado de 1.6 kb (Figura 6). Por este procedimiento se logró amplificar los genes *chr1NCa* y *chrA1b*.

3 Clonación de los genes *chr1NCa* y *chrA1b* en pT12

Posterior a su amplificación por PCR, los genes *chr1NCa* y *chrA1b* se clonaron en pT12, que es un vector para recuperar productos de PCR. Los plásmidos recombinados

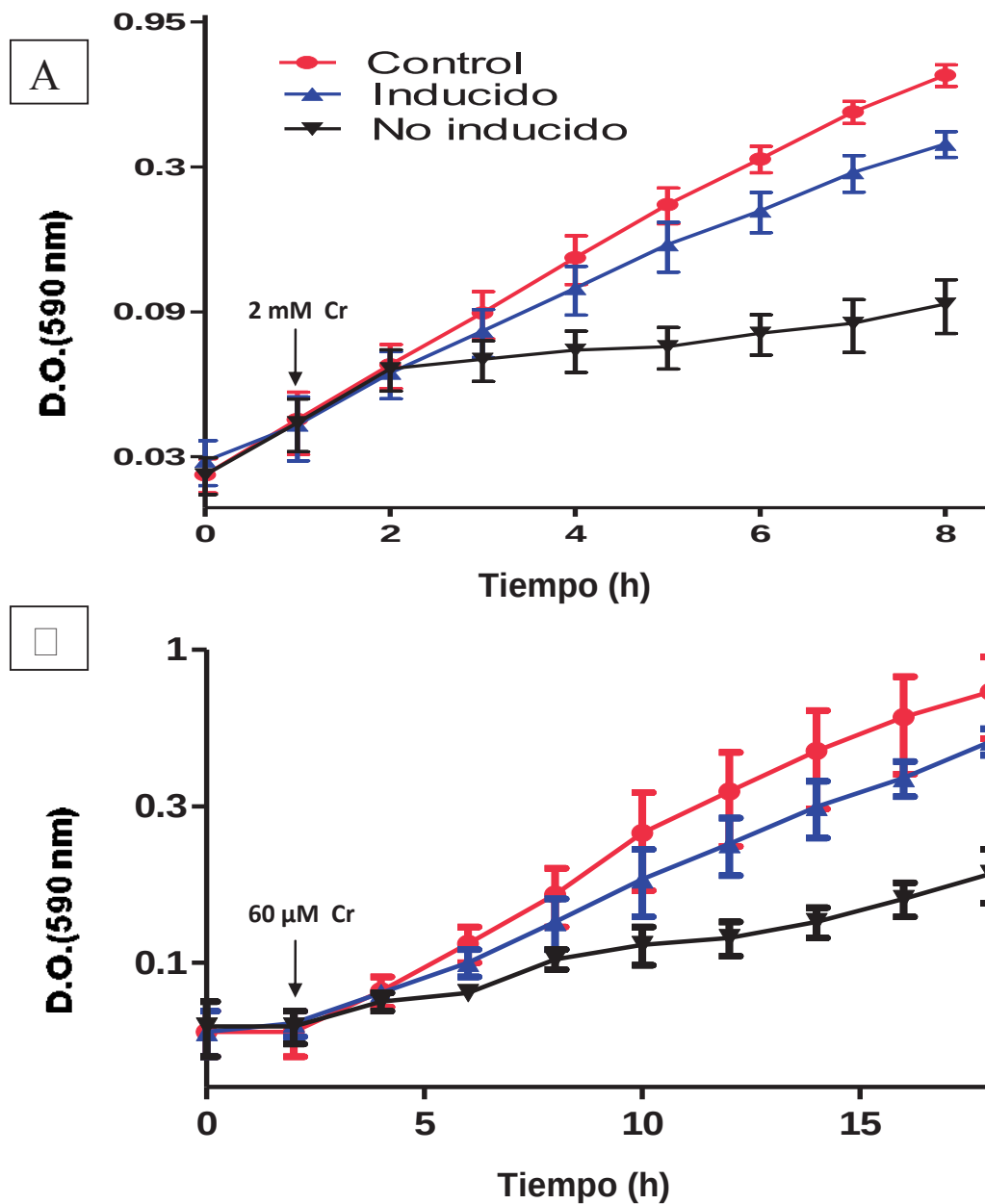


Figura 5 Inducción de resistencia a cromato de *B. xenovorans* LB400. Cultivos de *B. xenovorans* se crecieron en CN (A) o en LB (B) a 37°C con agitación constante durante 1 h y se distribuyeron en tres tubos con medio de cultivo fresco. Control, sin adiciones; inducidos al tiempo cero con LB (A) o con LB (B) de cromato y no inducido con cromato. Se incubaron a 37°C y a las 1 h se agregaron concentraciones tóxicas de cromato: 2 mM (A) y 60 μM (B). Se midió el crecimiento a intervalos. Las barras muestran la desviación estándar de la media (n=3).

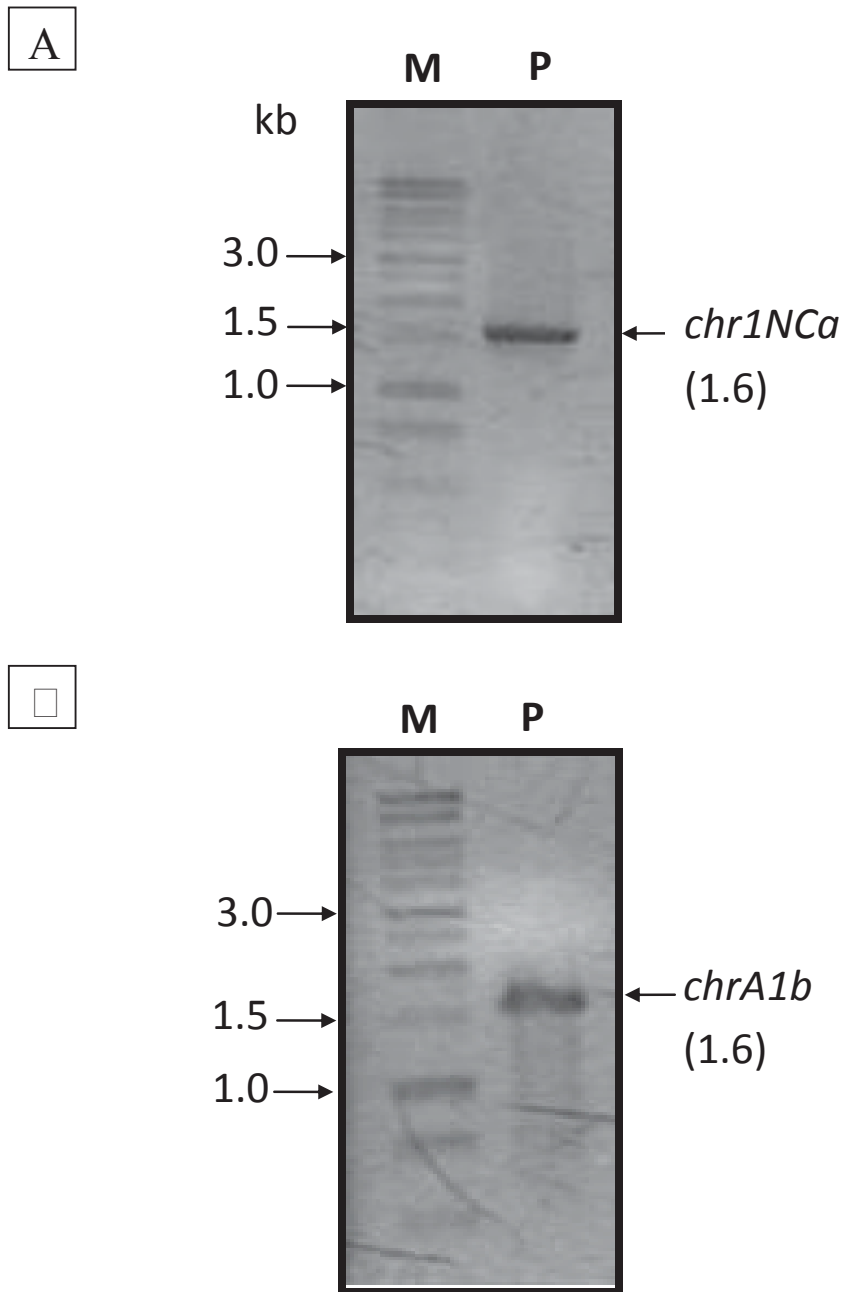


Figura 6. Amplificación por PCR de los clones *chr1NCa* y *chrA1b* de *B. xenovorans*. Fotografías de los geles de agarosa donde se corrieron los productos de amplificación de *chr1NCa* (A) y *chrA1b* (B). M, marcador de tamaño molecular (1 kb). P, producto de PCR. A la izquierda se indican las bandas del marcador utilizadas como referencia y a la derecha la posición del fragmento amplificado.

nantes se transfirieron a células electrocompetentes de *E. coli* DH5α y a las transformantes obtenidas se les realizó aislamiento de DNA plasmídico el cual se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Not*I para *chr1Nca* y *Not*I y *Not*I para *chrA*. Los plásmidos recombinantes p_{chr1Nca} y p_{chrA} presentaron el patrón de digestión esperado: una banda que corresponde al gen de interés (1.6 kb) y una al vector (0.8 kb) (datos no mostrados).

4. Subclonación de *chr1Nca* y *chrA* en los vectores pAC184 y pC20

Para estudiar la función de los genes *chr1Nca* y *chrA* se subclonaron en un vector de bajo número de copias (pAC184) y en un vector de alto número de copias (pC20). Para ello se digirieron los plásmidos p_{chr1Nca} con las enzimas *Bam*HI y *Not*I, y p_{chrA} con *Not*I y *Not*I. Con las mismas enzimas se digirieron los vectores pC20 y pAC184, los productos de digestión se ligaron y se obtuvieron los plásmidos recombinantes p_{c1Nca}, p_{cA1b}, p_{Ac1Nca} y p_{AcA1b} los cuales se digirieron con las enzimas correspondientes. En la **Figura 7** se muestran fotografías de los productos de digestión de p_{c1Nca} y p_{cA1b}. Los fragmentos obtenidos fueron del tamaño esperado: de 0.8 kb perteneciente al vector y de 1.6 kb de los genes *chr*.

5. Prueba de susceptibilidad a cromato

Para determinar si los genes *chr1Nca* y *chrA* confieren resistencia a cromato, a las transformantes se les realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en CN y en *DM*. La cepa que contiene el plásmido p_{Ac1Nca} presentó un crecimiento similar a la cepa que contiene el vector pAC184 (control sensible) en ambos medios de cultivo (**Figura 8**). Se concluyó que los genes *chr1Nca* no confieren resistencia a cromato clo

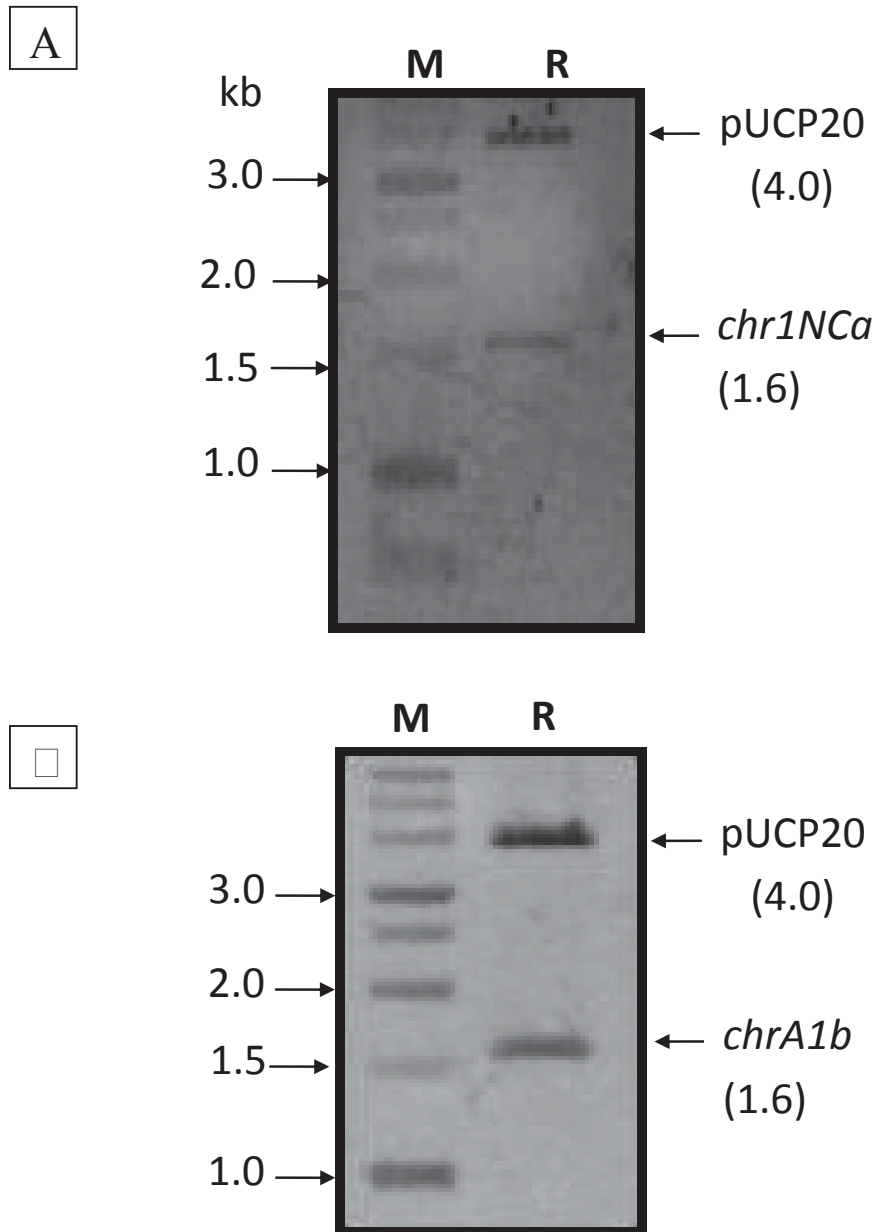


Figura 7 Digestión de los plásmidos recombinantes pchr1NCa y pchrA1b.

Fotografías de los geles de agarosa donde se corrieron los productos de restricción de pchr1NCa (A) y pchrA1b (B). R, Restricción con las enzimas *Bam*H y *ind* para *chr1NCa* y *chrA1* y *ind* para *chrA1*, marcador de tamaño molecular (M).

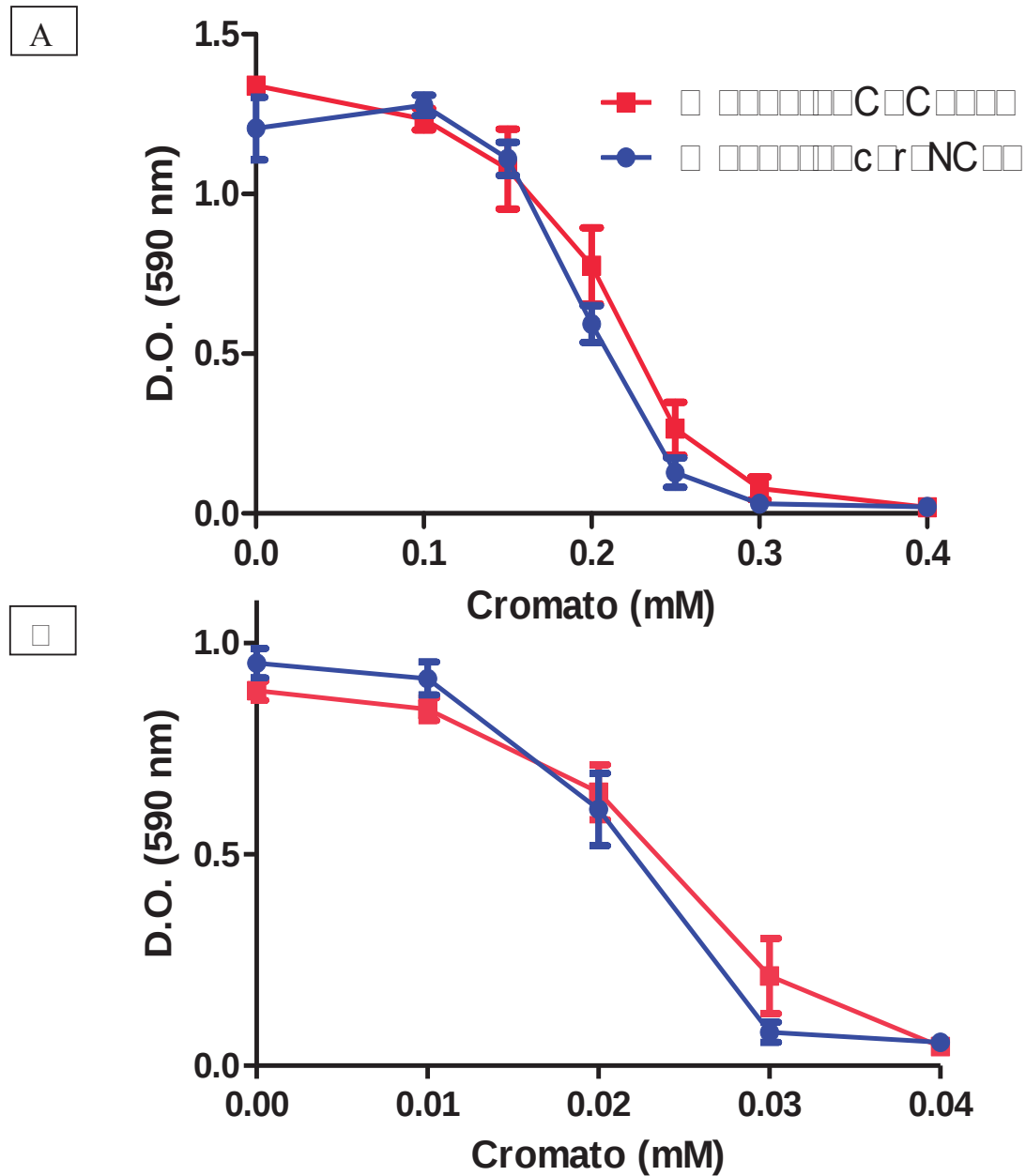


Figura 8. Sensibilidad a cromato de *E. coli* 3110 (pAc-r1Ca) Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo (A) o medio mínimo (B) con las concentraciones de cromato indicadas por la tabla 1 a 37°C y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se midió la absorbencia a 590nm. Las barras muestran la desviación estándar de la media. (n=3).

nado en un vector de alto número de copias en ambos medios de cultivo. Por otra parte, la cepa que contiene el plásmido pC₁NCa presentó un comportamiento similar a la cepa que contiene solo el vector pC₁ (control sensible) en CN (**Figura 9A**), mientras que en medio mínimo mostró un nivel de resistencia a cromato moderadamente mayor comparado con el control sensible (**Figura 9B**). Estos resultados sugieren que los genes *chrNca* se expresan bajo condiciones de cultivo específicas, es decir, sólo cuando se clonaron en un vector de alto número de copias (pC₁) y las pruebas se realizaron en medio mínimo.

La cepa que contiene el plásmido pC₁A1b presentó un nivel de resistencia similar al control sensible tanto en CN como en MM (**Figura 10**) de igual manera la cepa que contiene el plásmido pAc₁A1b mostró un comportamiento similar al control sensible (**Figura 11A**) sin embargo, esta misma cepa presentó un nivel de resistencia a cromato claramente mayor con respecto al control sensible cuando los cultivos se crecieron en MM (**Figura 11B**). Por lo tanto, de estos resultados se dedujo que el gen *chrA1* probablemente se expresa sólo cuando se halla clonado en un vector de alto número de copias (pAc₁) y las pruebas de susceptibilidad se realizaron en medio mínimo.

6. Análisis de expresión de los cromosomas *chr* de *B. xenovorans* LB400

Para evaluar los niveles de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a partir de RNA extraído de cultivos crecidos en diferentes condiciones. Para ello el RNA se utilizó para generar cDNA el cual se usó como molde para llevar a cabo ensayos de PCR y los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa. En los resultados sólo se muestra una parte del gel donde se observan las bandas correspondientes a los genes *chr* así como su localización (replicón) en el genoma de *B. xenovorans*. El gen 16S se usó como control de carga de los experimentos

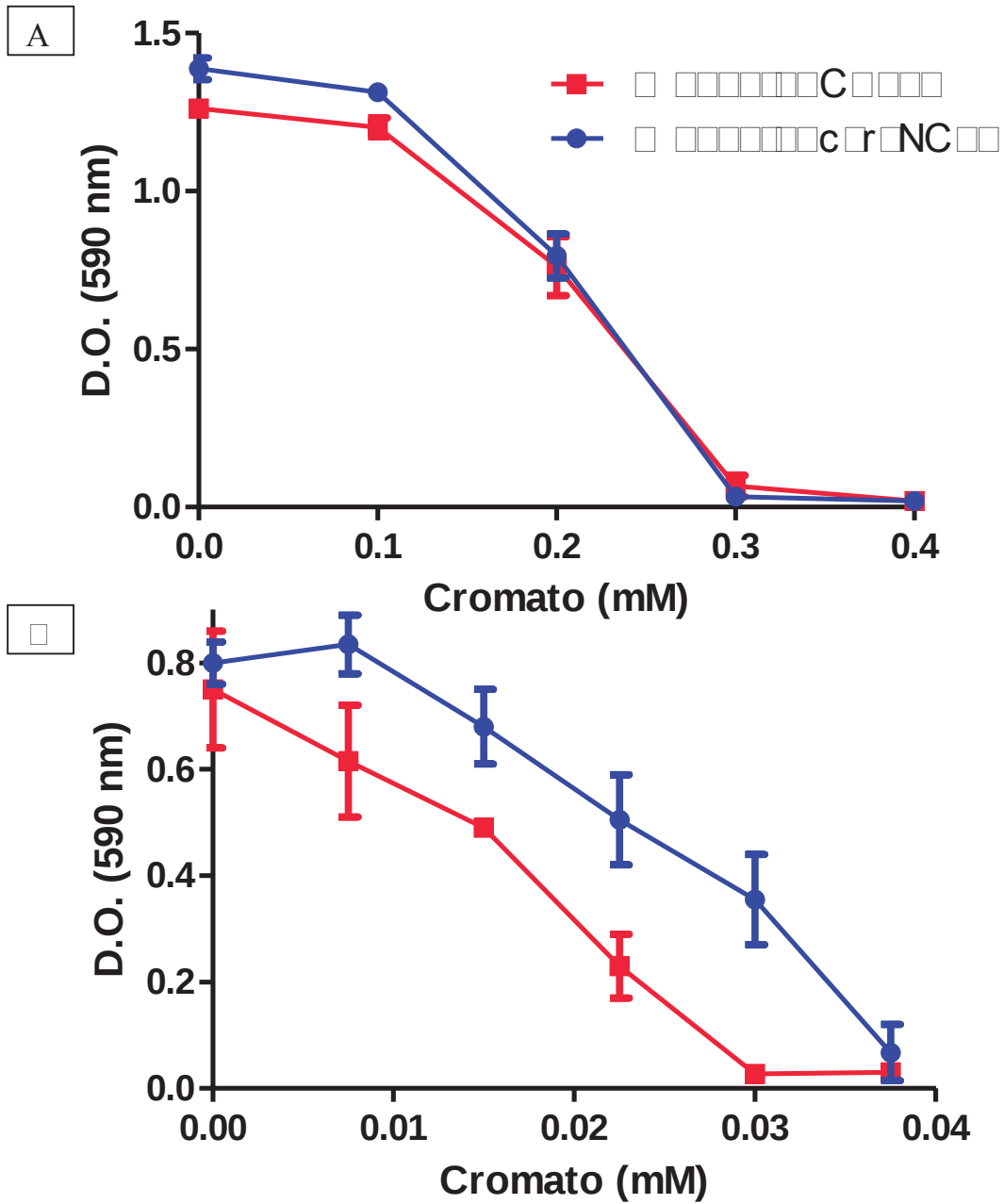


Figura 9. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* 3110 (p_{chr1}Ca) los cultivos se crecieron en caldo nutritivo (A) o medio mínimo (B) con las concentraciones de cromato indicadas por la tabla C y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. Las barras muestran la desviación estándar de la media. (n=3).

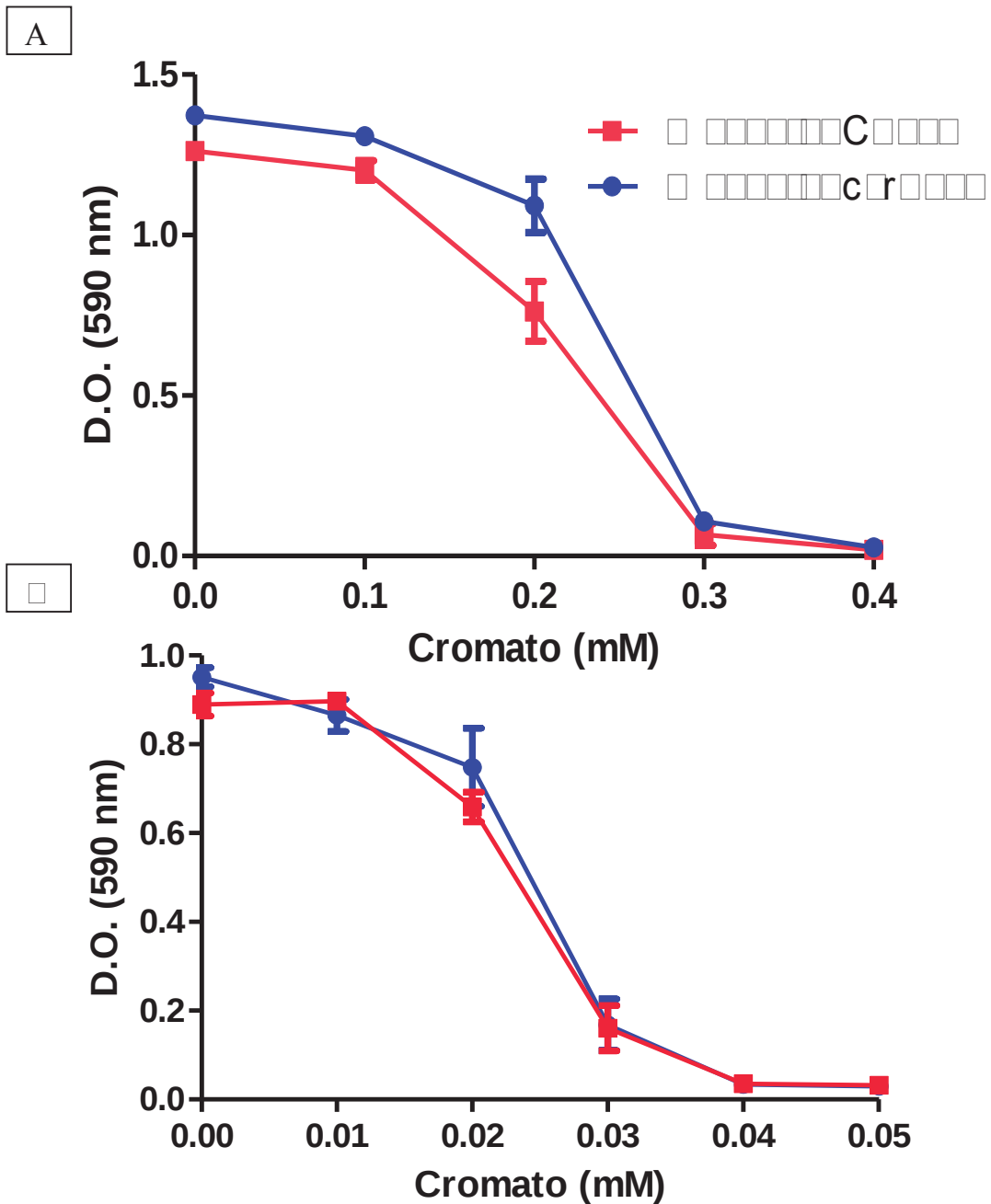


Figura 10 Sensibilidad a cromato de *E. coli* 3110 (pchrA1b) Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo (A) o medio mínimo (B) con las concentraciones de cromato indicadas por la tabla 10C y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. Las barras muestran la desviación estándar de la media. (n=3).

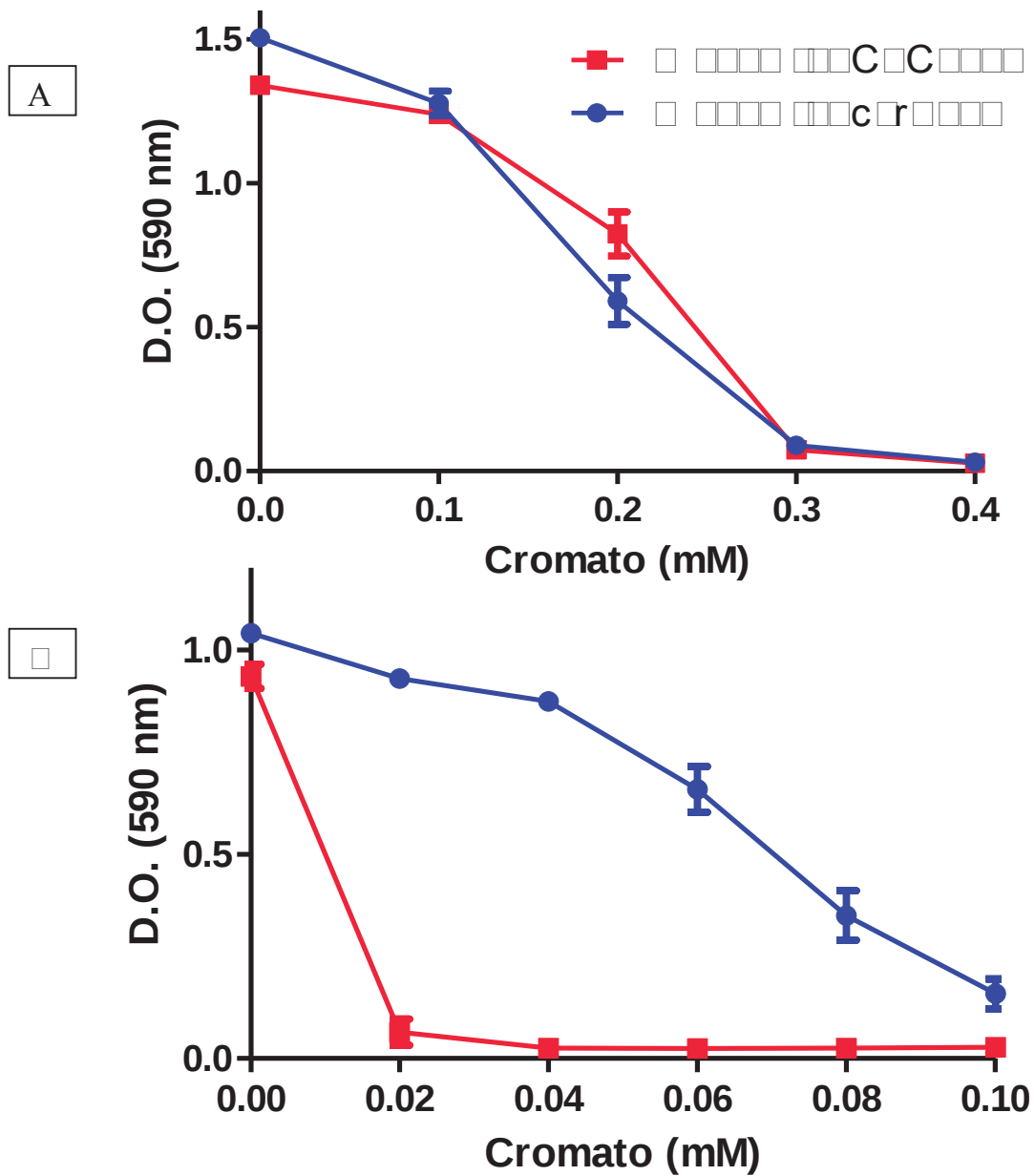


Figura 11 Sensibilidad a cromato de *E. coli* 3110 (pAc-rA1b) Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo (A) o medio mínimo (B) con las concentraciones de cromato indicadas por la leyenda y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. Las barras muestran la desviación estándar de la media. (n=3)

A las bandas de los geles se les realizó un análisis densitométrico y los datos se graficaron en unidades de expresión relativa en relación a la expresión del 16S.

a) Aislamiento de RNA total

Para el aislamiento de RNA total se crecieron los cultivos en diferentes condiciones. Se utilizó el procedimiento mencionado en materiales y métodos y el RNA se corrió en geles de agarosa al 1.0%. En la **Figura 12** se muestra una fotografía representativa de un gel donde se observa el RNA total aislado. Se concluyó que el RNA estaba íntegro debido a que se observaron señales definidas del RNA de las subunidades ribosomales 16S y 23S por lo que se consideró de buena calidad para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR.

b) RT-PCR

• **A partir de cultivos de *B. xenovorans* crecidos en caldo nutritivo**

Para determinar la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* inicialmente se realizaron ensayos de RT-PCR a partir de RNA total de cultivos de *B. xenovorans* en CN en presencia y ausencia de cromato. En ausencia de cromato se encontró que los genes *chrA* y *chrA'* prácticamente no se expresaron, los genes *chrA''*, *chrN''* y *chrA'''* dieron una señal baja, mientras que el gen *chrN'''* se expresó en un nivel moderado con relación al 16S, empleado como control de expresión (**Figura 13 barra gris**). De estos resultados se dedujo que los genes *chr* de *B. xenovorans* se expresan en diferentes niveles en células crecidas en CN. Cuando los cultivos se expusieron a 100% de cromato se encontró que, a excepción de *chrA* que no se expresó, y *chrN''* que mostró una señal disminuida, todos los genes restantes presentaron un nivel de expresión más alta con respecto a la mostrada en ausencia de cromato (**Figura 13 barra negra**). Sin embargo, los genes *chrA'* y *chrA''* respondieron de manera más

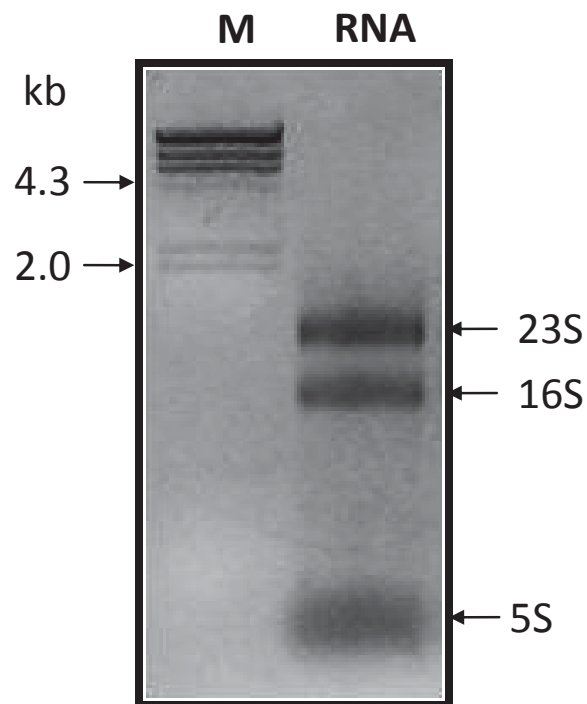


Figura 12 Aislamiento del RNA total. Se creció un cultivo de *B. xenovorans* en m^2 por m^2 a 37°C con agitación constante. Se aisló el RNA total utilizando el procedimiento descrito en materiales y métodos. Se muestra la fotografía de un gel de agarosa (1.0%) donde se observan las bandas del RNA de las subunidades ribosomales 23S y 16S . También se indica como referencia el marcador de tamaño molecular (λ indicated) (M).

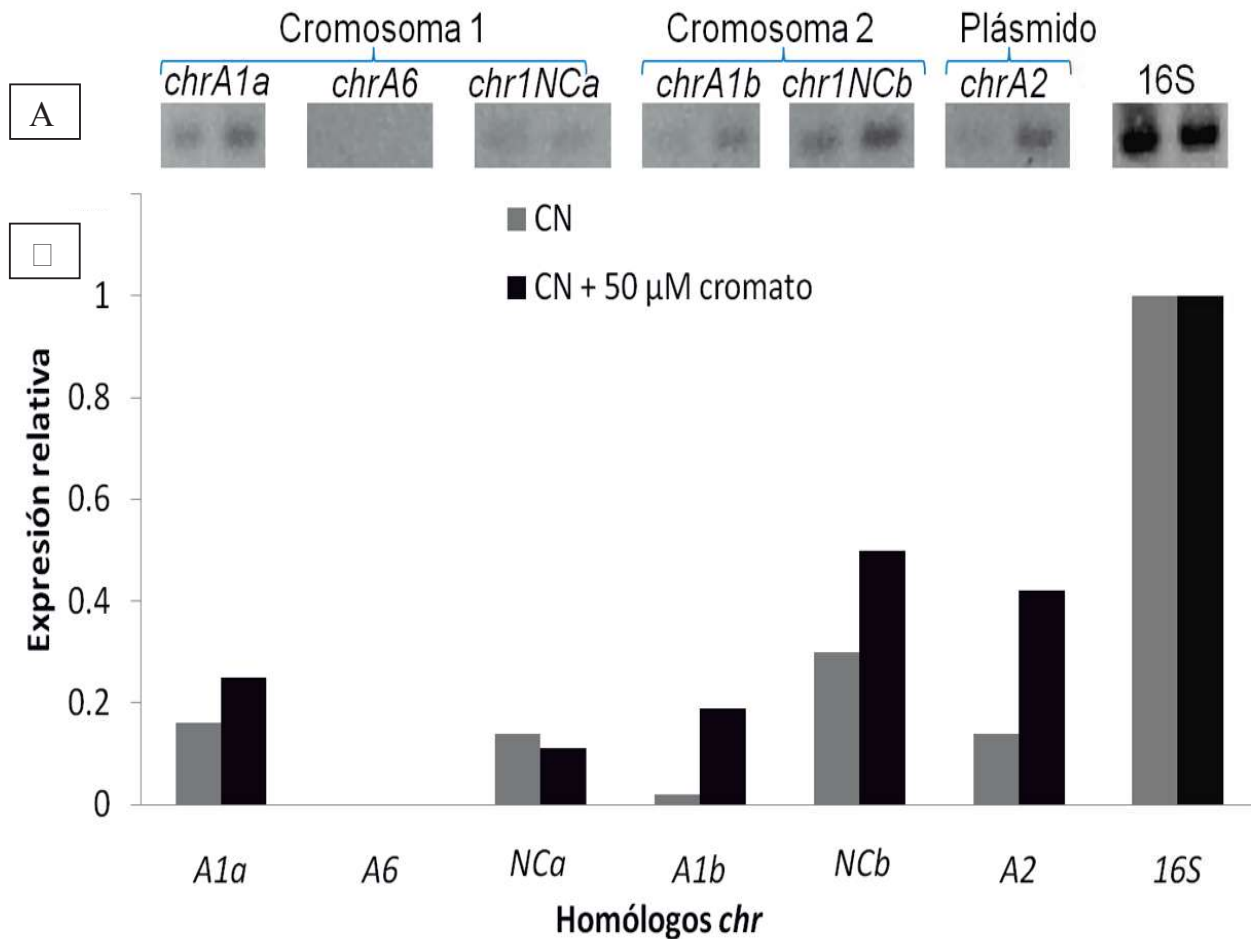


Figura 13 Expresión de los homólogos chr de *B. xenovorans* LB400 a partir de cultivos crecidos en caldo nutritivo. Se crecieron los cultivos en CN por 10 a 12 h con agitación constante. Se aisló el RNA total, se generó cDNA y se realizaron RT-PCR como se indica en el texto. A. Localización de los genes chr en el genoma de *B. xenovorans* se muestra sólo parte del gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes chr y del gen *RNAr* 16S, que se usó como unidad de expresión relativa (1.0). B. Análisis densitométrico de las bandas en (A) realizado con el programa ImageJ. Barras grises, expresión en ausencia de cromato; barras negras, expresión en presencia de 50 μM de cromato (representativo de n=3).

clara a cromato (**Figura 13**). Por lo tanto, en cultivos en CN la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans* se inducen por la exposición a cromato.

- **A partir de cultivo de *B. xenovorans* crecido en 9 con 2 mM de sulfato**

- **Fase logarítmica de crecimiento**

Para determinar cómo influye el medio de cultivo en la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* se realizaron RT-PCR a partir de cultivos crecidos hasta la fase exponencial de crecimiento (10⁷) en medio mínimo con 2 mM de sulfato, que es la concentración estándar de este ion en el medio. En ausencia de cromato se encontró que los genes *chrA* y *chrA* prácticamente no dieron señal, *chrN* mostró una expresión baja, los genes *chrA* y *chrN* se expresaron de manera moderada, mientras que *chrA* se expresó en un nivel parecido al 16S (**Figura 14 barra gris**). En las siguientes graficas no se presenta la expresión del control 16S. Al igual que en CN, los genes *chr* mostraron diferentes niveles de expresión. Cuando se realizaron RT-PCR de cultivos tratados con 2 mM de cromato, se observó que todos los genes *chr* presentaron un nivel de expresión más alto que en ausencia de cromato (**Figura 14 barra negra**). Sin embargo, los genes *chrA*, *chrN* y *chrA* se expresaron de forma mucho más pronunciada, incluso por arriba del nivel del 16S. Se puede concluir que en estas condiciones de crecimiento todos los genes *chr* de *B. xenovorans* responden a la exposición de cromato.

- **Fase estacionaria de crecimiento**

Para determinar el efecto que tiene la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes *chr* se realizaron ensayos de RT-PCR con RNA aislado a partir de cultivos de *B. xenovorans* crecidos por 10⁷ (fase estacionaria) al igual que el inciso anterior en 2 mM con 2 mM de sulfato, en ausencia y presencia de cromato. Sin cromato se encontró que

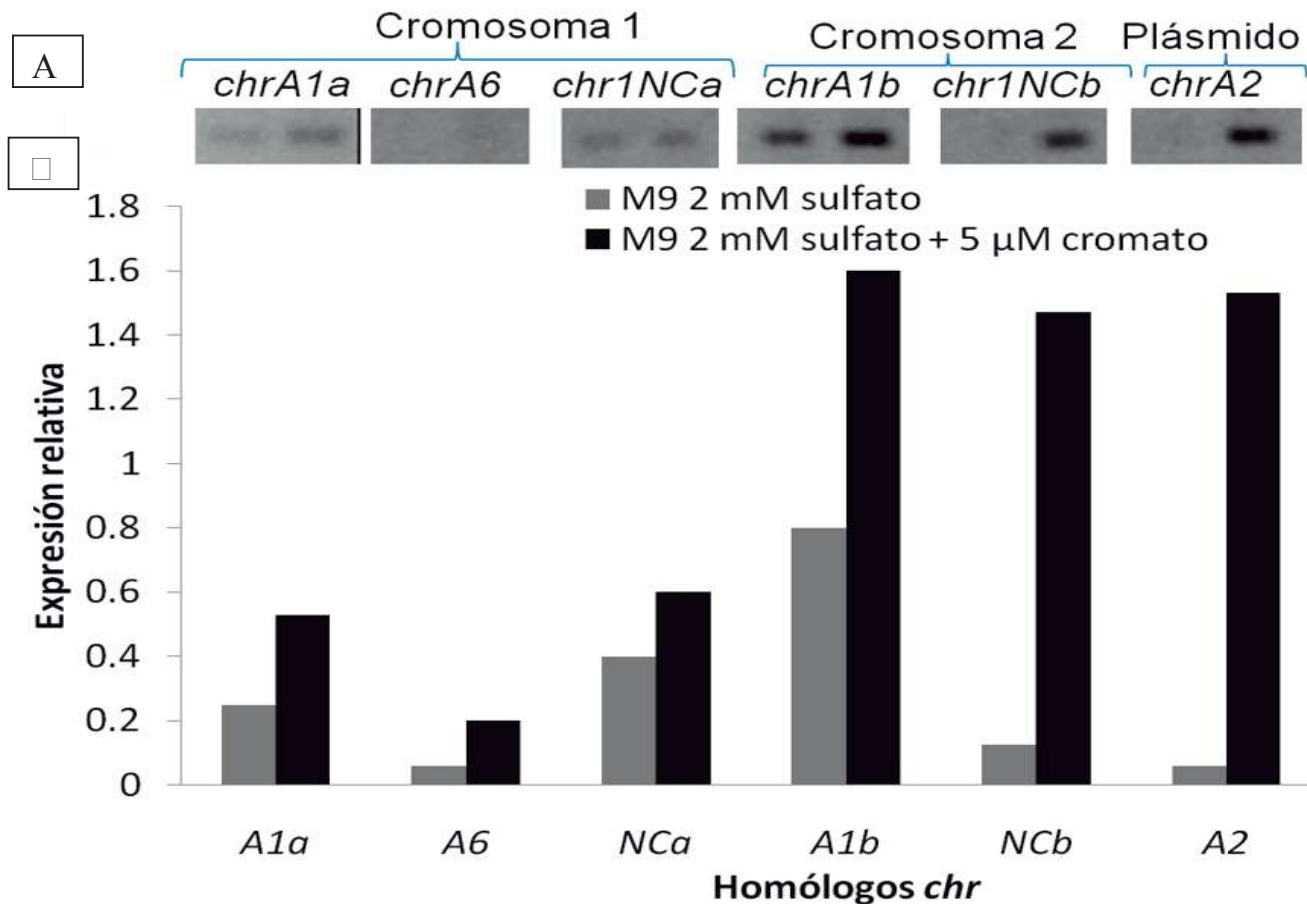


Figura 14 Expresión de los homólogos *chr* de clon de *B. xenovorans* LB400 en M9 (2 mM de sulfato) en fase logarítmica. Se crecieron los cultivos por 10 h a 37°C con agitación constante. Se aisló el RNA total, se generó cDNA y se realizaron qRT-PCR como se indica en métodos. A. Localización de los genes *chr* en el genoma de *B. xenovorans* se muestra sólo parte del gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes *chr*. La expresión del gen 16S se usó como unidad de expresión relativa (1.0). B. Análisis densitométrico de las bandas en (A) realizado con el programa ImageJ. Barras grises, indican expresión en ausencia de cromato; barras negras expresión en presencia de 5 μM de cromato (representativo n=3).

los genes *chrA*₁ y *chrN*₁ mostraron expresión casi nula, los genes *chrA*₂ y *chrA*₃ dieron señal baja, mientras que *chrA*₄ y *chrN*₂ se expresaron de manera moderada en relación al 16S (**Figura 15 barra gris**). Al igual que en fase logarítmica, los genes *chr* presentaron un patrón de expresión diferencial. En presencia de 0.04 mM de cromato se encontró que, a excepción del gen *chrN*₂ cuyo nivel de expresión disminuyó ligeramente, los demás genes mostraron un aumento en la expresión con respecto a los ensayos en ausencia de cromato (**Figura 15 barra negra**). Es importante notar que los genes *chrA*₁, *chrN*₁ y *chrA*₃ presentaron el aumento más claro en la expresión, incluso *chrA*₁ y *chrA*₃ dieron una señal por encima del valor del 16S. Los resultados indican que la fase de crecimiento no afecta considerablemente el patrón de expresión de la mayoría de los genes *chr* en los cultivos crecidos en 0.04 mM de sulfato.

- **A partir de cultivo de *B. xenovorans* crecido en 0.09 con 0.04 mM de sulfato**

- **Fase logarítmica de crecimiento**

Se ha demostrado que la expresión de otros genes *chr* puede estar influenciada por la concentración de sulfato en el medio de cultivo (Lunne y col. 1999). Por ello se realizaron ensayos de RT-PCR con RNA de cultivos crecidos en 0.04 mM de sulfato (0.04 mM), una concentración 10 veces menor que el medio estándar, que fue la concentración mínima a la cual se encontró que *B. xenovorans* aún crece normalmente (resultado no mostrado). Sin cromato, se encontró que el gen *chrA*₁ no se expresó, los genes *chrA*₂ y *chrN*₁ dieron una señal moderada y los genes *chrN*₂, *chrA*₃ y *chrA*₄ mostraron niveles incluso superiores al 16S (**Figura 16 barra gris**). En esta condición, la mayoría de los genes mostraron niveles de expresión altos comparados a los ensayos en 0.04 mM de sulfato (**Figura 14 y 15**). Cuando los cultivos se pusieron a

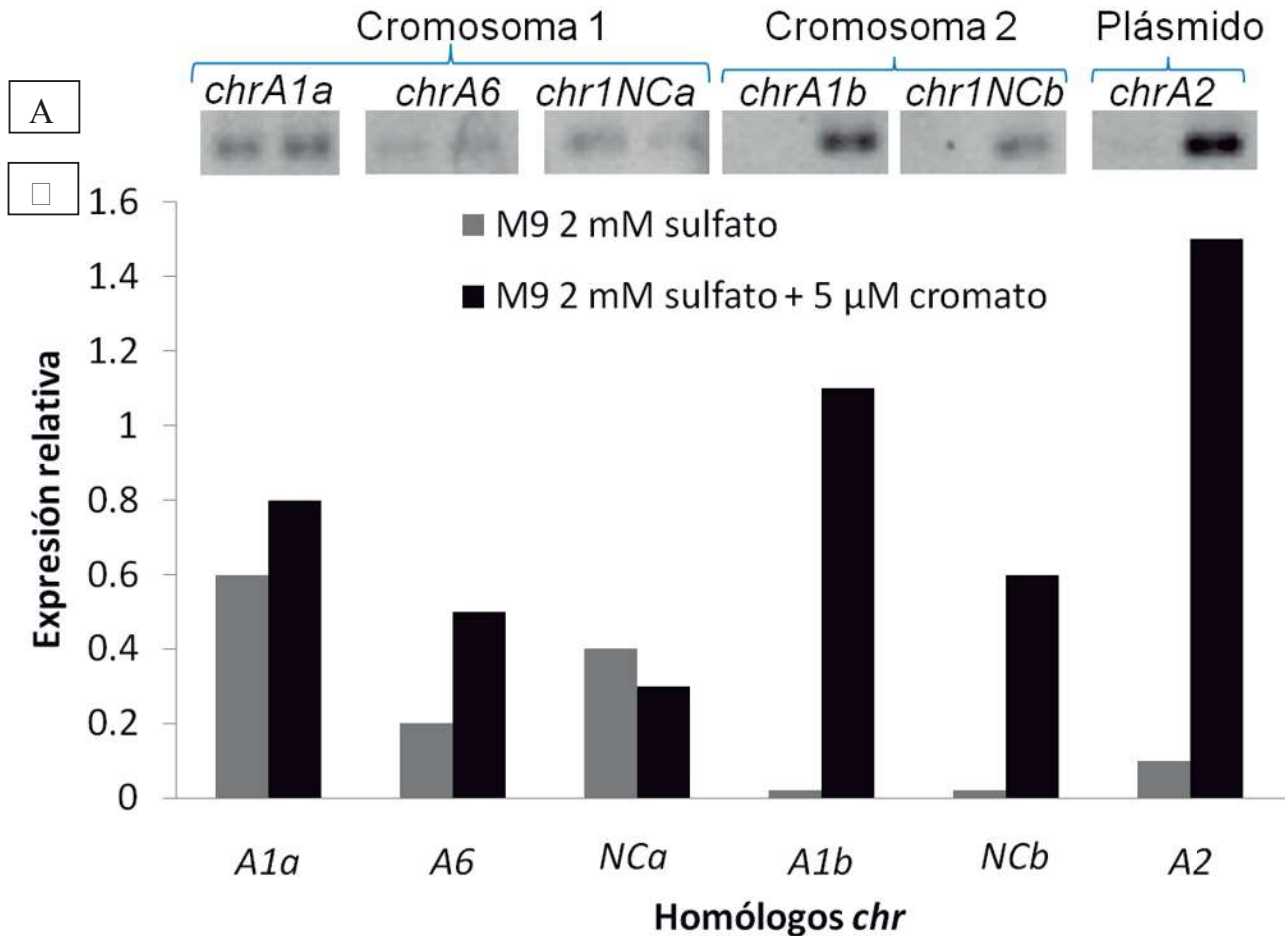


Figura 15 Expresión de los homólogos chr de *B. xenovorans* en M9 (2 mM de sulfato) en fase estacionaria. Se crecieron los cultivos a 30°C con agitación constante. Se aisló el RNA total, se generó cDNA y se realizaron qRT-PCR como se indica en métodos. A. Localización de los genes chr en el genoma de *B. xenovorans* se muestra sólo parte del gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes chr. La expresión del gen 16S se usó como unidad de expresión relativa (1.0). B. Análisis densitométrico de las bandas en (A) realizado con el programa ImageJ. Barras grises, indican expresión en ausencia de cromato; barras negras expresión en presencia de 5 μM de cromato.

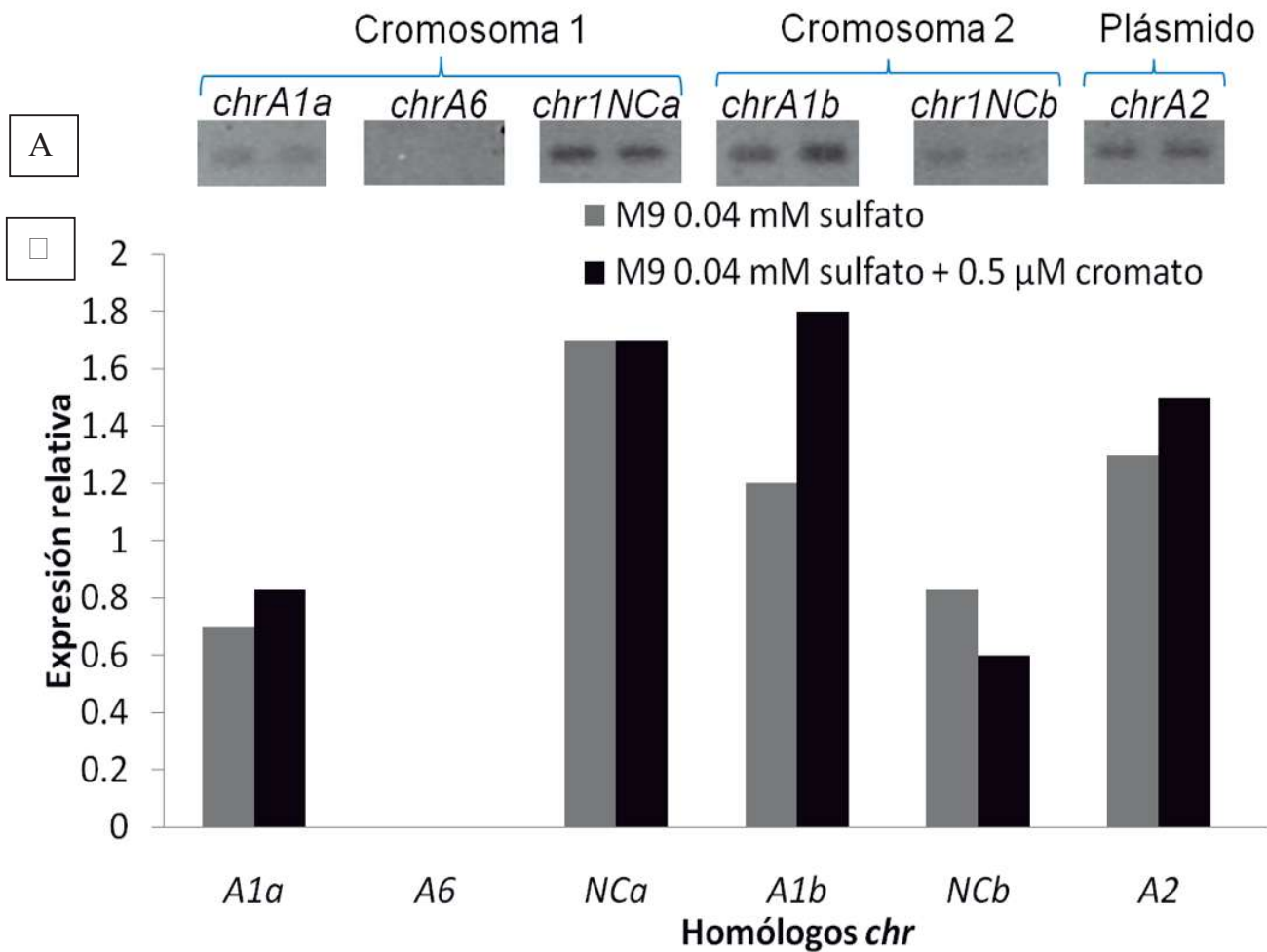


Figura 16 Expresión de los homólogos *chr* de cultivos de *B. xenovorans* en M9 (0.04mM de sulfato) en fase logarítmica. Se crecieron los cultivos por 1 día a 30°C con agitación constante. Se aisló el RNA total, se generó cDNA y se realizaron qRT-PCR como se indica en métodos. A. Localización de los genes *chr* en el genoma de *B. xenovorans* se muestra sólo parte del gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes *chr*. La expresión del gen 16S se usó como unidad de expresión relativa (1.0). B. Análisis densitométrico de las bandas en (A) realizado con el programa ImageJ. Barras grises, indican expresión en ausencia de cromato; barras negras expresión en presencia de 0.5 μM de cromato (representativo de n=3).

□.□□□ de cromato, a excepción del gen *chrA*□ que nuevamente no se expresó, los genes *chrA*□a□*chr*□N□a, *chr*□N□□, *chrA*□□ y *chrA*□ mostraron cambios en su expresión nulos o moderados con respecto a los ensayos en ausencia de cromato (**Figura 16 barra negra**). Por lo tanto la expresión de los genes *chr* no responde de manera notoria a cromato.

► Fase estacionaria de crecimiento

De igual manera se determinó el efecto que tiene la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes *chr* en □□ con □□□ m□ de sulfato. Para ello se realizaron ensayos de R□□□CR creciendo los cultivos por □□□ (fase estacionaria). En ausencia de cromato se encontró que el gen *chrA*□ nuevamente no se expresó, los genes *chr*□N□□ y *chrA*□ mostraron una señal moderada con respecto al 16S y los genes *chrA*□a, *chr*□N□a y *chrA*□□ presentaron niveles de expresión similares al 16S (**Figura 17 barra gris**). Del mismo modo que en fase de crecimiento logarítmica (**Figura 16**), a excepción de *chrA*□ que no se expresó, el resto de los genes mostraron niveles de expresión de moderada a alta. Con cromato se encontró que, a excepción de *chrA*□ que siguió sin expresarse, los genes *chrA*□□ □ *chrA*□ mostraron expresión similar al ensayo sin cromato, mientras que el resto de los genes presentó un aumento en su expresión con relación a en ausencia de cromato (**Figura 17 barra negra**). Por lo tanto, a excepción de *chr*□N□□□ que respondió moderadamente a cromato el resto de los genes no mostraron cambios notorios. En el caso de los genes *chrA*□a, *chr*□N□a y *chr*□N□□ la expresión con cromato fue incluso por arriba del 16S. Se concluyó que la fase de crecimiento no afecta el patrón de expresión de la mayoría de los genes *chr* en los cultivos en □□ con □□□ m□ de sulfato.

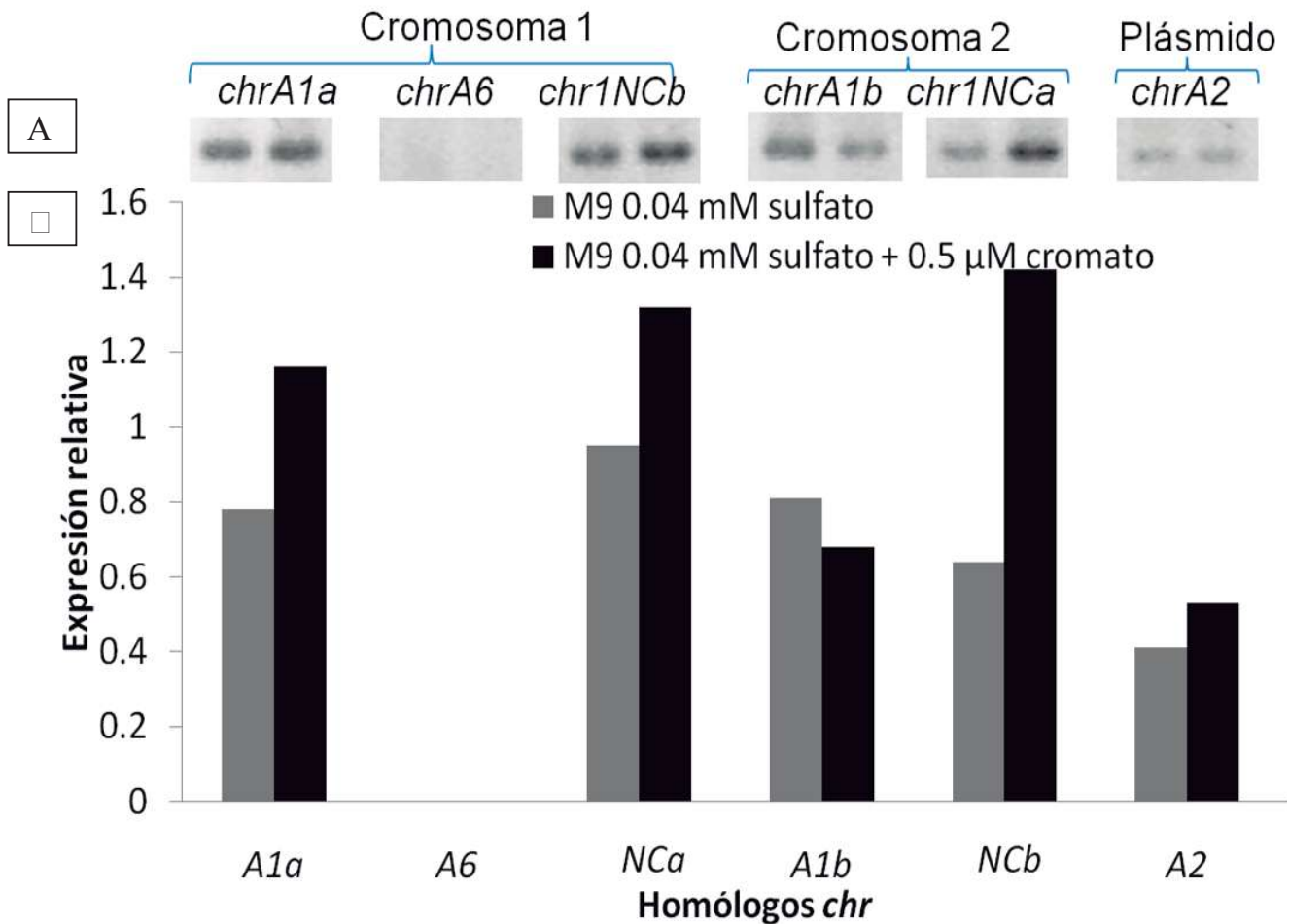


Figura 17 Expresión de los homólogos *chr* de cultivos de *B. xenovorans* en M9 (0.04mM de sulfato) en fase estacionaria. Se crecieron los cultivos por 24h a 30°C con agitación constante. Se aisló el RNA total, se generó cDNA y se realizaron qRT-PCR como se indica en métodos. A. Localización de los genes *chr* en el genoma de *B. xenovorans*. Se muestra sólo parte del gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes *chr*. La expresión del gen 16S se usó como unidad de expresión relativa (1.0). B. Análisis densitométrico de las bandas en (A) realizado con el programa ImageJ. Barras grises, indican expresión en ausencia de cromato; barras negras expresión en presencia de 0.5 μM de cromato (representativo de n=3).

INTRODUCCIÓN

La proteína ChrA es el determinante de resistencia a cromato más ampliamente estudiado. Se ha determinado que las proteínas ChrA de la γ -proteobacteria *Aeruginosa* codificada en el plásmido p₁ (Cervantes y col. 1990) y la β -proteobacteria *Neisseria meningitidis* codificada en el plásmido p₁ O₁ (Nies y col. 1991) confieren resistencia a cromato. Estas proteínas se agrupan en las subfamilias α -CHR y β -CHR de la superfamilia CHR, respectivamente. Recientemente se determinó que las ChrA de la α -proteobacteria *Chromobacterium violaceum* codificada en el transposon *hcr* (Branco y col. 2008), y la γ -proteobacteria *Herbaspirillum sergentii* ANA₁, codificada en el plásmido 1 (Aguilar-Arañas y col. 2008), también confieren resistencia a cromato. Ambas proteínas están ubicadas en la subfamilia α -CHR.

En un análisis filogenético (Díaz-Rey y col. 2008) se encontraron bacterias que contienen en sus genomas varios homólogos CHR (**Tabla 1**). Entre éstas está la β -proteobacteria *B. xenovorans* ATCC 35061, la cual contiene cuatro homólogos α -CHR ubicados en las subfamilias α -CHR1 (dos homólogos, denominados ChrA1a y ChrA1b), α -CHR2 y α -CHR6. También presenta dos homólogos SCHR (denominados Chr1NCa y Chr1NCb), ambos ubicados en la subfamilia SCHR1.

Como no se había determinado si los homólogos agrupados en subfamilias diferentes a α -CHR2 y α -CHR6 confieren resistencia a cromato, resultaba interesante conocer si la función de las proteínas de la superfamilia CHR es generalizada. Debido a esto se llevó a cabo un análisis de los homólogos α -CHR de *B. xenovorans* (León-Rique y col. 2008). Se clonaron los genes *lchr*, se transfirieron a *E. coli* y se encontró que el homólogo ChrA1a confiere resistencia a cromato en medio mínimo cuando se expresa en *E. coli*, clonado en el vector de bajo número de copias pAC104. El homólogo

C_{trA} confirió resistencia a cromato en *E. coli* cuando se clonó en un vector de alto número de copias (pC₁₉₇) y las pruebas se realizaron en caldo nutritivo o medio mínimo. Por otra parte, C_{trA6} confirió un fenotipo resistente en *E. coli* cuando se clonó en pC₁₉₇ y se crecieron los cultivos en caldo nutritivo (León y col. 2004) (Tabla 2). Estos resultados de que los genes *chr* confieren resistencia a cromato bajo diferentes condiciones de cultivo sugirieron que los homólogos CHR probablemente se expresan de manera diferencial en el hosped heterólogo.

También se llevó a cabo el análisis del homólogo de *B. xenovorans* de la familia SCHR (C_{tr1NCb}) y se encontró que confiere resistencia a cromato cuando se expresa en *E. coli* y se clonó en los vectores pAC₁₀₄ o pC₁₉₇ creciendo los cultivos en medio mínimo (Díaz y col. 2004) (Tabla 2).

De estos ensayos se pudo concluir que conferir resistencia a cromato es una función generalizada dentro de la superfamilia CHR, ya que se encontraron proteínas de las subfamilias CHR1, CHR6, CHR de la familia de proteínas grandes (CHR) y SCHR1 y SCHR de la familia de proteínas pequeñas (SCHR) que llevan a cabo esta función.

Los resultados de que los homólogos *chr* de *B. xenovorans* confieren resistencia a cromato bajo diferentes condiciones de cultivo no son sorprendentes dado que *B. xenovorans* es un microorganismo que habita múltiples nichos ecológicos, lo cual probablemente se relaciona con el hecho de que tiene un genoma relativamente grande (4.5 Mb) (Cáin y col. 2006). Por tanto, es probable que los genes *chr* se expresen dependiendo de las condiciones ambientales o de cambios nutricionales a las cuales esta bacteria se expone, confiriéndole ventajas adaptativas es decir, tal vez la

expresión diferencial de los genes *chr* le permite a *B. xenovorans* sobrevivir en sitios contaminados con cromato.

El hecho de que *B. xenovorans* tiene múltiples homólogos *chr* que se expresan bajo diferentes condiciones hacía pensar que una exposición previa a cromato era probablemente capaz de inducir su resistencia al oxidación. Para determinarlo se realizaron ensayos de inducción en CN y en H_2O_2 y se encontró que una exposición previa a cromato en efecto induce la resistencia a cromato en ambos medios de cultivo (**Figura 5**). Es probable que el aumento en la resistencia a cromato se deba a que la expresión de los genes *chr* se induce por la exposición al oxidación. Un ejemplo similar es el reportado en la α -proteobacteria *Mycobacterium xenopus* que tiene dos etapas en su ciclo de vida, una fase crecimiento vegetativo y una de desarrollo donde la célula forma cuerpos fructíferos debido a la deficiencia de nutrientes. Se encontró que las células en crecimiento presentaban un mayor nivel de resistencia a cobre con respecto a las células en desarrollo, sin embargo, cuando las células en desarrollo se expusieron previamente a cobre mostraron un nivel de resistencia similar al observado en las células en crecimiento (Schnepf y col. 1999). Se dedujo que la exposición previa a cobre posiblemente induce mecanismos de tolerancia a cobre, entre estos probablemente los genes parálogos que codifican las oxidasas de cobre (CuoA, CuoB y CuoC).

Dado que al inicio de este trabajo sólo se habían analizado cuatro de los seis homólogos *chr* de *B. xenovorans*, uno de los objetivos iniciales fue determinar la participación de los homólogos restantes, *chrN* y *chrA*, en la resistencia a cromato en *E. coli*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada uno de los genes, incluyendo los posibles promotores y terminadores transcripcionales. Los fragmentos se amplificaron por PCR, se clonaron en un vector para clonar fragmentos de PCR y

enseguida se subclonaron en los vectores de expresión pAC1 y pC. Se siguió la estrategia utilizada por Aguilar-Lara y col. (2004) que, al estudiar el gen *chrA* del plásmido 1 de *Hebilla* sp. ANA, encontró que éste confiere resistencia a cromato a *E. coli* cuando fue clonado en pAC1 y a *E. aeruginosa* cuando fue clonado en el vector pC, cuando las pruebas se realizaron en medio mínimo. Como no se sabía bajo qué condición se observaría el fenotipo conferido por los genes *chr* de *B. xenovorans* (2004), éstos se clonaron en ambos vectores. Los plásmidos recombinantes se transfirieron a *E. coli* y las pruebas de susceptibilidad se realizaron tanto en caldo nutritivo como en medio mínimo.

Los resultados mostraron que *chrN* confiere resistencia moderada a cromato en *E. coli* cuando se clonó en el vector de alto número de copias pC y las pruebas de susceptibilidad se realizaron en (Figura 9A) no fue así cuando se clonó en el vector de bajo número de copias pAC1, donde se observó un comportamiento similar al control sensible (Figura 8). Este dato fue diferente del resultado obtenido para el homólogo *chrN* de la misma subfamilia, el cual confirió resistencia a cromato en *E. coli* cuando se clonó en pAC1 y pC y las pruebas se realizaron en medio mínimo (Díaz Agaña y col. 2004). Al parecer, para que los genes *chrN* confieran resistencia a cromato se necesita que las proteínas que codifican se expresen en una cantidad mayor y esto sólo se consigue cuando los genes están clonados en el vector pC y no en pAC1.

También se encontró que *chrA* confiere resistencia a cromato en *E. coli* cuando se clonó en pAC1 y las pruebas se realizaron en medio mínimo (Figura 11B). Este es un resultado similar al obtenido para el homólogo *chrA* de la misma subfamilia que también confirió resistencia a cromato en *E. coli* clonado en pAC1 en medio

mínimo (Cebón y Trque y col. 1999). Sin embargo, cuando *chrA* se clonó en pC no confirió resistencia a cromato ni en CN ni en (Figura 10). Se sabe que el aumento del número de copias de un plásmido no necesariamente causa un aumento proporcional de los niveles de expresión de las proteínas codificadas (Carrier y col. 1999). Hay ejemplos en que los promotores de los genes son fuertes y con ellos se logra una expresión más eficiente cuando se utiliza un vector de moderado o de bajo número de copias (Bergulao y col. 1999), lo que podría ser el caso de *chrA* también se sabe que cuando hay sobreexpresión de proteínas de membrana estas se pueden precipitar y formar agregados con lo cual pierden su función (Bagner y col. 1999). Esto es lo que tal vez ocurra con la proteína codificada por gen *chrA* cuando es clonado en un vector de alto número de copias como pC. Se puede deducir que se necesita una cantidad pequeña de proteína C_{trA}1b para llevar a cabo su función, probablemente porque en cantidades mayores esta precipita y no es funcional, aunque no se tiene evidencia al respecto.

El medio de cultivo en el que se crecen los microorganismos en estudio también proporciona una condición fisiológica específica en la que el gen se expresa y la proteína funciona. Cuando las células bacterianas se crecen en un medio mínimo, aumenta la expresión de genes relacionados con varios tipos de estrés, incluyendo el estrés nutricional (Bergulao y col. 1999). El que se haya observado que los genes *chrN* y *chrA* confieren resistencia a cromato en *E. coli* cuando las pruebas se realizaron en medio mínimo probablemente se debe a que el estrés dado por la deficiencia de nutrientes en el medio promueve su expresión.

El hecho de que los genes *chr* confieren resistencia a cromato bajo condiciones específicas cuando se expresan en *E. coli* sugiere que estos genes probablemente

también se expresan bajo diferentes condiciones de cultivo en *B. xenovorans* [10]. Esto no resulta sorprendente dado que es un microorganismo que tiene un genoma muy grande (10.6 pb) y presenta a la fecha el porcentaje más alto de redundancia genética (11.6%), siendo el promedio 6% en bacterias de vida libre (Cain y col. [6]). Se conoce que existe una correlación entre el tamaño del genoma y la redundancia genética: genomas grandes contienen un número mayor de genes redundantes (Jordan y col. [1]). A la fecha no se sabe exactamente cuál podría ser la ventaja que les proporciona a microorganismos con genomas relativamente grandes, como *B. xenovorans*, mantener múltiples copias de genes homólogos. Se ha propuesto que en bacterias que habitan en ambientes hostiles (e.g. salinidad o temperatura elevadas), sus genes podrían no expresarse en todas las condiciones fisicoquímicas del medio, por lo que para contender con este problema las bacterias tienen dos o más copias de genes cuya expresión es modulada por las condiciones ambientales, cada uno realizando la misma función bajo diferentes circunstancias (Sincere y col. [4]). Hay ejemplos de genes redundantes que se expresan bajo diferentes condiciones de crecimiento. Uno de estos es el mostrado por los genes homólogos *box* y *boxM* de la ruta catabólica de benzoato de la bacteria de nuestro estudio, *B. xenovorans* [10]. Estos genes son codificados en el cromosoma 1 y el megaplásmido, respectivamente. El gen *box* se expresa cuando los cultivos se crecen sobre bifenilo y *boxM* se expresa durante la fase de transición a la fase estacionaria y cuando los cultivos se crecen en benzoato (Deneff y col. [4]). Se deduce que los genes *box* se expresan de manera diferencial y que son capaces de catabolizar benzoato. Esto le permite a *B. xenovorans* habitar sitios contaminados con compuestos recalcitrantes como el benzoato.

Otro caso interesante son los ya mencionados genes homólogos que codifican las oxidasas de cobre (CuoA, CuoB y CuoC) de la micobacteria *M. xenovorus* (Sánchez-Sutil y col. 2004). Se encontró que el gen *cuoA* se expresa sólo en respuesta a cobre a las 12 y 24 h y *cuoB* también dio señal en presencia de cobre pero a las 24 h, mientras que el gen *cuoC* se expresa de manera constitutiva durante la etapa de crecimiento de *M. xenovorus*. En la etapa de desarrollo de *M. xenovorus* se encontró que *cuoA* y *cuoB* se expresaron sólo en presencia de cobre, pero a diferencia de la etapa de crecimiento el gen *cuoB* se mostró señal hasta las 48 h. El gen *cuoC* se expresó en condiciones de deficiencia de nutrientes (Sánchez-Sutil y col. 2004). De este trabajo se concluyó que los tres genes homólogos que codifican las oxidasas redundantes de cobre de *M. xenovorus* se regulan de manera diferencial.

Por tanto, es probable que *B. xenovorans* al tener varias copias de genes homólogos *chr* éstos se expresen bajo condiciones de crecimiento específicas. Sin embargo, a la fecha no se han determinado los patrones de expresión de los genes *chr* en *B. xenovorans* 2004

Para evaluar los patrones de expresión de los genes antes mencionados se realizaron inicialmente ensayos de RT-PCR a partir de cultivos de *B. xenovorans* crecidos en un medio rico en nutrientes (caldo nutritivo). En ausencia de cromato se encontró que algunos genes prácticamente no se expresaron (*chrA1* y *chrA2*), otros genes dieron una señal baja de expresión (*chrA3*, *chrN1* y *chrA4*) y el gen *chrN2* se expresó en un nivel moderado en relación al 16S (Figura 13). El hecho de que los genes *chr* de *B. xenovorans* hayan mostrado diferentes niveles de expresión en esta condición, puede ser una ventaja porque probablemente proporcionan un respaldo uno al otro, manteniendo un fenotipo estable de resistencia a cromato, es decir, cualquier gen *chr* probablemente

puede llevar a cabo la función del otro. Un ejemplo de genes aparentemente redundantes lo proporciona la superfamilia de tiorredoxinas en *E. coli*. Se encontró que las tiorredoxinas citoplasmicas y las glutaredoxinas son redundantes y proporcionan respaldo una a la otra, de tal forma que las mutantes en los genes que codifican a una proteína o a la otra son viables bajo condiciones estándar de laboratorio (Crin y col. 1999). De hecho, en estas condiciones, sólo cuando se mutaron los genes que codifican las enzimas más eficientes se observó un fenotipo letal, por lo que aparentemente cualquier proteína del grupo podía llevar a cabo la función de respaldo.

Cuando los cultivos de *B. xenovorans* en CN se expusieron a 100 µM de cromato, la molécula probablemente inductora de los genes *chr* se encontró que a excepción de *chrA* que no se expresó, y *chrN* que mostró una expresión disminuida, todos los genes presentaron un nivel de expresión más alto con respecto a la mostrada en ausencia de cromato (Figura 13). Por lo tanto, la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans* respondieron a la exposición a cromato. El hecho de que algunos genes *chr* se hayan inducido por cromato no es sorprendente dado que los homólogos *chr* son genes adaptativos que responden a condiciones de estrés, en este caso la exposición a cromato. Como se mencionó anteriormente, el medio de cultivo en el que se crecen las células bacterianas juega un papel importante para que los genes se expresen y la proteína lleve a cabo su función (Mergulhao y col. 2004). Por tanto, para determinar cómo afecta el medio de cultivo en la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* se realizaron ensayos de RT-PCR de cultivos en un medio de cultivo mínimo (MM) con 1 mM de sulfato, que es la concentración estándar del medio, crecidos hasta fase logarítmica. En ausencia de cromato se encontró que algunos genes prácticamente no dieron señal de expresión (*chrA* y *chrN*), otros genes se expresaron de manera moderada (*chrA* y

chrN_{1a}) y el gen *chrA₁* que se expresó en un nivel parecido al 16S (**Figura 14**). Al igual que en los ensayos en CN, los genes *chr* en $\square\square$ con $\square$ m $\square$ de sulfato mostraron diferentes niveles de expresión. Estos datos confirman que los genes *chr* posiblemente proporcionan respaldo uno a otro en diferentes condiciones de cultivo. Cuando se realizaron ensayos de RT-PCR de cultivos expuestos a cromato se observó que todos los genes *chr* presentaron un nivel de expresión más alto que en ausencia de cromato (**Figura 14**). Se puede concluir que en esta condición de cultivo la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans* responden a la exposición de cromato, como era de esperarse para estos genes adaptativos que codifican sistemas de expulsión del ión tóxico.

Resultados similares fueron reportados para los genes *chr* de $\square$. *Deallidurans*. Se encontró que *chrA₁* codificado en el plásmido p $\square$ O $\square\square$, y *chrA₂* codificado en el cromosoma, se indujeron por cromato en un medio mínimo con $\square$ m $\square$ de sulfato (Bühne y col. $\square\square\square$). Para el caso del gen *chrA₆* que a diferencia de CN (**Figura 13**) bajo esta condición sí mostró expresión, aunque a un nivel muy bajo (**Figura 14**), es probable que el medio de cultivo proporcionó las condiciones fisiológicas para dicha expresión. Al ver al igual que para los genes *chr* de $\square$. *Deallidurans* la concentración de sulfato que contiene el medio de cultivo favoreció su expresión, aunque no se conoce de qué forma.

Dado que está ampliamente reportado que la fase de crecimiento afecta la expresión de algunos genes adaptativos (Amann y col. $\square\square\square$, Deneff y col. $\square\square\square$, Sánchez-Sutil y col. $\square\square\square$), se determinó el efecto que tiene la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes *chr*. Se realizaron ensayos de RT-PCR de cultivos de *B. xenovorans* también en $\square\square$ con $\square$ m $\square$ de sulfato pero crecidos hasta fase estacionaria ($\square\square\square$) en lugar de logarítmica ($\square\square\square$). Al igual que en fase logarítmica de crecimiento, sin cromato, los

genes mostraron diferentes niveles de expresión (**Figura 15**) y no hubo una variación notable en la expresión en ambas fases de crecimiento. Un resultado contrario se reportó para los homólogos *cuo* de *M. xanthus* donde se encontró que el gen *cuoA* se expresa sólo en fase estacionaria (□□□□ □□), *cuoB* sólo en fase logarítmica (□ y □□) y *cuoC* a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus* (Sincé-Sutil y col. □□□□). En presencia de □□□ de cromato se encontró que el nivel de expresión del gen *chrN□a* disminuyó ligeramente, mientras que el resto de los genes mostraron un aumento en su expresión con respecto a los ensayos en ausencia de cromato—incluso los genes *chrA□□* y *chrA□* se expresaron por encima del nivel del 16S, lo cual indica que hubo una sobreexpresión de estos genes, dado que el 16S es un gen cuya expresión de por sí es alta ya que es un componente de los ribosomas y su función es indispensable para la síntesis de proteínas.

Para comparar el efecto que tiene el cromato sobre la expresión de los genes *chr* en □□ con □m□ de sulfato en las distintas fases de crecimiento, se tomaron los datos de las **Figura 14** □ **15** y se calculó el número de veces que la expresión de los genes *chr* se indujo por cromato (**Tabla 5**). Para considerar que hubo inducción se tomó un valor arbitrario de aumento de la expresión ≥ 2 . En fase logarítmica de crecimiento se encontró que, a excepción de los genes *chrN□a* todos los genes *chr* se indujeron por el cromato, con los genes *chrN□□* y *chrA□* mostrando la inducción más clara (de 1□ a □□ veces) (**Tabla 5**). En fase estacionaria de crecimiento, se encontró que a excepción de los genes *chrA□a* y *chrN□a* que no se indujeron, el resto de los genes respondieron a cromato y los genes *chrA□□*, *chrN□□* y *chrA□* lo hicieron de forma más eficiente (de 1□ a □□ veces) (**Tabla 5**). Por lo tanto, se puede concluir que el cromato indujo la expresión de la mayoría de los genes *chr* a partir de cultivos de *B. xenovorans* crecidos en □□ con □m□ de sulfato, independientemente de la fase de crecimiento.

Tabla 5. Efecto del cromato sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* crecida en $\square\square$ con $\square m\square$ de sulfato

Gene	Expresión relativa ^a	
	Factor logarítmica	Factor efectoria
<i>chrA1a</i>	2.6	1.3
<i>chrA6</i>	3.3	2.5
<i>chr1NCa</i>	1.6	0.8
<i>chrA1b</i>	2.0	55.0
<i>chr1NCb</i>	11.8	30.0
<i>chrA2</i>	25.0	15.0

^a. Se tomaron los datos de las figuras 1 y 1 y se dividió el valor de expresión de los genes en presencia de cromato entre la expresión en ausencia de cromato. Los números indican el cociente resultante. Se consideró que hubo inducción con un valor ≥ 2 . En números rojos se muestran los genes inducidos y en negros los no inducidos.

Sin embargo, se encontraron algunas diferencias como para el gen *chrA_{1a}* que en fase logarítmica se induce ligeramente por cromato, mientras que en fase estacionaria no se induce. También se encontró que *chrA_{1b}* en fase logarítmica apenas se induce (1 vez), mientras que en estacionaria se induce de manera considerable (10 veces) (Tabla 5). Se sabe que las células bacterianas están sometidas a diferentes tipos de estrés en las distintas etapas de su crecimiento. En fase logarítmica el metabolismo es más activo y hay síntesis de numerosos componentes celulares. En cambio, en fase estacionaria hay escasez de nutrientes y acumulación de compuestos tóxicos (propios y col. 1996). Las diferencias en expresión de los genes *chr* probablemente se deban a los cambios en las condiciones fisiológicas proporcionadas por las distintas fases de crecimiento.

Es importante mencionar que los genes *chrA_{1b}* y *chrN_{1b}* ubicados en el cromosoma 2, así como el gen *chrA_{1b}* localizado en el megaplásmido de *B. xenovorans* respondieron a cromato de manera mucho más eficiente en comparación con los genes *chrA_{1a}*, *chrA_{1b}* y *chrN_{1b}* localizados en el cromosoma 1 (Tabla 5). Este resultado no es sorprendente, dado que se sabe que el cromosoma 2 y el megaplásmido contienen principalmente genes adaptativos, como los genes de fijación de nitrógeno *ni₁* que le permiten a *B. xenovorans* habitar la rizosfera (Cain y col. 1996). En cambio, el cromosoma 1 contiene principalmente genes de metabolismo central (equipo maquinaria traduccional, replicación del DNA, división celular y metabolismo de nucleótidos) (Cain y col. 1996) lo que a esto se deba la buena respuesta a cromato de los genes *chr* localizados en este replicón.

Se conoce que la concentración de sulfato influye en la expresión de algunos genes *chr* como los ya citados de *B. allidurans*. Los genes *chrA_{1b}* y *chrA_{2b}* se inducen por cromato de forma clara en alto sulfato, mientras que en bajo sulfato su inducción es

menor (Uñe y col. 2004). Para evaluar el papel que tiene el sulfato en la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, se realizaron ensayos de RT-PCR creciendo inicialmente los cultivos hasta fase logarítmica en LB con bajo sulfato (0.05 mM). En ausencia de cromato se encontró que el gen *chrA* no se expresó, los genes *chrAa* y *chrN* dieron una señal moderada en relación al 16S, mientras que los genes *chrNa*, *chrA* y *chrA* incluso mostraron niveles superiores al 16S (Figura 16). Estos resultados de expresión moderada a alta de la mayoría de los genes *chr* y los mostrados en las Figuras 14 y 15 (LB con 0.5 mM de sulfato) sugieren que el sulfato reprime la expresión de la mayoría de los genes *chr* (*chrAa*, *chrNa*, *chrN* y *chrA*). Esto debido a que la expresión de los genes antes mencionados fue baja en 0.05 mM de sulfato con respecto a la mostrada en 0.5 mM de sulfato (Comparar figura 14 y 16). Este es un resultado contrario al obtenido por Uñe y col. (2004), quienes demostraron que los genes *chrA* y *chrA* de *B. allidurans* no se expresaron en medio mínimo con bajo sulfato (0.05 mM). Cuando los cultivos se expusieron a 0.5 mM de cromato, a excepción del gen *chrA* que nuevamente no se expresó, el resto de los genes mostraron incrementos nulos o moderados en su expresión (Figura 16). Esto indica que el cromato no haya provocado un aumento importante en la expresión de los genes *chr* en estas condiciones de cultivo probablemente se debe a que la expresión mostrada en ausencia de cromato fue de por sí alta, posiblemente debido a que los genes *chr* están desreprimidos por la deficiencia de sulfato en el medio de cultivo (Figura 16).

También se determinó el efecto que tiene la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, ahora creciendo los cultivos en LB con 0.05 mM de sulfato hasta fase estacionaria. En ausencia de cromato se encontró un gen que no se

expresó (*chrA*), genes que mostraron una señal moderada con respecto al 16S (*chrN* y *chrA*) y genes que presentaron niveles altos de expresión, similares al 16S (*chrAa*, *chrNa* y *chrA*) (**Figura 17**). Del mismo modo que en fase de crecimiento logarítmica a excepción de *chrA* que no se expresó, el resto de los genes mostraron niveles de expresión de moderada a alta. Aguilar-Arañas y col. (2011) demostraron que los genes *chr* de *A. aeruginosa*, *Helicobacter sp.* ANA y *Neisseria meningitidis* no transportan sulfato al interior de la célula; sin embargo, es probable que algunos genes *chr* de *B. xenovorans* lleven a cabo una función dual, es decir, transporten sulfato al interior celular en condiciones de deficiencia del oxígeno, mientras que en alto sulfato expulsen cromato. Esto debido a que el nivel de expresión es alto en deficiencia de sulfato, hecho que se relaciona con la expresión de los genes que codifican los transportadores de sulfato cuyo nivel de expresión es alto en deficiencia de sulfato (Dreyfuss, 1966). Con cromato se encontró que, a excepción de *chrA* que siguió sin expresarse, los genes *chrA* y *chrA* mostraron expresión similar al ensayo sin cromato, el resto de los genes presentaron un aumento en su expresión con relación a los ensayos en ausencia de cromato (**Figura 17**). En el caso de los genes *chrAa*, *chrNa* y *chrN* la expresión con cromato fue incluso por arriba del 16S. Al igual que en fase de crecimiento logarítmica, se puede concluir que la mayoría de los genes *chr* no mostraron cambios notorios en su expresión con respecto a los ensayos en ausencia de cromato.

Para establecer el efecto cuantitativo que tiene el cromato sobre la expresión en la presencia de sulfato, se calculó el número de veces que los genes *chr* se indujeron por cromato en esta condición (**Tabla 6**). A excepción de los genes *chrN* que presentaron un valor de inducción de 1 en la fase de crecimiento estacionaria, ningún

Tabla 6. Efecto del cromato sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* crecida en H_2O con 100mM de sulfato

Gene	Expresión relativa ^a	
	Factor logarítmica	Factor estacionaria
<i>chrA1a</i>	1.4	1.5
<i>chrA6</i>	ND	ND
<i>chr1NCa</i>	1.1	1.3
<i>chrA1b</i>	1.4	0.9
<i>chr1NCb</i>	1.0	2.0
<i>chrA2</i>	1.2	1.1

^a. Se tomaron los datos de las figuras 16 y 17 y se dividió el valor de expresión de los genes con cromato entre la expresión sin cromato. Los números indican el cociente resultante. Se consideró que hubo inducción con un valor ≥ 2 . En números rojos se muestran los genes inducidos y en negros los no inducidos.

gen *chr* se indujo por cromato en ninguna de las fases de crecimiento (**Tabla 6**). Estos resultados indican que el cromato no indujo la expresión de la mayoría de los genes *chr* y esto probablemente es debido a que los genes están desreprimidos en baño sulfato.

De igual manera que en el caso de sulfato, la fase de crecimiento no afectó considerablemente el patrón de expresión de la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans*. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias en la expresión de genes *chr* entre fases de crecimiento. Los genes *chrN1* se indujeron por cromato en fase estacionaria mientras que en logarítmica no lo hicieron. Además el gen *chrA1* se expresó en menor nivel en fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica. Estas diferencias probablemente se deban a las condiciones fisiológicas proporcionadas en las distintas fases de crecimiento analizadas.

También se estableció el efecto que tiene el sulfato sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* en las diferentes fases de crecimiento, se tomaron los datos de las **Figura 14** y **16** (fase logarítmica) y las **Figura 15** y **17** (fase estacionaria) y se calculó si la expresión de los genes *chr* se reprime por sulfato (**Tabla 7**). Para considerar que hubo represión se tomó un valor arbitrario de disminución de la expresión ≤ 0.5 . En fase logarítmica de crecimiento se encontró que, a excepción de *chrA1* que no se reprimió, todos los genes *chr* se reprimieron por sulfato, con el gen *chrA1* presentando la represión más notoria (**Tabla 7**). En fase estacionaria de crecimiento, se encontró que a excepción de *chrA1a* que no se reprimió, el resto de los genes *chr* se reprimieron por sulfato y los genes *chrA1* y *chrN1* mostraron los valores de represión más clara (**Tabla 7**). De esta manera, se puede concluir que el sulfato reprime la expresión de la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans* independientemente de la fase de crecimiento.

Tabla 7. Efecto del sulfato sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*

Gene	Expresión relativa ^a	
	Factor logarítmica ^b	Factor efectoria ^c
<i>chrA1a</i>	0.40	0.80
<i>chrA6</i>	ND	ND
<i>chr1NCa</i>	0.24	0.40
<i>chrA1b</i>	0.70	0.02
<i>chr1NCb</i>	0.20	0.03
<i>chrA2</i>	0.05	0.24

^a. Se tomaron los datos de las figuras 1^a y 16^b y las figuras 1^a y 1^c y se dividió el valor de expresión de los genes con 0 mM de sulfato entre la expresión con 100 mM de sulfato. Los números indican el cociente resultante. Se consideró que hubo represión con un valor ≤ 0.1 . Los números verdes se muestran los genes reprimidos y en negros los no reprimidos.

A partir de los resultados obtenidos se propone un modelo hipotético de regulación de los genes *chr* de *B. xenovorans* (**Figura 18**). En concentraciones elevadas (10^{-3} M) de sulfato, la cantidad de SO_4^{2-} que ingresa a las células es suficiente para actuar como un correpresor que active a un represor que se encuentra en su forma inactiva (**Figura 18 A**). El represor activo se une a la región promotor-operador de algunos genes *chr* impidiendo su expresión (**Figura 18B**). Cuando la célula se expone a cromato, este ión reconoce al represor que se encuentra unido al DNA provocando que se inactive y permitiendo la expresión de los genes *chr* (**Figura 18C**). Cuando la concentración de sulfato es baja (10^{-4} M), la cantidad de este ión que ingresa no es suficiente para actuar como un correpresor, de tal manera que el represor se mantiene en forma inactiva (**Figura 18D**). El represor inactivo no se une a la región promotor-operador por lo que los genes se expresan. Cuando las células se exponen a cromato, este ingresa y no ejerce un efecto inductor debido a que el represor no está unido a la secuencia promotor-operador. De esta manera, los genes *chr* se expresan (**Figura 18E**).

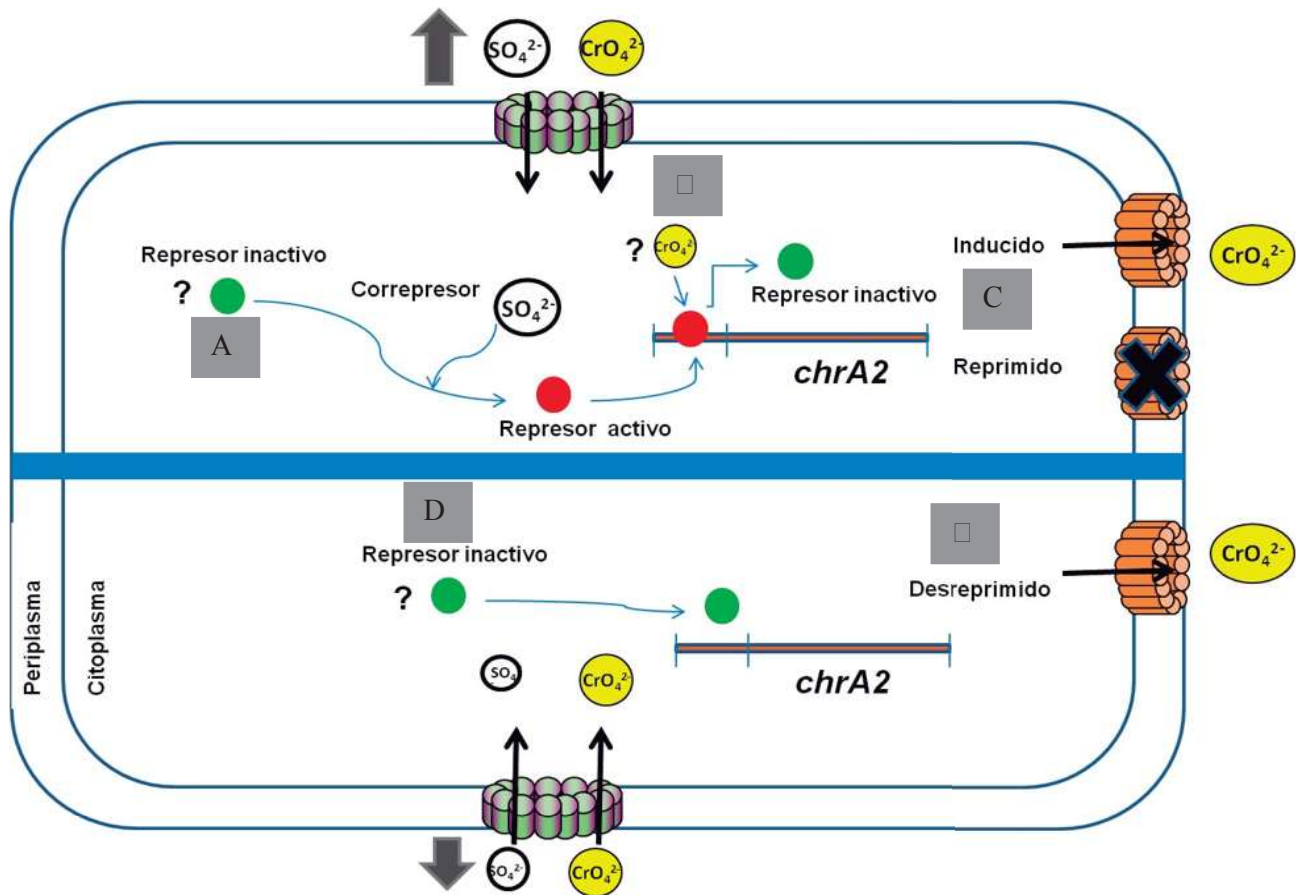


Figura 18 Modelo hipotético de regulación del gene *chr* de *B. xenovorans*. En la parte superior se indica el transporte de sulfato-cromato en condiciones de alto sulfato (m). A. Activación del represor por la unión del correpresor, el cual reconoce al promotor-operador manteniendo a *chrA* reprimido. B. Inducción de la expresión por cromato mediante el desplazamiento del represor unido al promotor-operador. C. Funcionamiento de CtrA en condiciones de inducción o represión. En la parte inferior se muestra el transporte de sulfato-cromato en condiciones de bajo sulfato (mm). D. El represor permanece inactivo debido a la ausencia de correpresor por lo que no hay reconocimiento del promotor-operador y la expresión de *chrA* se lleva a cabo. E. Funcionamiento de CtrA en estado desreprimido.

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se demostró que los genes *chr* de *B. xenovorans* se expresan de manera diferencial en las condiciones de cultivo analizadas.
- El sulfato reprime la expresión de la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans*.
- El cromato induce la expresión de la mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans*.

BBL GRAF A

Aguilar-Laraías J., Caluscio J., Cervantes C., Rensing C. (1999). Expression of chromate resistance genes from *heanella* sp. strain ANA in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiol. Lett.* 167:111-116.

Aguilar-Laraías J. (2001). Análisis funcional de homólogos bacterianos de la superfamilia CHR. Tesis de doctorado. UNAM.

Alvarez A. H., Moreno-Sánchez R., Cervantes C. (1999). Chromate efflux by means of the CtrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriol.* 181:1111-1116.

Aslund J., Beckwith J. (1999). The tiorodion superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *Journal of Bacteriol.* 181:1111-1116.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.L., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smit, J.A., Struhl, J. (eds.) (1999). Current protocols in molecular biology, John Wiley y Sons, N.Y.

Birnboim H. C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1522.

Copp J. H. (1996). Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain 1000. *Journal of Microbiol.* 178:111-116.

Cranco R., Chang A. J., Johnston J., Aurel J., Oras J., Witkovic A. (1999). The chromate-inducible *chrBA* operon from the transposable element *tnp1hr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. *Journal of Bacteriol.* 181:666-671.

Brooks B. (1999). Microbiología Médica de Murray, Tenenac y Adelberg. Manual moderno. 16a ed. 1999.

Carrier B., Jones B., Masling D. (1999). mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. Biotechnol. Bioeng. 66:666-671.

Cary C. B. (1999). Chromium in air, soil, and natural waters. In: Langard S. (ed) Biological and Environmental Aspects of Chromium. Elsevier, Amsterdam, 1996.

Cervantes C., Ortega H., Cu B., Misra B., Silver S. (1999). Cloning, nucleotide sequence, and expression of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pBB1000. J Bacteriol. 181:1111-1116.

Cervantes C., Campos-Marcía B., Devars S., Gutierrez-Corona B., Lopez-Avera H., Torres-Muniz B., Moreno-Sanchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. S Microbiol. Rev. 65:1111-1121.

Cervantes C., Campos-Marcía B. (2000). Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: Nies DH, Silver S (eds) Molecular Microbiology of Heavy Metals. Springer-Verlag, Berlin, 1999:111-121.

Cain B. B. S., Deneff B. B., Constantinidis B. B., Berge B. B., Agullo B., Reyes B. B., Hauser B., Córdova B., Gómez B., González B., and B., Rao B., Ramirez B., Lima B., Palenzuela B., Alfatti S. A., Bar C. B., Arnell B., Ramette A., Richardson B., Seeger B., Smit D., Spiller B., Sul B. B., Soe B. B., Lirio B. B., Gulin B. B., Fiedel B. B. (2006). *Burkholderia xenovorans* harbors a multi

replicon, 10000 pb genome shaped for versatility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10000-10000.

Coen E. J., Doulin B., Montemps C., Andamme B., Rena B., Boivin-Besson C. (2004) Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. Microbiol. 160:6600-6600.

Coenye B., Andamme B. (2004). Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches Environ. Microbiol. 6:1000-1000.

Denef B. B., Traucaan B. A., Llorone C., Caron B., Soi B. B., Berstraete B. B., Bied B. B., Itis B. D. (2004). Root substrate and phosphate specific expression of biphenyl, benzoate and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* 10000 Microbiol. 160:6000-6000.

Denef B. B., Lappenbach B. A., Traucaan B. A., Llorone C., Rodrigues B. B. B., Soi B. B., Berstraete B. B., Itis B. D., Bied B. B. (2006). Genetic and genomic insights into the role of benzoate catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* 10000 Appl. Environ. Microbiol. 72:10000-10000.

Díaz-García A., Aguilar-Arañas B., Moreno-Sánchez R., Ramírez-Díaz B. B., Riveros-Rosas H., Vargas B., Cervantes C. (2004). Sortasein chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. Microbiol. 161:10000-10000.

Díaz-Re B. C., Cervantes C., Campos-Marcía B., Ulín-Sánchez A., Riveros-Rosas H. (2004) Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. 10000 6:6000-6000.

Dreyfuss J (1969). Characterization of a Sulfate and Thiosulfate Transporting System in *Allochromatium phydrii*. J Biol Chem. 244:11111-11115.

Trlica H. J. (1999). How microbes mobilize metals in ores: A view of current understandings and proposals for further research. Miner. Metall. Process 14:111-115.

Foris J, De Vos J, Caballero Mellado J, Falsen J, Quensen J, et al. (1999). Classification of the biphenyl and polychlorinated biphenyl degrading strain 11111(t) and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. Int. J Syst. Microbiol. 49:1611-1615.

Shorrock D., Currie J. (1991). Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 19:1111-1115.

Imhelfer R., Campos-Marcía J, Cervantes C. (1996). Membrane topology of the chromate transporter CrA of *Pseudomonas aeruginosa*. J S Microbiol. Lett. 136:111-115.

Jordan J., Jaraova J. S., Spurge J., Wolf J., Moonin J. J. (1991). Lineage specific gene expansions in bacterial and archaeal genomes. Genome Res. 1:111-116.

Unk S., Leitsc N., Hubener N., Probe C., Nies D. H. (1999). Ne genes involved in chromate resistance in *Ralstonia eallidurans* strain CH Arc J Microbiol. 14:111-115

Pat S. A., Salem H. (1999). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. J Appl. Microbiol. 87:111-115

Qasim D. Q., Qumar N. Q., Hussain R. C. (1999). Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62:1000-1006

Hayashi Q., Orozuka N, Yamamoto Q., Ueda Q., Sono Q., Choi S., Ohtsubo Q., Iwaba Q., Tanner Q. Q., Mori H., Horiuchi Q. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* O157 strains O156 and O111. Mol. Syst. Biol. 1:1

Wanders Q., Kerr Q. Q., Robertson Q. Q., Lipper Q. Q., Eig Q. Q., Ingram Q., Denton Q. (2000). Survival and growth of *Burkholderia cepacia* in the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1:111111.

León Rique. Q. (2000). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia CHR. Tesis de maestría. 111111 SH.

Essie Q. Q., Hendrickson Q., Manning Q. D., Devereux R. (1996). Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. J. S. Microbiol. Lett. 1:1111111111.

Cleod Q. Q., Arren R. Q., Hsiao Q. Q. Q., Araji N., Yinre Q., Fernandes C., Iyaka D., Ong Q., Millquist A., Wang D., Dosan Q., Hirofurni H., Retescu A., Orin R. D., Wang Q., Stott Q. Q., Schein Q. Q., Shin H., Smailus D., Siddiqui A. S., Barra Q. A., Jones S. Q. Q., Holt R., Rinman Q. S. Q., Iyauai Q., Ueda Q., Davies Q. Q., Oon, Q. Q., Itis Q. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into catabolic powerhouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:1111111111111111.

Palentiralingam M., Urban M. A., Goldberg M. (1999). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex Nat. Rev. Microbiol. 1:111-16.

Pergulano M., Monteiro M. A., Larsson M., Sandén A., Carell A., Nystrom M., Cabral J. S., Paiva A. A. (1999). Medium and copy number effects on the secretion of human proinsuline in *Escherichia coli* using the universal stress promoters *uspA* and *uspB*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:111-116.

Poulain M., Dunne A., Dreyfus M., Boivin M., Asson C. (1999). Nodulation of legumes by members of the β subclass of α -proteobacteria Nature 401:111-116.

Nies A., Nies DH., Silver S. (1999). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. Microbiol. Chem. 66:666-671.

Nies D. H., MocS., Maci S., LeitscN., Saier M. H. (1999). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. Microbiol. 100:111-116.

Pardida Martine M., HertecC. (1999). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. Nature 401:111-116.

Perin M., MartineAguilar M., CastroMonales R., Estrada de los Santos M., CabellosOvelar M., Paredes H. M., Reis M. M., and CaballeroMellado M. (1996). Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field grown maize and sugarcane. Appl. Environ. Microbiol. 62:111-116.

Jiménez J. L., Moreno-Sánchez R., Cervantes C. (2000). Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the CrA protein. *Int J Microbiol. Lett.* 181:111-115.

Tringali A., Aslund A., Beckwith M (1999). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Mol. Cell.* 13:661-666.

Ramírez-Díaz J. L., Díaz-Carretero C., Vargas J., Riveros-Rosas H., Campos-Marcía J., Cervantes C. (2000). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 13:111-115.

Riley R. J., Macara J. J., Obber J. J. (1999). Chemical contaminants on DOE lands and selection of contaminant mixtures for subsurface science research Report DOE/R-99-005 Department of Energy, Washington DC.

Sambrook J., Fritsch E. J., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez-Moreno J. L., Mira A., Nyiro J., Gasic J., Rodríguez-Alera J. (2000). Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends Genet.* 16:111-115.

Sánchez-Sutil J. C., Gómez-Santos N., Orleda-Luño A., Martins J. O., Trepo, J. L., Dorado J. (2000). Differential expression of the three multicopper oxidases from *Mycobacterium xenopus*. *Microbiol. 181*:111-115.

Manisckaerren C., Vieira J. (1999). Improved p1p2 cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the p1p2 and pC1 vectors. *Gene* 221:111-115

Samana A., Wang Q., Houye Q. (1999). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* 33:1001-1010.

Agner S., Maars Q., Ottersberg Q., Hussmeier A., Agner C. S., Nord O., Nygren Q., van der Meer Q. (1999). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics* 6:1001-1010.

Best S. Q., Scheiwer H. Q., Dall C., Sample A. Q., Runyen-Janecky Q. Q. (1999). Construction of improved *Escherichia pseudo-onas* shuttle vectors derived from pC119 and sequence of the region required for their replication in *Escherichia aeruginosa*. *Gene* 199:1-6.

Chong Q. Q., Revors Q. Q. (1999). Chromium toxicity to algae and bacteria. In: Nriagu JO, Nieboer Q (eds), Chromium in the Natural and Human Environments. Wiley, New York, 1999:1-10.

Chong-Millareal A., Caballero-Mellado Q. (1999). Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating rhizobial species based on CR16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Syst. and Appl. Microbiol.* 22:100-105.

Clay A., Berry N. (1999). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* 211:1-6.