



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

*“Clonación y Expresión Funcional de Proteínas de la
Familia LCHR”*

Que presenta:

Q.F.B. Yhoana L. León Márquez

Asesor:

D.C. Carlos Cervantes Vega

Morelia, Mich., diciembre de 2009

ÍNDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	1
	1. Generalidades del cromo	1
	2. Química del cromo	2
	a. Cromo hexavalente	2
	b. Cromo trivalente	3
	3. Mecanismos de toxicidad del cromo	5
	4. Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato	6
	- Expulsión de cromato	7
	5. Análisis filogenético de ChrA	11
	6. El género <i>Burkholderia</i>	13
	Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	17
	A. <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	17
	- Descripción de <i>Burkholderia xenovorans</i>	18
	a. Descripción del genoma de <i>Burkholderia xenovorans</i>	18
	B. <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	20
	a. <i>Burkholderia vietnamiensis</i> TVV75	21
II.	JUSTIFICACIÓN	21
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
	Hipótesis	21
	Objetivo general	22
	Objetivos específicos	22
IV.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
	Reactivos y medios de cultivo	23
	Cepas	23
	Vectores	24
	Métodos	25
	1. Reacción en cadena de la polimerasa	25
	2. Electroforesis en geles de agarosa	25
	3. Purificación de plásmidos	27
	4. Transformación por electroporación	28
	a. Preparación de células competentes	28
	b. Transformación	28
	5. Tratamiento enzimático de las moléculas de DNA	29
	a. Restricción con endonucleasas	29
	b. Ligación	29
	6. Pruebas de susceptibilidad a cromato	29

VI.	RESULTADOS	30
1.	Proteínas LCHR seleccionadas	30
1.1	Comparación de los dominios amino y carboxilo de las proteínas seleccionadas	33
1.2	Perfil hidropático de las proteínas seleccionadas	36
1.3	Análisis de segmentos transmembranales de las proteínas seleccionadas	40
2.	Pruebas de susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>Burkholderia</i> utilizadas	45
3.	Diseño de oligonucleótidos	46
4.	Amplificación de los genes <i>lchr</i>	53
5.	Clonación en el vector pGEM-T	53
6.	Clonación en el vector pJET 1.2	53
7.	Subclonación en el vector pUCP20	54
8.	Subclonación en el vector pACYC184	60
9.	Pruebas de susceptibilidad a cromato	62
A.	Cepas con los genes <i>lchr</i> de <i>Burkholderia xenovorans</i>	62
1.	Genes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
2.	Genes expresados en <i>Escherichia coli</i>	65
a.	Genes en el vector pUCP20	65
b.	Genes en el vector pACYC184	71
B.	Gen <i>lchr5</i> de <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	71
1.	Gen <i>lchr5</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
2.	Gen <i>lchr5</i> en <i>Escherichia coli</i>	73
a.	En el vector pUCP20	73
b.	En el vector pACYC184	73
VII.	DISCUSIÓN	77
VIII.	CONCLUSIÓN	89
IX.	BIBLIOGRAFÍA	90

RESUMEN

La presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente ha dado lugar a la selección de variantes bacterianas resistentes a este ión. El determinante de resistencia a cromato más ampliamente estudiado es la proteína de membrana ChrA. A la fecha se han estudiado las proteínas ChrA codificadas en los plásmidos pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*, pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans*, el plásmido 1 de *Shewanella sp* y la ChrA presente en el transposón TnOtChr de *Ochrobactrum tritici*. ChrA es una proteína hidrofóbica que expulsa cromato en forma dependiente del potencial de membrana. En un análisis filogenético reciente se identificaron 135 secuencias homólogas de ChrA de los tres dominios de la vida. Estas proteínas se agruparon en la superfamilia de transportadores CHR. Las proteínas CHR se clasificaron de acuerdo a su tamaño en proteínas LCHR (345–495 aa) y en proteínas SCHR (123–234 aa). Las proteínas LCHR bacterianas fueron, a su vez, agrupadas en seis subfamilias (LCHR1–LCHR6). Las β -proteobacterias *Burkholderia xenovorans* y *Burkholderia vietnamiensis* son los organismos que presentan un mayor número de genes que codifican proteínas LCHR; de manera conjunta presentan nueve proteínas LCHR de cuatro subfamilias distintas. Además de las ChrAs mencionadas, que se ubican en las subfamilias LCHR2 y LCHR5, no existe evidencia de que otros miembros de las familias LCHR confieran resistencia a cromato, por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar si las proteínas LCHR de *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis* confieren resistencia a cromato. Se eligió un gen de cada subfamilia y se amplificaron por PCR, luego se clonaron en un vector de recuperación para posteriormente subclonarse en los vectores pUCP20 Y pACYC184, de alto y bajo número de copias, respectivamente. Con los plásmidos recombinantes que se obtuvieron se transformó a *E. coli* W3110 y a *P. aeruginosa* PAO1 y se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato a las transformantes tanto en un medio rico (caldo nutritivo) como en un medio mínimo (M9). El gen *lchr1* de *B. xenovorans* confirió resistencia a cromato sólo a *E. coli*, clonado en el vector pACYC184 y cuando las pruebas se realizaron en M9; el gen *lchr2* de *B. xenovorans* confirió resistencia a cromato tanto a *E. coli* como a *P. aeruginosa* clonado en el vector pUCP20 en CN y M9; el gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* confirió resistencia a cromato a *E. coli*, clonado en el vector pACYC184 cuando las pruebas de susceptibilidad se realizaron en M9 y el gen *lchr6* de *B. xenovorans* confirió resistencia a cromato a *E. coli* clonado en pUCP20 sólo en CN. De estos resultados se concluye que las proteínas LCHR analizadas de *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis* confieren resistencia a cromato, pero cada una en condiciones de crecimiento específicas.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del cromo

El cromo fue identificado por primera vez en 1797 por el químico francés Vauquelin, quien lo aisló de la crocoita, un mineral también llamado “plomo rojo siberiano”. El cromo es el séptimo elemento más abundante sobre la corteza terrestre, su nombre proviene del griego *chroma*, que significa color y le fue dado por los muchos colores de sus compuestos: el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) es rojo, el cromato de potasio (K_2CrO_4) es amarillo, y el tricloruro de cromo ($CrCl_3$) es verde (Shupak, 1991). El elemento se encuentra en forma combinada principalmente como el mineral cromita ($FeCrO_4$). Se encuentra también en minerales menos abundantes como la crocoita, del que fue aislado ($PbCrO_4$), el cromo ocre (Cr_2O_3) y se pueden encontrar cantidades trazas de cromo en los rubíes y las esmeraldas. Los principales depósitos se encuentran en Sudáfrica, con el 96% de las reservas conocidas. El cromo se encuentra de forma natural en rocas, animales, plantas, suelos y en las cenizas y gases volcánicos. Sus compuestos no tienen olor ni sabor. El cromo no se degrada o destruye por combustión, sino que recircula entre el suelo, la atmósfera y las aguas de la superficie y del subsuelo (Ohio EPA, 2002).

En su forma metálica, el cromo es un metal blanco, duro, quebradizo y lustroso, que funde a 1903 ± 10 °C. Se disuelve fácilmente en ácidos minerales no oxidantes. No se disuelve en ácido nítrico (concentrado o diluido) o agua regia fría, debido posiblemente a un evento de pasivación (de aquí, el gran uso del metal como protector e inhibidor de la corrosión). El cromo tiene un gran número de usos en la industria. Quizá el más conocido es el plateado decorativo, protector y brillante sobre los metales. El cromo también es un componente importante en la aleación del acero

inoxidable porque lo hace más fuerte y más resistente a la corrosión. Su uso en los pigmentos de las pinturas constituye más de la tercera parte del uso del cromo cada año. Otros usos comprenden pigmentos, el curtido de pieles, químicos textiles, rubíes sintéticos para láser, esmeraldas sintéticas, en la preservación de la madera, como catalizador, en acero inoxidable, en cintas magnéticas de dióxido de cromo, en el etiquetado de glóbulos rojos y como fungicida (Shupak, 1991).

2. Química del cromo

La química del cromo no es sólo rica en la variedad de colores de sus compuestos, también lo es en la variedad de estados de oxidación y las geometrías de éstos. Los estados de oxidación del cromo van de -2 a +6, pero los más abundantes son el Cr(VI) y el Cr(III).

a. Cromo hexavalente

El Cr(VI) es un oxidante fuerte, lo que limita el número de los compuestos que puede formar debido a que la mayoría de sus posibles ligandos serán oxidados con la consecuente reducción del metal a estados de oxidación menores. Como resultado, el Cr(VI) está presente, casi exclusivamente, en compuestos con haluros y oxígeno como ligandos. El trióxido de cromo (CrO_3), cloruro de cromilo (CrO_2Cl_2), y varios cromatos son los compuestos de Cr(VI) más comúnmente encontrados. Dependiendo del pH y de las concentraciones del metal en solución, el Cr(VI) puede existir como cromato (CrO_4^{2-}), hidroxicromato (HCrO_4^-) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). El cromato es la principal forma aniónica a pH neutro (alrededor del 75%), y el bajar el pH a 6 lleva a la presencia predominante del HCrO_4^- . En soluciones ácidas con Cr(VI), concentraciones por arriba de 10mM de HCrO_4^- forman el dímero $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. A pH fisiológico y niveles típicos de

exposición a Cr(VI), la formación de iones dicromato es insignificante (Zhitkovich, 2005).

El arreglo tetraédrico de los oxígenos del cromato lo hace estructuralmente similar al sulfato, y esto le permite entrar fácilmente a las células vía los transportadores activos de sulfato (Ballatori, 2002) (**Fig.1**). Una vez dentro de la célula, el Cr(VI) es rápidamente reducido a Cr(III) (**Fig.2**), el cual forma complejos estables con proteínas y DNA y esto lleva a concentraciones intracelulares muy altas del metal (Zhitkovich, 2005).

El Cr(VI) es termodinámicamente estable en un amplio rango de valores de pH cuando es disuelto en agua pura. Sin embargo, es fácilmente reducido en soluciones ácidas que contienen cualquier molécula orgánica con grupos oxidantes, incluyendo el DNA y las proteínas. A pH neutro, el Cr(VI) es mucho más difícil de reducir, y sólo se han encontrado algunas moléculas orgánicas capaces de reducirlo de manera significativa. La fuerte capacidad oxidante del Cr(VI) a pH bajo es debida a sus altos valores positivos de E_o en estas condiciones, lo que permite reacciones de transferencia de electrones de un amplio rango de donadores orgánicos. Incluso para agentes que son capaces de reducir al Cr(VI) a pH 7 como el glutatión, la tasa de reducción crece a medida que el pH disminuye, lo que refleja una formación más favorable de ésteres entre el reductor y el HCrO_4^- (Zhitkovich, 2005).

b. Cromo trivalente

El Cr(III) es termodinámicamente muy estable, forma compuestos hexacoordinados con el H_2S y muchas otras moléculas que contienen átomos de O, N o S. El Cr(III) actúa como un ácido fuerte de Lewis y prefiere coordinarse con grupos de oxígeno

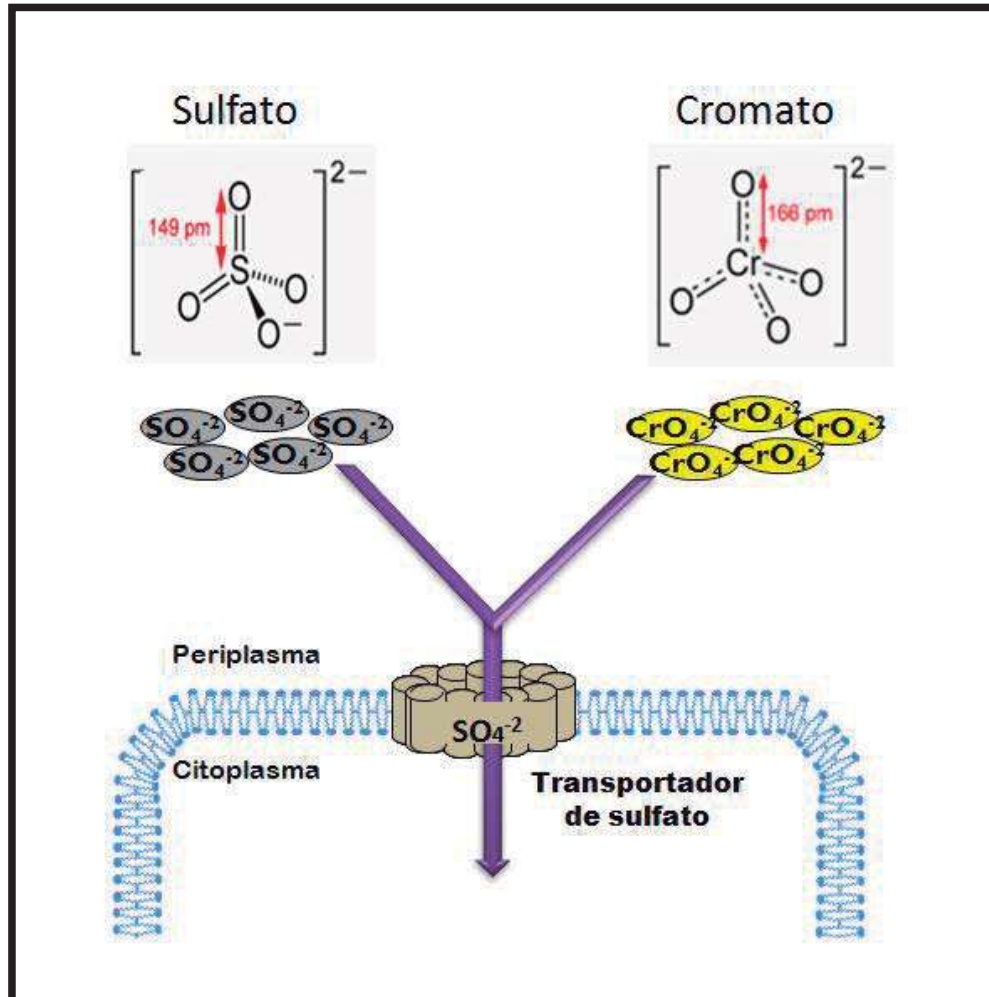


Fig. 1. Ingreso del cromato al citoplasma bacteriano. El cromato ingresa a la célula por los transportadores de sulfato debido a que estos dos oxianiones son estructuralmente muy parecidos. En el esquema se muestra la comparación de los diámetros de enlace (en picometros) y la estructura tetraédrica del sulfato y el cromato.

cargados negativamente. Todos los complejos de Cr(III) tienen ligandos con arreglos octaédricos (Zhitkovich, 2005).

La falta de toxicidad del Cr(III) se atribuye generalmente a la incapacidad de los compuestos que lo contienen de entrar a las células, aunque actualmente hay información de estudios *in vivo* que demuestran el ingreso del Cr(III) a la célula. La capacidad de ciertos compuestos de Cr(III) de entrar en las células no necesariamente significa que los efectos tóxicos pudieran derivarse de este hecho, ya que la coordinación con ligandos multidentados hace que el Cr(III) no sea reactivo (Zhitkovich, 2005).

3. Mecanismos de toxicidad del cromo

El metabolismo reductor del Cr(VI) dentro de la célula o *in vitro*, siempre conlleva al Cr(III) como la forma final de oxidación. Se cree que los tioles de bajo peso molecular (glutatión y cisteína) son los responsables primarios de la reducción intracelular del Cr(VI). La capacidad de formar compuestos estables con varios ligandos y la presencia de seis estados de coordinación, le proporciona al Cr(III) la oportunidad de generar más de un enlace cruzado con el DNA y otras moléculas (aductos ternarios) (Zhitkovich, 2005). Los enlaces cruzados de glutatión, cisteína, ascorbato con el DNA, mediados por el Cr(III) representan la clase más importante de modificaciones de DNA. En cultivos celulares se determinó que los enlaces cruzados Cisteína-Cr(III)-DNA y glutatión-Cr(III)-DNA son las lesiones más abundantes, y de manera colectiva aportan cerca del 80% de todos los aductos ternarios Cr-DNA formados (Quievryn y col., 2003). Se ha observado que la reducción *in vitro* del Cr(VI) también genera aductos binarios Cr(III)-DNA, pero se desconoce si su producción es significativa en las células. Todos los

aductos Cr(III)-DNA ternarios, y la mayoría de los binarios se forman por el ataque de los complejos de Cr(III) al DNA. El Cr(III) también puede formar enlaces cruzados con el DNA - proteínas, y entre hebras del DNA, pero el mecanismo por el que se forman no ha sido determinado aún. Se ha encontrado que los potenciales genotóxico y mutagénico de los aductos Cr-DNA está relacionado con el volumen del ligando unido, los más grandes generaron una tasa mayor de mutantes. En un estudio *in vivo* donde se redujo al Cr(VI) con cisteína y ascorbato se encontró que los aductos Cr-DNA son los principales responsables del daño mutagénico y del bloqueo de la replicación (Zhitkovich., 2005).

La mayoría de los estudios que se han realizado a la fecha sobre los efectos tóxicos del Cr(VI) en la célula, apuntan a que los aductos Cr-DNA son las lesiones genéticas claves que contribuyen a la inducción de los efectos biológicos principales de Cr(VI), tales como mutagénesis, inhibición de la replicación y muerte celular. Se ha propuesto, incluso, que la formación de aductos ternarios Cr-DNA genotóxicos es independiente de la capacidad de reducción de la célula y debe exhibir una dosis dependencia lineal con respecto al Cr(VI) intracelular (Zhitkovich, 2005).

Además de la formación de aductos, en algunos organismos como *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que el daño oxidativo a las proteínas es el principal mecanismo de toxicidad del Cr (Sumner y col., 2002).

4. Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato

La presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente ha originado la selección de variantes bacterianas resistentes a este ión. Existen varios reportes de especies bacterianas resistentes a cromato. Esta resistencia puede estar codificada ya

sea en plásmidos o en el cromosoma (Cervantes y Silver, 1992). Generalmente los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales median directamente la expulsión de iones cromato del citoplasma celular. Los sistemas codificados en el cromosoma bacteriano tienen que ver con la reducción inespecífica del Cr(VI), actividades de destoxificación de radicales libres, reparación del daño del DNA y procesos asociados con la homeóstasis del azufre y el hierro (Cervantes y Campos-García, 2007) (**Fig. 2**). La expulsión del cromato es uno de los mecanismos más ampliamente caracterizados y es el que se describirá a continuación.

- **Expulsión de cromato**

La expulsión de cromato es un mecanismo de resistencia conferido por la proteína ChrA. Esta proteína está codificada en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col. 1990) y en el plásmido pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans* (Nies y col. 1990). La ChrA de *P. aeruginosa*, de 416 aminoácidos (aa), presenta una topología de 13 segmentos transmembranales (STM) (Jiménez-Mejía y col., 2006). ChrA funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa cromato del citoplasma de forma dependiente del potencial de membrana (Álvarez y col., 1999, Pimentel y col., 2002). La expulsión de cromato es inhibida por sulfato, lo que sugiere que este análogo podría unirse también a ChrA. De hecho, se ha propuesto que ChrA podría funcionar como un antiportador cromato/sulfato (Nies y col., 1998), aunque no se ha demostrado el transporte de sulfato por ChrA. La mutagénesis al azar de la ChrA de *P. aeruginosa* mostró que los aminoácidos esenciales se localizan en el dominio amino terminal de ChrA (Aguilera y col., 2004). Esto último fue confirmado por el

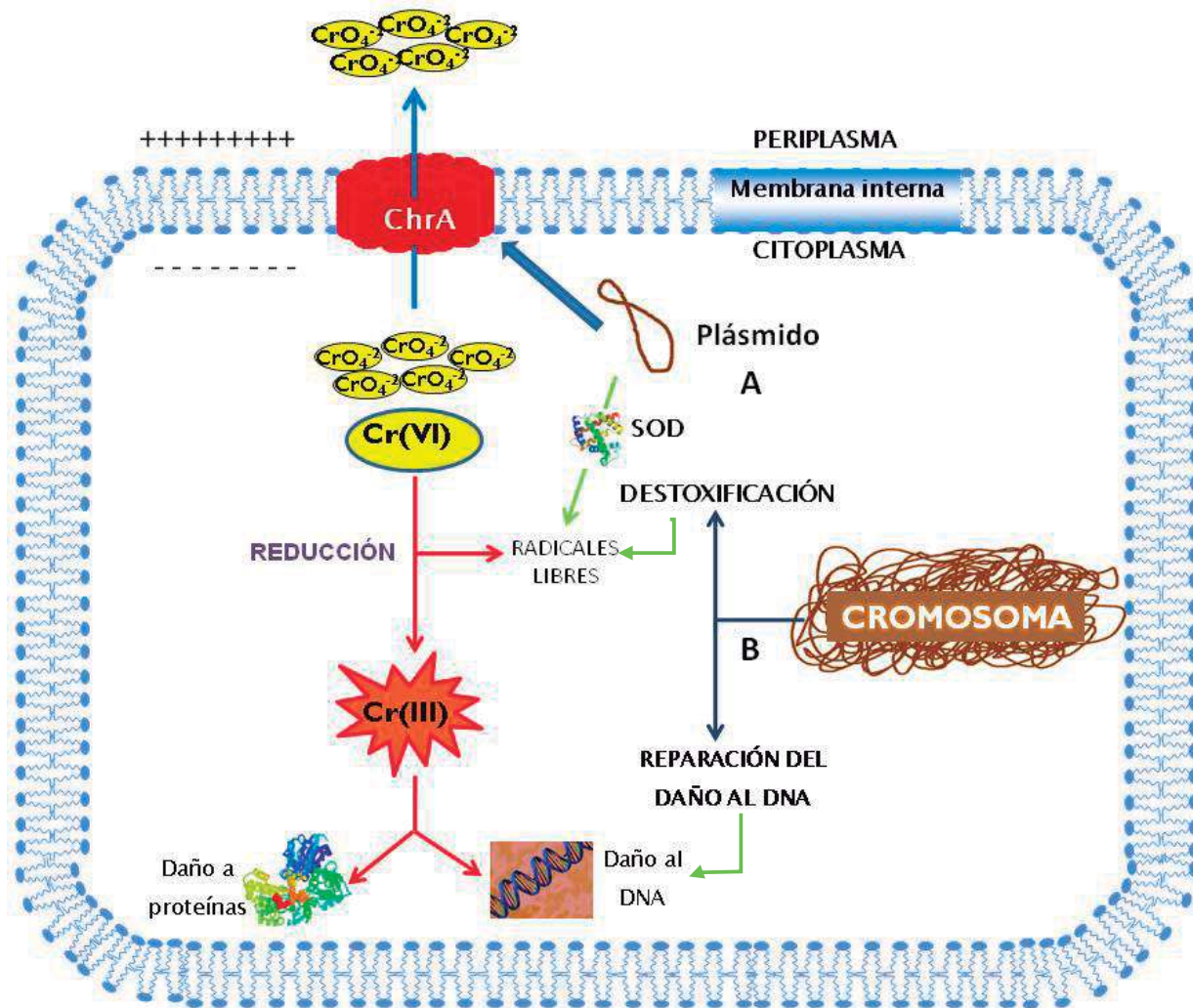


Fig. 2. Mecanismos de resistencia bacteriana a cromato. Los efectos tóxicos del cromato se deben a que una vez dentro de la célula el $Cr(VI)$ es reducido a $Cr(III)$ que es la especie tóxica porque es capaz de unirse al DNA y las proteínas. Durante el proceso de reducción se generan además radicales libres. A. En los plásmidos se pueden codificar sistemas de expulsión de cromato, como la proteína ChrA y sistemas de destoxificación, como ChrC, que es una superóxido dismutasa (SOD). B. En el cromosoma se pueden codificar sistemas de resistencia relacionados con mecanismos de destoxificación para contrarrestar el daño ocasionado por los radicales libres y sistemas de reparación de daños al DNA (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2008).

análisis filogenético de los homólogos de ChrA, el cual reveló que las mitades amino están más conservadas que las mitades carboxilo (Díaz-Pérez y col., 2007). Esto sugiere que las dos mitades de ChrA llevan a cabo diferentes funciones en el transporte de cromato.

La proteína ChrA de *C. metallidurans*, de 401 aa, presenta una topología diferente de 10 STM y muestra un porcentaje de identidad de 29% con respecto a la ChrA de *P. aeruginosa*. El mecanismo de resistencia, sin embargo, parece ser la expulsión de los iones cromato, igual que la ChrA codificada en pUM505. En el plásmido pMOL28 de *Cupriavidus* se encontró también el gen *chrB*, localizado río arriba de *chrA* que codifica la proteína ChrB, probable regulador transcripcional (Nies y col., 1989).

Además de *chrA* y *chrB*, pMOL28 contiene al menos cuatro genes más que podrían estar involucrados en la resistencia a cromato:

- Río abajo de *chrA* se encuentra el gen *chrC*, que codifica una proteína de 197 aminoácidos (aa), que tiene homología con superóxido dismutasas de hierro y manganeso.
- Directamente río abajo de *chrC*, hay dos ORFs más que codifican proteínas putativas de 113 y 140 aa. Estos genes fueron designados *chrE* y *chrF*, respectivamente. A ChrE se le asignó la función de regulador transcripcional y a ChrF función de rodanasa (Juhnke y col., 2002).
- Río arriba de *chrB*, en orientación opuesta a su transcripción, está otro ORF denominado *chrI* que codifica una proteína de 164 aa. A ChrI también se le asignó una función de regulador transcripcional.

Las ChrA de *C. metallidurans* y *P. aeruginosa* sólo presentaron función cuando fueron expresados en sus propios huéspedes, y no cuando fueron expresados en *E. coli* (Cervantes y col., 1990; Nies y col., 1990). En el plásmido 1 de *Shewanella sp.* ANA-3 se encontraron también genes *chrBAC*, los cuales fueron transferidos a *E. coli* (Aguilar-Barajas y col., 2008). La expresión solamente del gen *chrA* en un vector de alto o bajo número de copias, aumentó la resistencia a cromato de la cepa. Por el contrario, la expresión del operón *chrBAC* completo no resultó en un aumento significativo de la resistencia, aunque la expresión en un vector de bajo número de copias aumentó la resistencia de las cepas a cromato 10 veces más. El gen *chrA* también confirió resistencia cuando fue expresado en *P. aeruginosa*, pero en este caso el gen *chrR* fue necesario para una completa resistencia a cromato. Ensayos de transporte de cromato mostraron una disminución de la entrada de este ión a la célula, lo que sugieren que igual que para las ChrAs de *C. metallidurans* y *P. aeruginosa*, la resistencia a cromato conferida por la CrhA de *Shewanella sp.* es debida a la expulsión del ión (Aguilar-Barajas y col., 2008).

Branco y colaboradores (2008) identificaron un transposón TnOtChr (**Fig. 9**) en la bacteria *Ochrobactrum tritici* 5bv11, capaz de sobrevivir a concentraciones mayores a 50 mM de cromato. El transposón TnOtChr, de 7,189 pb, agrupa los genes de resistencia a cromato *chrB*, *chrA*, *chrC* y *chrF*, localizados entre genes de una transposasa y una resolvasa. En sus experimentos, los genes *chrB* y *chrA* resultaron ser esenciales para la resistencia a cromato, no así *chrF* y *chrC*. El promotor *chr* fue fuertemente inducido por cromato o dicromato, pero el Cr(III), agentes oxidantes, sulfato u otros oxianiones no provocaron ninguna respuesta. La proteína ChrB se identificó como un sensor de cromato, regulador de la expresión del operón,

suprimiendo la acumulación celular de cromato a través de la actividad de una bomba expulsora de cromato codificada por *chrA*. La expresión de *chrB*, *chrC* o *chrF* en *E. coli* con las dobles mutaciones en los genes *sodA* y *sodB*, restauró su crecimiento aeróbico y le confirió resistencia a agentes generadores de superóxido como la menadiona y el paraquat, lo que sugiere que estos tres genes participan en la resistencia a cromato contrarrestando el estrés oxidativo generado durante la reducción del Cr(VI) a Cr(III). La tinción de nitroazul de tetrazolio en geles nativos mostró que ChrC posee actividad de superóxido dismutasa (Branco y col., 2008).

5. Análisis filogenético de ChrA

El aumento en el número de genomas completos secuenciados, permitió identificar varios homólogos putativos de ChrA, llamados en un principio la familia de transportadores del ión cromato (CHR) (Nies y col., 1998). En un análisis filogenético exhaustivo se identificaron 135 secuencias no redundantes homólogas de ChrA, de las cuales 128 fueron bacterianas, seis de hongos y una de arqueas. Estas proteínas se agruparon formando la superfamilia de transportadores CHR (Díaz-Pérez y col., 2007).

Las proteínas CHR fueron clasificadas de acuerdo a su tamaño en proteínas bacterianas bidominio o LCHR (345 – 495 aa) y en proteínas bacterianas monodominio o SCHR (123 – 234 aa). Las proteínas LCHR bacterianas fueron, a su vez, agrupadas en seis subfamilias (LCHR1 – LCHR6) (**Fig. 3**). Cada subfamilia posee un contexto genómico característico y la identidad y la similitud entre dos miembros son mucho mayores entre ellos que cuando se les compara con uno de otra subfamilia (Díaz Pérez y col., 2007).

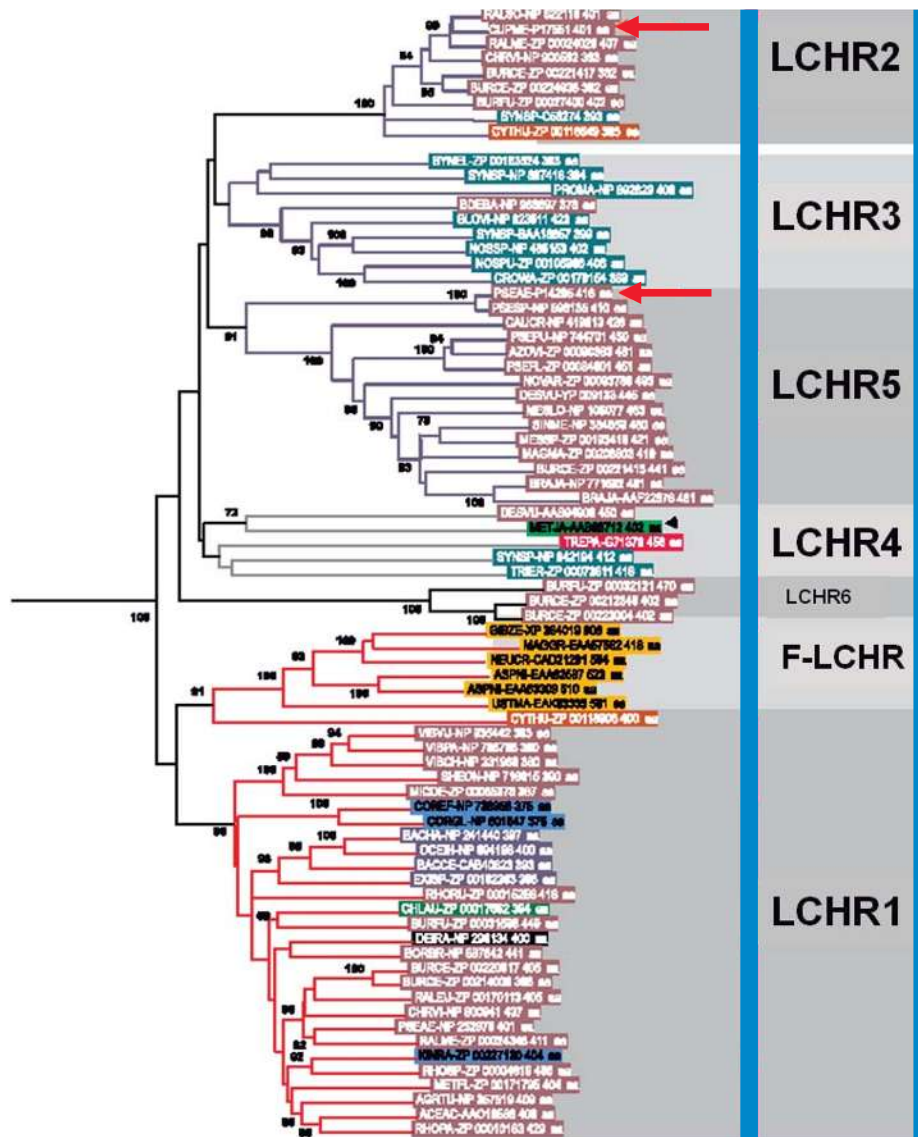


Fig. 3. Árbol filogenético de las proteínas LCHR. Las proteínas de esta familia se agrupan en seis subfamilias bacterianas y una de hongos. Con flechas rojas se señalan las ChrA de pUM505 y de pMOL28, que se ubican en las subfamilias 2 y 5 respectivamente, y son las únicas cuya función ha sido extensamente estudiada. La única proteína de las arqueas, señalada con una punta de flecha negra y remarcada en verde se ubica en la subfamilia 4. La subfamilia de hongos agrupa a seis proteínas de cinco organismos distintos (Díaz-Pérez y col., 2007).

La comparación del contexto genómico de las proteínas de las diferentes subfamilias, usando como referencia el bien caracterizado contexto de la ChrA de pMOL28, arrojó que las proteínas de la subfamilia LCHR2 están generalmente asociadas con genes *chrB* (en el 78% de los casos) y con genes *chrF* (en el 67%). Con respecto a las proteínas LCHR5, éstas se asocian con genes *chrB*, *chrC* y *chrF*, pero esta asociación es menos frecuente con sólo el 19, 19 y 31%, respectivamente. Las proteínas LCHR1, LCHR3, LCHR5 y LCHR6 no se asocian con ningún gen que tenga relación con la resistencia a cromato (**Fig. 4**).

Con respecto a la distribución de las proteínas LCHR en los diferentes taxones bacterianos, se encontró que las β -proteobacterias son el grupo taxonómico con el mayor número de homólogos de ChrA, presentando proteínas de cinco subfamilias diferentes, cuatro de éstas LCHR (**Fig. 5**).

6. El género *Burkholderia*

El género *Burkholderia* fue creado por Yabuuchi y col., en 1992 para acomodar el anterior grupo rRNA II de Pseudomonadas, excluyendo a *P. pickettii* y *P. solanacearum*, que fueron transferidas al género *Ralstonia*. Este género fue nombrado en honor al bacteriólogo norteamericano W.H. Burkholder, que fue el descubridor del agente etiológico de la piel agria de la cebolla y el primero en relacionar a las bacterias con enfermedades de las plantas (Burkholder, 1948). Es un grupo de organismos filogenéticamente bien definido que agrupa especies que habitan diversos nichos ecológicos. Las más de 40 especies descritas a la fecha habitan nichos extraordinariamente diversos, comprenden bacterias del suelo y la rizósfera, así como

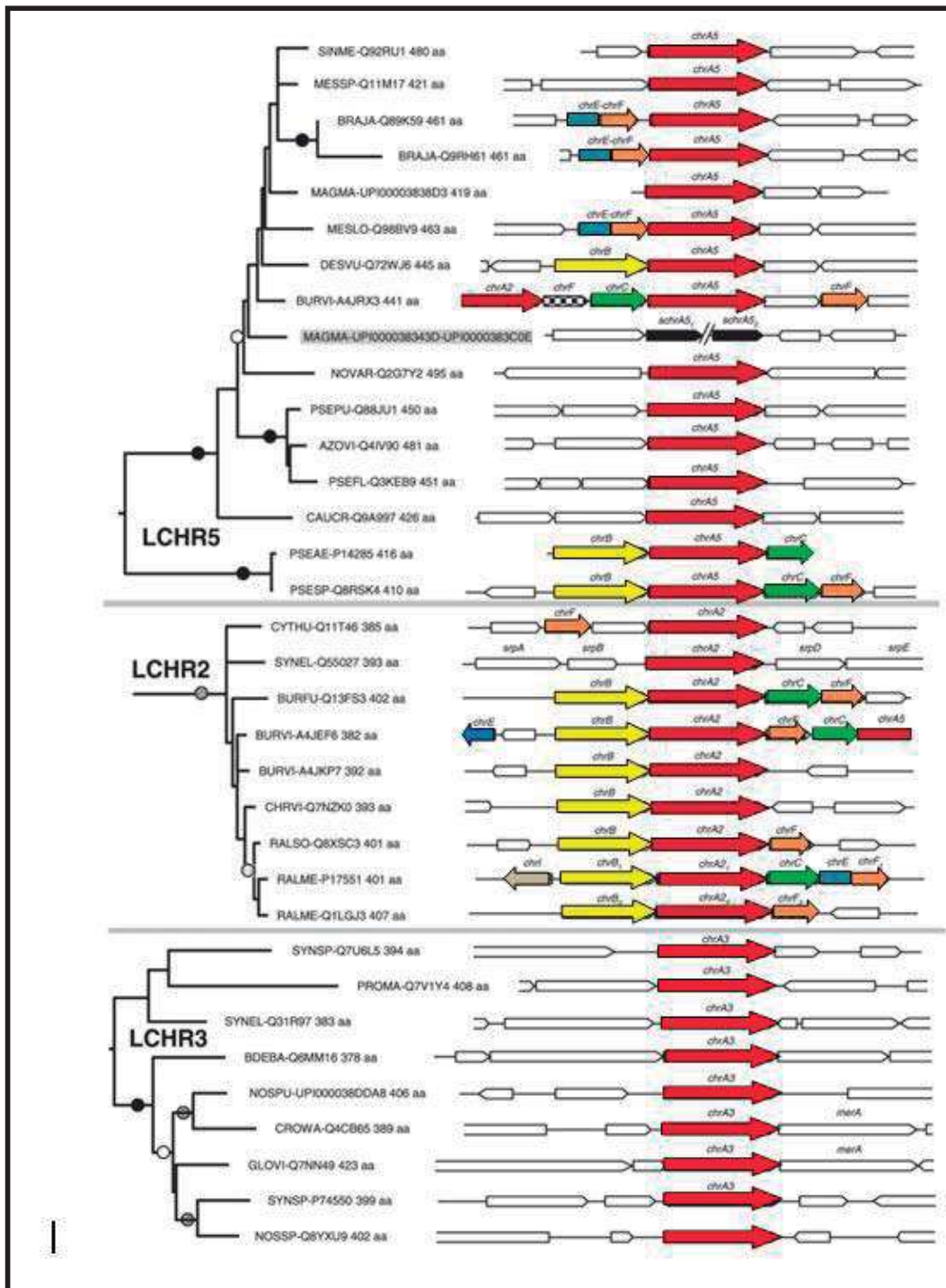


Fig. 4. Contexto genómico de las proteínas LCHR. Con flechas rojas se indican los genes *chrA*, con amarillas *chrB*, con verdes *chrC*, con naranjas *chrF*, con azules, *chrE* y con gris *chl*. (Tomado de Díaz-Pérez y col., 2007).

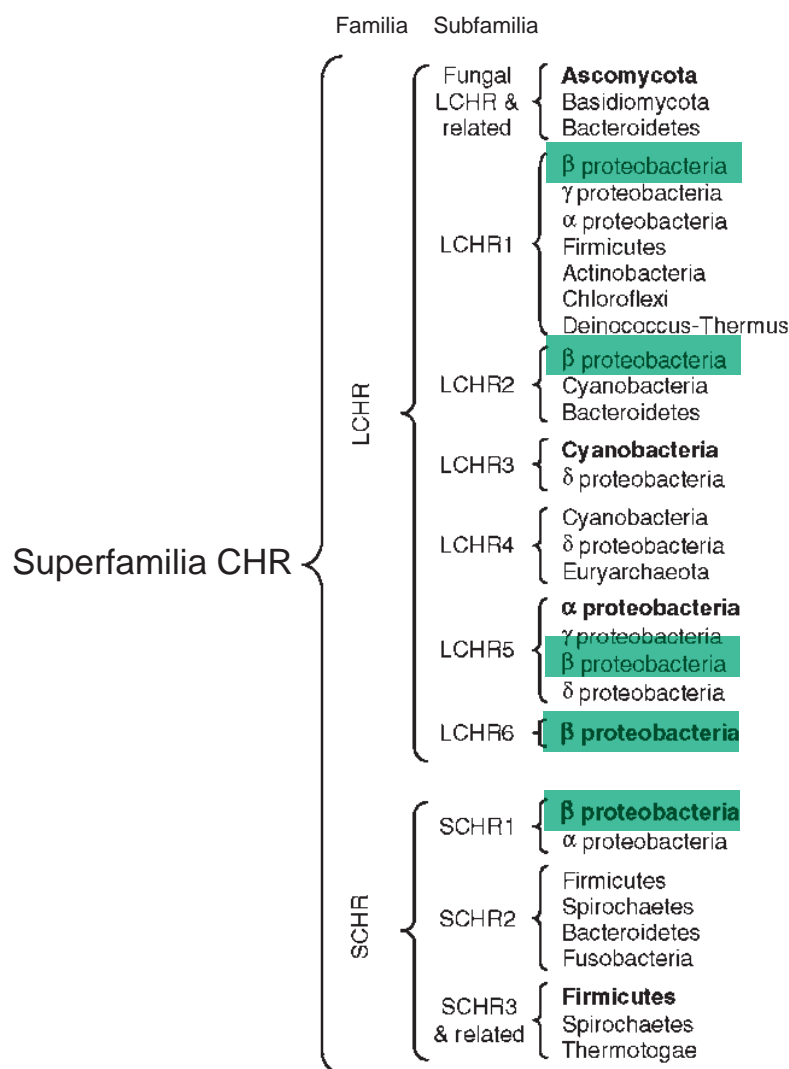


Fig.5. Distribución taxonómica de la superfamilia CHR. A la derecha se indican los grupos taxonómicos a los que pertenecen los microorganismos que presentan proteínas CHR. Las β-proteobacterias (en recuadro verde) presentan proteínas de cuatro subfamilias LCHR, además de la subfamilias SCHR1 (Modificado de Díaz-Pérez y col., 2007).

patógenos de planta, patógenos de humanos y patógenos oportunistas de humanos (Payne y col., 2005).

Las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* son bacilos rectos gram-negativos, no fermentadores, con uno o varios flagelos polares. Una sola especie del género, *B. mallei*, es atrica y no móvil. Producen catalasa y la actividad de oxidasa varía entre las especies. Los ácidos grasos celulares están caracterizados por la presencia de 3-hidroxi C_{16:0}. Las cepas tipo de varias especies se caracterizan por la presencia de dos tipos de lípidos de ornitina. La mayoría de las especies crecen a 40°C. Todas las especies pueden crecer con los siguientes sustratos como fuente única de carbono: glucosa, glicerol, inositol, galactosa, sorbitol y manitol. Algunas especies son patógenas para humanos, animales o plantas. Se pueden aislar de plantas, suelo o muestras clínicas. Pueden ser reconocidas en base a la secuencia del rRNA 16S. La mayoría de las cepas acumulan polihidroxitirato como material de reserva y son capaces de efectuar la ruptura orto del protocatecuato. El contenido de G+C es de 59.0 a 69.5 mol%. La especie tipo es *Burkholderia cepacia* (Gillis y col., 1995).

Tradicionalmente las especies de *Burkholderia* son conocidas como patógenos de plantas y como bacterias de suelo, con dos excepciones importantes, *B. mallei* y *B. pseudomallei*, las cuales son primariamente patógenos de humanos y animales. El conocimiento actual sobre la diversidad de los miembros de este género, indica que el rango de interacciones entre estas bacterias y su hospedero es más complejo, diverso y frecuentemente contradictorio. Las interacciones de algunas especies parecen estar restringidas a un tipo de hospedero, mientras que otras tienen un rango mucho más amplio de hospederos. El principal tipo de interacciones puede ser de patógenos, pero también puede ser simbiótico, o ambos. La mayoría de las especies de *Burkholderia*,

sin embargo, se sabe que son bacterias de suelo, las cuales exhiben diferentes tipos de interacciones no-patógenas con plantas (Coenye y Vandamme, 2003).

- Complejo *Burkholderia cepacia* (BCC)

El complejo de *Burkholderia cepacia* consiste de varias especies de bacterias gram-negativas muy relacionadas entre sí y extremadamente versátiles que se encuentran de manera natural en el suelo, el agua y la rizósfera de las plantas. Las cepas del BCC han sido utilizadas en el control biológico de enfermedades de plantas y en la biorremediación, mientras que algunas cepas son patógenos de plantas o patógenos oportunistas en humanos con fibrosis quística (Mahenthiralingam y col., 2000). La versatilidad ecológica de estas bacterias ha sido atribuida a que poseen un multirreplícón relativamente grande (4 – 9 Mb), rico en secuencias de inserción y genomas sumamente plásticos, que contienen genes para el metabolismo de un gran número de compuestos orgánicos y para la producción de antibióticos (Lessie y col., 1996). Los miembros del BCC poseen un potencial biotecnológico considerable como agentes para la biorremediación y el control biológico (Coenye y col., 2001).

A. *Burkholderia xenovorans* LB400

Varias cepas de *Burkholderia* han ganado interés debido a su capacidad de degradar compuestos xenobióticos, tales como halogenados aromáticos. Uno de los ejemplos mejor estudiados es *B. xenovorans* LB400 (anteriormente *Pseudomonas* sp. LB400, *Burkholderia* sp. LB400, *B. fungorum* LB400) una cepa aislada de un suelo contaminado con PCB en Moreau, Nueva York, EEUU por ingenieros de la compañía General Electric (Bedard y col., 1986). Esta cepa es capaz de oxidar más de 20 congéneres de los PCB

(bifenilos policlorados) con más de seis sustituciones cloruro en el anillo bifenilo (Coenye y col., 2001).

- **Descripción de *Burkholderia xenovorans***

Burkholderia xenovorans (del griego adj. XENOS extranjero; L. part. pres. VORANS devorar, digerir; N. L. part. adj. XENOVORANS que digiere compuestos extraños). Son células gram-negativas, móviles, no esporuladas, bacilos rectos (1-2 μm de largo y 0.5 μm de ancho). Las cepas crecen en agar nutritivo a 28°C pero no a 42°C (Goris y col., 2004).

a. **Descripción del genoma de *Burkholderia xenovorans***

El genoma de *B. xenovorans* LB400 tiene un tamaño de 9.73 megapares de bases (Mpb), y posee alrededor de 9000 secuencias codificantes distribuidas a lo largo de tres replicones, los cuales fueron designados cromosoma 1 (4.90 Mpb), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y cromosoma 3 (1.47 Mpb) (Chain y col., 2006). El cromosoma más grande concentra las funciones celulares más importantes, por ejemplo, las maquinarias traduccional, de replicación de DNA, de división celular y el metabolismo de nucleótidos y pueden ser considerado como el cromosoma medular. Los otros dos cromosomas tienen funciones enfocadas al metabolismo energético, metabolismo secundario, transporte y metabolismo de iones inorgánicos y metabolismo y transporte de aminoácidos (Chain y col., 2006).

La redundancia de genes y de funciones parece ser un tema importante en los genomas bacterianos grandes. En el genoma de *B. xenovorans*, 1581 de los 9000 genes (17%) tuvieron el mejor apareamiento dentro del mismo genoma de la bacteria

en lugar de la base de datos con los cientos de genomas completos. Este porcentaje es el más grande a la fecha de potencial redundancia de genes y de funciones entre todos los genomas de bacterias de vida libre, entre las que el promedio es de 7.6% ($\pm 4.0\%$) de sus genes. La lista de parálogos en el genoma de *B. xenovorans* está enriquecida con genes relacionados con el transporte (230 parálogos), transducción de señales (164), elementos móviles (112), proteínas de membrana (66) y metabolismo secundario, incluyendo 120 deshidrogenasas, 32 di-oxigenasas y 13 mono-oxigenasas. Estos 1581 parálogos están distribuidos numéricamente de manera más o menos uniforme entre los tres replicones (aproximadamente 500 genes por replicón). El alto número de parálogos entre las proteínas de transporte se correlaciona con la gran fracción de los genes de *B. xenovorans* (aproximadamente 1400 codificando más o menos 610 sistemas de transporte). Presenta aproximadamente 180 sistemas de expulsión, que incluyen 89 bombas de expulsión de drogas, 18 sistemas de secreción de proteínas, 21 bombas de expulsión de metales pesados y 18 bombas de expulsión de aminoácidos y de aminoácido-lactonas. Los otros 430 sistemas están involucrados en el ingreso de compuestos orgánicos, cationes inorgánicos esenciales y varios aniones (Chain y col., 2006).

La segunda clase de proteínas para los que se observa un gran número de parálogos es la transducción de señales. Se ha visto anteriormente que el número de redes de transducción de señales aumenta desproporcionadamente con el tamaño del genoma. El 9% del genoma de *B. xenovorans* está dedicado a la transducción de señales y utiliza casi el espectro entero de dominios sensores y reguladores encontrados en la transducción de señales en procariotas. 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 esta bacteria se enfatiza por el hecho de que *Rhodococcus sp.*, un organismo con un nicho y un tamaño de genomas similares, posee 25% menos de sistemas de transporte y menos de la mitad de sistemas de transducción de señales (McLeod y col., 2006).

B. *Burkholderia vietnamiensis*

El nombre de *Burkholderia vietnamiensis* hace referencia a Vietnam, el país donde se aislaron las cepas provenientes del arroz. Son células móviles de 0.8 a 2 μm de largo y de 0.3 a 0.8 μm de ancho. El contenido de G+C varía de 66.9 a 68.1%. Han sido aisladas de suelos donde se cultiva arroz y de muestras clínicas. La cepa tipo es *B. vietnamiensis* TVV75 (Contenido de G+C = 67.9%) (Gillis y col., 1995).

La cepa de *B. vietnamiensis* G4 fue aislada de una poza de retención en una planta de tratamiento de desperdicios industriales de la Estación Aérea Naval (NAS) en una zona con historial de contaminación por compuestos organoclorados en Pensacola, Florida, EEUU. Fue la primera cepa capaz de degradar tricloroetilenos (TCE), con CO_2 y compuestos no volátiles como productos finales de la degradación (Nelson y col., 1986), por esta razón se le estudia principalmente con fines de utilizarla en la biorremediación de suelos contaminados con compuestos organoclorados (Yeager y col., 2001).

- ***Burkholderia vietnamiensis* TVV75**

En 1988 Trần Van aisló varias cepas capaces de fijar nitrógeno atmosférico, asociadas con raíces de plantas de arroz en campos de Vietnam, a las que llamó cepas TVV. Estas cepas fueron caracterizadas posteriormente y mostraron ser fenotípicamente muy similares a *Burkholderia cepacia* (Trần Van, 1988).

En 1995, Gillis y col., propusieron que estas cepas eran una nueva especie de *Burkholderia*, las primeras capaces de fijar nitrógeno atmosférico y las llamaron *Burkholderia vietnamiensis*, siendo la TVV75 la cepa tipo. A esta cepa se le estudia principalmente con fines de utilizarla como promotora del crecimiento de las plantas (Trần Van y col., 2000; Govindarajan y col., 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran cantidad de secuencias de proteínas LCHR que se han identificado, y que se siguen identificando a medida que aumenta el número de genomas secuenciados, y debido a que sólo se han estudiado proteínas de dos de las seis subfamilias LCHR, es de nuestro interés saber si existen homólogos funcionales en subfamilias que no han sido estudiadas.

Para ello se utilizaron como fuente de homólogos a las β -proteobacterias *B. xenovorans* LMG 21463 (LB400) y *B. vietnamiensis* TVV75, que presentan un gran número de proteínas LCHR de distintas subfamilias.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS: Las proteínas de la familia LCHR de *Burkholderia xenovorans* y *Burkholderia vietnamiensis* confieren resistencia a cromato.

OBJETIVO GENERAL: Determinar si proteínas LCHR de *Burkholderia xenovorans* y *Burkholderia vietnamiensis* confieren resistencia a cromato

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar análisis bioinformáticos a las secuencias de proteínas LCHR seleccionadas
- Transferir los genes de *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis* que codifican proteínas de distintas subfamilias LCHR a cepas huésped
- Determinar si los genes clonados confieren resistencia a cromato

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia completa que se diseñó para cumplir los objetivos propuestos se muestra en la figura 6.

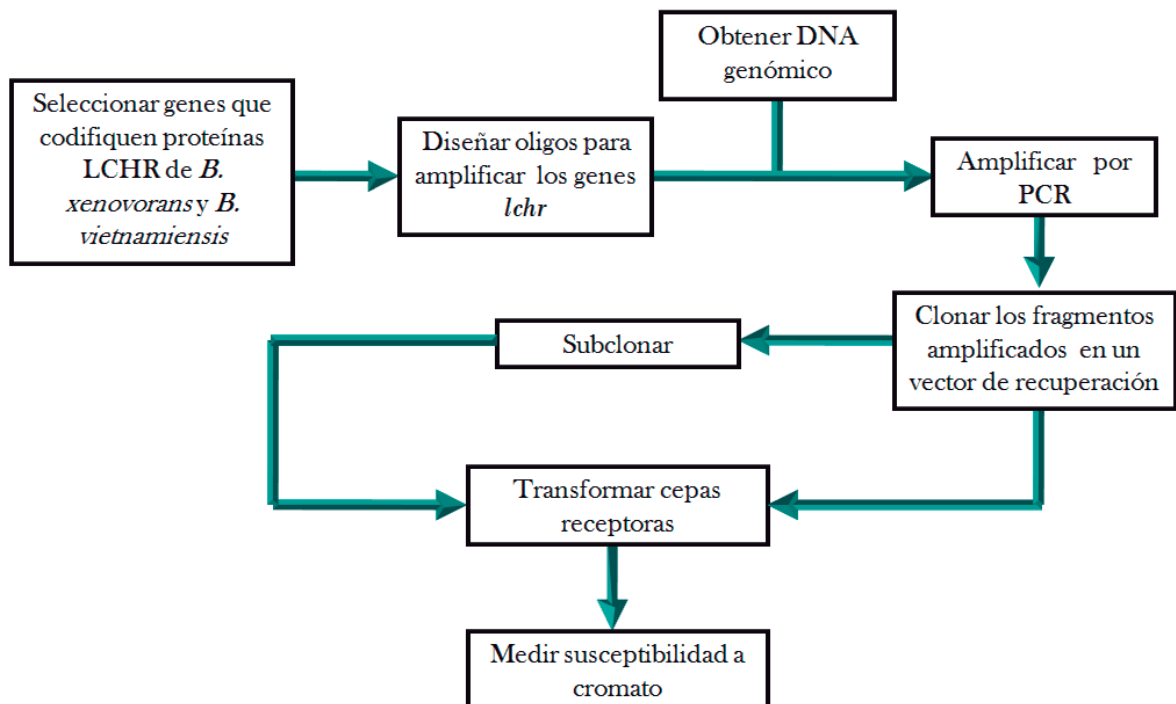


Fig. 6. Estrategia experimental.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

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

- K₂CrO₄ de los laboratorios Merck.
- Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%. Se empleó para crecimiento de bacterias, para preinóculos en las pruebas de susceptibilidad al cromo y para aislamiento de DNA.
- Agar Luria Bertani (AL): Al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico. Se utilizó para crecer las bacterias luego de la transformación y para sembrarlas.
- Caldo nutritivo (CN): Extracto de carne 3.0 g, peptona de carne 5.0 g y agua destilada cbp 1 litro. Se utilizó para crecimiento de bacterias y para realizar pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido.
- Agar nutritivo: La misma preparación del caldo y se le agregan 15 g/l de agar bacteriológico. Se utilizó para el crecimiento de las cepas de *Burkholderia*.
- Medio mínimo M9: Sales M9 (Sigma), sulfato de magnesio 2 mM, glucosa 20 mM, cloruro de calcio 0.1 mM. Se utilizó para realizar pruebas de susceptibilidad a cromato.

CEPAS

- *Escherichia coli* JM101. *supE thi-1Δ(lac-proAB)[F' traΔ36 proAB lacI^q AΔM15]* (Yanish-Perron y col., 1985). Se utilizó para transformar con los plásmidos recombinantes derivados de pGEMT.

- *Escherichia coli* TOP-10. F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻ (Durfee y col., 2008). Se utilizó para transformar con los plásmidos recombinantes derivados de pJET 1.2.
- *Escherichia coli* W3110. F⁻ λ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE) (Bachman, 1972). Esta cepa fue receptora de los plásmidos recombinantes y se utilizó para realizar las pruebas de susceptibilidad a cromato.
- *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1969). Esta cepa fue receptora de los plásmidos recombinantes derivados de pUCP20.
- *Burkholderia vietnamiensis* TVV75 (Gillis y col., 1995).
- *Burkholderia xenovorans* LMG21463 (LB400) (Goris y col., 2004).

Las cepas de *Burkholderia* fueron donadas por el Dr. Jesús Caballero Mellado del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

VECTORES

Los vectores que se utilizaron son los siguientes:

- pGEM-T (Promega), para la recuperación de productos de PCR, con un número de copias de 300 a 700 por célula, tiene un gen de resistencia a ampicilina (Summerton y col., 1983).
- pJET 1.2 (Fermentas), para la recuperación de productos de PCR, con un número de copias de 500 a 700.
- pUCP20. Este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina y orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas* (West y col., 1994). En *E. coli* presenta un número de copias de alrededor de 500 y en *P. aeruginosa*, 20 copias.

- pACYC 184. Es un vector de clonación de *E. coli*, con alrededor de 15 copias por célula y genes de resistencia a cloramfenicol y tetraciclina (Sambrook y col., 1995).

MÉTODOS

1. Reacción en cadena de la polimerasa

Como muestra de DNA para la amplificación se usaron de 200 a 400 ng del DNA total de los organismos a probar. Se adicionaron de 10 a 20 picomoles (pm) de oligos directo y reverso (**Tabla 1**) y 12.5 μ l de la mezcla de reacción Super Mix II que contiene la enzima *Taq* polimerasa, anticuerpos anti-*Taq* (inhiben la actividad de la enzima a temperatura ambiente y proveen a la enzima de un “hot start”), una proteína AccuPrime termoestable (mejora la hibridación oligo-molde), magnesio y dNTPs a concentraciones optimizadas. La mezcla se sometió a 25–35 ciclos con las siguientes condiciones 95°C/ 30–40 s (desnaturalización), 46–60°C/40-60 s (alineamiento), 72°C/2 min (polimerización) y a un ciclo final de polimerización de 72°C/5 min. Lo anterior en un termociclador Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR System 2400.

2. Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa a una concentración de 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M). Los geles se depositaron en una cámara de electroforesis horizontal, las cuales contenían el mismo amortiguador. Las muestras de DNA se mezclaron con 2 μ l de la solución colorante (azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 5%, sacarosa 40%) y se descargaron en los pozos del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder y se sometió a un voltaje constante por un

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes *lchr*.

OLIGO ^a	SECUENCIA ^b	ENZIMA DE RESTRICCIÓN ^c
Bfu_LCHR6_470_D	5' GATCCGTCGTCTG <u>AAGCTT</u> ATC 3'	<i>Hind</i> III
Bfu_LCHR6_470_R	5' GTTCGTTCCATCCAGG <u>GAATTC</u> 3'	<i>Eco</i> RI
Bfu_LCHR1_449_D	5' GGGTAGTCGG <u>AAGCTT</u> TCATG 3'	<i>Hind</i> III
Bfu_LCHR1_449_R	5' CCTC <u>TCTAGA</u> AAGGTGGCAACC 3'	<i>Xba</i> I
Bvi_LCHR5_474_D	5' GTTCTCGC <u>TCTAGA</u> CATGTAC 3'	<i>Xba</i> I
Bvi_LCHR5_474_R	5' GATCGATCG <u>AAGCTT</u> TCAC 3'	<i>Hind</i> III
Bxe_LCHR2_402_D	5' CGAATAGCA <u>TCTAGA</u> CGCTTG 3'	<i>Xba</i> I
Bxe_LCHR2_402_R	5' GGACGATCG <u>GAATTC</u> TCTCGC 3'	<i>Eco</i> RI
Bxe_FCA2B_D	5' GTCCAT <u>TCTAGA</u> AAGGAGGTAAGC 3'	<i>Xba</i> I
Bxe_FCA2B_R	5' CAGTTGCGTG <u>AAGCTT</u> CGAC 3'	<i>Hind</i> III

a. El nombre del oligo indica el nombre abreviado del organismo, la subfamilia a la que pertenece la proteína LCHR, el tamaño (aa) y la orientación: directo (D), reverso (R). b. Se indica en negritas y subrayado el sitio de restricción adicionado para usarse posteriormente en la subclonación. c. Se indican las enzimas empleadas.

periodo adecuado de tiempo. Luego del corrimiento los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min. Las bandas teñidas se observaron en un transiluminador de luz UV y posteriormente se fotografiaron.

3. Purificación de plásmidos

Por lisis alcalina, por el método de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1989, descrito a continuación:

Se centrifugaron 4 ml de un cultivo bacteriano crecido toda la noche durante 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Luego se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 μ l de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8 y EDTA 10 mM). Luego se le adicionaron 20 μ l de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Se agregaron 300 μ l de la solución de lisis recién preparada compuesta por NaOH 0.2N y SDS 1% se agitó suavemente y se incubó durante 10 min en hielo. Luego se adicionaron 200 μ l de una solución de acetato de potasio 5M (acetato de potasio 5M y ácido acético glacial pH 4.8), se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo (o con un palillo estéril se retiraron los restos celulares). Al sobrenadante se le adicionaron 500 μ l de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 24:24:1, se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm. Luego se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se le agregaron 500 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, se mezcló suavemente y se centrifugó durante 3 min a 12 000 rpm. Se desechó el sobrenadante, se lavó dos veces con 500 μ l de etanol al 70% centrifugando durante 3 min entre cada lavado. Se secó la pastilla a 65°C y se resuspendió en 50 μ l de agua desionizada estéril

o agua HPLC. Se agregaron 5 µl de RNasa y se incubó a 37°C durante 30 min, luego de este tiempo se inactivó la enzima a 65°C/15 min. El DNA obtenido se corrió en un gel de agarosa o bien se almacenó a -20°C.

4. Transformación por electroporación

a. Preparación de células competentes

Se creció la cepa receptora de los plásmidos en 4 ml de CL a 37°C con agitación constante por 14 h. Luego de este tiempo se transfirieron los 4 ml del cultivo a 250 ml de CL precalentado a 37°C y se incubó a esta temperatura con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 590 nm. Una vez que alcanzó esta densidad óptica se colocó el matraz en hielo por 15 min. Posteriormente se centrifugó el cultivo en tubos de 40 ml por 10 min a 6 000 rpm. A continuación, se lavaron las células dos veces con 20 ml de agua desionizada, estéril y fría, centrifugando 10 min a 8 000 rpm en cada ocasión. Por último, las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol al 10% y se almacenaron a -80°C.

b. Transformación

A 100 µl de células competentes se les adicionaron 2 µl de DNA y la muestra se colocó entre los electrodos de una celda en la cámara de electroporación del Electroporador 215 (Eppendorf), la mezcla se sometió a un pulso eléctrico e inmediatamente después se pasó la suspensión a un tubo con 2 ml de CL y se incubó por 1 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl en placas de agar con medio selectivo para la obtención de transformantes y se incubó de 24 – 48 h a 37°C. Las colonias obtenidas se inocularon en 4 ml de CL con el antibiótico adecuado y se les realizó aislamiento de DNA.

5. Tratamiento enzimático de las moléculas de DNA

a. Restricción con endonucleasas

Los DNAs purificados se digirieron utilizando 1 unidad de la enzima correspondiente por cada μg de DNA, y se incubó a 37°C por 12 – 18 h. Posteriormente se hizo el corrimiento electroforético de la mezcla de restricción en geles de agarosa para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

b. Ligación

Los fragmentos de DNA, purificados a partir del gel de agarosa, se ligaron manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector). Se usaron aproximadamente 30 ng del DNA de vector y 100 ng de inserto empleando la ligasa del fago T4, incubando a 4°C toda la noche.

6. Pruebas de susceptibilidad a cromato

Por el método descrito a continuación:

Se prepararon tubos con 4 ml de CN o medio mínimo M9 y con diferentes concentraciones de cromato. A cada tubo se le agregaron 40 μl de cultivo crecido en CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante. Como control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo sin cromato. Los tubos inoculados se incubaron por un periodo de 18–20 h a 37°C con agitación constante. La susceptibilidad se midió en función de la absorbencia de los cultivos a 590 nm en un espectrofotómetro.

VI. RESULTADOS

1. Proteínas LCHR seleccionadas

Una subfamilia proteica agrupa a proteínas idealmente ortólogas que llevan a cabo la misma función (Riveros-Rosas y col., 2003). Debido a la redundancia de genes *lchr* que presentan *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis* en sus genomas, se compararon la identidad y la similitud de las proteínas de cada subfamilia LCHR, tanto entre ellas mismas como con las ChrA de pUM505 de la subfamilia LCHR5 y de pMOL28 de la subfamilia LCHR2, para determinar si existían diferencias significativas entre los miembros de cada subfamilia y las proteínas cuya función está ampliamente demostrada. Los alineamientos por parejas se hicieron en BioEdit, utilizando la opción de alineamiento global óptimo. Los resultados se muestran en la **figura 7**.

Las proteínas LCHR1 de *B. xenovorans* (430 aa) y *B. vietnamiensis* (405 aa) presentaron porcentajes de identidad parecidos con respecto a las ChrAs de pUM505 y pMOL28, de alrededor de 35%. La proteína LCHR2 de *B. xenovorans* (398 aa) y las proteínas de *B. vietnamiensis* (395 y 392 aa) presentaron porcentajes de identidad de alrededor del 38% con respecto a la ChrA de pUM505 y de 72% con respecto a la ChrA de pMOL28, que también pertenece a esta subfamilia. La proteína LCHR5 de *B. vietnamiensis* (474 aa) presentó un porcentaje de identidad de 37% con respecto a la ChrA de pUM505, que pertenece a su misma subfamilia, y de 34% con respecto a la ChrA de pMOL28. Las proteínas LCHR6 de *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis* (402 aa) presentaron un porcentaje de identidad de 34% con respecto a la ChrA de pUM505 y de 33% con respecto a la ChrA de pMOL28 (**Fig. 7**).

LCHR1

	ChrA pMOL28		ChrA pUM505		Bxe_LCHR1_430		Bvi_LCHR1_405	
Bxe_LCHR1_430	32.8	36.2	35.9	41.7	-	-	53.6	58.5
Bvi_LCHR1_405	35.4	38.3	36.6	39.9	53.6	58.5	-	-

LCHR2

	ChrA pMOL28		ChrA pUM505		Bxe_LCHR2_402		Bvi_LCHR2_392		Bvi_LCHR2_395	
Bxe_LCHR2_398	68.8	75.5	36.1	40.4	-	-	66.5	75.5	66.4	74.8
Bvi_LCHR2_392	74.9	82.8	38.0	42.3	66.5	75.5	-	-	84.1	89.7
Bvi_LCHR2_395	74.2	83.2	39.9	42.7	66.4	74.8	84.1	89.7	-	-

LCHR5

	ChrA pMOL28		ChrA pUM505	
Bvi_LCHR5_474	34.9	40.1	37.2	42.2

LCHR6

	ChrA pMOL28		ChrA pUM505		Bxe_LCHR6_402		Bvi_LCHR6_402	
Bxe_LCHR6_402	33.7	38.6	34.0	37.2	-	-	62.4	69.2
Bvi_LCHR6_402	33.2	36.1	34.5	39.1	62.4	69.2	-	-

Fig. 7. Comparación de la Identidad y similitud de las proteínas LCHR de *B. xenovorans* y *B. vietnamiensis*. En cada tabla se comparan los porcentajes de identidad (sombreado) y similitud de las proteínas de la primera columna con las proteínas a la derecha. El nombre de las proteínas indica la abreviatura del organismo de que proceden, la subfamilia LCHR y el número de aminoácidos. Los valores se obtuvieron alineando por parejas las secuencias de las proteínas utilizando el programa BioEdit.

Con estos resultados de identidad y similitud entre los miembros de la misma subfamilia se decidió estudiar la función de una proteína de cada subfamilia diferente de *B. xenovorans* o de *B. vietnamiensis*.

Las proteínas seleccionadas fueron las siguientes:

- De la subfamilia LCHR1, se eligió la proteína de 430 aa de *B. xenovorans* codificada en el cromosoma 1. El gen que codifica a esta proteína LCHR1 (Bxe_A1857) está flanqueado por genes que codifican a una proteína hipotética y una posible proteína antigénica de reacción cruzada con la miosina (MCRA), que probablemente no están relacionados con la resistencia a cromato (**Fig. 8A**).
- De la subfamilia LCHR2 se eligió a la proteína de 398 aa de *B. xenovorans*. Aledaños al gen Bxe_C1206 que codifica a la proteína LCHR2, se encuentran genes que codifican proteínas homólogas a ChrB, ChrC y ChrF del plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* y del transposón *TnOtChr* de *O. tritici* (**Fig. 8B**). Las proteínas codificadas por el posible operón ChrBA2FC presentan una alta identidad y similitud con las proteínas codificadas en el transposón *TnOtChr*, de igual forma que las transposasas y las resolvasas que los flanquean, además de que los genes que codifican estas proteínas presentan el mismo arreglo (**Fig. 9**).
- De la subfamilia LCHR5 la proteína a estudiar fue la de 474 aa de *B. vietnamiensis*. Esta proteína está dentro de un operón putativo, que además de tener genes aledaños que codifican a homólogos de ChrB, ChrC y ChrF, tiene cerca genes que codifican proteínas ChrA2 y ChrF. Este operón está formado por nueve genes, de los cuales siete están relacionados con la resistencia a cromato (**Fig. 8C**).
- De la subfamilia LCHR6 se eligió a la proteína de 402 aa de *B. xenovorans*. Esta proteína está codificada en el cromosoma 1 y tiene aledaños genes que codifican

una proteína hipotética y una posible di guanilato ciclasa/fosfodiesterasa (DGC), probablemente no relacionadas con la resistencia a cromato (**Fig. 8D**).

1.1 Comparación de los dominios amino y carboxilo de las proteínas LCHR seleccionadas

Las proteínas LCHR presentan dos dominios que se han denominado los dominios amino y carboxilo y se sabe que el dominio amino se encuentra mejor conservado que el dominio carboxilo (Díaz-Pérez y col., 2007). Para la ChrA de pUM505 se encontró un mayor número de aminoácidos esenciales para la función en el dominio amino que en el dominio carboxilo, esto sugiere que cada uno de los dominios podría llevar a cabo una función diferente en la expulsión de cromato (Aguilera y col., 2004). Para saber si esto se presenta en todos los miembros de las subfamilias de las proteínas de estudio se compararon los grados de conservación de los dominios amino y carboxilo por separado de cada subfamilia.

Para determinar la variación del nivel de identidad y similitud de los dominios por separado entre las diferentes subfamilias, las secuencias de proteínas se dividieron por la región interdominio, se compararon con varios miembros de la misma subfamilia y se alinearon utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson y col., 2002) (**Fig. 10**).

En el caso de la subfamilia LCHR1, en el dominio amino alrededor del 17% de los aminoácidos son idénticos entre los miembros de la subfamilia (**Fig. 10A**), mientras que en el dominio carboxilo este porcentaje sube hasta 25% (**Fig. 11A**), por lo que el dominio carboxilo está más conservado que en el amino. Para la subfamilia LCHR5 se observa el caso contrario, en el dominio amino se observa que el 16% de los aminoácidos son idénticos entre los miembros de la subfamilia (**Fig. 10C**) y en el

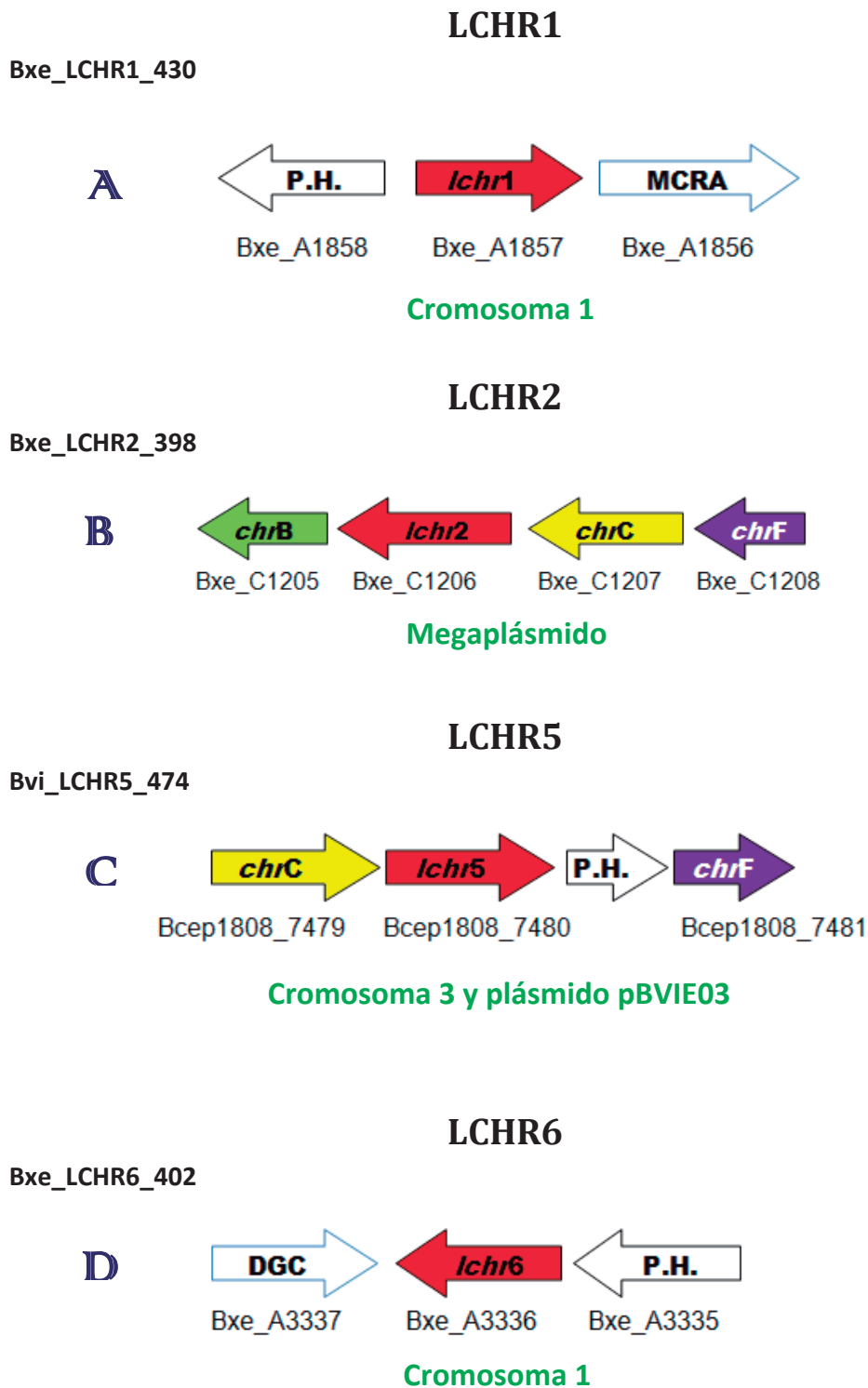


Fig. 8. Contexto genómico de los genes *lchr* de *Burkholderia* seleccionados. En el nombre, a la izquierda, se indica la especie de *Burkholderia*, la subfamilia a la que pertenece la proteína que codifica el gen y el tamaño (aa). Las flechas que representan los genes indican el sentido de la transcripción. Debajo de cada flecha se indica la etiqueta del gen y su localización en los distintos replicones del genoma. P.H. corresponde a un gen que codifica una proteína hipotética. Los datos fueron tomados del NCBI.

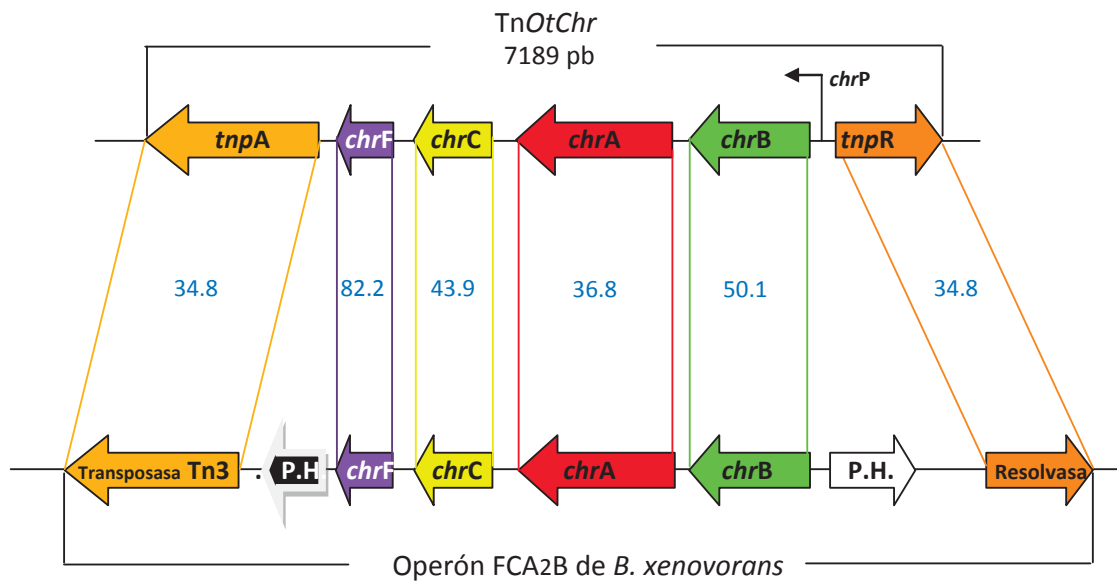


Fig.9. Comparación de las secuencias del transposón TnOtChr de *O. tritici* con el operón putativo chrFCA2B de *B. xenovorans*. Las flechas que representan los genes indican el sentido de la transcripción. Los genes homólogos se representan con el mismo color en ambos arreglos. chrP indica la ubicación del promotor identificado en el transposón y la flecha señala la dirección de la transcripción. En azul se indica la identidad en porcentaje. P.H. Indica un gen que codifica una proteína hipotética.

dominio carboxilo sólo el 12% de los aminoácidos se conservan (**Fig. 11C**). En la subfamilia LCHR2 el porcentaje de aminoácidos conservados en el dominio amino es de alrededor del 36% (**Fig. 10B**) y 45% en el carboxilo (**Fig. 11B**), en esta subfamilia el dominio carboxilo está más conservado que el amino. En la subfamilia LCHR6, los porcentajes de aminoácidos conservados son muy altos: el dominio amino presenta un 51% de aminoácidos idénticos entre los tres miembros de la subfamilia (**Fig. 10D**) y el dominio carboxilo presenta un 62% (**Fig. 11D**), por lo que, al igual que en las subfamilias LCHR1 y LCHR2, el dominio carboxilo parece estar más conservado que el dominio amino.

1.2 Perfil hidropático de las proteínas seleccionadas

La arquitectura de las proteínas de membrana se refleja en el perfil hidropático de su secuencia de aminoácidos (Degli-Esposti y col., 1990). Los elementos de las estructuras secundaria y terciaria determinan el perfil, y dado que la estructura proteica está mejor conservada que la secuencia de aminoácidos, el perfil hidropático puede detectar relaciones evolutivas más distantes de lo que lo hace la estructura primaria (Lolkelma y Slotboom, 1998).

Para determinar si las proteínas seleccionadas presentaban una topología membranar similar a la topología reportada de las proteínas funcionales se compararon sus perfiles hidropáticos y los posibles STM. Se usó el programa BioEdit para comparar los perfiles hidropáticos de las proteínas LCHR seleccionadas con el de las proteínas ChrA de *P. aeruginosa* y ChrA de pMOL28 (**Figs. 12-15**). Debido a la diferencia de tamaño entre las secuencias, se realizó un alineamiento entre cada pareja comparada, se cortaron los aminoácidos dispares al inicio y al final del alineamiento y luego se graficaron los

perfiles hidropáticos. Utilizando el programa TopPred (Claros y col., 1994), se predijo el número de STM y su posible orientación en la membrana.

Los resultados de la comparación entre las ChrAs de pUM505, pMOL28 y la proteína LCHR1 muestran que los perfiles son muy parecidos al inicio, en la parte que corresponde al dominio amino (**Fig. 12**); la mayor variación se presenta a la mitad de la gráfica en ambos casos y se observa la misma cantidad de picos, aunque de diferente tamaño en lo que corresponde al dominio carboxilo. Los resultados del análisis en TopPred predicen 11 STM para la proteína LCHR1, utilizando los mismos parámetros con que predicen 13 STM para la ChrA de pUM505 y 12 para la ChrA de pMOL28. Los resultados del análisis del perfil hidropático corresponden a las predicciones en TopPred ya que es a partir de la mitad de la secuencia donde se presentan las variaciones en el número y posición de los STM. Los STM presentan la misma orientación en la membrana, ambas iniciando en el citoplasma (**Fig. 12**).

Con respecto a la proteína LCHR2, las principales diferencias de su perfil hidropático y el de la proteína ChrA de pUM505 se presentan al final de la secuencia (**Fig. 13**), mientras que con respecto a la ChrA de PMOL28 (también de la subfamilia LCHR2) son prácticamente iguales y fue en el único caso en el que no se tuvo que hacer un alineamiento para graficar el perfil, tanto al inicio como al final son muy parecidos y sólo difieren en el tamaño de uno de los picos, a la mitad de la gráfica. Los resultados de TopPred señalan que la proteína LCHR2 posiblemente presenta 12 STM y una orientación opuesta a la que presentan la ChrAs de pUM505 y pMOL28, iniciando en la región extracelular y no en el citoplasma (**Fig. 13**).

Para las comparaciones con la proteína LCHR5 no se hicieron cortes en la secuencia, puesto que las diferencias se ubican a la mitad de la secuencia. El perfil hidropático de la proteína LCHR5 es parecido al inicio al de las ChrAs de pUM505, que pertenece a la misma subfamilia y también a la de pMOL28 de la subfamilia LCHR2 (**Fig. 14**), y difiere notablemente a partir de la mitad de las gráficas, donde el de la proteína de *B. vietnamiensis* muestra una región altamente hidrofílica y las otras no. La proteína de *B. vietnamiensis*, de acuerdo a TopPred presenta 11 STM con una orientación opuesta a la ChrAs de pUM505 y pMOL28 (**Fig. 14**).

El perfil de la proteína LCHR6 de *B. xenovorans* es muy similar al de las ChrA de pUM505 y de pMOL28 (**Fig. 15**), la mayor diferencia se presenta a la mitad de la secuencia, donde el perfil de la ChrA de pUM505 presenta un pico que podría corresponder a un STM que no presenta la de *B. xenovorans*, lo que se refleja también en los resultados arrojados por TopPred, según los cuales la proteína LCHR6 presenta 12 STM, con la misma orientación que las de pUM505 y PMOL28 (**Fig. 15**).

1.3 Análisis de segmentos transmembranales de las proteínas seleccionadas

Los dominios amino y carboxilo de la proteína ChrA de pUM505 tienen una orientación opuesta con respecto a su orientación en la membrana (Jiménez-Mejía y col., 2006). Un análisis bioinformático de la topología de la familia de proteínas pequeñas (SCHR) mostró que las secuencias correspondientes al dominio amino y al dominio carboxilo también muestran una orientación opuesta (Díaz-Pérez y col., 2007). Esta orientación podría ser necesaria para la función de la proteína, por lo que se hizo un análisis bioinformático para determinar si se conserva en las subfamilias de las proteínas LCHR seleccionadas.

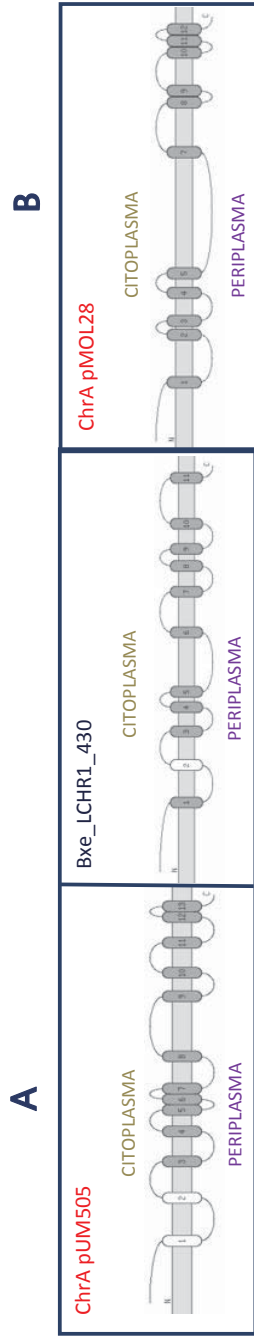
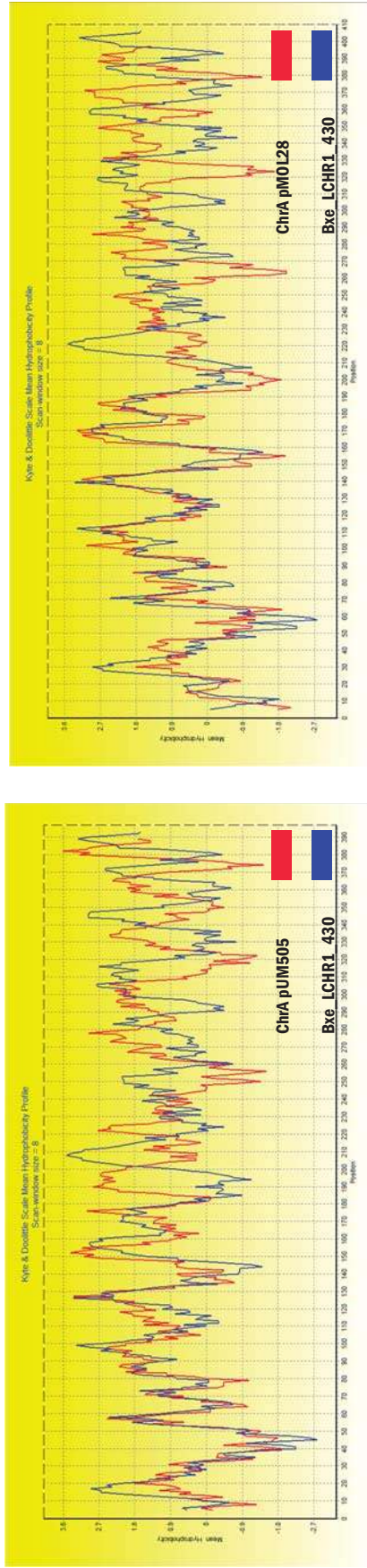


Fig. 12. Comparación de los perfiles hidrofóbicos y los posibles segmentos transmembranales de ChrA de pUM505 y pMOL28 con el homólogo LCHR1 de *B. xenovorans*. **A.** Comparación de los perfiles hidrofóbicos y STM de la ChrA de pUM505 con la proteína LCHR1 de *B. xenovorans*. **B.** Comparación de los perfiles hidrofóbicos y STM de la ChrA de pMOL28 con la proteína LCHR1 de *B. xenovorans*. Las secuencias de la pareja de proteínas se alinearon y se cortaron los aminoácidos dispares al inicio y al final de la secuencia y luego se graficaron los perfiles hidrofóbicos utilizando el programa BioEdit, con el algoritmo de Kyte & Doolittle y utilizando un tamaño de ventana de 8. Se introdujeron las secuencias en el programa TopPred, que predice los STM de las proteínas y su orientación en la membrana. Los segmentos con alta certeza, el programa los presenta sombreados (ciertos) y los segmentos putativos los presenta en blanco. La barra sombreada representa la membrana, los cilindros representan los STM y están unidos por las asas, en la parte superior se indica la posición del citoplasma y en la inferior del periplasma. Se predicen 11 STM para la proteína LCHR1 (a la izquierda), comparados con los 13 y 11 STM de las ChrAs de pUM505 y pMOL28 (a la derecha), con los extremos N y C en la misma orientación.

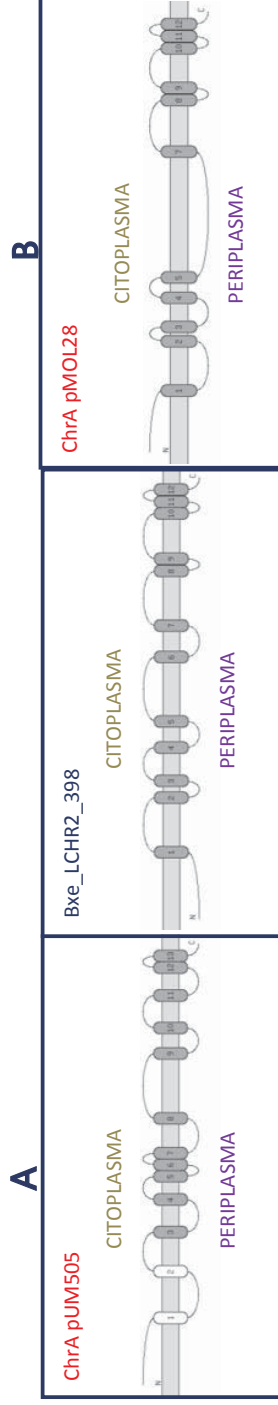
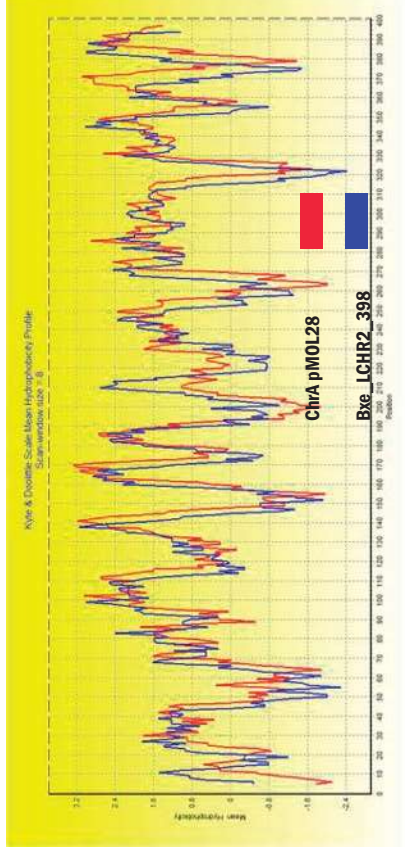
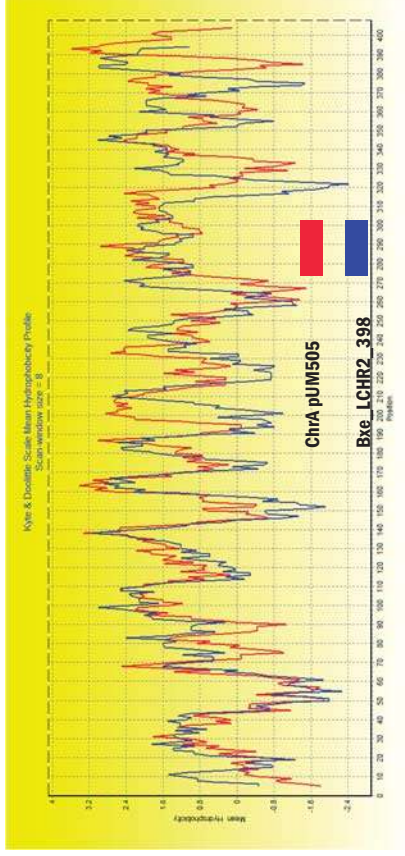
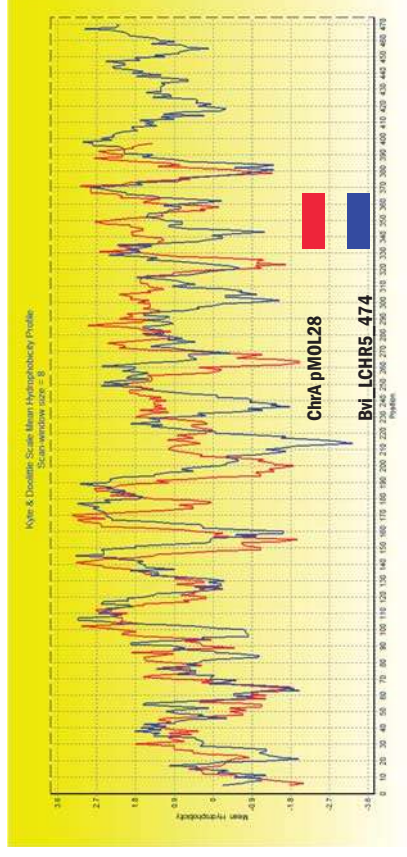
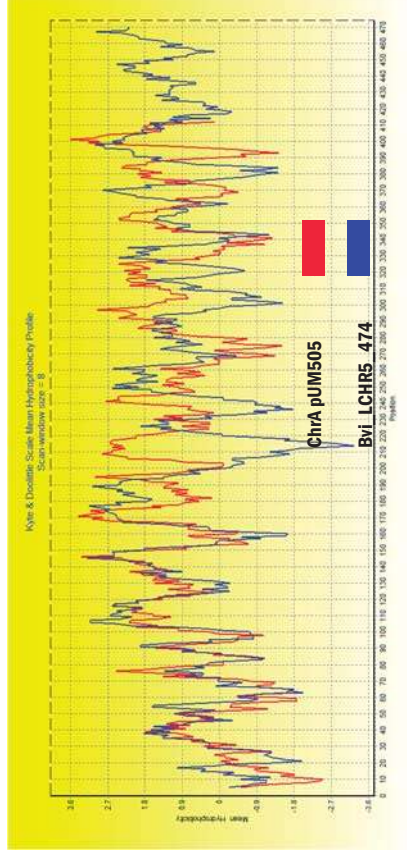
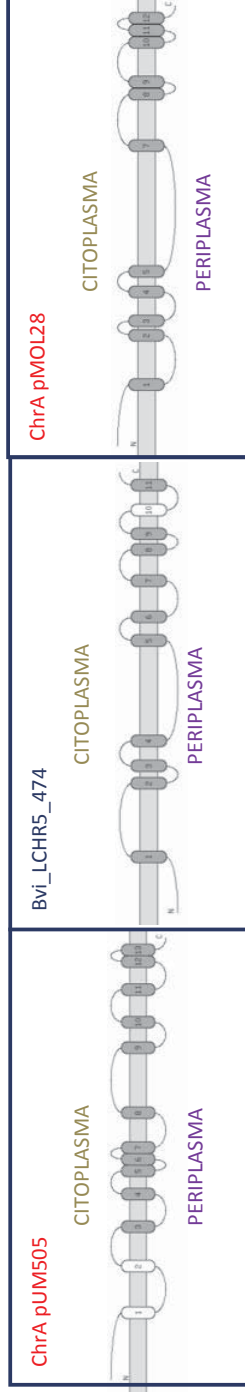


Fig. 13. Comparación de los perfiles hidropáticos y los posibles segmentos transmembranales de ChrA de pUM505 y pMOL28 con el homólogo LCHR2 de *B. xenovorans*. **A.** Comparación de los perfiles hidropáticos y STM de la ChrA de pUM505 con la proteína LCHR2 de *B. xenovorans*. **B.** Comparación de los perfiles hidropáticos y STM de la ChrA de pMOL28 con la proteína LCHR2 de *B. xenovorans*. Las secuencias de la pareja de proteínas se alinearon y se cortaron los aminoácidos dispares al inicio y al final de la secuencia y luego se graficaron los perfiles hidropáticos utilizando el programa BioEdit, con el algoritmo de Kyte & Doolittle y utilizando un tamaño de ventana de 8. Se introdujeron las secuencias en el programa TopPred, que predice los STM de las proteínas y su orientación en la membrana. Los segmentos con alta certeza, el programa los presenta sombreados (ciertos) y los segmentos putativos los presenta en blanco. La barra sombreada representa la membrana, los cilindros representan los STM y están unidos por las asas, en la parte superior se indica la posición del citoplasma y en la inferior del periplasma. Se predicen 12 STM para la proteína LCHR2 (a la derecha), lo mismo que para la proteína de pMOL28 y 13 para la ChrA. de pUM505 (a la derecha), con los extremos N y C con orientaciones opuestas en ambas comparaciones.



A



B

Fig. 14. Comparación de los perfiles hidropáticos y los posibles segmentos transmembranales de ChrA de pUM505 y pMOL28 con el homólogo LCHR5 de *B. vietnamiensis*. **A.** Comparación de los perfiles hidropáticos y STM de la ChrA de pUM505 con la proteína LCHR5 de *B. vietnamiensis*. **B.** Comparación de los perfiles hidropáticos y STM de la ChrA de pMOL28 con la proteína LCHR5 de *B. vietnamiensis*. Los perfiles hidropáticos se graficaron utilizando el programa BioEdit, con el algoritmo de Kyte & Doolittle y utilizando un tamaño de ventana de 8. Se introdujeron las secuencias en el programa TopPred, que predice los STM de las proteínas y su orientación en la membrana. Los segmentos con alta certeza, el programa los presenta sombreados (ciertos) y los segmentos putativos los presenta en blanco. La barra sombreada representa la membrana, los cilindros representan los STM y están unidos por las asas, en la parte superior se indica la posición del citoplasma y en la inferior del periplasma. Se predicen 12 STM para la proteína LCHR5 (a la derecha), 10 de ellos como ciertos, para la proteína de pMOL28 y para la ChrA. de pUM505 (a la derecha) se predicen 13 y 12 STM respectivamente, con los extremos N y C con orientaciones opuestas a los de la proteína LCHR5.

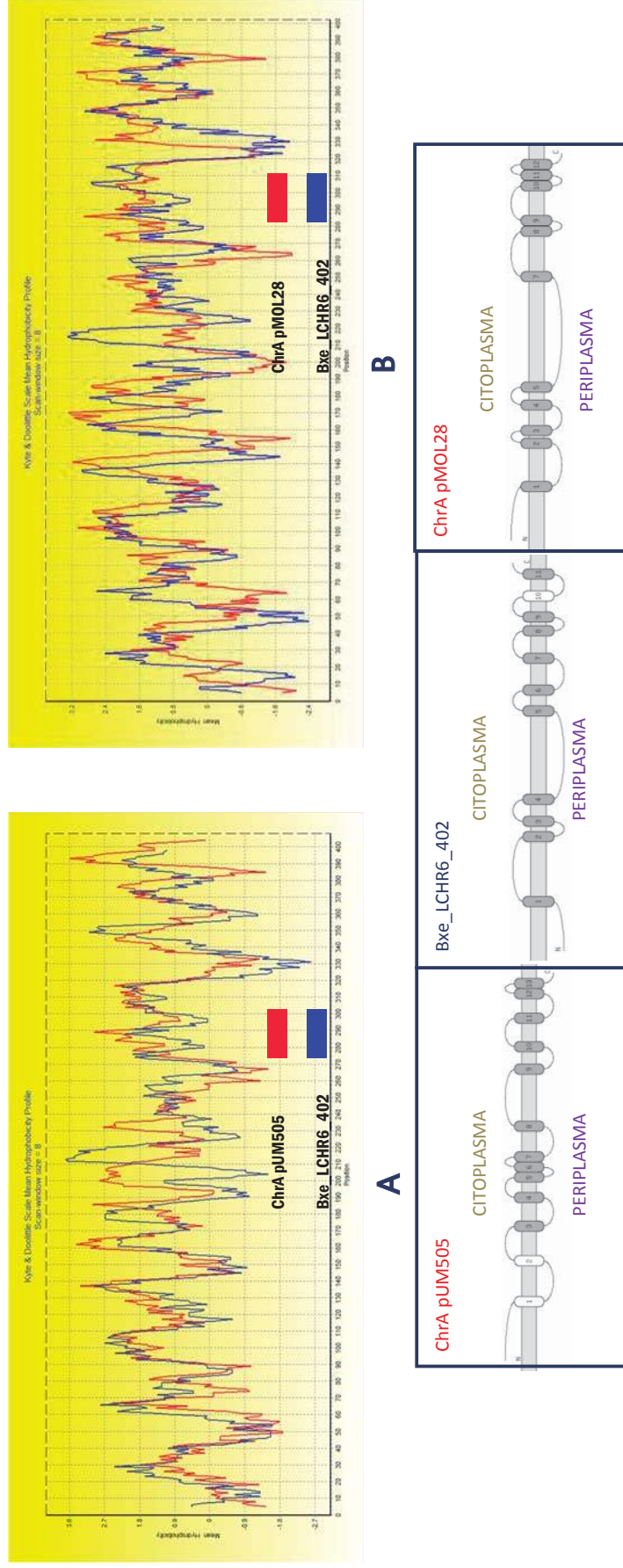


Fig. 15. Comparación de los perfiles hidropáticos y los posibles segmentos transmembranales de ChrA de pUM505 y pMOL28 con el homólogo LCHR6 de *B. xenovorans*. **A.** Comparación de los perfiles hidropáticos y STM de la ChrA de pUM505 con la proteína LCHR6 de *B. xenovorans*. **B.** Comparación de los perfiles hidropáticos y STM de la ChrA de pMOL28 con la proteína LCHR6 de *B. xenovorans*. Los perfiles hidropáticos se graficaron directamente utilizando el programa BioEdit, con el algoritmo de Kyte & Doolittle y se cortaron los aa dispares al inicio de la secuencia, para la comparación con la de pMOL28 se graficaron directamente utilizando el programa BioEdit, con el algoritmo de Kyte & Doolittle y utilizando un tamaño de ventana de 8. Se introdujeron las secuencias en el programa TopPred, que predice los STM de las proteínas y su orientación en la membrana. Los segmentos con alta certeza, el programa los presenta sombreados (ciertos) y los segmentos putativos los presenta en blanco. La barra sombreada representa la membrana, los cilindros representan los STM y están unidos por las asas, en la parte superior se indica la posición del citoplasma y en la inferior del periplasma. Se predicen 12 STM para la proteína LCHR5 (a la derecha), 11 de ellos como ciertos, para la proteína de pMOL28 y para la ChrA. de pUM505 (a la derecha) se predicen 12 y 13 STM respectivamente, con los extremos N y C con orientaciones opuestas a los de la proteína LCHR6.

Se utilizó el programa TopPred para determinar la distribución de los STM de los dominios amino y carboxilo por separado de cinco miembros de cada subfamilia LCHR. Se cuantificaron los residuos con carga positiva (lisina y arginina) de las asas para tratar de determinar su posición con respecto a la membrana citoplásmica, de acuerdo a la regla del positivo adentro que establece que las asas con un gran número de estos residuos tienen una localización citoplasmática (von Heijne, 1992).

Se compararon los perfiles hidropáticos de cada dominio con proteínas de la misma subfamilia (**Fig. 16-19**). Al principio se observó mucha variación al sobreponer los perfiles por la diferencia de tamaño de las proteínas, por lo que se hizo un alineamiento y se eliminaron los aminoácidos variables al inicio de las secuencias. Se volvieron a graficar los perfiles hidropáticos y se pudo observar que de esta manera casi se empalmaban. De esta forma se puede suponer que la topología membranal es muy similar entre los miembros de cada subfamilia. Sin embargo, con los resultados obtenidos, en ninguno de los casos se puede hacer una predicción sobre la topología membranal puesto que no se observan diferencias en el número de residuos positivos de asa a asa que permitan saber la orientación.

2. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *Burkholderia* utilizadas

En la literatura no existen reportes sobre la resistencia a cromato de las cepas *B. vietnamiensis* TVV75 ni *B. xenovorans* LB400, y dado que éstas son las cepas donadoras de los genes de resistencia a cromato a estudiar, se les realizaron pruebas de susceptibilidad a este oxianión. Las pruebas mostraron que *B. xenovorans* LMG 21463 (LB400) fue mucho más resistente a cromato con respecto a las cepas de referencia (**Fig. 20**), como se esperaba, ya que en su genoma presenta tres proteínas LCHR y dos

pares de proteínas SCHR. Mostraron además que *B. vietnamiensis* resultó incluso más sensible a cromato que *E. coli* W3110, que no presenta genes *chr*, y que *P. aeruginosa* PAO1 (**Fig. 20**). Este resultado fue inesperado para *B. vietnamiensis* ya que presenta cinco genes para proteínas LCHR diferentes y siete para proteínas LCHR en total (además de dos pares de proteínas SCHR), por lo que se esperaban niveles altos de resistencia.

3. Diseño de oligonucleótidos

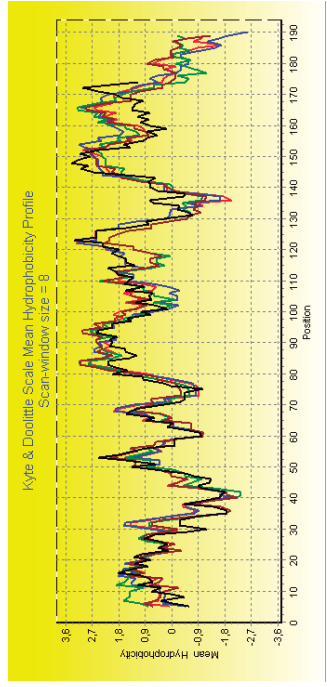
Para determinar si los genes *lchr* seleccionados confieren resistencia a cromato se eligió la estrategia de clonarlos en un vector de expresión y el primer paso para ello fue la amplificación por PCR. Para amplificar específicamente los genes *lchr* de Burkholderia se diseñaron oligonucleótidos, de acuerdo al esquema en la **figura 21**. Los oligonucleótidos se diseñaron de forma que se amplificaran también las posibles secuencias promotoras y terminadoras del gen o del conjunto de genes.

Primeramente se utilizó el software BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) y se identificaron los posibles promotores de los genes *lchr1*, *lchr2* y *chrB* de *B. xenovorans* y *lchr5* de *B. vietnamiensis*; posteriormente, se utilizó el programa PROMOTER FINDER (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) para identificar los promotores de los genes *chrF*, *chrC* y *lchr6* de *B. xenovorans* y *lchr5* de *B. vietnamiensis*.

A los oligonucleótidos que se diseñaron se les adicionaron sitios de restricción para usarse posteriormente en la subclonación (**Tabla 1**).

DOMINIO AMINO

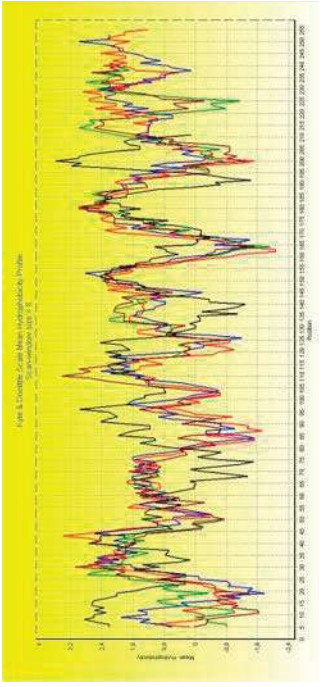
A_sinma_g92rul_480 MAVEESELVETQNTTASAGCALSHGIEFQ...
 A_burvi_a43rx3_474 MEANSVPPISVVFAPALQVSRF...
 A_psepu_g68rul_450 MSHLQETAQTPASV...
 A_azovi_g41990_453 MPELALPQ...
 A_pseae_P14285_416 MSWANESYRFSYDATTAEVPPMSYF...



A

DOMINIO CARBOXILO

C_sinma_g92rul_480 QVADITLCHKVPALPPFISHDVAV...
 C_burvi_a43rx3_474 QVAVRSHMAKEMKAGLJMLK...
 C_psepu_g68rul_450 QVAVHGLSFTMDLALZET...
 C_azovi_g41990_453 QVAVHGLSFTMDLALZET...
 C_pseae_P14285_416 AS...



B

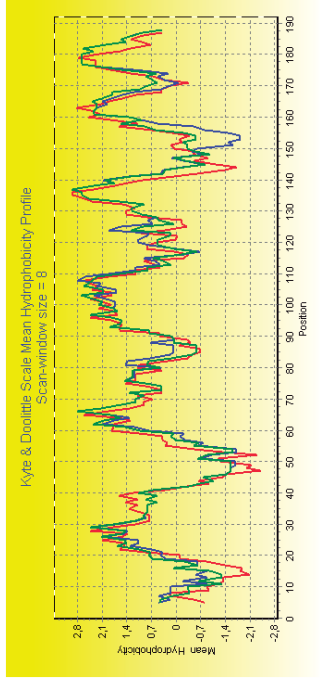
Fig. 18. Análisis de los posibles STM de los dominios amino y carboxilo de las proteínas LCHR5. **A.** Análisis de los posibles STM del dominio amino. **B.** Análisis de los posibles STM de los dominios carboxilo. Se seleccionaron cinco proteínas LCHR5 para el análisis y se separaron en dominios amino y carboxilo. Las secuencias por separado fueron ingresadas en el programa TopPred que dio la posible distribución de los STM. Se cuantificaron los residuos con carga positiva (K y R) de las asas para determinar la posible orientación en la membrana. Con el programa BioEdit se alinearon los perfiles hidropáticos de cada dominio y luego se alinearon y se cortaron los gaps al inicio del alineamiento para uniformizar los perfiles. Al inicio de la secuencia se indica el dominio (Carboxilo, C; Amino, A) nombre abreviado del organismo, el número de acceso del gen y el tamaño de la proteína que codifica. Sombreados con verde se indican los aminoácidos que forman parte de un posible STM y en color rosa los aminoácidos con carga positiva que forman parte de las asas. En las gráficas se muestran los perfiles hidropáticos de las secuencias sobrepuestas para compararlas.

DOMINIO AMINO

```

10 .....
11 .....
12 .....
13 .....
14 .....
15 .....
16 .....
17 .....
18 .....
19 .....
20 .....
21 .....
22 .....
23 .....
24 .....
25 .....
26 .....
27 .....
28 .....
29 .....
30 .....
31 .....
32 .....
33 .....
34 .....
35 .....
36 .....
37 .....
38 .....
39 .....
40 .....
41 .....
42 .....
43 .....
44 .....
45 .....
46 .....
47 .....
48 .....
49 .....
50 .....
51 .....
52 .....
53 .....
54 .....
55 .....
56 .....
57 .....
58 .....
59 .....
60 .....
61 .....
62 .....
63 .....
64 .....
65 .....
66 .....
67 .....
68 .....
69 .....
70 .....
71 .....
72 .....
73 .....
74 .....
75 .....
76 .....
77 .....
78 .....
79 .....
80 .....
81 .....
82 .....
83 .....
84 .....
85 .....
86 .....
87 .....
88 .....
89 .....
90 .....
91 .....
92 .....
93 .....
94 .....
95 .....
96 .....
97 .....
98 .....
99 .....
100 .....
101 .....
102 .....
103 .....
104 .....
105 .....
106 .....
107 .....
108 .....
109 .....
110 .....
111 .....
112 .....
113 .....
114 .....
115 .....
116 .....
117 .....
118 .....
119 .....
120 .....
121 .....
122 .....
123 .....
124 .....
125 .....
126 .....
127 .....
128 .....
129 .....
130 .....
131 .....
132 .....
133 .....
134 .....
135 .....
136 .....
137 .....
138 .....
139 .....
140 .....
141 .....
142 .....
143 .....
144 .....
145 .....
146 .....
147 .....
148 .....
149 .....
150 .....
151 .....
152 .....
153 .....
154 .....
155 .....
156 .....
157 .....
158 .....
159 .....
160 .....
161 .....
162 .....
163 .....
164 .....
165 .....
166 .....
167 .....
168 .....
169 .....
170 .....
171 .....
172 .....
173 .....
174 .....
175 .....
176 .....
177 .....
178 .....
179 .....
180 .....
181 .....
182 .....
183 .....
184 .....
185 .....
186 .....
187 .....
188 .....
189 .....
190 .....
191 .....
192 .....
193 .....
194 .....
195 .....
196 .....
197 .....
198 .....
199 .....
200 .....
201 .....
202 .....
203 .....
204 .....
205 .....
206 .....
207 .....
208 .....
209 .....
210 .....
211 .....
212 .....
213 .....
214 .....
215 .....
216 .....
217 .....
218 .....
219 .....
220 .....
221 .....
222 .....
223 .....
224 .....
225 .....
226 .....
227 .....
228 .....
229 .....
230 .....
231 .....
232 .....
233 .....
234 .....
235 .....
236 .....
237 .....
238 .....
239 .....
240 .....
241 .....
242 .....
243 .....
244 .....
245 .....
246 .....
247 .....
248 .....
249 .....
250 .....

```



DOMINIO CARBOXILO

```

10 .....
11 .....
12 .....
13 .....
14 .....
15 .....
16 .....
17 .....
18 .....
19 .....
20 .....
21 .....
22 .....
23 .....
24 .....
25 .....
26 .....
27 .....
28 .....
29 .....
30 .....
31 .....
32 .....
33 .....
34 .....
35 .....
36 .....
37 .....
38 .....
39 .....
40 .....
41 .....
42 .....
43 .....
44 .....
45 .....
46 .....
47 .....
48 .....
49 .....
50 .....
51 .....
52 .....
53 .....
54 .....
55 .....
56 .....
57 .....
58 .....
59 .....
60 .....
61 .....
62 .....
63 .....
64 .....
65 .....
66 .....
67 .....
68 .....
69 .....
70 .....
71 .....
72 .....
73 .....
74 .....
75 .....
76 .....
77 .....
78 .....
79 .....
80 .....
81 .....
82 .....
83 .....
84 .....
85 .....
86 .....
87 .....
88 .....
89 .....
90 .....
91 .....
92 .....
93 .....
94 .....
95 .....
96 .....
97 .....
98 .....
99 .....
100 .....
101 .....
102 .....
103 .....
104 .....
105 .....
106 .....
107 .....
108 .....
109 .....
110 .....
111 .....
112 .....
113 .....
114 .....
115 .....
116 .....
117 .....
118 .....
119 .....
120 .....
121 .....
122 .....
123 .....
124 .....
125 .....
126 .....
127 .....
128 .....
129 .....
130 .....
131 .....
132 .....
133 .....
134 .....
135 .....
136 .....
137 .....
138 .....
139 .....
140 .....
141 .....
142 .....
143 .....
144 .....
145 .....
146 .....
147 .....
148 .....
149 .....
150 .....
151 .....
152 .....
153 .....
154 .....
155 .....
156 .....
157 .....
158 .....
159 .....
160 .....
161 .....
162 .....
163 .....
164 .....
165 .....
166 .....
167 .....
168 .....
169 .....
170 .....
171 .....
172 .....
173 .....
174 .....
175 .....
176 .....
177 .....
178 .....
179 .....
180 .....
181 .....
182 .....
183 .....
184 .....
185 .....
186 .....
187 .....
188 .....
189 .....
190 .....
191 .....
192 .....
193 .....
194 .....
195 .....
196 .....
197 .....
198 .....
199 .....
200 .....
201 .....
202 .....
203 .....
204 .....
205 .....
206 .....
207 .....
208 .....
209 .....
210 .....
211 .....
212 .....
213 .....
214 .....
215 .....
216 .....
217 .....
218 .....
219 .....
220 .....
221 .....
222 .....
223 .....
224 .....
225 .....
226 .....
227 .....
228 .....
229 .....
230 .....
231 .....
232 .....
233 .....
234 .....
235 .....
236 .....
237 .....
238 .....
239 .....
240 .....
241 .....
242 .....
243 .....
244 .....
245 .....
246 .....
247 .....
248 .....
249 .....
250 .....

```

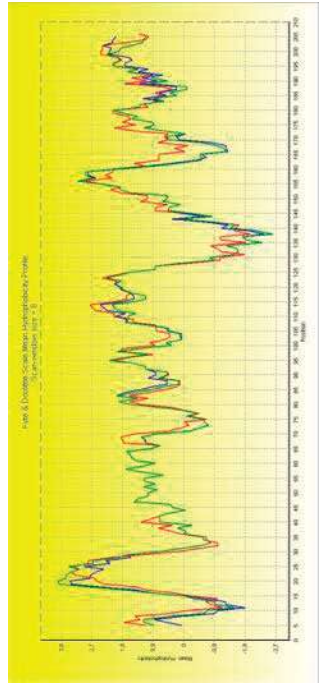


Fig. 19. Análisis de los posibles STM de los dominios amino y carboxilo de las proteínas LCHR6. **A.** Análisis de los posibles STM del dominio amino. **B.** Análisis de los posibles STM de los dominios carboxilo. Se seleccionaron cinco proteínas LCHR6 para el análisis y se separaron en dominios amino y carboxilo. Las secuencias por separado fueron ingresadas en el programa TopPred que dio la posible distribución de los STM. Se cuantificaron los residuos con carga positiva (K y R) de las asas para determinar la posible orientación en la membrana. Con el programa BioEdit se alinearon los perfiles hidropáticos de cada dominio y luego se alinearon y se cortaron los gaps al inicio del alineamiento para uniformizar los perfiles. Al inicio de la secuencia se indica el dominio (Carboxilo, C; Amino, A) nombre abreviado del organismo, el número de acceso del gen y el tamaño de la proteína que codifica. Sombreados con amarillo se indican los aminoácidos que forman parte de un posible STM y en color rosa los aminoácidos con carga positiva que forman parte de las asas. En las gráficas se muestran los perfiles hidropáticos de las secuencias sobrepuestas para compararlas.

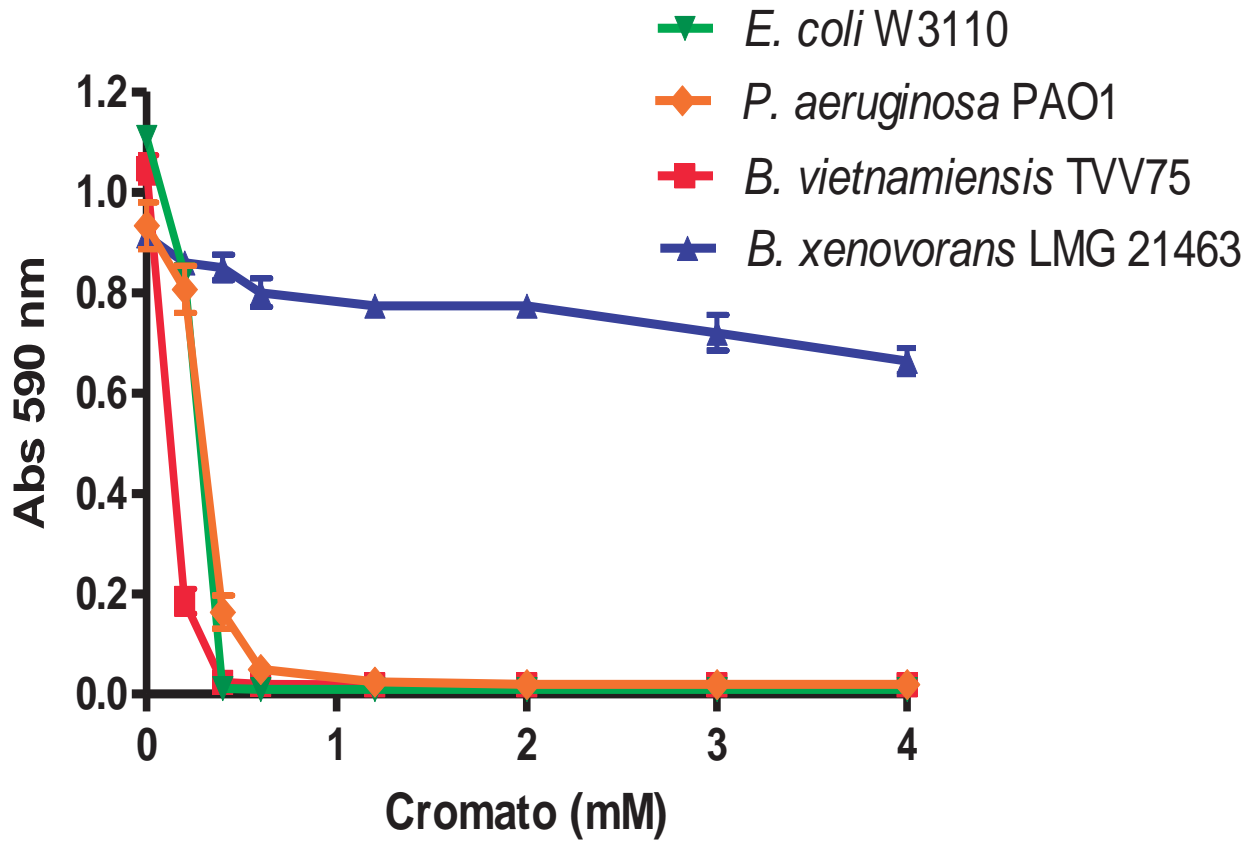


Fig.20. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *Burkholderia* utilizadas. Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 30°C y agitación de 250 rpm y después de ese tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. A la derecha se indican las cepas utilizadas, se incluye a *E. coli* W3110 y *P. aeruginosa* PAO1 como cepas de referencia. Se muestra el resultado de un ensayo por triplicado, representativo de tres ensayos más con resultados similares.

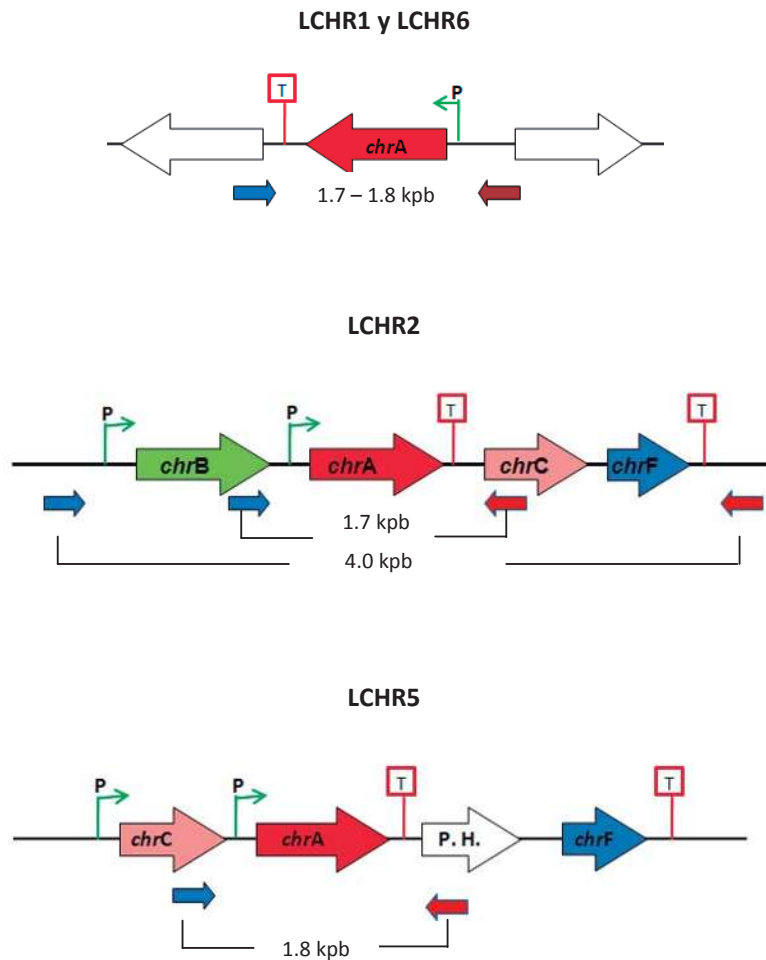


Fig.21. Diagrama de la estrategia empleada para la amplificación los genes *lchr*. Las flechas que representan los genes indican el sentido de la transcripción. Con flechas verdes se indican los promotores y su orientación y en recuadros rojos la posible localización de los terminadores. Con flechas azules pequeñas se indica la posición del oligo directo y con flechas pequeñas rojas la del oligo reverso. Debajo se indica el tamaño del fragmento (en kilobases) que se amplifica utilizando cada pareja de oligos.

4. Amplificación de los genes *lchr*

Para clonar los genes *chr* y poder estudiar su función, fue necesario tener un gran número de copias de cada uno. Esto se logró amplificándolos por PCR, utilizando los oligonucleótidos que se habían diseñado anteriormente. Debido a que el contenido de G + C de las regiones a amplificar es mayor al 63%, fue necesario en todos los casos adicionar DMSO, que facilita el rompimiento de los puentes de hidrógeno y facilita la separación de las hebras de DNA. En todos los casos, después del PCR se obtuvo una banda única del tamaño esperado para cada gen: de 1700 pb para el gen *lchr1*; de 1650 pb para el gen *lchr2*; de 1800 pb para los genes *lchr5* y *lchr6*, y de 4000 pb para el conjunto de genes *chrFCA2B* (Figs. 22-24).

5. Clonación en el vector pGEM-T

Posterior a la amplificación por PCR, los fragmentos con los genes *lchr1* y *lchr6* se clonaron en el vector pGEM-T. Con los plásmidos recombinantes pGTBxe_*lchr1* y pGTBxe_*lchr6* resultantes, se transformaron células competentes de *E. coli* JM101. Luego se aisló el DNA plasmídico y se cortó con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI* (plásmido pGTBxe_*lchr1*) y con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* (plásmido pGTBxe_*lchr6*). Los productos de restricción en cada caso fueron dos bandas, una que coincidía con el tamaño del vector (3.0 kb) y otra con el tamaño del inserto de 1.7 y 1.8 kb, respectivamente. En la **figura 25** se muestra la clonación del gen *lchr1* como ejemplo. Se realizó el mismo procedimiento para el gen *lchr6* (datos no mostrados).

6. Clonación en el vector pJET 1.2

El gen *lchr5* y el conjunto de genes *chrFCA2B* se clonaron en el vector pJET 1.2, que es similar al pGEM-T. Se purificaron los plásmidos recombinantes y se transformaron por

electroporación células competentes de *E. coli* TOP-10, posteriormente se caracterizaron los insertos con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*. Para el plásmido pJBvi_*lchr5* se obtuvo una banda aproximada del tamaño del vector de 2.8 kb y una banda de 1.8 kb, correspondiente al inserto; para el plásmido pJBxe_*chrFCA2B* se obtuvieron bandas de 2.8 y 4.0 kb correspondientes al vector y al inserto, respectivamente. En la **figura 26** se muestra la clonación del gen *lchr5*. El conjunto de genes *chrFCA2B* se clonó de la misma forma (resultados no mostrados).

7. Subclonación en el vector pUCP20

La función de otros genes *chr* ha sido demostrada en *E. coli* o en *P. aeruginosa*, el vector pUCP20 es un vector binario que se replica en estos dos organismos por lo que para estudiar la función de los genes *lchr* en ambos organismos se decidió subclonarlos en este vector. Para subclonar los genes *lchr1*, *lchr5* y el conjunto de genes *chrFCA2B* se cortaron con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI* tanto los plásmidos recombinantes pGTBxe_*lchr1*, pJBvi_*lchr5* y pJBxe_*chrFCA2B* como pUCP20, los productos de restricción se ligaron para dar lugar a los plásmidos recombinantes pUCBxe_*lchr1*, pUCBvi_*lchr5* y pUCBxe_*FCA2B*, respectivamente. El gen *lchr2* se clonó directamente en pUCP20, para lo cual luego de la amplificación por PCR se purificó y se cortó con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, con las mismas enzimas se cortó pUCP20 y los productos de restricción se sometieron a ligación para dar lugar al plásmido pUCBxe_*lchr2*. Para la clonación de la pareja de genes A2B, se cortó el plásmido pUCBvi_LCHR5 con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* y se purificó la banda de 7 kpb y posteriormente se religó, para obtener el plásmido pUCBxe_A2B.

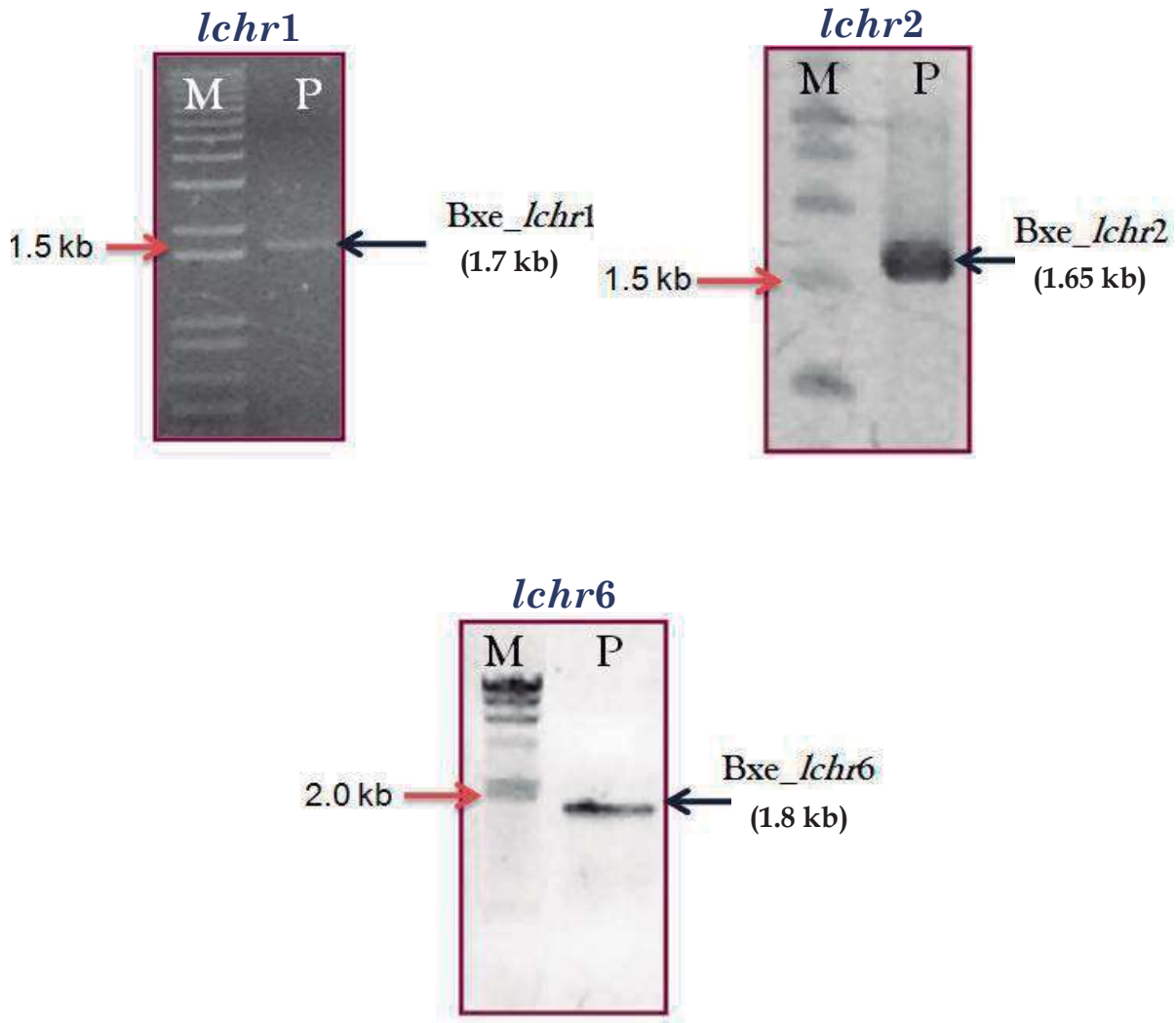


Fig.22. Amplificación por PCR de los genes *lchr1*, *lchr2* y *lchr6* de *B. xenovorans*. Fotografías de los geles de agarosa donde se separaron los productos de PCR. M, el marcador de tamaño molecular (1 kb o λ -HindIII). P, producto de PCR. A la izquierda se indica el tamaño de banda del marcador utilizada como referencia y a la derecha se indica el nombre y el tamaño esperado del gen amplificado.

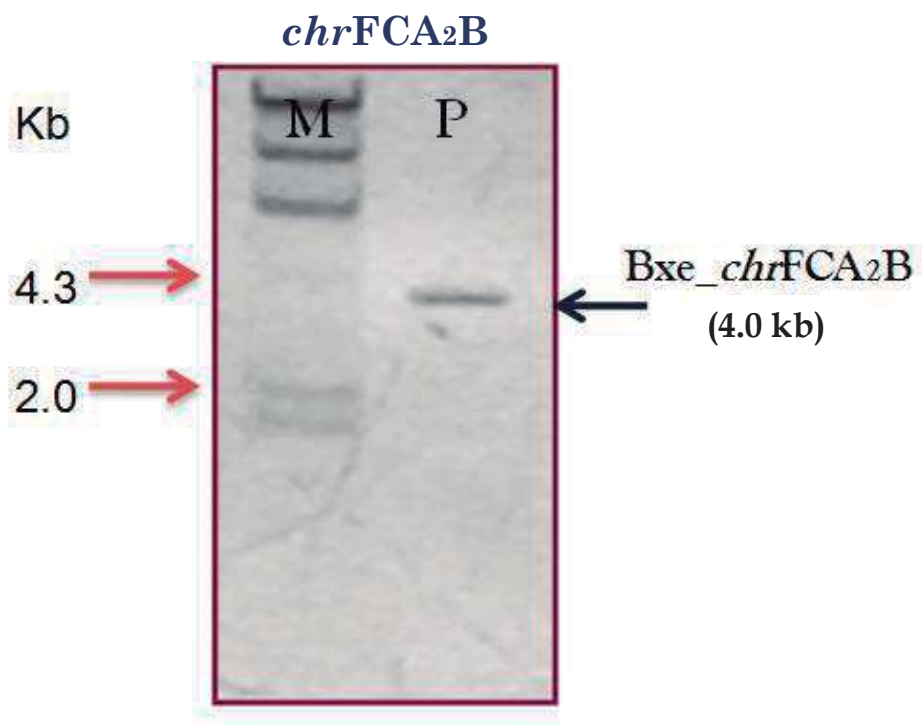


Fig. 23. Amplificación por PCR del conjunto de genes *chrFCA₂B* de *B. xenovorans*. Fotografía del gel de agarosa donde se separó el producto de amplificación. M, marcador de tamaño molecular (λ -*Hind*III); P, producto de PCR. A la izquierda se indican las bandas del marcador utilizadas como referencia y a la derecha se indica el producto de amplificación y su tamaño.

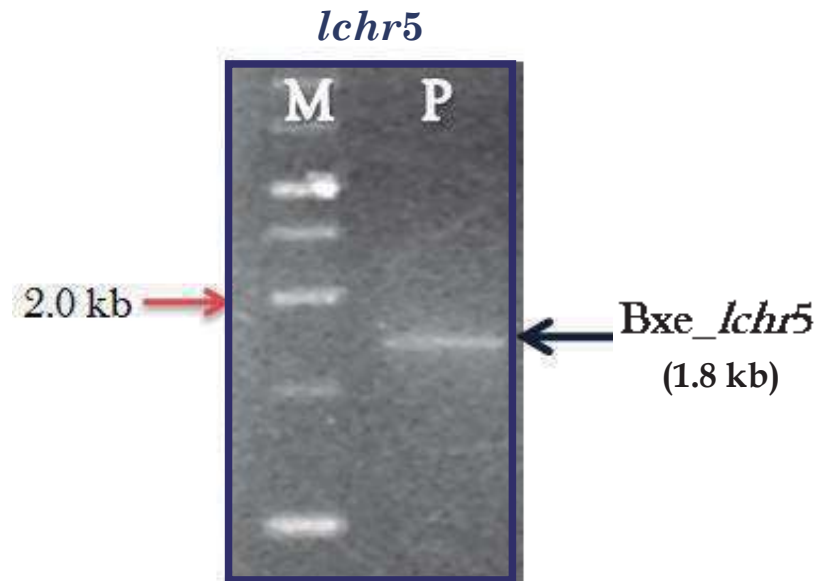


Fig.24. Amplificación por PCR del gen *lchr5 B. vietnamiensis*. Fotografía del gel de agarosa donde se corrió el producto de amplificación. M, marcador de tamaño molecular (1 kb); P, producto de PCR. A la izquierda se indica la banda del marcador utilizada como referencia y a la derecha se indica el nombre del gen y el tamaño esperado.

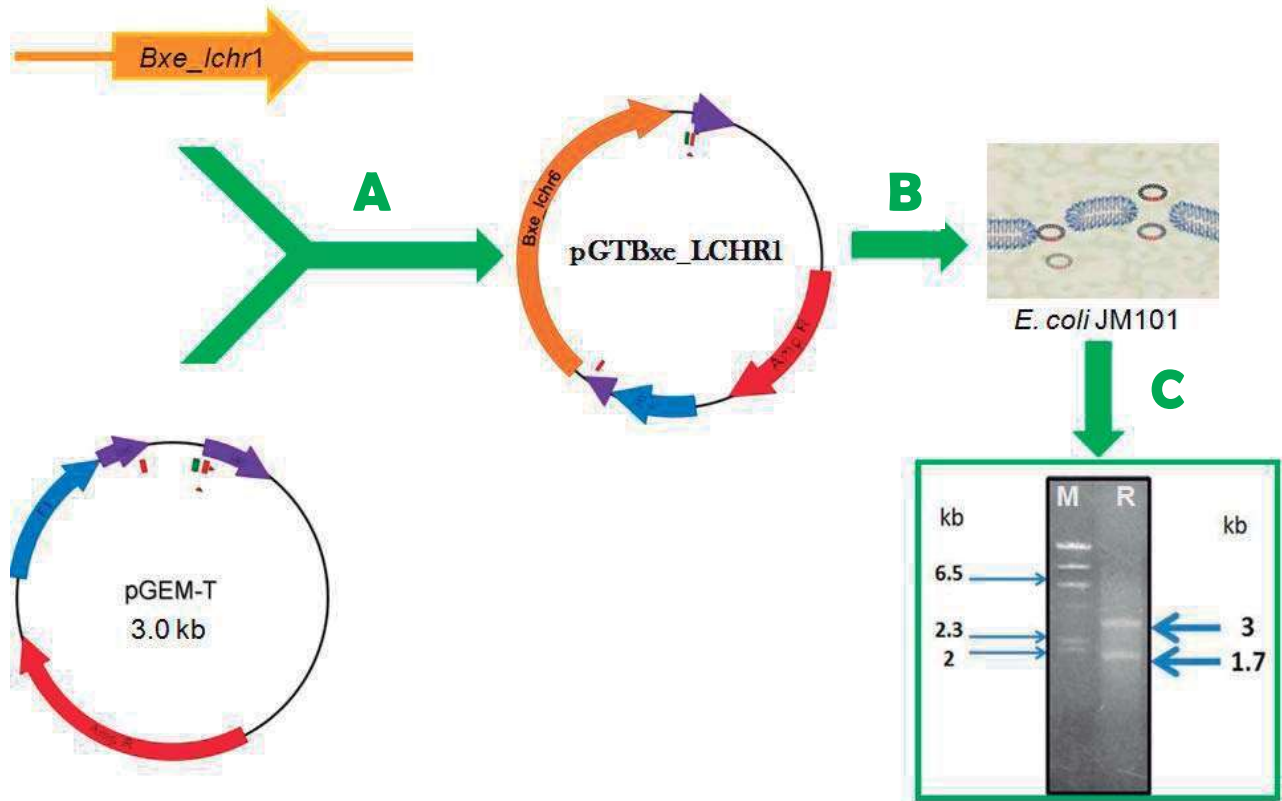


Fig.25. Clonación del gen *lchr1* de *B. xenovorans* en el vector pGEM-T. A. Clonación en el vector pGEM-T B. Transformación en *E. coli* JM101. C. Caracterización del plásmido. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan dos bandas de los tamaños esperados, una correspondiente al tamaño del vector (3.0 kb) y una del tamaño del inserto (1.7 kb). M, marcador de tamaño molecular (λ -HindIII); R, producto de restricción. Los detalles se dan en el texto.

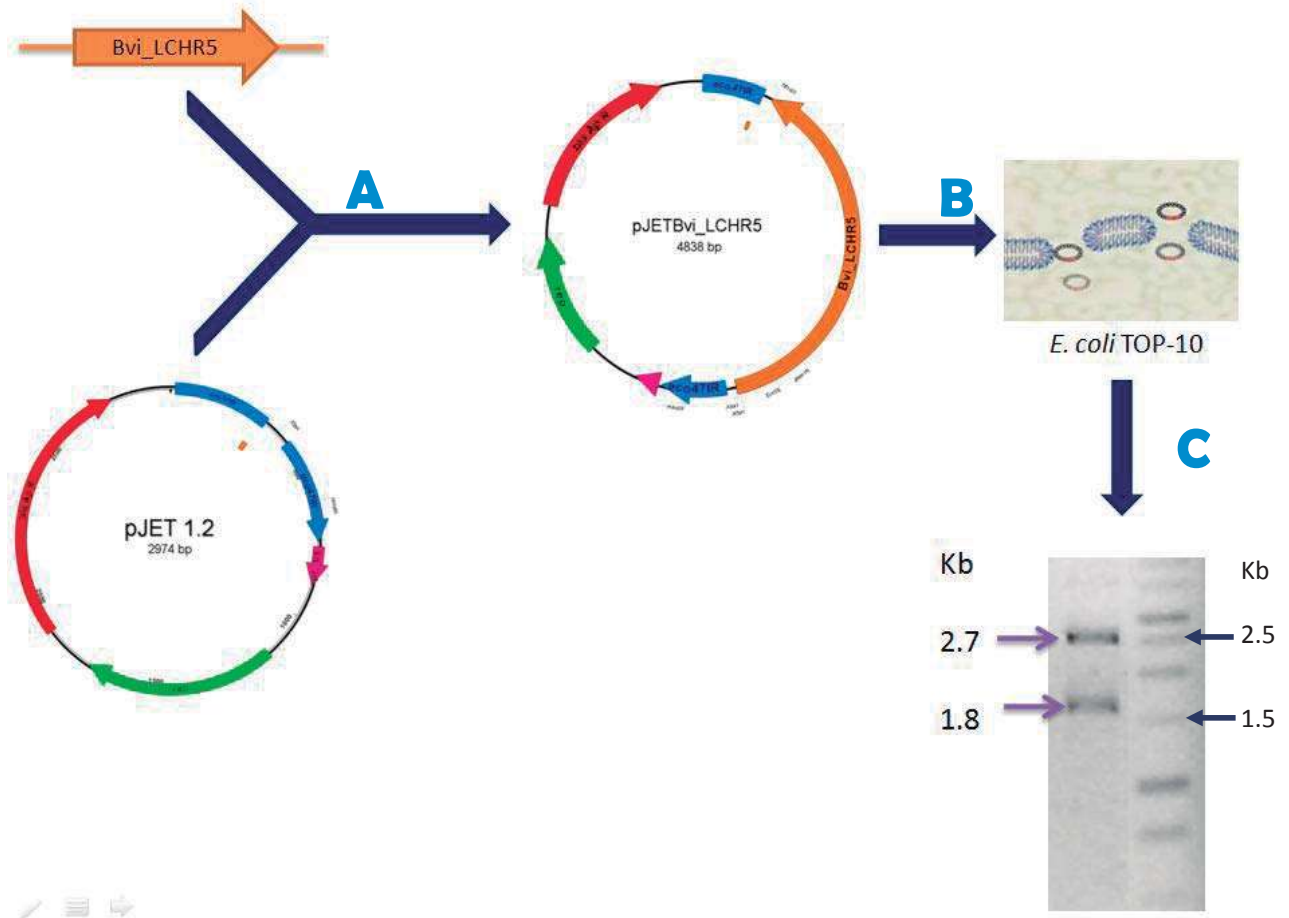


Fig.26. Clonación del gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* en el vector pJET 1.2. A. Clonación en el vector pJET 1.2. B. Transformación en *E. coli* TOP-10. C. Caracterización del plásmido. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan dos bandas de los tamaños esperados, una correspondiente al tamaño aproximado del vector (3.0 kb) y una del tamaño del inserto (1.8 kb). M, marcador de tamaño molecular (λ -HindIII); R, producto de restricción. Los detalles se dan en el texto.

Con los plásmidos recombinantes se transformaron por electroporación células competentes de *P. aeruginosa* PAO1 o de *E. coli* JM101, y el DNA plasmídico de las transformantes se caracterizó con enzimas de restricción y se obtuvieron en todos los casos dos bandas cuyo tamaño correspondió al tamaño del vector, de 3.9 kb y de cada inserto. En la **figura 27** se muestra la clonación del gen *lchr6*. Con los demás genes se siguió el mismo procedimiento (resultados no mostrados).

8. Subclonación en el vector pACYC184

La expresión de proteínas de membrana, como las proteínas LCHR, a partir de un vector de alto número de copias como pUCP20 puede resultar tóxica para la célula, o simplemente puede resultar costoso para las bacterias mantener un plásmido con muchas copias y esto causar un retraso en el crecimiento. Para tratar de excluir estas variables, se clonaron los genes *lchr* también en el vector para *E. coli* de bajo número de copias pACYC184. Para clonar los genes *lchr1*, *lchr5* y el conjunto de genes *chrFCA2B* en este vector, se cortaron con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI* los plásmidos recombinantes pGTBxe_*lchr1*, pJBvi_*lchr5* y pJBxe_*chrFCA2B* para liberar los genes y el vector pACYC 184, luego se ligaron los productos de restricción y se obtuvieron los plásmidos pACBxe_*lchr1*, pACBvi_*lchr5* y pACBxe_*chrFCA2B*, respectivamente. Para clonar el gen *lchr2*, se cortó con la enzima *NcoI* el plásmido pJBxe_*chrFCA2B* y el vector pACYC184 y luego se ligaron los productos de restricción, obteniéndose el plásmido pACBxe_*lchr2*. Para clonar el gen *lchr6*, se cortó con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* tanto el plásmido pGTBxe_*lchr6* como pUCP20, los productos de restricción se ligaron y se obtuvo el plásmido pACBxe_*lchr6*. Con los plásmidos pAC resultantes se transformaron por electroporación células competentes de *E. coli* W3110 y se caracterizaron los plásmidos con las enzimas de restricción correspondientes. En todos

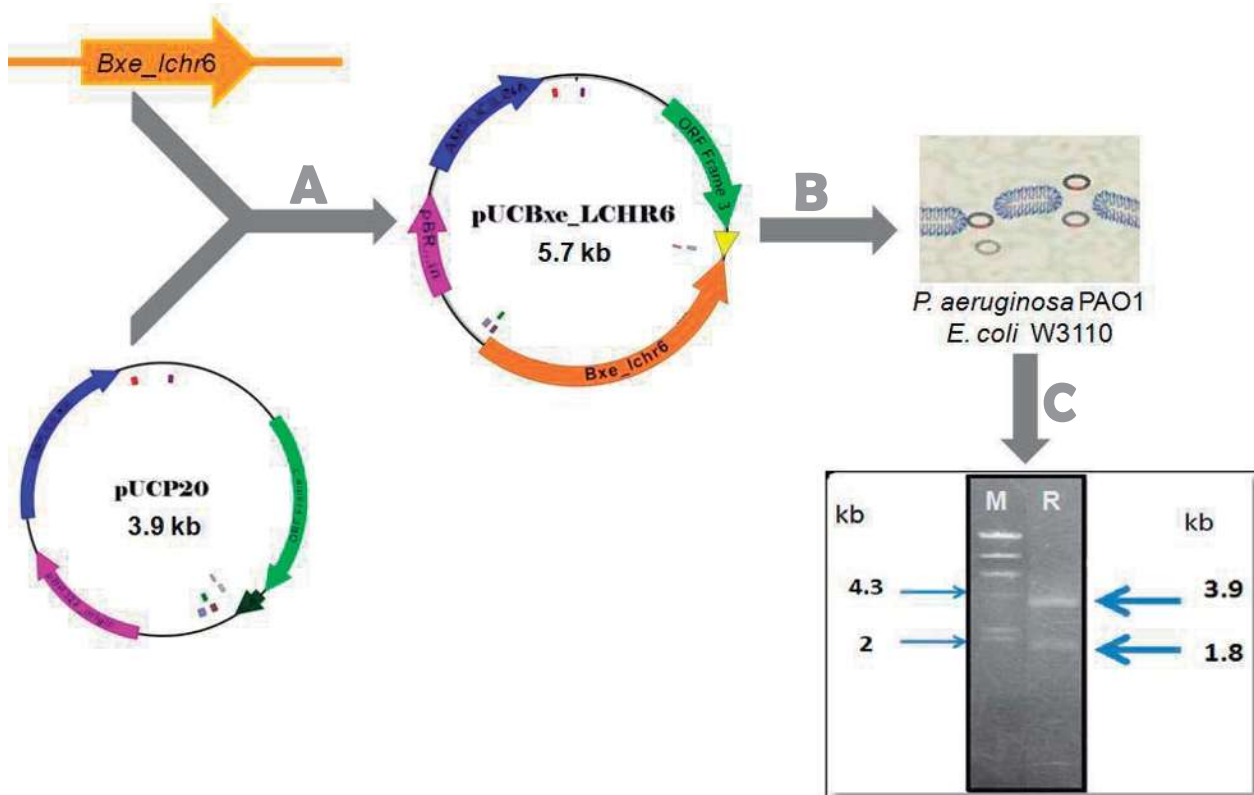


Fig.27. Subclonación del gen *lchr6* de *B. xenovorans* en el vector pUCP20. A. Clonación en pUCP20. B. Transformación en *P. aeruginosa* PAO1 o *E. coli* W3110. C. Caracterización del plásmido. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan dos bandas de los tamaños esperados, una correspondiente al tamaño del vector (3.9 kb) y una del tamaño del inserto (1.8 kb). M, marcador de tamaño molecular (λ -HindIII); R, producto de restricción. Los detalles se dan en el texto.

los casos se obtuvo una banda del tamaño del vector (4.2 kb) y del tamaño de cada inserto. En la **figura 28** se muestra la clonación del gen *lchr1*. Se hizo lo mismo con los demás genes (resultados no mostrados).

9. Pruebas de susceptibilidad a cromato

A. Cepas con los genes *lchr* de *Burkholderia xenovorans*

1. Genes en *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Burkholderia* es un grupo fenotípicamente muy parecido al género *Pseudomonas* y ambos son relativamente cercanos taxonómicamente. Los genes *lchr* provenientes de *B. xenovorans* fueron clonados como se indicó antes y en un inicio expresados en *P. aeruginosa* para estudiar su función. A las cepas transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *lchr1*, *lchr2*, *lchr6* y el conjunto de genes *chrFCA2B* clonados en el vector pUCP20 se les realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato. Las primeras pruebas se realizaron en caldo nutritivo (CN) y se observó que sólo el gen *lchr2* y el conjunto de genes *chrFCA2B* confirieron resistencia a cromato mientras que con los genes *lchr1* y *lchr6* no se observó diferencia con el control sensible (*P. aeruginosa* PAO1 transformada solamente con pUCP20) (**Fig. 29 A**).

El conjunto de genes *chrFCA2B*, contrario a lo que esperaba, confirió un nivel de resistencia a cromato menor que el gen *lchr2* solo. Este conjunto de genes, como se mencionó anteriormente, codifica una proteína homóloga a ChrF, que se ha descrito como un posible regulador transcripcional con efecto sobre ChrB, otro regulador transcripcional (Juhnke y col., 2002) y se le atribuye también actividad de superóxido dismutasa (Branco y col., 2008). Para tratar de dilucidar el papel de este gen y de ChrC

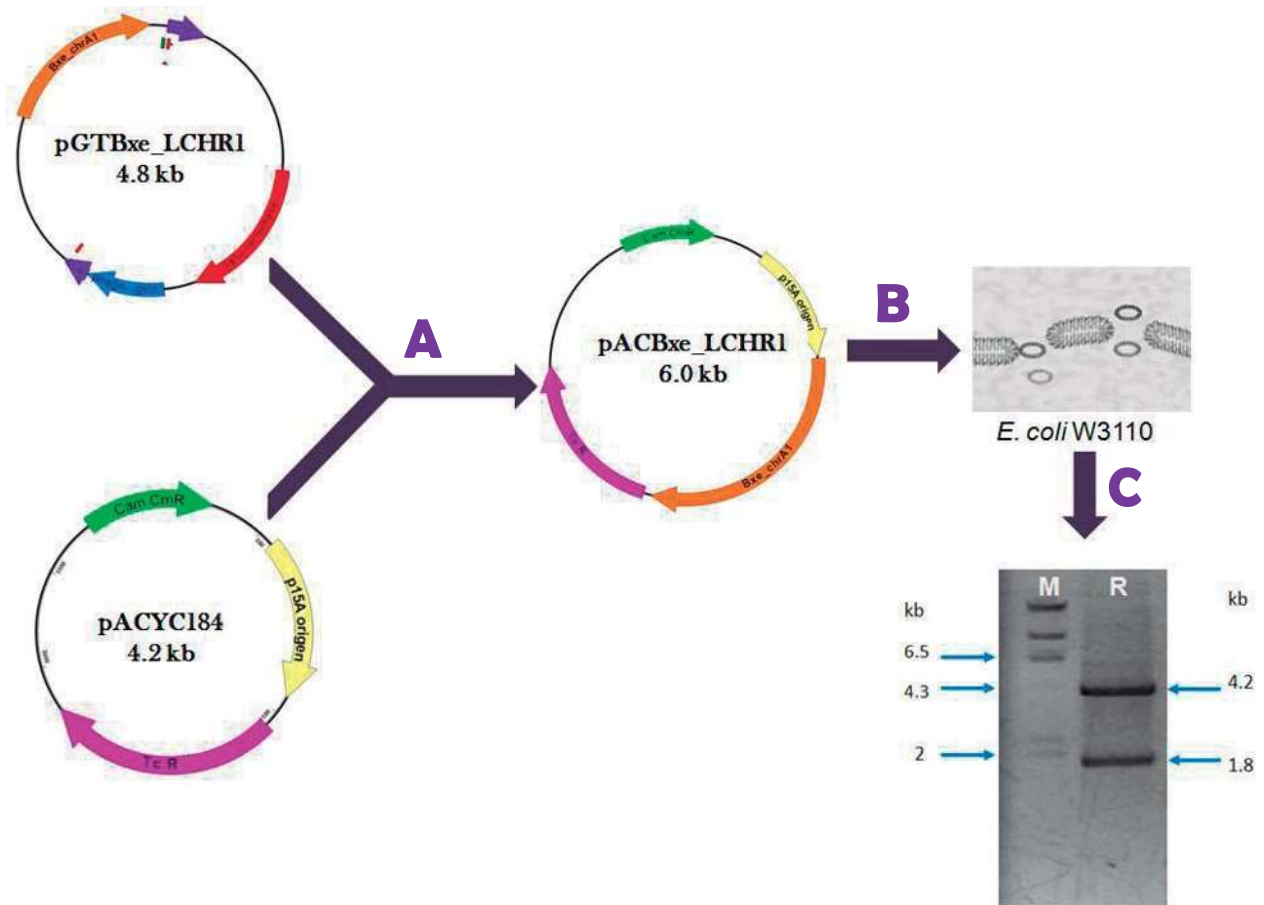


Fig.28. Subclonación del gen *lchr1* de *B. xenovorans* en el vector pACYC184. A. Clonación en pACYC184. B. Transformación de *E. coli* W3110. C. Caracterización del plásmido. Se muestra la fotografía del gel de agarosa donde se observan dos bandas de los tamaños esperados, una correspondiente al tamaño del vector (4.2 kb) y una del tamaño del inserto (1.7 kb). M, marcador de tamaño molecular (λ -HindIII); R, producto de restricción. Los detalles se dan en el texto.

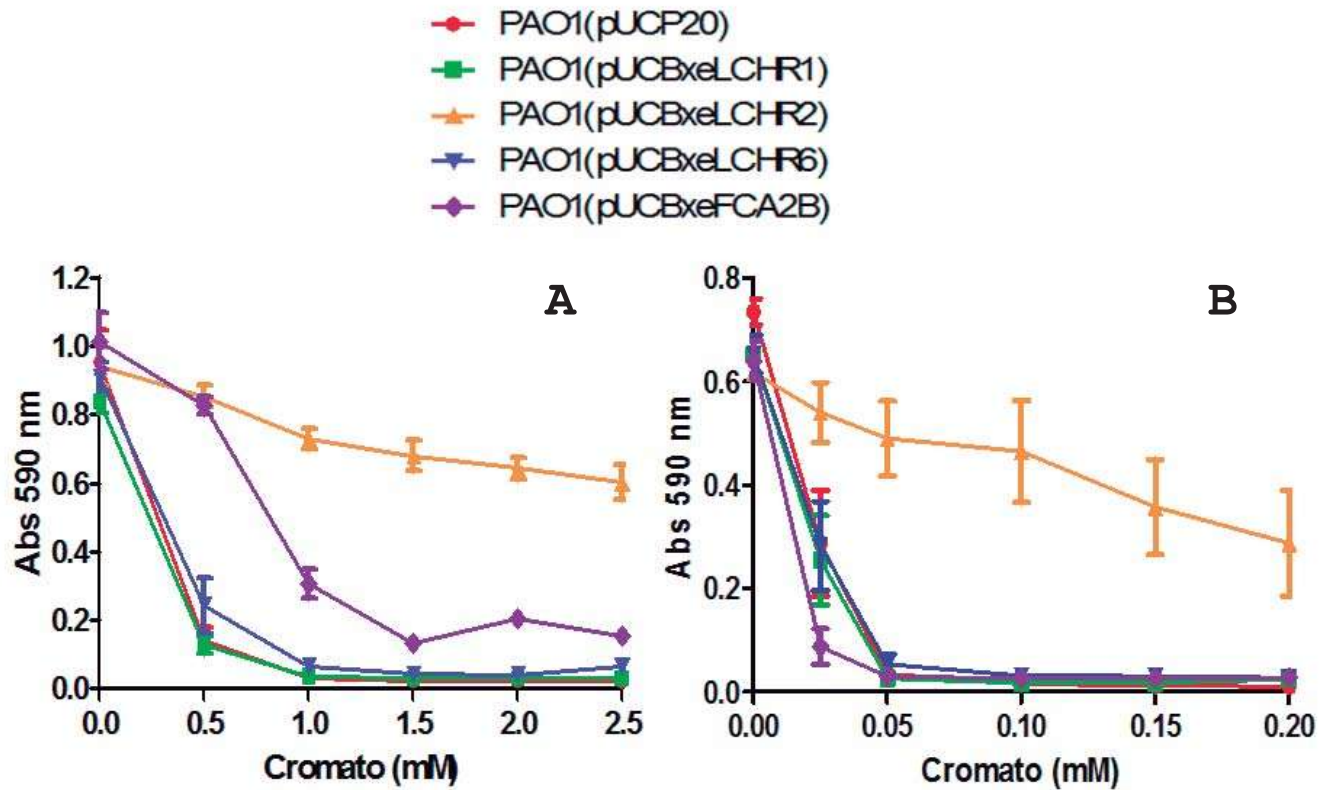


Fig. 29. Susceptibilidad a cromato de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con los genes que codifican a las proteínas LCHR de *B. xenovorans* en el vector pUCP20. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h (A) y en medio mínimo por 20 h (B) a 37°C y con agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. PAO1(pUCP20) es el control sensible. Se muestra el resultado de dos ensayos por duplicado, tanto en CN como en medio mínimo.

en el fenotipo observado en *P. aeruginosa* se hicieron pruebas de susceptibilidad comparando el efecto de expresar solamente el gen *lchr2*, el gen *lchr2* con el gen *chrB* o el conjunto de genes *chrFCA2B* en un intervalo menor de concentraciones de cromato. En estos ensayos se observó que a concentraciones de 0 a 0.8 mM de cromato el conjunto de genes *chrFCA2B* confiere un nivel de resistencia a similar al del gen *lchr2* clonado de manera individual, y la pareja de genes *chrA2B* también es capaz de conferir resistencia a cromato, pero en un nivel menor que cuando el gen *lchr2* está solo o cuando todos los genes están en conjunto (**Fig. 30**).

A continuación se realizaron pruebas de susceptibilidad en medio mínimo M9. Este medio, al ser mineral por su composición, proporciona condiciones fisiológicas completamente diferentes al medio rico (CN) y puede estimular la expresión de genes que en otras condiciones no se expresarían. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad en M9 mostraron que en estas condiciones sólo el gen *lchr2* confiere resistencia a cromato al igual que en las pruebas en CN (**Fig. 29 B**). Las cepas con los genes *lchr1* y *lchr6* nuevamente no mostraron diferencia con el control. En el medio M9 la cepa transformada con los genes *chrFCA2B* resultó ser incluso más sensible que el control; cuando se realizaron pruebas en un intervalo menor de cromato se observó claramente la hipersensibilidad de la cepa de *Pseudomonas* con los genes *chrFCA2B* clonados (**Fig.31**).

2. Genes expresados en *Escherichia coli*

a. Genes en el vector pUCP20

El vector pUCP20 permite la expresión de genes tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*, por lo que se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato también a las cepas

W3110 de *E. coli* transformadas con los mismos plásmidos recombinantes pUCP20 con los que se transformó a *P. aeruginosa*. Cuando los ensayos se realizaron en CN se observó que sólo los genes que codifican a las proteínas LCHR2 y LCHR6 confirieron resistencia a cromato en esta condición, y que la proteína LCHR2 confiere un nivel de resistencia mayor que la proteína LCHR6 (**Fig. 32 A**). Tanto la cepa de *E. coli* transformada con el gen que codifica a la proteína LCHR1 como la cepa transformada con el conjunto de genes *chrFCA2B* mostraron un comportamiento casi idéntico al del control sensible (la cepa W3110 transformada únicamente con el vector pUCP20) (**Fig. 32 A**). De igual manera que como se hizo cuando los genes se expresaron en *Pseudomonas*, se evaluaron diferentes combinaciones del conjunto de genes *chrFCA2B* a concentraciones menores de cromato y se observó que el gen *lchr2* era capaz de conferir resistencia a cromato en *E. coli* en CN solamente cuando está clonado de manera individual, porque tanto las cepas transformadas con el conjunto de genes *chrFCA2B* como con la pareja de genes A2B, presentaron un fenotipo similar al de la cepa control (**Fig. 33 A**).

Cuando las pruebas se realizaron en medio mínimo, sólo el gen *lchr2* y el conjunto de genes *chrFCA2B* confirieron resistencia a cromato, observándose que el primero confirió una resistencia mucho mayor. Las cepas con los genes *lchr1* y *lchr6* presentaron el mismo comportamiento que la cepa control (**Fig. 32 B**). Estos resultados se mantuvieron cuando se probó la resistencia a cromato de las cepas transformadas con diferentes combinaciones de los genes *chrFCA2B* en un intervalo de concentraciones menor. El gen *lchr2* confiere el mayor nivel de resistencia, el conjunto de genes *chrFCA2B* también confirió resistencia y la cepa transformada con la pareja de genes *chrA2B* presenta el mismo comportamiento que el control sensible (**Fig. 33 B**).

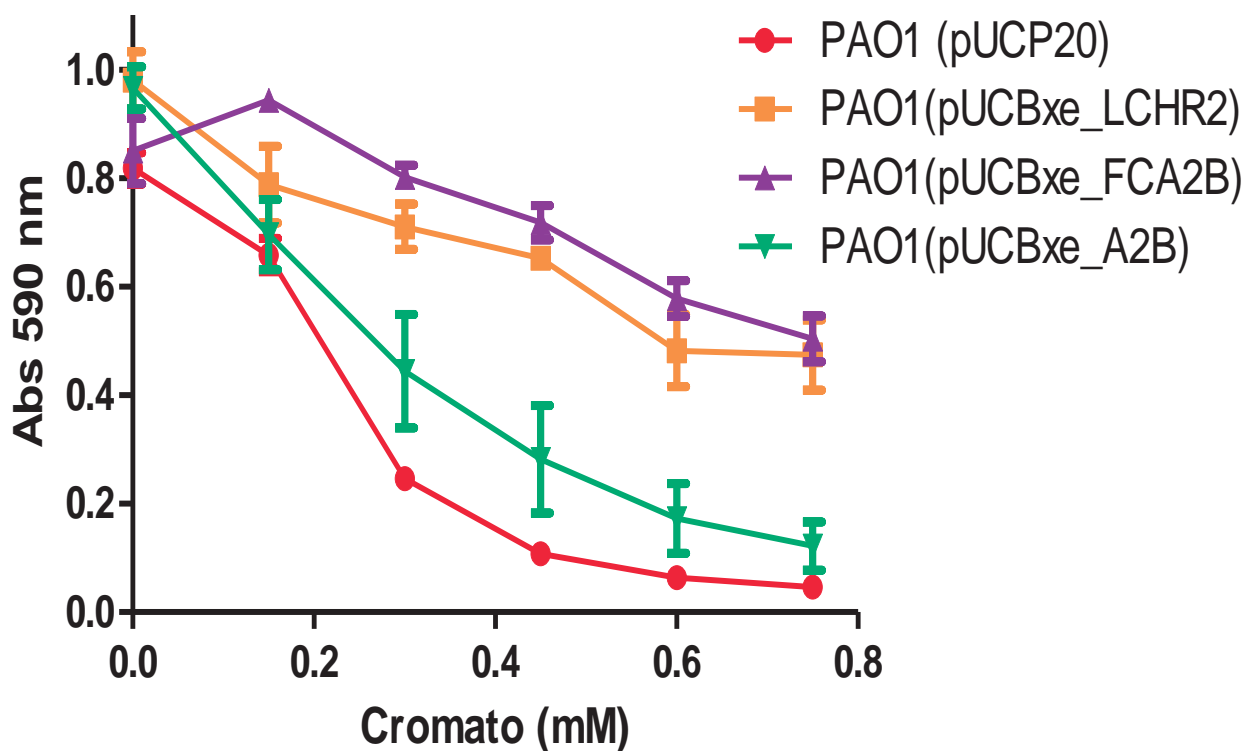


Fig. 30. Susceptibilidad a cromato de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con los genes *chrFCA2B* de *B. xenovorans* en el vector pUCP20. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C y agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbancia a 590 nm. PAO1(pUCP20) es el control sensible. Se muestra el resultado de dos ensayos por duplicado y triplicado.

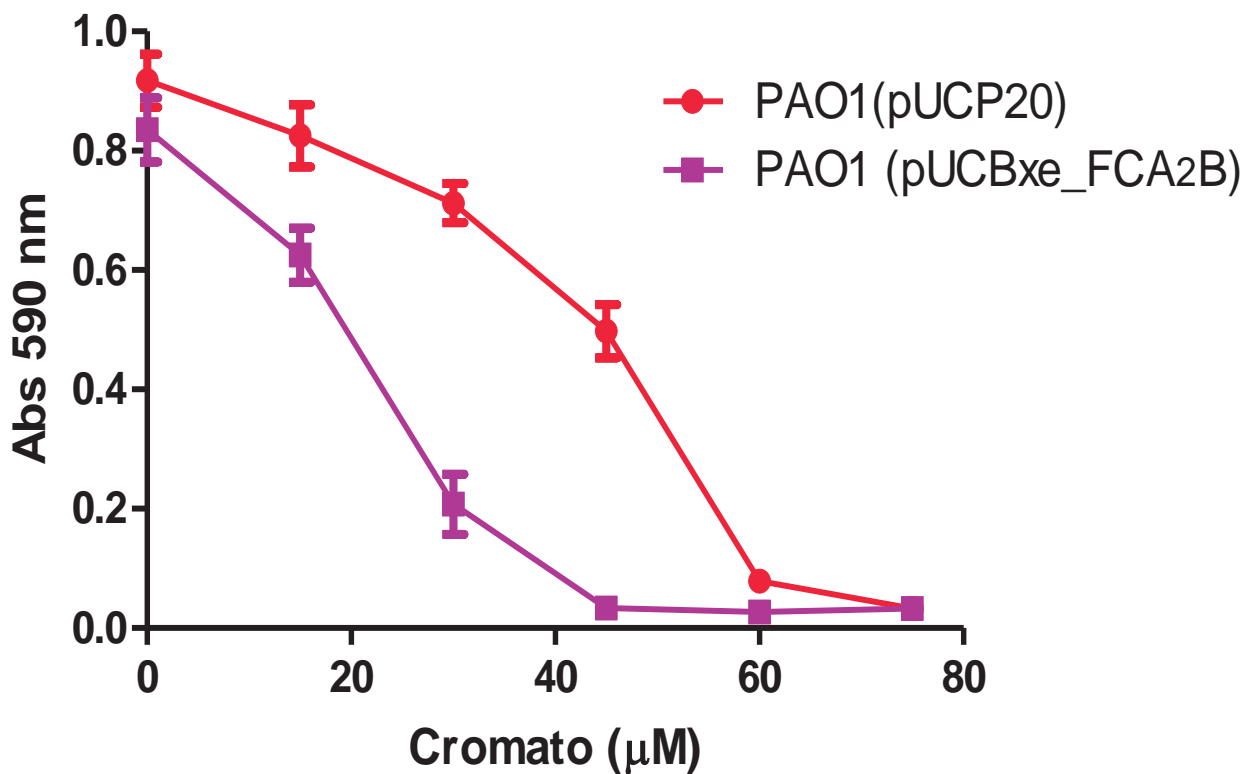


Fig. 31. Susceptibilidad a cromato de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el conjunto de genes *chrFCA2B* de *B. xenovorans* en el vector pUCP20. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 por 20 h a 37°C y agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. PAO1(pUCP20) es el control sensible, PAO1(pUCBxeFCA2B) es la cepa transformada con los genes que codifican a las proteínas ChrF, ChrC, LCHR2 y ChrB. Se muestran los resultados de dos ensayos por duplicado.

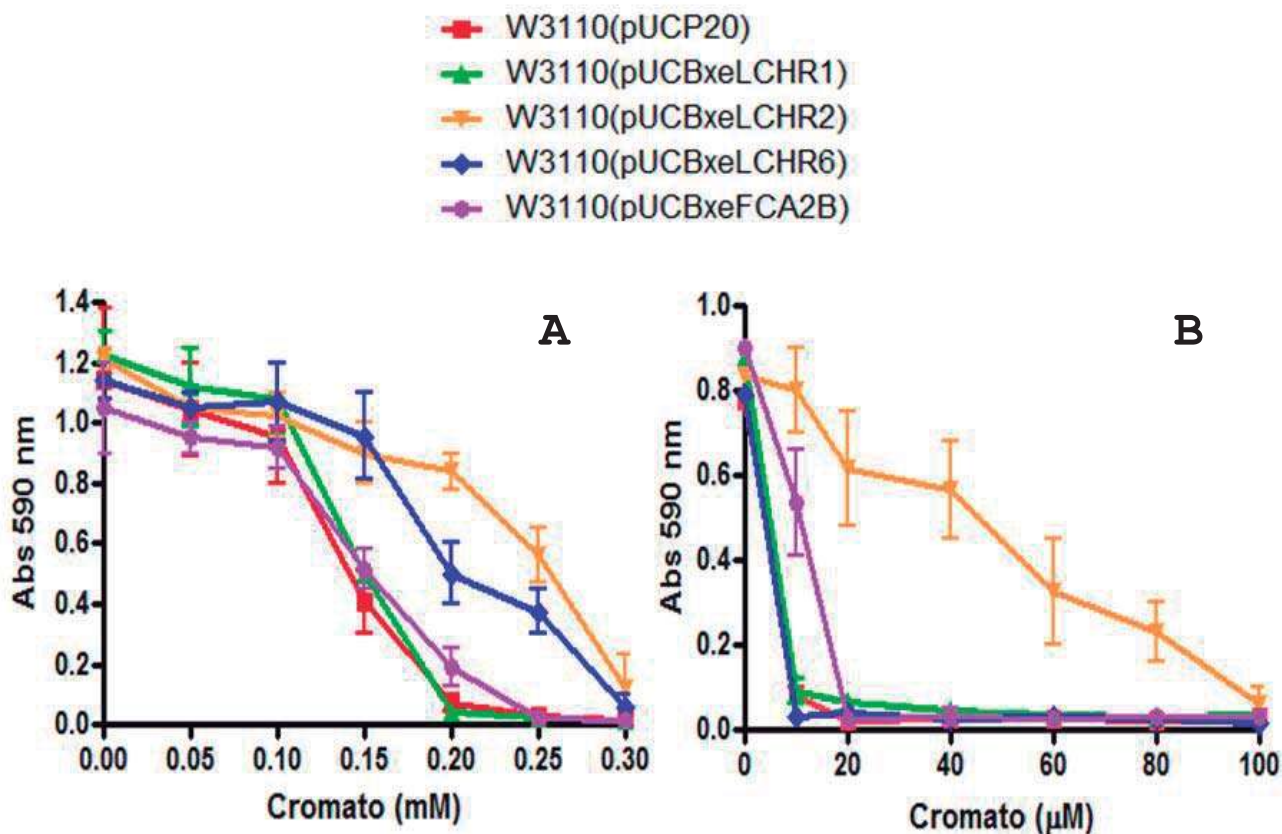


Fig.32. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* W3110 transformada con los genes que codifican a las proteínas de *B. xenovorans* en el vector pUCP20. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h (A) y en medio mínimo por 20 h (B) a 37°C y agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. W3110(pUCP20) es el control sensible. Se muestra el resultado de tres ensayos por duplicado tanto en CN como en medio mínimo.

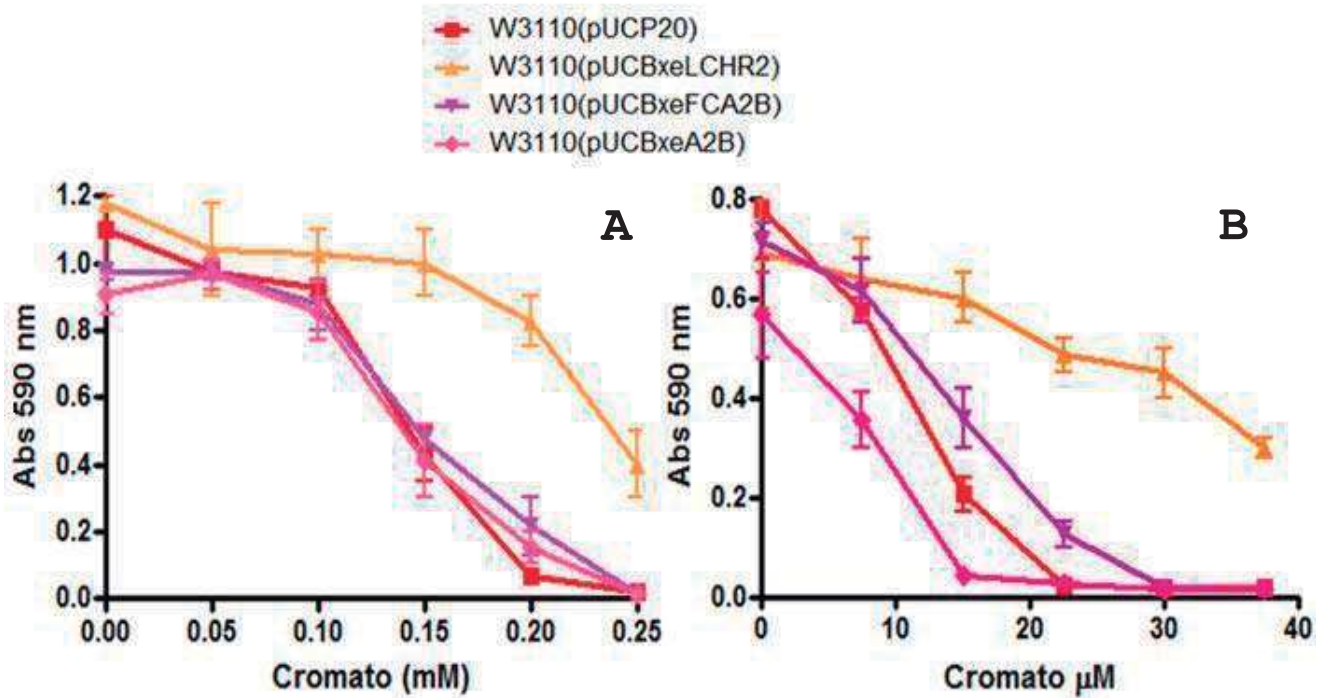


Fig. 33. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* W3110 transformada con los genes *chrFCA2B* de *B. xenovorans* en el vector pUCP20. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h (A) y en medio mínimo M9 por 20 h (B) a 37°C y agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. W3110(pUCP20) es el control sensible. Se muestra el resultado tres ensayos por duplicado en CN y de dos ensayos por duplicado y triplicado en medio mínimo.

b. Genes en el vector pACYC184

Luego de probar la resistencia a cromato de las cepas con los genes *lchr* clonados en el vector pUCP20, se analizaron los genes clonados en el vector de bajo número de copias pACYC184 para ver si hay un efecto del número de copias del vector en el fenotipo de resistencia a cromato, y sobre todo para determinar si en esta condición se podía observar la función conferida por el gen *lchr1*, ya que no se había visto en ningún experimento anterior. En las pruebas en caldo nutritivo se observó que las cepas con los genes *lchr1* y el conjunto de genes *chrFCA2B* clonados presentaron un comportamiento similar al del control sensible, mientras que las cepa con los genes *lchr2* y *lchr6*, que clonados en el vector pUCP20 habían mostrado conferir resistencia a cromato, mostraron ser aún más sensibles que el control (la cepa de *E. coli* W3110 transformada con el vector pACYC184) (**Fig. 34 A**).

Cuando las pruebas de susceptibilidad se realizaron en medio mínimo, pudo observarse claramente que el gen que codifica a la proteína LCHR1 fue el único que confirió resistencia a cromato en estas condiciones. Las cepas con los genes *lchr2*, *lchr6* y el conjunto de genes *chrFCA2B* presentaron un comportamiento idéntico al del control (**Fig. 34 B**).

B. Cepas transformadas con el gen *lchr5* de *Burkholderia vietnamiensis*

En las pruebas de susceptibilidad a cromato realizadas a *B. vietnamiensis* TVV75 se observó un fenotipo de aparente hipersensibilidad inesperado (**Fig. 28**), no obstante el gran número de genes *chr* que presenta esta bacteria. Aún así se eligió estudiar la función del gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* en las mismas condiciones en las que se probaron los genes de *B. xenovorans*.

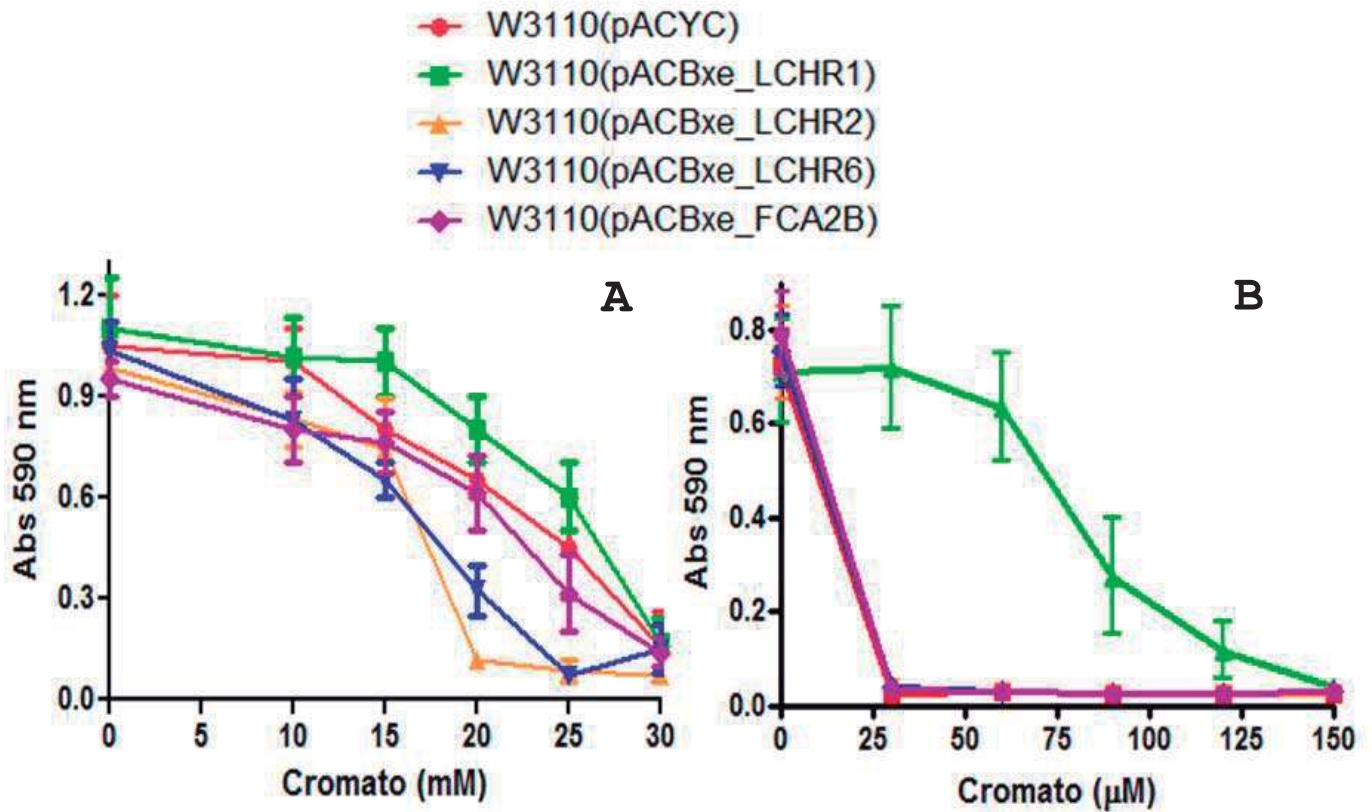


Fig. 34. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* W3110 transformada con los genes que codifican a las proteínas de *B. xenovorans* en el vector pACYC184. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 18 h (A) y en medio mínimo M9 por 20 h (b) a 37°C y agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. W3110(pACYC) es el control sensible. Se muestra el resultado de tres ensayos por duplicado tanto en CN como en medio mínimo.

1. Gen *lchr5* en *Pseudomonas aeruginosa*

La función del gen *lchr5* se analizó primero clonado en el vector pUCP20 y expresado en *P. aeruginosa* PAO1. Las pruebas de susceptibilidad realizadas en CN mostraron que en estas condiciones, el gen *lchr5* no confería resistencia a cromato e incluso se observó que la cepa transformada con el este gen era ligeramente más sensible a cromato que el control (**Fig. 35 A**). Este resultado se repitió cuando las pruebas de susceptibilidad se realizaron en medio mínimo (**Fig. 35 B**).

2. Gen *lchr5* en *Escherichia coli*

a. En el vector pUCP20

A continuación se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato a la cepa de *E. coli* W3110 transformada con el mismo plásmido recombinante con el que se transformó la cepa de *Pseudomonas*. Cuando las prueba se realizaron en CN se observó que la cepa transformada con el gen que codifica la proteína LCHR5 de *B. vietnamiensis* presentó casi el mismo comportamiento que la cepa control (**Fig. 36 A**). En medio mínimo se obtuvo el mismo resultado (**Fig. 36 B**).

b. En el vector pACYC184

Se realizaron a continuación pruebas de susceptibilidad a cromato con la cepa de *E. coli* W3110 transformada con el gen *lchr5* pero esta vez clonado en el vector de bajo número de copias pACYC184. Cuando las pruebas se realizaron en CN, la cepa con el gen *lchr5* no presentó un fenotipo de resistencia, se comportó igual a la cepa control (**Fig. 37 A**). Sin embargo, cuando las pruebas se realizaron en medio mínimo, la cepa transformada con el gen que codifica a la proteína LCHR5 de *B. vietnamiensis* fue más resistente a cromato que la cepa control. Este gen, igual que el gen *lchr1* de *B.*

xenovorans sólo confirió resistencia a *E. coli* cuando se clonó en el vector pACYC y las pruebas se realizaron en medio mínimo (Fig. 37 B).

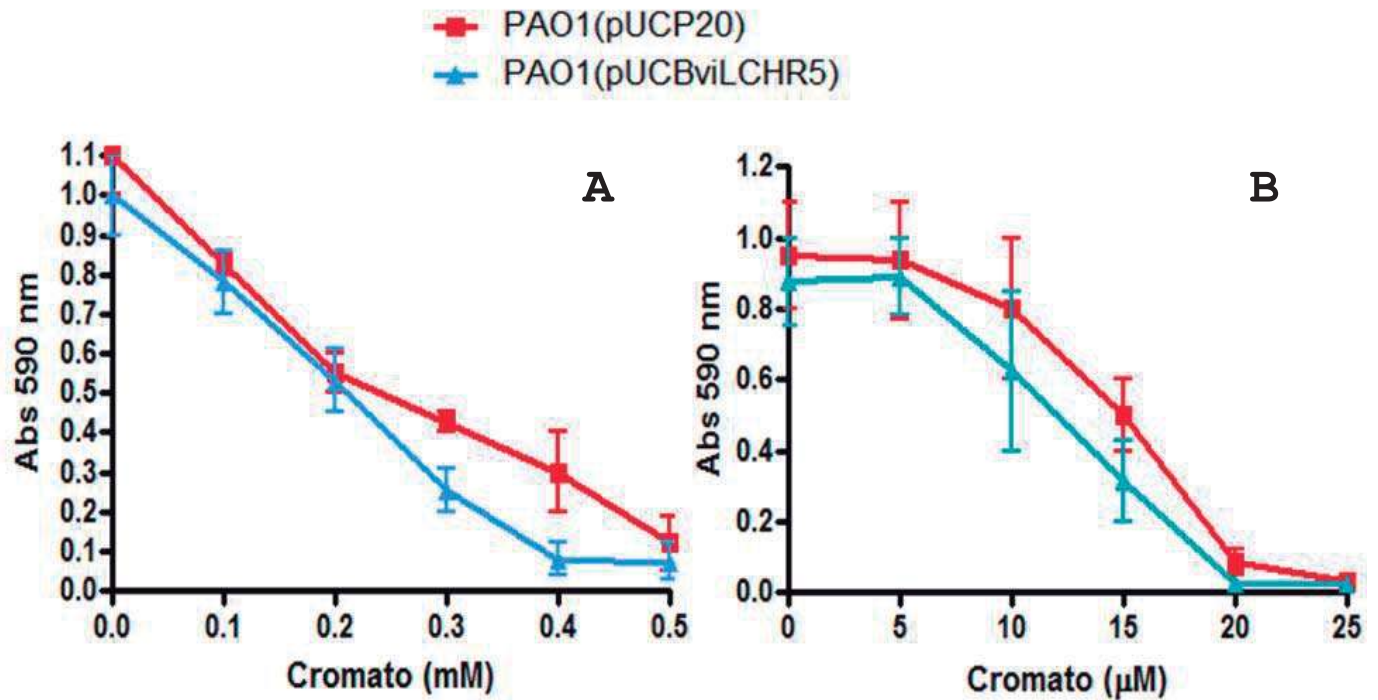


Fig. 35. Pruebas de susceptibilidad a cromato de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* en el vector pUCP20. Las curvas se realizaron creciendo los cultivos en CN 18 h (A) y en medio mínimo 20 h (B) a 37°C con agitación constante, luego de ese tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. PAO1(pUCP20) es la cepa control y PAO1(pUCBvi_LCHR5) es la cepa transformada con el gen que codifica la proteína LCHR5. Se muestran los resultados de dos ensayos por duplicado en CN y en medio mínimo.

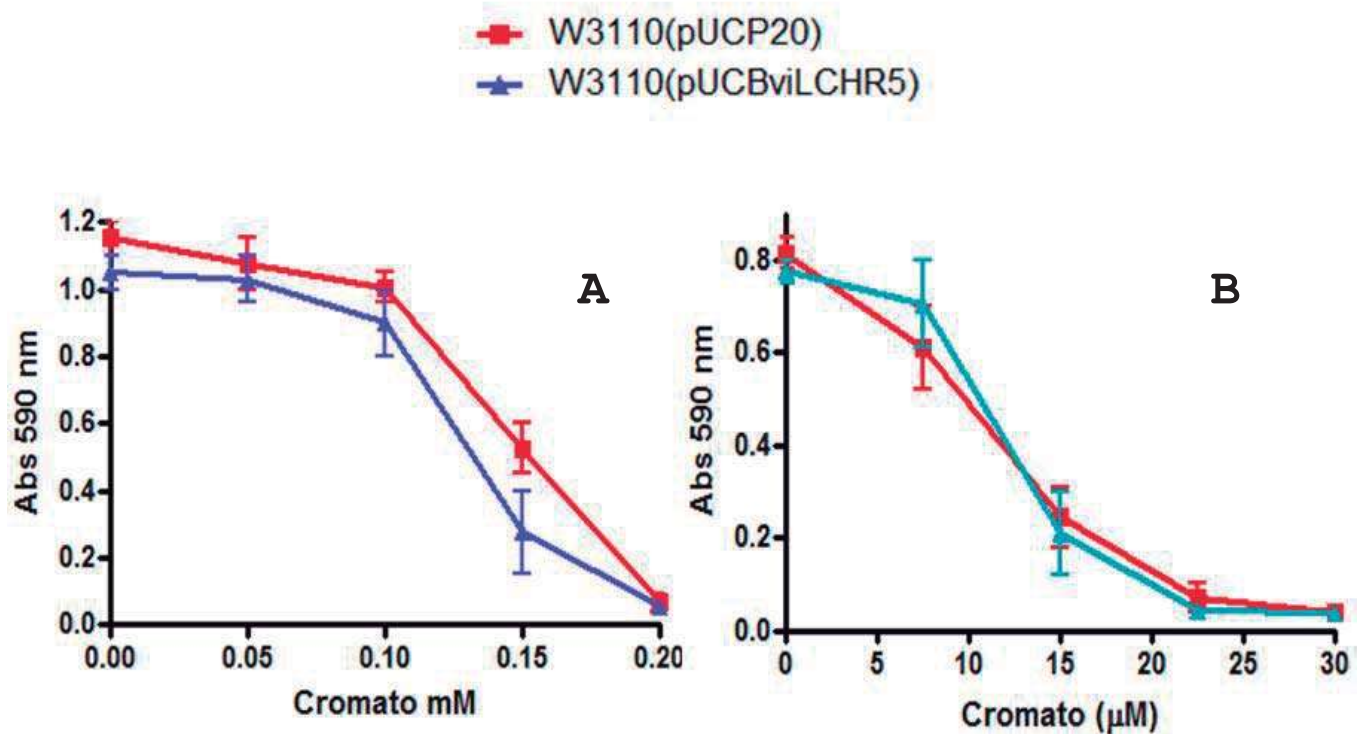


Fig.36. Pruebas de susceptibilidad a cromato de la cepa de *E. coli* W3110 transformada con el gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* en el vector pUCP20. Las curvas se realizaron creciendo los cultivos en CN 18 h (A) y 20 h en medio (B) mínimo a 37°C con agitación constante, luego de ese tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. W3110(pUCP20) es la cepa control y W3110(pUCBviLCHR5) es la cepa transformada con el gen que codifica la proteína LCHR5. Se muestran los resultados de dos ensayos por duplicado.

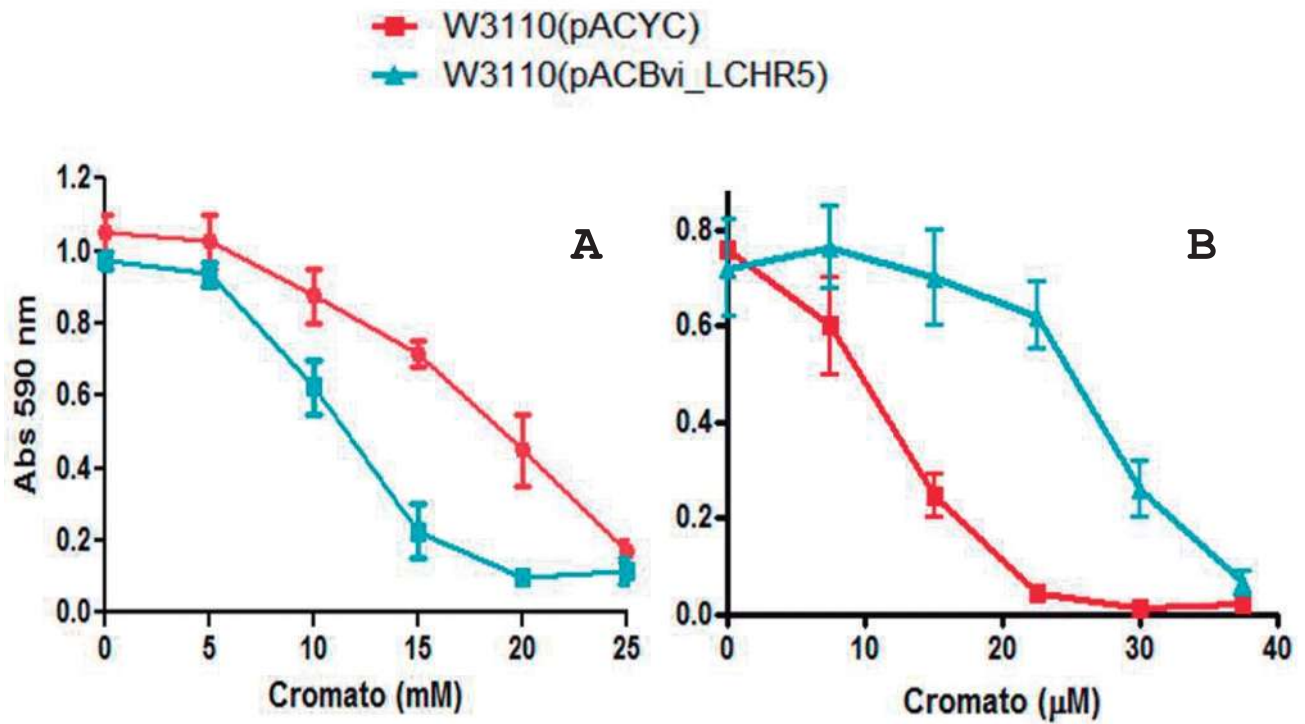


Fig. 37. Susceptibilidad a cromato de *E. coli* W3110 transformada con el gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* clonado en el vector pACYC184. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h (A) y en medio mínimo por 20 h (B) a 37°C y agitación constante a las concentraciones de cromato indicadas, luego de este tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. W3110(pUCP20) es el control sensible, W3110(pUCBviLCHR5) es la cepa transformada con el gen que codifica la proteína LCHR5. Se muestra el resultado de dos ensayos por duplicado en CN y en medio mínimo.

VII. DISCUSIÓN

El cromo es el séptimo elemento más abundante sobre la corteza terrestre (Ramírez-Díaz y col., 2008), por lo que posiblemente la mayoría de los organismos han estado en contacto siempre con sus compuestos. El cromo es un metal tóxico para la mayoría de las formas de vida, incluyendo las bacterias, por lo que algunos organismos han desarrollado mecanismos de resistencia para contrarrestar sus efectos tóxicos (**Fig. 2**). La proteína ChrA es el determinante de resistencia a cromato más ampliamente estudiado. Un análisis filogenético mostró que los genes que codifican homólogos de ChrA están ampliamente distribuidos ya que fueron encontrados en los tres dominios de la vida (Díaz-Pérez y col., 2007). De las 77 secuencias de proteínas homólogas a ChrA de la familia LCHR identificadas a la fecha sólo se habían estudiado dos de ellas: las presentes en los plásmidos pUM505 de la γ -proteobacteria *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de la β -proteobacteria *C. metallidurans* (Nies y col., 1990), y de manera más reciente se estudiaron dos homólogos más presentes en el plásmido 1 de la γ -proteobacteria *Shewanella* sp. (Aguilar-Barajas y col., 2008) y en el transposón TnOtChr de la α -proteobacteria *Ochrobactrum tritici* (Branco y col., 2008) que no se identificaron en el análisis filogenético porque los genomas de estos organismos aún no se habían secuenciado. Estas proteínas pertenecen a las subfamilias LCHR2 y LCHR5, que dentro del árbol filogenético de la subfamilia LCHR (**Fig. 3**) forman un grupo muy cercano entre sí. No se conocían a la fecha homólogos funcionales dentro de las demás subfamilias.

Un análisis de la distribución taxonómica de las proteínas LCHR mostró que las β -proteobacterias son el grupo bacteriano con mayor presencia (**Fig. 5**), al presentar

homólogos en cuatro de las seis subfamilias LCHR, además de que algunas de ellas presentan varias secuencias de proteínas CHR en sus genomas, como *C. metallidurans* que presenta dos proteínas LCHR. El ejemplo más notable de la presencia de múltiples homólogos CHR de diferentes subfamilias son las β -proteobacterias *B. xenovorans* LB400 y *B. vietnamiensis* G4 (**Fig. 3**).

Una de las revelaciones sorprendentes de los genomas procarióticos fue la existencia de un número inesperadamente grande de genes redundantes. Antes de que la secuenciación de genomas completos fuera común, se creía que las células bacterianas contenían muy poca, si es que alguna, información redundante en sus genomas (Pushker y col., 2004). Se encontró además una correlación entre la redundancia de genes y el tamaño del genoma: genomas más grandes contienen un mayor número de genes redundantes (Jordan y col., 2001). Una comparación de la cantidad de genes parálogos presentes en genomas grandes mostró además que con el tamaño del genoma aumenta también el tamaño de las familias de genes presentes. Se encontró que existe una gran conservación del número de copias de los genes presentes aún en ecotipos de bacterias muy diferentes, lo que indica que estos genes redundantes podrían llevar a cabo un papel funcional diferente y no ser un simple respaldo, como se creía al principio (Pushker y col., 2004).

Un ejemplo de la función específica de genes aparentemente redundantes lo proporcionó el estudio de la superfamilia de tiorredoxinas en *E. coli*. Al principio, las evidencias apuntaron a que las tiorredoxinas citoplásmicas y las glutarredoxinas eran redundantes y proporcionaban respaldo una a la otra porque las mutantes en los genes que codificaban a una proteína o a la otra eran viables bajo las condiciones de crecimiento estándar de laboratorio (Prinz y col., 1997). De hecho, en estas

condiciones, sólo cuando se mutaban las enzimas más eficientes se observaba un fenotipo letal, por lo que aparentemente cualquier proteína podía llevar a cabo la función de respaldo. Posteriormente se encontró que, bajo condiciones específicas de crecimiento que involucraban algún tipo de estrés, la mutación de uno solo de los genes producía un fenotipo letal. Esto indica que algunas de estas proteínas pueden sustituir la función de otras bajo ciertas condiciones, pero que hay algunas rutas o condiciones ambientales en las que sólo se puede utilizar una de estas proteínas (Aslund y Beckwith, 1999).

B. xenovorans LB400 y *B. vietnamiensis* G4 presentan una gran redundancia de genes adaptativos (Chain y col., 2006; O’Sullivan y col., 2007) y a la fecha no se sabe exactamente cuál podría ser la ventaja que esto les proporciona a organismos con genomas relativamente grandes. *B. xenovorans* es el caso en el que se ha estudiado a detalle la redundancia de genes de este tipo. Presenta redundancia génica y funcional en la oxidación del formaldehído en la vía del catabolismo del benzoato; para cada uno de estos procesos presenta tres rutas potenciales y ha sido estudiada y confirmada la funcionalidad de cada una de estas rutas (Chain y col., 2006). La redundancia de genes no es del todo inesperada porque estos organismos tienen que contender en condiciones variables de tipos, fuentes y concentraciones de nutrientes. Esto último ha sido ejemplificado por el estudio detallado del catabolismo del benzoato, el cual sugiere que cada una de estas rutas está condicionalmente regulada dependiendo de los niveles de benzoato y oxígeno presentes en la célula (Denef y col., 2004 y 2005). Podría esperarse algo parecido con respecto al funcionamiento de genes de resistencia a metales u otros agentes tóxicos. Un ejemplo podrían ser los genes *lchr*: se esperaría

que si los múltiples homólogos confieren resistencia a cromato cada uno lo hiciera en condiciones específicas de crecimiento.

B. xenovorans LB400 presenta dos proteínas LCHR1, de 430 y 412 aa codificadas en los cromosomas 1 y 2, respectivamente; una proteína LCHR2 codificada en el megaplásmido y una proteína LCHR6 codificada en el cromosoma 1. *B. xenovorans* posee además dos parejas de proteínas SCHR codificadas también en los cromosomas (Díaz-Pérez y col., 2007). *B. vietnamiensis* G4 por su parte presenta una proteína LCHR1 codificada en el cromosoma 1, tres proteínas LCHR2 dos idénticas de 395 aa codificadas en el cromosoma 3 y en el plásmido pBVIE03, respectivamente, y otra de 392 aa codificada en el cromosoma 2; dos proteínas LCHR5 (de 474 y 472 aa idénticas en 472 aa codificadas en el cromosoma 3 y en el plásmido pBVIE03, respectivamente) y una proteína LCHR6 codificada en el cromosoma 1. *B. vietnamiensis* posee además dos parejas de proteínas SCHR codificadas en el cromosoma 1 (Díaz-Pérez y col., 2007).

Debido a que los porcentajes de identidad y similitud entre los miembros de la misma subfamilia son mayores al 50% en la mayoría de los casos (**Fig. 7**), en este trabajo se decidió estudiar la función de un gen de cada subfamilia diferente y se eligieron tres genes (*lchr1*, *lchr2* y *lchr6*) de *B. xenovorans* y uno (*lchr5*) de *B. vietnamiensis* (**Fig. 8**).

A las secuencias de las proteínas LCHR se les realizaron análisis bioinformáticos para compararlas con las ChrAs más ampliamente caracterizadas y ver si compartían características que indicaran que serían funcionales. El primer análisis fue una comparación de los porcentajes de identidad de los dominios amino y carboxilo por separado (**Fig. 10 y 11**). Los resultados mostraron que en las subfamilias LCHR1, LCHR2 y LCHR6 el dominio carboxilo está más conservado que el dominio amino y que sólo en

la subfamilia LCHR5 se conserva más el dominio amino. Este último resultado coincide con lo que se había reportado para la ChrA de pUM505 que pertenece a la subfamilia LCHR5 (Aguilera y col., 2004). Aunque en algunos casos se analizó un número muy pequeño de secuencias y habría que refinar los alineamientos, de este análisis puede concluirse que la conservación de dominios depende de la subfamilia y no se conserva en la familia LCHR y que este no puede ser un parámetro que ayude a determinar si una proteína LCHR va a conferir resistencia a cromato.

Se compararon también los perfiles hidropáticos de las proteínas seleccionadas con los perfiles de las ChrAs de pMOL28 y pUM505 (**Fig. 12-15**) y se hizo una predicción de los posibles STM. Se encontraron diferencias tanto en el número de STM como en la orientación de éstos con respecto a la membrana, aún en los miembros de la misma subfamilia. Por ejemplo, entre las proteínas ChrA de pUM505 y la proteína LCHR5 de *B. vietnamiensis*, aunque ambas pertenecen a la misma subfamilia, para la primera se predicen trece STM con el extremo amino orientado al citoplasma y para la segunda se predicen once, con el extremo amino orientado al periplasma (**Fig. 14**). Incluso para las proteínas ChrA de pMOL28 y LCHR2 de *B. xenovorans*, cuyos perfiles hidropáticos son muy parecidos, se predice el mismo número de 12 STM, pero la orientación en la membrana es opuesta (**Fig.13**). Por lo que los resultados que se obtuvieron no aportaron datos que apoyaran que alguna de estas proteínas podría ser funcional porque no presentó una topología u orientación parecida a alguna de las ChrA funcionales.

Posteriormente se realizó un análisis para predecir la posible orientación en la membrana de los dominios amino y carboxilo para tratar de determinar si éstos tienen una orientación opuesta en la membrana, como se ha reportado para la ChrA de

pUM505 (Jiménez-Mejía y col., 2006) y para algunas proteínas SCHR (Díaz-Pérez y col., 2007). Se encontró que la topología se conserva entre los miembros de la misma subfamilia (**Fig. 16-19**), porque los perfiles hidropáticos de los dominios amino y carboxilo son muy parecidos y al graficarlos juntos éstos casi se sobreponen. Sin embargo, al determinar el número de residuos positivos en las posibles asas los resultados no permitieron hacer una predicción concluyente sobre la orientación de los STM con respecto a la membrana y no fue posible saber si la orientación opuesta se conserva entre estas proteínas.

Ninguno de los análisis bioinformáticos realizados a las secuencias de las proteínas LCHR seleccionadas en los que se les comparó con las ChrAs más ampliamente caracterizadas arrojó resultados que demostraran que alguna de las proteínas estudiadas podía conferir resistencia a cromato, ya que las características que se compararon no fueron idénticas entre las proteínas estudiadas y las ChrAs de pUM505 y pMOL28 pero mostraron que la mayoría de las características son comunes a los miembros de la misma subfamilia, y que por lo tanto la funcionalidad podría estar conservada entre las proteínas de la misma subfamilia.

Cuando se tuvo acceso a las cepas *B. xenovorans* LMG 21463, que es la misma que la cepa LB400 cuyo genoma está totalmente secuenciado, y *B. vietnamiensis* TVV75, que es muy parecida a la cepa G4 cuyo genoma está secuenciado (J. Caballero-Mellado, comunicación personal), se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato a las cepas utilizando como referencia a *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* W3110. Las primeras pruebas se realizaron en CN, donde *B. xenovorans* resultó ser más resistente a cromato que las cepas control tolerando concentraciones de hasta 6 mM (**Fig. 20 y resultados no mostrados**). El resultado contrario se observó con *B. vietnamiensis*, que presentó

un fenotipo de hipersensibilidad ya que su crecimiento se vio inhibido a concentraciones de cromato menores que el de *E. coli* (**Fig. 20**), que es considerada una cepa sensible a cromato. Posteriormente se realizaron pruebas de susceptibilidad en medio mínimo, pensando que al cambiar las condiciones metabólicas se podía inducir alguno de los genes *lchr* de *B. vietnamiensis* y observar un fenotipo de resistencia. Sin embargo, se obtuvo un resultado similar al obtenido en CN, es decir, *B. xenovorans* presentó resistencia a cromato, mientras que *B. vietnamiensis* se mostró sensible (resultados no mostrados). Aún con estos resultados negativos, no se puede concluir que los genes *lchr* de *B. vietnamiensis* no confieren resistencia a cromato, se piensa más bien que las condiciones en las que se realizaron las pruebas de susceptibilidad no son las adecuadas para que se expresen los genes, pero probablemente existe alguna condición fisiológica en la que éstos sean funcionales.

Para determinar si los genes *lchr* seleccionados confieren resistencia a cromato, primero se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificarlos de manera que se amplificaran también los posibles promotores y terminadores transcripcionales (**Fig. 21, Tabla 1**). Los fragmentos con los genes *lchr* se amplificaron por PCR (**Figs. 22-24**), se clonaron en vectores de recuperación (**Figs. 25-26**) y posteriormente se subclonaron en los vectores pUCP20 y pACYC184 (**Figs. 27 y 28**). Se escogieron estos vectores por los antecedentes que existen en el laboratorio al estudiar la función de otros genes *lchr*. El gen *chrA* de pUM505 clonado en pUCP20, por ejemplo, confiere resistencia a cromato solamente a *P. aeruginosa* y no a *E. coli* en CN (Cervantes y col., 1990; Nies y col., 1990); por otra parte, el gen *chrA* del plásmido 1 de *Shewanella* sp. confiere resistencia a cromato a *E. coli* cuando es clonado en pACYC184 y a *P. aeruginosa* clonado en el vector pUCP20 cuando las pruebas se realizan en M9 (Aguilar-Barajas y

col., 2008). Como no se sabía en qué condiciones podía observarse el fenotipo conferido por los genes *lchr* de las cepas de *Burkholderia*; estos se clonaron en ambos vectores y con los plásmidos recombinantes se transformó tanto a *P. aeruginosa* como a *E. coli* y se realizaron las pruebas de susceptibilidad a cromato en medio rico y en medio mínimo.

El género *Burkholderia* es más parecido fenotípica y genotípicamente al género *Pseudomonas* que al género *Escherichia*, por lo que en un inicio se pensó que era más probable observar la función de los genes *lchr* de *Burkholderia* cuando éstos se expresaran en *P. aeruginosa*. Así, se realizaron primero pruebas de susceptibilidad a cromato a las transformantes de la cepa PAO1.

En los resultados de las pruebas en CN se observó que solamente el gen *lchr2* y el conjunto de genes *chrFCA2B* confieren resistencia y que cuando el primero está clonado de manera individual confiere un nivel de resistencia mucho mayor (sigue creciendo a concentraciones mayores a 2.5 mM de cromato) que cuando se clona con los genes aledaños (**Fig. 29A**). De hecho, cuando las pruebas se realizaron en M9 el gen *lchr2* confirió resistencia sólo clonado de manera individual y la cepa con el conjunto de genes *chrFCA2B* resultó ser más sensible incluso que el control (**Fig. 29B**), de modo que el efecto que los tres genes aledaños al gen *lchr2* confieren al fenotipo de resistencia se ve acentuado cuando las pruebas se realizan en medio mínimo (**Fig. 31**). Se analizó el efecto de expresar diferentes combinaciones de los genes *chrFCA2B* en *P. aeruginosa* y los resultados mostraron que tanto *chrF* como *chrB* tienen un efecto importante en el fenotipo de resistencia cuando las pruebas se realizan en CN, posiblemente actuando como reguladores de la expresión (**Fig. 30**).

El vector pUCP20 permite la expresión de genes tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*. Lo que se hizo a continuación fue realizar pruebas de susceptibilidad a cromato a las cepas de *E. coli* W3110 transformadas con los mismos plásmidos con los que se transformó a *P. aeruginosa*. Cuando las pruebas se realizaron en CN se observó que el gen *lchr2* nuevamente era capaz de conferir resistencia; en esta condición también el gen *lchr6* confirió resistencia a cromato, mientras que las cepas transformadas con los genes *lchr1* y el conjunto de genes *chrFCA2B* presentaron un comportamiento similar al de la cepa control (**Fig. 32A**). En medio mínimo solamente el gen *lchr2* confirió resistencia a cromato y la cepa transformada con el gen *lchr6* fue tan sensible como la cepa control (**Fig. 32B**). Posiblemente este gen sólo se expresa en las condiciones fisiológicas proporcionadas al crecer la cepa en CN, es decir un medio rico. Se sabe que cuando una célula bacteriana se crece en un medio rico se ve aumentada la expresión de genes relacionados con algunos tipos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo (Tao y col., 1999), y posiblemente la proteína LCHR6 sea una proteína de respuesta a alguna de estas condiciones, que no se presentan cuando las células se crecen en medio mínimo, aunque no existe evidencia al respecto.

Los genes aledaños al gen *lchr2* también tuvieron un efecto sobre la resistencia a cromato cuando se expresaron en *E. coli* (**Fig. 33B**), aunque solamente cuando las pruebas se realizaron en M9. Se observó un efecto similar en el operón *chrBAC* de *Shewanella* sp., cuando los genes se clonaron en un vector de alto número de copias (pGEM-T). En pruebas de susceptibilidad a cromato en M9 se observó que el gen *chrA* confería un nivel de resistencia mucho mayor clonado de manera individual que en conjunto con los genes *chrB* y *chrC* (Aguilar-Barajas y col., 2008). Aunque no se sabe a qué se debe este efecto, podría estar relacionado con que en un vector de alto número

de copias, además de sobreexpresarse la proteína que confiere resistencia a cromato, se sobreexpresan también los genes que codifican a los reguladores transcripcionales *chrB* y *chrF*. El hecho de que el efecto de los genes aledaños sea más notable cuando las pruebas de susceptibilidad se realizan en M9 posiblemente está relacionado con que *chrB* y *chrF* son reguladores transcripcionales, probablemente responden a las concentraciones de sulfato presentes en este medio (Juhnke y col., 2002).

Hasta este punto se había demostrado que los genes *lchr2* y *lchr6* confieren resistencia a cromato, pero el gen *lchr1* no había conferido resistencia en ninguna de las condiciones probadas. A continuación se clonaron los genes en el vector de bajo número de copias pACYC184. En las pruebas en CN se observó que el gen *lchr1* confería un nivel de resistencia muy bajo pero reproducible (**Fig. 34A**), mientras que las cepas de *E. coli* transformadas con los genes *lchr2* y *lchr6* eran más sensibles a cromato que la cepa control, contrario a lo que ocurre cuando estos genes están clonados en pUCP20 (**Fig. 34B**). Posiblemente para que estos genes confieran un nivel de resistencia a cromato apreciable en el sistema usado se necesita que las proteínas que codifican se expresen en un número mayor, y esto sólo se consigue cuando los genes están clonados en el vector pUCP20 y no en pACYC184. Cuando las pruebas se realizaron en M9 se observó claramente que en esta condición sólo el gen *lchr1* era capaz de conferir resistencia a cromato (**Fig. 34B**). Se sabe que el aumentar el número de copias de un plásmido no causa un aumento proporcional de los niveles de expresión de las proteína codificadas (Carrier y col., 1998). Hay algunos ejemplos, cuando los promotores de los genes son fuertes, se logra una expresión más eficiente de la proteína cuando se utiliza un vector de bajo o de moderado número de copias (Mergulhao y col., 2002), lo que podría ser el caso del gen *lchr1*. Se sabe también que

cuando hay una sobreexpresión de proteínas de membrana éstas se precipitan y forman agregados (Wagner y col., 2007), lo que posiblemente ocurra cuando el gen *lchr1* se clona en el vector pUCP20, que es de alto número de copias, aunque no hay evidencia al respecto. El medio en el que se realizan las pruebas también proporciona una condición fisiológica específica en la que este 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. El que se haya observado la función del gen *lchr1* solamente cuando se clonó en el vector de bajo número de copias pACYC184 y cuando las pruebas se realizaron en medio mínimo podría deberse a alguno o varios de estos factores.

Los resultados obtenidos hasta aquí con los genes de *B. xenovorans*, que señalan que todos confieren resistencia a cromato, pero sólo en condiciones de cepa, vector y medio de cultivo específicas, no son del todo inesperados. Esta bacteria codifica 21 sistemas de expulsión de metales pesados y ocho de ellos corresponden a genes *chr*. El hecho de que cada uno funcione en condiciones fisiológicas específicas podría explicar la gran cantidad de genes de resistencia a cromato que presenta esta bacteria, que habita en nichos ecológicos muy diversos (Chain y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, cuando se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato a la cepa de *B. vietnamiensis* se encontró que lejos de presentar un fenotipo de resistencia a cromato, mostró ser hipersensible al oxianión en las condiciones en las que se realizaron los experimentos (**Fig. 20**). Aún así se decidió estudiar la función del gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* como se había planteado desde un inicio, debido a que pertenece a una subfamilia diferente a la de los genes *lchr* estudiados de *B. xenovorans*, y en la que se han descrito otros homólogos funcionales, y analizarlo en

las condiciones en las que se habían probado los genes de *B. xenovorans* para ver si en alguna de las condiciones se podía determinar su función.

El gen *lchr5* se amplificó por PCR, se clonó en el vector pJET 1.2 y se transformó a *E. coli* TOP-10 con el plásmido recombinante. Posteriormente este gen se subclonó en pUCP20 y en pACYC184 y con los plásmidos recombinantes se transformó tanto a *E. coli* W3110 como a *P. aeruginosa* PAO1. A las cepas transformantes se le hicieron pruebas de susceptibilidad a cromato tanto en CN como en M9 (**Fig. 35-37**). Sólo se observó que el gen *lchr5* confiere resistencia a cromato clonado en el vector pACYC184 y en *E. coli* W3110 y cuando las pruebas se realizaron en M9 (**Fig. 37B**) y en ninguna otra condición, igual que lo encontrado con el gen *lchr1* de *B. xenovorans*. Estos resultados demostraron que el gen *lchr5* de *B. vietnamiensis* confiere resistencia a cromato clonado en *E. coli*, y confirman que las condiciones iniciales en las que se realizaron las pruebas de susceptibilidad a cromato a *B. vietnamiensis* no fueron las adecuadas para la expresión de los genes *lchr*. En alguna condición de crecimiento *B. vietnamiensis* podría presentar un fenotipo de resistencia a cromato debida a la expresión de uno o varios de los genes *lchr* presentes.

VIII. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que los genes *lchr1*, *lchr2*, *lchr5* y *lchr6* de cepas de *Burkholderia* confieren resistencia a cromato en condiciones específicas de cepa receptora, medio de cultivo y número de copias del vector. Nuestra conclusión es que las proteínas LCHR de *B. vietnamiensis* y *B. xenovorans* analizadas confieren resistencia a cromato. Este es el primer reporte que demuestra la función de miembros de las subfamilias LCHR1 y LCHR6 de la superfamilia CHR como posibles transportadores de cromato. Con estos homólogos LCHR suman ya cuatro las subfamilias en las que se han identificado miembros funcionales, distribuidas a lo largo del árbol filogenético de la superfamilia CHR. Con estos resultados, y con los resultados obtenidos por Díaz-Magaña y col. (2009), que demuestran que las proteínas de las subfamilias SCHR1 y SCHR3 también confieren resistencia a cromato cuando son clonados en pareja, se puede concluir que los miembros de la superfamilia CHR confieren resistencia a cromato, si no como su función principal, al menos como una de sus funciones, en alguna condición de crecimiento.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Barajas, E., Paluscio, E., Cervantes, C. y Rensing, C. (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 285:97-100.
2. Aguilera, S., Aguilar, M. E., Chávez, M. P., López-Meza, J. E., Pedraza-Reyes, M., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 232:107-12.
3. Alvarez, A.H., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (2002). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181:7398-7400.
4. Aslund, F. y Beckwith, J. (1999). The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. J. Bacteriol. 181:1375-1379.
5. Bachmann, B. J., Low, K. B. y Taylor, A. L. (1976). Recalibrated linkage of *Escherichia coli* K-12. Bacteriol. Rev. 40:116-67.
6. Ballatori, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. Environ. Health Prospect. 110:689-693.
7. Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 24:1513–1523.
8. Bopp, L.H. y Ehrlich, H.L. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. Arch. Microbiol. 150: 426-431.
9. Branco, R., Chung, AP., Johnson, T., Gurel, V., Morais, P. y Zhitkovich, A. (2008). The chromate-inducible *chrFACB* operon from the transposable element

- Tn*OtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. J. Bacteriol. 190:6993-7003.
10. Bedard, D., L., Unterman, R., Bopp, L. H., Brennan, M. J., Haberl, M. L. y Johnson, C. (1986). Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated byphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 51:761-768.
 11. Bridgewater, L.C., Manning, F.C., Woo, E.S. y Patierno, S.R. (1994). DNA polymerase arrest by adducted trivalent chromium. Mol. Carcinog. 9:122-133.
 12. Burkholder, W. H. (1948). Bacteria as plant pathogens. Annu. Rev. Microbiol. 2:389-412.
 13. Campos-García, J., Martínez-Cadena., G., Álvarez-González, R. y Cervantes, C. (1997). Purification and partial characterization of a chromate reductase from *Bacillus*. Rev. Lat-Amer Microbiol. 39:73-81.
 14. Carrier, T., Jones, K. y Keasling, J. D. (1997). mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. Biotechno. Bioeng. 59:666-672.
 15. Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T. y Silver, S. (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. 172: 278-291.
 16. Cervantes, C. y Silver, S. (1996). Sistemas de resistencia a metales en *Pseudomonas*. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 38:45-64.
 17. Cervantes, C. y Campos-García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate in bacteria. In: Nies DH, Silver S (eds) Molecular Microbiology of Heavy Metals. Springer-Verlag, Berlin, pp 407–420.

18. Chain, P.S.G., Denef, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulló, L., Latorre-Reyes, V., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Jun Sul, W., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B. y Tiedje, J.M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. Proc. Natl. Acad. Sci. 103:15280-15287.
19. Claros, M. G. y von Heijne, G. (1994). TopPred II: An improved software for membrane protein structure prediction. CABIOS. 10:685-686.
20. Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R.W. y Lipuma, J. (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J. Clin. Microbiol. 39:3427-3436.
21. Coenye, T. y Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environ. Microbiol. 5:719-729.
22. Conway, B.A. y Greenberg, E.P. (2001). Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. J. Bacteriol. 184:1187-1191.
23. Degli-Esposti, M., Crimi, M., y Venturoli, G. (1990). A critical evaluation of the hydrophathy profile of membrane proteins. Eur. J. Biochem. 190:207-219.
24. Denef, V. J., Park, J., Tsoi, T. V., Rouillard, J.-M., Zhang, H., Wibbenmeyer, J. A., Verstraete, W., Gulari, E., Hashsham, S. A. y Tiedje, J. M. (2004). Biphenyl and benzoate metabolism in a genome context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. Appl. Environ. Microbiol. 70:4961-4970.

25. Denef, V. J., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Park, J., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Tiedje, J. M. y Eltis, L. D. (2005). Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate and C₁ methabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J. Bacteriol.* 187:7996-8005.
26. Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Campos-García, J., Julián-Sánchez, A. y Riveros-Rosas, H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274:6215-6227.
27. Díaz-Magaña, A., Aguilar-Barajas, E., Moreno-Sánchez, R., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, E., Vargas, E. y Cervantes, C. (2009). Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191:5441-5445.
28. Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csorgo, B., Pósfai, G., Winstock, G. M. y Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhouse. *J. Bacteriol.* 190:2597-606.
29. Gillis, M., Tran Van, V., Bardin, R., Goor, M., Hebbbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T. y Fernández, MP. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 274-289.
30. Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen III, J.F., Tiedje, J.M. y Vandamme, P. (2004). Classification of the biphenyl-and

- polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1667-1681.
31. Govindarajan, M., Balandreau, J., Muthukumarasamy, R., Revathi, G. y Lakshminarasimhan, C. (2006). Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. Plant Soil. 280:239-252.
32. Holloway, BW. (1969). Genetics of Pseudomonas. Bacteriol. Rev. 33:419-43.
33. Ish-Horowicz, D. y Burke, JF. (1982). Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 9:2989-98.
34. Jordan, I.K., Makarova, K.S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I. y Koonin, E. V. (2001). Lineage specific gene expansions in bacterial and archaeal genomes. Genome Res. 11:555-565.
35. Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N., GroBe, C. y Nies, D.H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. Arch. Microbiol. 179:15-25.
36. Lolkelma, J.S. y Slotboom, D.J. 2005. Sequence and hydropathy profile analysis of two clases of secondary transporters. Mol. Membr. Biol. 22:177-189.
37. Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomsky, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y. y Vandamme, P. (2000). DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. J. Clin. Microbiol. 38:3165-3173.
38. McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hirofurni, H.,

- Pretescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J. M., Holt, R., Brinkman, F. S. L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W. y Eltis, L. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:15582-15587.
39. Mergulhao, F.J.M., Monteiro, G.A., Larsson, G., Sandén, A.M., Farewell, A., Nystrom, T., Cabral, J.M.S. y Taipa, M.A. (2003). 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: 495-501.
40. Nelson, M.J.K., Montgomery, E., O'Neill, E.J y Pritchard, P.H. (1986). Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:383-384.
41. Nies, D.H., Nies, A. y Silver S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
42. Nies, D.H., Nies, A., Chu, L. y Silver, S. (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7351-7355.
43. O'Sullivan, L. A., Weightman, A. J., Jones, T. H., Marchbank, A. M., Tiedje, J. M. y Mahenthalingam, E. (2007). Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environ. Microbiol.* 9:1017-34.

44. Ohio Environmental Protection Agency. (2002). Chromium and chromium compounds. Pollution Prevention Fact Sheet. No. 90. Columbus, Ohio.
45. Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Hefin-Jones, T. y Mahenthiralingam, E. (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3917-3927.
46. Pimentel, B.E., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 212,249-254.
47. Prinz, W. A., Aslund, A. y Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272:15661-15667.
48. Pushker, R., Mira, A. y Rodríguez-Valera, F. (2004). Comparative genomics of gene-family size in closely related bacteria. *Genome Biol.* 5(4):R27.
49. Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2007). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals.* 21:321–332.
50. Rehman, L. y Daugulis, A.J. (2007). Enhancement of PCB degradation by *Burkholderia xenovorans* LB400 in biphasic systems by manipulating culture conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 99:521-528.
51. Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J. P. y Piña, E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur. J. Biochem.* 270:3309-3334.

52. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
53. Shields, S.M., Montgomery, S.O., Chaptman, P.J., Cuskey, S.M. y Pritchard, P.H. (1989). Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1624-1629.
54. Sultan, S. y Hasnain, S. (2005). Plasmid mediated chromate resistance in bacteria isolated from industrial waste. *Pak. J. Biol. Sci.* 8:1771-1777.
55. Summerton, J., Atkins, T., Bestwick, R. (1983). A rapid method for preparation of bacterial plasmids. *Annal. Biochem.* 133:79-84.
56. Sumner, E. R., Shanmuganathan, S., Sideri, T.C., Willer, S.A., Houghton, J.E. y Avery, S.V. (2005). Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology.* 151:1939-1938.
57. Shupak, S.I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ Health Perspect.* 92:7-11.
58. Quievryn, G., Peterson, E., Messer, J. y Zhitkovich, A. (2003). Genotoxicity and mutagenicity of chromium (VI) ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry.* 42:1062-1070.
59. Tabacchioni, S., Bevivino, A., Dalmastrì, C. y Chiarini, L. (2002). *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. *Ann. Microbiol.* 52:103-117.
60. Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. y Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal media and rich media. *J. Bacteriol.* 181:6425-6440.

61. Thompson, J. D., Gibson, T. J. y Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter 2: Unit 2.3.
62. Trân Van, V. (1989). Isolement et identification des bactéries fixatrices d'azote associées aux racines du riz poussant sur un sol riziére du Viêt-nam. Mémoire pur Diplome dvétudes approfondies. Université Claude Bernard. Lyon I, Lyon France.
63. Trân Van, V., Berge, O., Ngô Kê, S., Balandreau, J. y Heulin, T. (1999). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil*. 218:273-284.
64. US Environmental Protection Agency. (1998). Toxicological review of hexavalent chromium. CAS No. 18540-29-9. Washington, DC.
65. Von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction: Hidrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol*. 225:487-94.
66. Wagner, S., Baars, L., Yttersberg, J., Klussmeier, A., Wagner, C.S., Nord, O., Nygren, P., van Wijk, K.J. y de Gier, J. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics*. 6:1527-50.
67. West, SE. y Schweizaer, H.P. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 148:81-6.
68. Summerton, J., Atkins, T. y Bestwick, R. (1983). A rapid method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem*. 133, 79–84.

69. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, y., Ezaki, T. y Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. And transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36:1251-1275.
70. Yeager, C. M., Bottomley, P. J. y Arp D. J. (2001). Requirement of DNA repair mechanisms for survival of *Burkholderia cepacia* G4 upon degradation of trichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol. 67:5384-5391.
71. Zhitkovich, A., Song, y., Quievryn, G. y Voitkun, V. (2001). Nonoxidative mechanism are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(IV) with cysteine: rol of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. Biochemistry. 40:549-560.