



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

“Regulación de la expresión de los genes *chr* de
Burkholderia xenovorans LB400 por cromato y sulfato”

TESIS

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad en:
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:
Q.F.B. Yaned Milagros Acosta Navarrete

Asesor:
Doctor en Ciencias Bioquímicas Carlos Cervantes Vega

Co Asesora:
Doctora en Ciencias en Biología Experimental Martha Isela Ramírez Díaz

Morelia Mich., Diciembre 2013

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a mis padres:

Estela Navarrete Merlos y Roberto Acosta Gutiérrez

Por estar siempre con migo apoyándome incondicionalmente en cada una de mis decisiones.

A mi familia que para mí es lo más importante y valioso que dios me dio, y que nunca me dejan sola:

A mis hermanas; Vicky e Idaly.

A mis sobrinos: José, Fernando, Andrea, Estela, Roberto y Paola.

GRACIAS

Agradecimientos

A mi asesor de tesis el D.C. Carlos Cervantes Vega por darme la oportunidad de realizar este trabajo y el apoyo brindado.

A mi co-asesora la D.C. Martha Isela Ramírez Díaz por su ayuda en el desarrollo y revisión de este trabajo.

A la M.C. Martha Patricia Chávez Moctezuma por estar siempre al pendiente de las necesidades para el desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

A mis revisores de tesis; el D.C. Jesús Campos García, D.C. Gustavo Santollo Pizano y D.C. Víctor Meza Carmen, Q.F.B. Sandra Suarez Moreno, por su ayuda en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Amada Victor, Neto, Carlos, Rosa y Karen por sus consejos y ayuda brindada.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Cromo.....	1
2. Transporte y acumulación de cromo.....	2
3. Toxicidad del cromo.....	2
4. Mecanismos bacterianos de resistencia cromato.....	3
4.1. Expulsión de cromato.....	3
5. Superfamilia de transportadores CHR.....	5
6. <i>Burkholderia xenovorans</i>	8
7. <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	8
7.1. Genoma de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	9
7.2. Redundancia génica en <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	11
II. ANTECEDENTES.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVO GENERAL.....	20
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	21
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Reactivos y medios de cultivo.....	22
2. Cepa empleada.....	22
3. Cinéticas de crecimiento.....	23
4. Aislamiento de RNA.....	23
4.1. Electroforesis en geles de agarosa.....	24
5. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR) en tiempo real.....	24
5.1. Diseño de oligonucleótidos y sondas.....	24
5.2. Amplificación.....	26
5.3. Curva estándar y curva de eficiencia de amplificación.....	26
5.4. Cuantificación relativa.....	28

6.	RT-PCR.....	28
6.1.	Diseño de oligonucleótidos.....	28
6.2.	Amplificación.....	30
IX.	RESULTADOS.....	31
1.	Condiciones para el análisis de expresión de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	31
1.1.	Modificación del medio de cultivo K1.....	31
1.2.	Determinación de las concentraciones de sulfato.....	31
1.3.	Determinación de la concentración subinhibitoria de cromato.....	33
2.	Estandarización del RT-PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i>	35
2.1.	Eficiencia de amplificación.....	35
2.2.	Expresión del gen 16S <i>rRNA</i>	39
3.	Análisis de la expresión de los genes <i>chr</i> de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	39
3.1.	Expresión de los genes <i>chr</i> en la fase exponencial.....	39
3.1.1.	Regulación de la expresión de los genes <i>chr</i> por sulfato.....	39
3.1.2.	Efecto del cromato sobre la expresión de los genes <i>chr</i>	46
3.2.	Expresión de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> en la fase estacionaria del crecimiento.....	47
4.	Expresión de los genes <i>chrBACF</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	47
X.	RESUMEN DERESULTADOS.....	52
XI.	DISCUSIÓN.....	53
XII.	CONCLUSIONES.....	60
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

La superfamilia CHR consta de transportadores de membrana que confieren resistencia a cromato mediante un sistema de expulsión. Se han identificado microorganismos con múltiples genes *chr* que codifican homólogos CHR. Entre éstos se encuentra *Burkholderia xenovorans* LB400 que posee en su genoma seis genes *chr* (*chrA1a*, *chrA1b*, *chrA6*, *chrA2*, *chr1NCa* y *chr1NCb*). *B. xenovorans* es significativamente más resistente a cromato que otras especies bacterianas. Los genes *chr* de *B. xenovorans* confieren resistencia a cromato en diferentes condiciones de sulfato cuando se expresan en *Escherichia coli*. Esto sugiere que la expresión de los genes *chr* es regulada por sulfato. El objetivo del trabajo es determinar el papel del cromato y sulfato en la expresión de los múltiples genes *chr* de *B. xenovorans*. La expresión de los genes *chr* se evaluó, mediante ensayos de RT-PCR cuantitativo en tiempo real, a partir de RNA total de *B. xenovorans* LB400 crecida en medio mínimo en diferentes concentraciones de sulfato y en presencia o ausencia de cromato. Los genes *chr* presentaron diversos niveles de expresión entre sí, pero no mostraron cambios significativos en sus niveles de expresión en las diferentes condiciones de sulfato, por lo que se concluye que el sulfato no regula la expresión de los genes *chr* en *B. xenovorans*. A excepción del gen *chrA2* que mantuvo su nivel de expresión, el resto de los genes *chr* mostraron una disminución en su nivel de expresión durante la fase estacionaria del crecimiento. El gen *chrA2*, que se localiza dentro de un megaplásmido, fue el único gen *chr* que aumentó su nivel de expresión en presencia de cromato. Además, se encontró que este gen forma parte del operón *chrBACF*, cuya expresión responde a la exposición de cromato. Estos resultados sugieren fuertemente que el gen *chrA2* es el principal responsable de la resistencia a cromato en *B. xenovorans*.

PALABRAS CLAVE: *Burkholderia xenovorans*, cromato, genes *chr*.

ABSTRACT

The chromate ion transporter (CHR) superfamily comprises transporters that confer chromate resistance by extruding toxic chromate ions from cytoplasm. *Burkholderia xenovorans* strain LB400 has been reported to encode six CHR homologues in its multireplicon genome. We found that strain LB400 displays chromate-inducible resistance to chromate. Susceptibility tests of *Escherichia coli* strains transformed with cloned *B. xenovorans chr* genes indicated that the six genes confer chromate resistance, although under different growth conditions, and suggested that expression of *chr* genes is regulated by sulfate. Expression of *chr* genes was measured by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) from total RNA of *B. xenovorans* LB400 grown under different concentrations of sulfate and exposed or not to chromate. The *chr* homologues displayed distinct expression levels, but showed no significant differences in transcription under the various sulfate concentrations tested, indicating that sulfate does not regulate *chr* gene expression in *B. xenovorans*. The *chrA2* gene, encoded in the megaplasmid, was the only *chr* gene whose expression was induced by chromate and it was shown to constitute the chromate responsive *chrBACF* operon. These data suggest that this determinant is mainly responsible for the *B. xenovorans* LB400 chromate resistance phenotype.

I. INTRODUCCIÓN

1. Cromo

El cromo es un metal de transición, que presenta distintos estados de oxidación que van de -2 a +6, siendo los más comunes y estables el cromo trivalente, Cr(III), y el cromo hexavalente, Cr(VI). El Cr(VI), se considera la forma más tóxica del cromo, y generalmente lo encontramos en solución, como oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), dependiendo del pH. El Cr(VI) es un oxidante fuerte, el cual se reduce a Cr(III) en presencia de materia orgánica. El Cr(III) es menos soluble en agua que el Cr(VI) y por lo tanto menos móvil, lo encontramos principalmente ligado a materia orgánica en el medio ambiente (McGrath y Smith, 1990). El Cr(III) es menos tóxico debido a que es menos soluble a pH fisiológico. A pH fisiológico el Cr(III) tiende a precipitar como hidróxido ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) u óxido hidratado ($\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Ehrlich, 2002).

El cromo lo podemos encontrar en todas las condiciones del medio ambiente, incluyendo suelo, agua y aire. De forma natural en suelos, el cromo se encuentra en concentraciones que van de 10 a 50 mg Kg^{-1} . En agua dulce las concentraciones de cromo oscilan entre 0.1 y 117 mg L^{-1} , mientras que los valores en agua salada son de 0.2 a 50 mg L^{-1} . Las concentraciones de cromo en la atmósfera varían ampliamente, desde 5.0×10^{-6} – 1.2×10^{-3} mg m^{-3} (Shanker y col., 2005).

El cromo y sus compuestos tienen un amplio uso en la industria, se emplea en el curtido de pieles, pigmentos, agentes de limpieza de galvanoplastia, fabricación catalítica, aleaciones de acero inoxidable, conservación de madera, fungicidas, etc. El uso generalizado del

cromo lo ha convertido en un peligroso contaminante de suelo, aire y agua (McGrath y Smith, 1990).

2. Transporte y acumulación de cromo

El cromo atraviesa las membranas biológica activamente, en forma de cromato, vía la captación de sulfato; esto ha sido demostrado en varias especies bacterianas (Cervantes y col, 2001). La analogía química de estos dos oxianiones ha sido enfatizada por el hecho que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en aquellas especies bacterianas en donde se ha probado. El Cr(III) atraviesa las membranas celulares con poca eficiencia debido a que forma compuestos insolubles (Cervantes y Campos-García, 2007). Dentro de la célula, el Cr(IV) es reducido rápidamente a Cr(III), por la acción de diversas actividades enzimáticas y no enzimáticas. El Cr(III) generado puede ejercer diversos efectos tóxicos en el citoplasma (Cervantes y col., 2001).

3. Toxicidad del cromo

A nivel extracelular el Cr(VI) es altamente tóxico debido a que ingresa rápidamente al citoplasma donde puede ejercer sus efectos tóxicos (Wong y Trevors, 1988; Katz y Salem, 1993). En el citoplasma, la toxicidad del cromo se relaciona principalmente a los procesos de reducción del Cr(VI) a estados de oxidación menores, Cr(III) y Cr(V), en los que se forman radicales libres. Se cree que los tioles de bajo peso molecular (por ejemplo glutatión), son los principales responsables de la reducción intracelular del Cr(VI). El daño oxidativo al DNA es probablemente responsable de los efectos genotóxicos causados por el cromato (Kadiiska y col., 1994).

4. Mecanismos bacterianos de resistencia cromato

Se ha reportado una variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato, los mecanismos de resistencia a este oxianión pueden ser codificados tanto por genes de plásmidos o cromosoma. Usualmente, los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, que median directamente la expulsión del ion cromato del citoplasma de la célula. Por otra parte, los sistemas de resistencia codificados por cromosomas bacterianos están generalmente relacionados con estrategias tales como la reducción específica o inespecífica de Cr(VI), destoxicación de radicales libres, reparación de daño al DNA (Figura 1) y procesos asociados con homeostasis hierro-azufre (Ramírez-Díaz y col., 2008).

4.1. Expulsión de cromato

El sistema de transporte de cromato más estudiado es la proteína ChrA, que es codificada por el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*. ChrA de *P. aeruginosa* es una proteína de 416 aminoácidos (aa) que muestra una topología de 13 segmentos transmembranales (Jímenez-Mejía y col., 2006). El transportador ChrA funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa el cromato del citoplasma usando la fuerza protón-motriz (Pimentel y col., 2002). La expulsión de cromato es inhibida por sulfato, lo que sugiere que este análogo podría unirse también a ChrA (Pimentel y col., 2002). De hecho, se ha propuesto que ChrA puede funcionar como un antiportador de cromato/sulfato (Nies y col., 1998), aunque no ha sido determinado el transporte de sulfato por la proteína ChrA

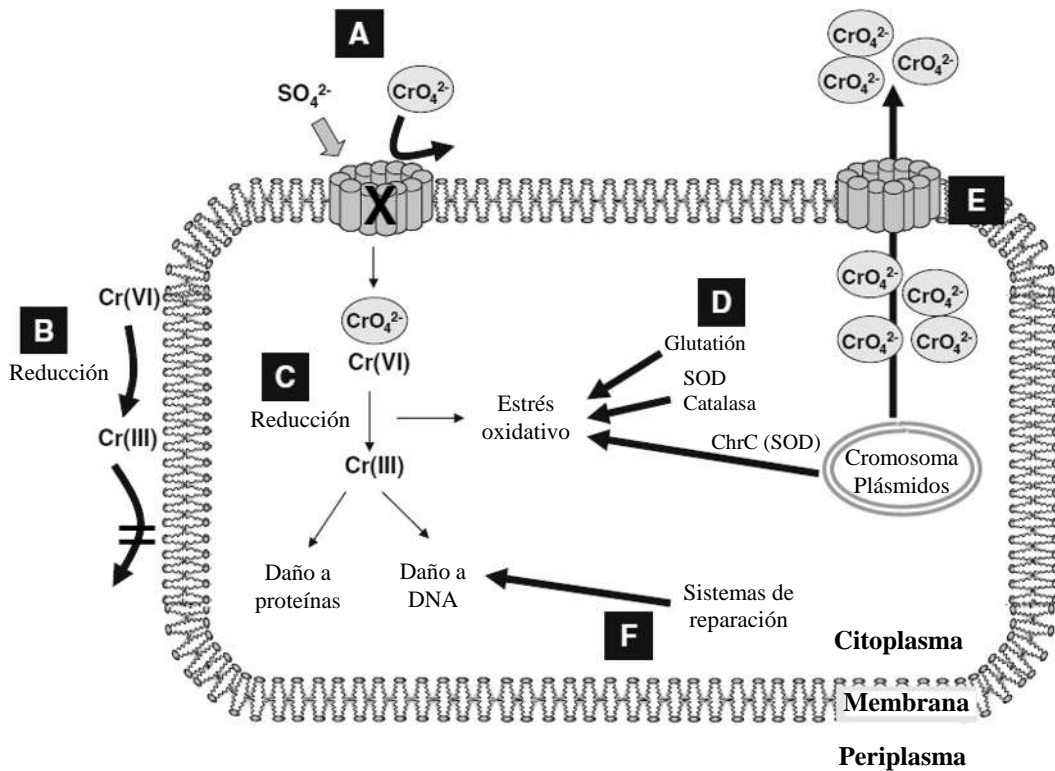


Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia a cromato en células bacterianas. Los mecanismos de daño y resistencia se indican en flechas delgadas y gruesas, respectivamente. (A) La vía de captación de sulfato (codificado en cromosoma) es también utilizada por el cromato para entrar a la célula; cuando se muta el transportador de sulfato (X) disminuye el transporte de cromato. (B) Reducción extracelular de Cr(VI) a Cr(III), que no atraviesa la membrana. (C) Reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III), que puede generar estrés oxidativo, así como daño a DNA y proteínas. (D) Enzimas detoxificantes involucradas en protección contra estrés oxidativo, minimizando los efectos tóxicos del cromato. (E) Transportadores que pueden expulsar cromato del citoplasma (codificados en cromosoma y plásmidos). (F) Sistemas de reparación de DNA participan en la protección del daño generado por derivados de cromo (Ramírez-Díaz y col., 2008).

5. Superfamilia de transportadores CHR

La superfamilia CHR es un grupo de proteínas involucradas en el transporte de cromato, que comprende actualmente cientos de homólogos distribuidos en los tres dominios de la vida (Díaz-Pérez y col., 2007; Henne y col., 2009). La superfamilia CHR está constituida por miembros de dos tamaños: proteínas de cadena corta (familia SCHR) con una longitud de ≈ 200 aa con un solo dominio, y son comúnmente codificadas por un par de genes adyacentes; y proteínas de cadena larga (familia LCHR) con una longitud de ≈ 400 aa con dos dominios homólogos. La distribución en la longitud de secuencias de las proteínas CHR en SCHR monodominio y LCHR bidominio, estas últimas con dominios homólogos, sugiere que las proteínas LCHR surgieron por un evento de duplicación génica en tándem. Las proteínas LCHR se agrupan en seis subfamilias de bacterias (LCHR1-LCHR6) y una subfamilia de hongos, y las proteínas SCHR se agrupan en tres subfamilias (SCHR1-SCHR3) (Figura 2). Aunque la mayoría de los organismos donde se identificaron proteínas CHR sólo poseen un único homólogo CHR, es interesante encontrar organismos que presentan múltiples proteínas CHR. Las β -proteobacterias son el grupo taxonómico con un mayor número de homólogos CHR, ejemplo de esto son *Cupriavidus metallidurans* que posee tres LCHRs y un par de SCHR, *Burkholderia vietnamiensis* G4 posee cinco LCHRs y dos pares de SCHR, *Burkholderia xenovorans* LB400 posee cuatro LCHRs y dos pares de SCHR y *Burkholderia sp.* 383 posee dos LCHRs y dos pares de SCHR (Tabla 1) (Díaz-Pérez y col., 2007).

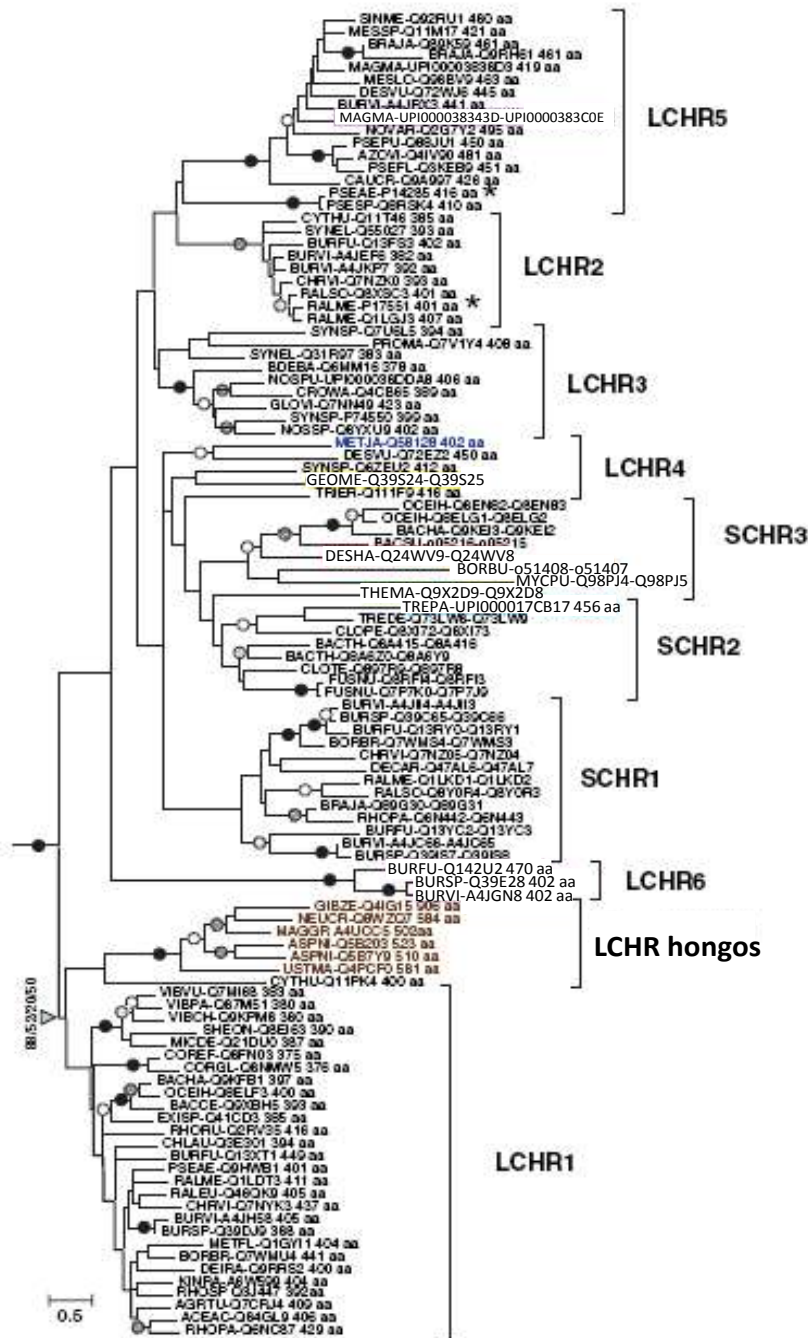


Figura 2. Análisis filogenético de las proteínas bidominio LCHR y los pares contiguos de proteínas SCHR. Los nombres de las secuencias se indican por los nombres abreviados de las especies, seguidos del número de acceso de la base de datos UniProt y del tamaño de la secuencia de la proteína (aa). Las secuencias de las proteínas de bacterias se indican en negro, de arqueas en azul y de hongos en café (Modificado de Díaz-Pérez y col., 2007).

Tabla 1. Redundancia génica en la superfamilia CHR.

LCHR ^a	Parejas SCHR ^a	Homólogos ^b	# de organismos	Organismo
1	0	1	35	-----
0	1	1	12	-----
2	0	2	6	-----
0	2	2	1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482
1	1	2	4	-----
2	1	3	2	-----
1	2	3	1	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
2	2	4	1	<i>Burkholderia</i> sp. 383
3	0	3	1	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1
3	1	4	1	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34
4	2	6	1	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400
5	2	7	1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4

^a Se indica el número de homólogos LCHR o parejas SCHR encontrados en los genomas bacterianos analizados.

^b Se muestra la suma de los homólogos LCHR y SCHR.

Luna-Luna, 2010. Modificado de Díaz-Pérez y col., 2007.

6. *Burkholderia xenovorans*

Burkholderia xenovorans [del griego adj. XENOS extranjero; L. part. pres. VORANS devorar, digerir; N. L. part. adj. XENOVORANS que digiere compuestos extraños (xenobióticos)]. Son bacilos rectos gram-negativas de 1-2 μm de largo y 0.5 μm de ancho, móviles, no esporulados, capaces de fijar nitrógeno. Las cepas crecen en agar nutritivo a 28°C. Las cepas no crecen en presencia de una concentración mayor a 1.5 % (w/v) de NaCl (Goris y col., 2004). La diversidad del género de *Burkholderia* es ejemplificada por la gran diversidad de nichos ecológicos ocupados por sus diferentes especies, que van desde suelo hasta ambientes acuosos, asociados a plantas, hongos y animales, de saprófitos a endosimbiontes, de agentes de control biológico a patógenos. Las cepas de *Burkholderia* han ganado interés por su capacidad de degradar xenobióticos, tales como compuestos aromáticos halogenados (Chain y col., 2006).

7. *Burkholderia xenovorans* LB400

Uno de los ejemplos mejor estudiados del género *Burkholderia* es la cepa de *B. xenovorans* LB400 (anteriormente *Pseudomonas* sp. LB400, *Burkholderia* sp. LB400, *B. fungorum* LB400) que fue aislada a partir de suelo contaminado con bifenilos policlorados (PCB) colectada de un vertedero en Moreau, Nueva York, EEUU (Bopp y col., 1986). Esta cepa es capaz de oxidar más de 20 congéneres de los PCB con hasta seis sustituciones cloruro en los anillos bifenilo (Seeger y col., 1995).

7.1. Genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400

Comúnmente las especies de *Burkholderia* presentan un genoma relativamente grande con multirreplicones, así como múltiples secuencias de inserción que confieren alta plasticidad genómica, lo cual explica la versatilidad del género (Lessie y col., 1996). El genoma de *B. xenovorans* LB400 tiene un tamaño de 9.73 Mpb con 9043 genes distribuidos en tres replicones, que han sido designados como cromosoma 1 (4.9 Mpb), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y megaplásmido (1.47 Mpb) (Figura 3). El replicón denominado cromosoma 1 lleva los genes que codifican a las proteínas implicadas en las funciones celulares principales (por ejemplo, maquinaria de traducción, replicación de DNA, división celular y metabolismo de nucleótidos) y se puede considerar el cromosoma central. El replicón de 3.36 Mpb fue definido como cromosoma 2 y no como megaplásmido debido a la presencia de tres operones para la síntesis de RNA ribosomales y varios genes de tRNA, así como genes que codifican a proteínas que participan en funciones celulares básicas involucradas en la replicación del DNA [DNA primasa (*dnaG*), DNA polimerasa I (*polA*)] y de metabolismo de aminoácidos. El cromosoma 2 tiene una tendencia funcional hacia metabolismo energético, metabolismo secundario, transporte y metabolismo de iones inorgánicos, aminoácidos y carbohidratos, estas funciones llevan a definir al cromosoma 2 como un replicón determinante del estilo de vida de la cepa LB400 (Chain y col., 2006). El megaplásmido, por su parte, no participa en ninguna función esencial y está ausente en otras cepas de la misma especie, este replicón posee genes que codifican a proteínas que llevan a cabo funciones altamente especializadas específicas de la cepa, por ejemplo reducción de nitrato y vías de degradación de bifenilos y benzoato. El porcentaje de GC del

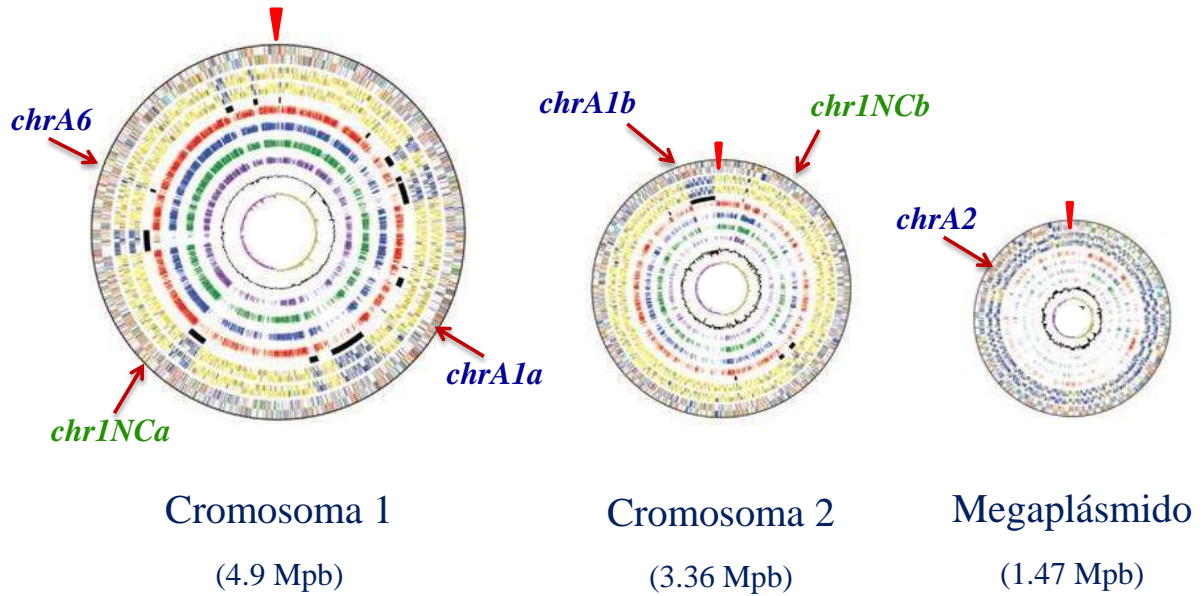


Figura 3. Localización de los genes *chr* en el genoma de *B. xenovorans* LB400. Esquema y tamaño de los tres replicones en los que se distribuye el genoma de *B. xenovorans*, denominados cromosoma 1, cromosoma 2 y megaplásmido. En flechas rojas se indica la localización de los cuatro genes *chr*, que codifican para proteínas grandes (azul), y dos pares de genes *chr*, que codifican para proteínas pequeñas (verde), en cada uno de los replicones. Modificado de Chain y col., 2006.

megaplásmido es 1% más bajo que el de los dos cromosomas el cual es del 62.7%, y junto con los patrones de porcentaje de GC y la alta proporción de secuencias de inserción, este replicón parece ser un mosaico de material genómico de origen foráneo (Chain y col., 2006).

7.2. Redundancia génica en *Burkholderia xenovorans* LB400

La redundancia génica se entiende como la presencia de múltiples genes (parálogos), que aparentemente codifican para una misma función dentro del genoma de un organismo y que posiblemente la inactivación de uno de estos genes tenga poco o ningún efecto sobre el fenotipo. La redundancia génica es resultado de eventos de duplicación de genes (Marx y col., 2004).

La redundancia génica parece estar relacionada con el tamaño de genomas bacterianos grandes. Se encontró que 1581 genes (17.6% de todos los genes) tienen un mejor alineamiento dentro del mismo genoma de *B. xenovorans* LB400 que en la base de datos con 260 genomas completos. A la fecha, éste representa el porcentaje más elevado de redundancia génica entre los genomas de bacterias de vida libre, donde el promedio de redundancia es 7.6%. La lista de parálogos en el genoma de LB400 está enriquecida en genes relacionados con el transporte (230 parálogos), transducción de señales (164 parálogos), elementos móviles (112 parálogos), proteínas de membrana (66 parálogos) y metabolismo secundario, incluyendo 120 deshidrogenasas, 32 di-oxigenasas y 13 monooxigenasas. Estos 1581 parálogos están numéricamente distribuidos de manera más o menos uniforme entre los tres replicones (≈ 500 genes por replicón). El elevado número de parálogos entre las proteínas de transporte se correlaciona con la gran proporción de genes

en LB400 dedicados a esta función (1386 genes que codifican para \approx 600 sistemas de transporte). Presenta más de 180 sistemas de expulsión, incluyendo 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 aminoácido-lactonas. Los otros 430 sistemas están involucrados en el ingreso de compuestos orgánicos, cationes inorgánicos esenciales y varios aniones (Chain y col., 2006).

Una segunda clase de proteínas con un elevado número de parálogos son las relacionadas con la transducción de señales. Se ha demostrado que el número de redes de transducción de señales aumenta de forma desproporcionada con el tamaño del genoma. *B. xenovorans* LB400 dedica el 9% de su genoma a la transducción de señales, y utiliza casi todos los dominios sensores y reguladores encontrados en la transducción de señales procariontas. Las proteínas de un componente de transducción de señales y un módulo regulatorio son el mecanismo de transducción de señal dominante en LB400, la mayoría de éstos son sistemas citoplasmáticos solubles, lo que indica que las señales ambientales son detectadas principalmente después de que se han transportado 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).

II. ANTECEDENTES

En el análisis filogenético de superfamilia CHR realizado por Díaz-Pérez y col., (2007) se encontró que las β -proteobacterias son el grupo taxonómico con un mayor número de homólogos CHR, entre ellas la cepa de *B. xenovorans* LB400, que posee en su genoma 6 homólogos CHR, cuatro homólogos de proteínas grandes (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6) y dos homólogos de proteínas pequeñas (Chr1NCa y Chr1NCb). Debido a la presencia de múltiples homólogos CHR en *B. xenovorans* LB400, León-Márquez y col., (2011) determinaron que la cepa LB400 presenta un fenotipo de resistencia a cromato en comparación con cepas de referencia como *Escherichia coli* W3110 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Figura 4). Este resultado sugirió que los homólogos CHR son los responsables de dicha resistencia, para analizarlos se clonaron y expresaron de manera individual cada uno de los genes *chr* de *B. xenovorans* en *E. coli* y se realizaron ensayos de susceptibilidad a cromato. Encontraron que todos los homólogos CHR confirieron resistencia a cromato cuando se expresan en *E. coli*, aunque de manera diferencial dependiendo de la condiciones de sulfato en el medio. Los homólogos ChrA1a, ChrA1b y Chr1NCa confirieron resistencia en condiciones de alto y bajo sulfato, mientras ChrA6 y Chr1NCb sólo confirieron resistencia en alto sulfato (Figura 5); este resultado sugirió que el sulfato pudiera regular la expresión de los genes *chr* en *E. coli*, y que esto también podría suceder en *B. xenovorans* LB400. El homólogo ChrA2 confirió resistencia a cromato en *E. coli* en condiciones de alto y bajo sulfato, pero sólo cuando se clonó en un vector de alto número de copias (pUCP20) (León-Marquez y col., 2011).

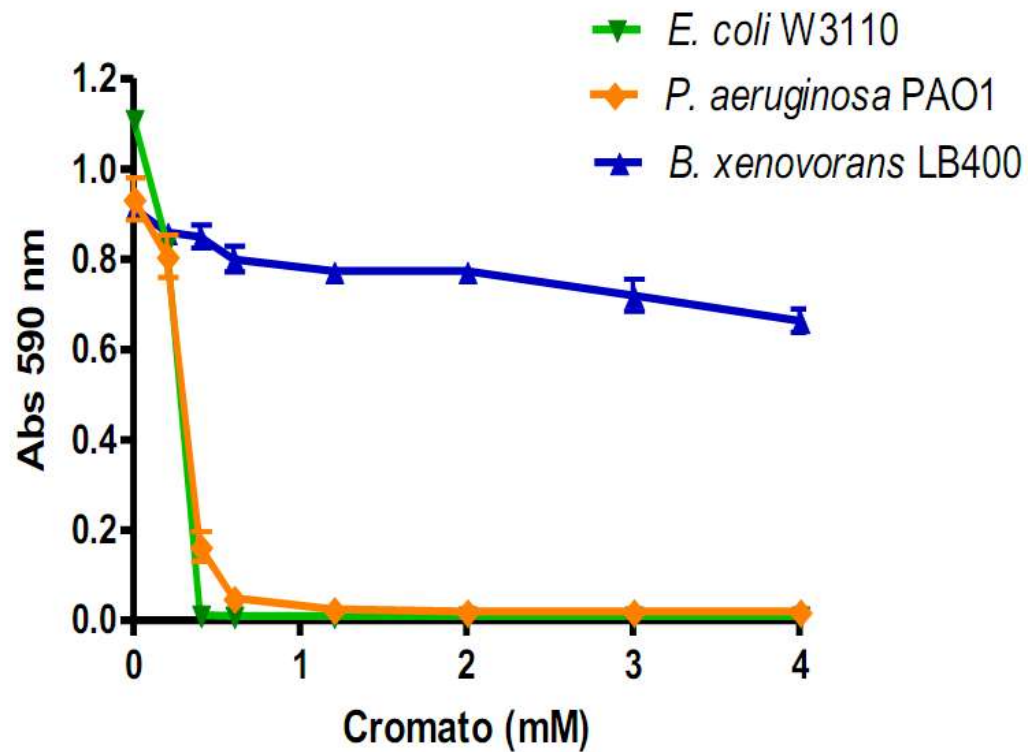
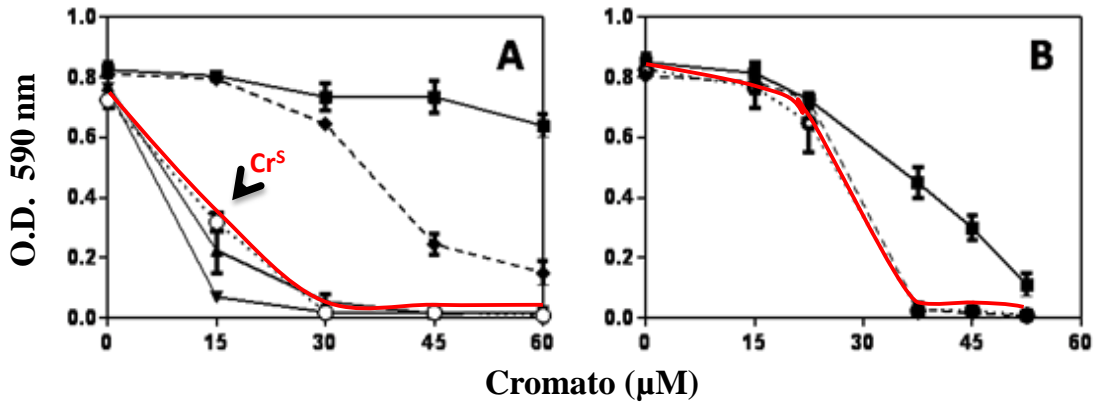


Figura 4. Susceptibilidad a cromato de *Burkholderia xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbencia a 590 nm. Como cepas de referencia se utilizó *E. coli* W3110 y *P. aeruginosa* PAO1 (Modificado de León-Márquez y col., 2011).

2 mM Sulfato



0.2 mM Sulfato

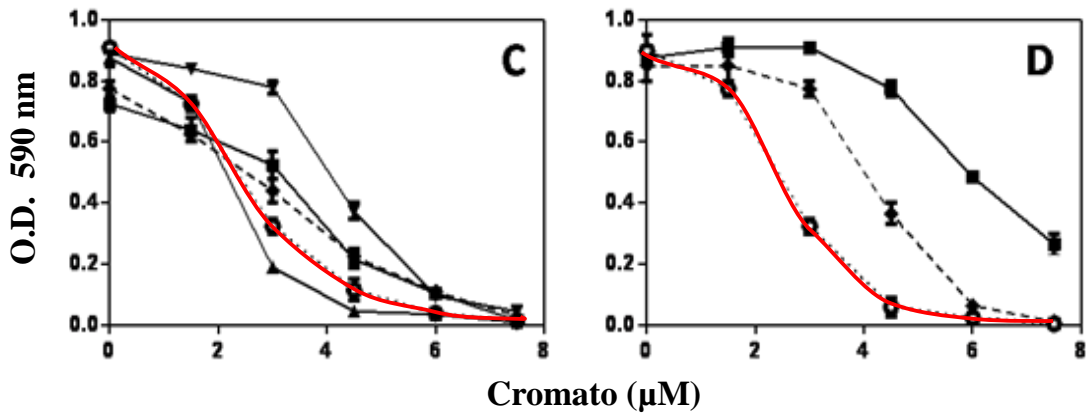


Figura 5. Susceptibilidad a cromato conferida por los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 clonados en *E. coli*. Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 con 2 mM de sulfato (A, B) o 0.2 mM de sulfato (C, D), por 18 h a 37°C, empleando las concentraciones indicadas de cromato. Se midió la absorbencia a 590 nm. A, C, *E. coli* W310 transformada con el vector pACYC184 (○, línea punteada roja), o con los plásmidos recombinantes con los homólogos de las proteínas grandes: ChrA1a (□), ChrA1b (◆), ChrA2 (▲) y ChrA6 (▼). B, D, *E. coli* transformada con el vector pACYC184 (○, línea punteada roja), o con los plásmidos recombinantes con los homólogos de las proteínas pequeñas: Chr1NCa (□) y Chr1NCb (◆) (Modificado de León-Márquez y col., 2011).

Mediante un análisis *in silico* de la región 5' de los genes *chr* del cromosoma 1 y 2 de *B. xenovorans*, se identificó que la mayoría de los genes (*chrA6*, *chrINCa* y *chrINCb*) presentan un posible promotor dependiente del factor sigma 70, mientras que los demás genes (*chrA1a* y *chrA1b*) poseen posibles promotores dependientes del factor sigma 54 (Tabla 2). Para el gen *chrA2*, localizado en el megaplásmido de *B. xenovorans* LB400 y que forma parte de un posible operón *chrBACF*, no se identificó ningún posible promotor, al parecer se expresa a partir del promotor del gen adyacente *chrB*, al cual se le identificó un posible promotor dependiente del factor sigma 70 (Tabla 2) (Salinas-Herrera, 2012). Para determinar si *chrA2* posee un promotor funcional, Salinas-Herrera (2012) analizó las posibles regiones promotoras de los genes *chrA2* y *chrB*, mediante ensayos de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* en *P. aeruginosa* PAO1. La fusión que contiene la posible región promotora del gen *chrB* (*chrB-lacZ*) presentó una alta actividad, mientras que la actividad de la fusión con la posible región promotora del gen *chrA2* (*chrA-lacZ*) fue casi nula (Figura 6). Estos resultados sugirieron que *chr2A* no posee un promotor funcional, y que se transcribe a partir del promotor corriente arriba del gen *chrB*.

En algunos organismos se ha estudiado la expresión de genes *chr*, como es el caso de *C. metallidurans* CH34 que alberga en su genoma dos determinantes de resistencia a cromato: *chr₁* localizado en el plásmido pMOL28 (genes *chrI*, *chrB₁*, *chrA₁*, *chrC*, *chrE* y *chrF₁*) y *chr₂* localizado en el cromosoma (genes *chrB₂*, *chrA₂*, y *chrF₂*), los cuales al expresarse en conjunto aumentan el nivel de resistencia a cromato. También se encontró que la expresión de los genes *chrB₁*, *chrA₁* y *chrC*, presentes en el plásmido, es inducida por cromato, además ésta se ve afectada de forma positiva por sulfato (Juhnke y col., 2002). Otro

Tabla 2. Posibles regiones promotoras de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400.

Genes <i>chr</i>	Replicón	Secuencia 5 ^a	Posición
<i>A6</i>	Cromosoma 1	TTGCCGGCCGCGTCGAATCACAAGGATGAT	32
<i>A1b</i>	Cromosoma 2	TGCAGAAATGCGGGTACCTAGCCG-TTAACA	37
<i>INCb</i>	Cromosoma 2	TTGCTCGACGCCGGTTCGGCGC--TAACCT	31
<i>BACF</i>	Megaplásmido	TAGTTACTGTTTTGTAGAGATCGCTACATC	36
Sigma 70		TTGACA-----16-18 nt-----TATAAT	
<i>A1a</i>	Cromosoma 1	CTTGCGATTGACCTGCA	65
<i>INCa</i>	Cromosoma 1	CTGGCGAACGAGCGCA	79
Sigma 54		CTGGNA-6 nt-TTGCA	

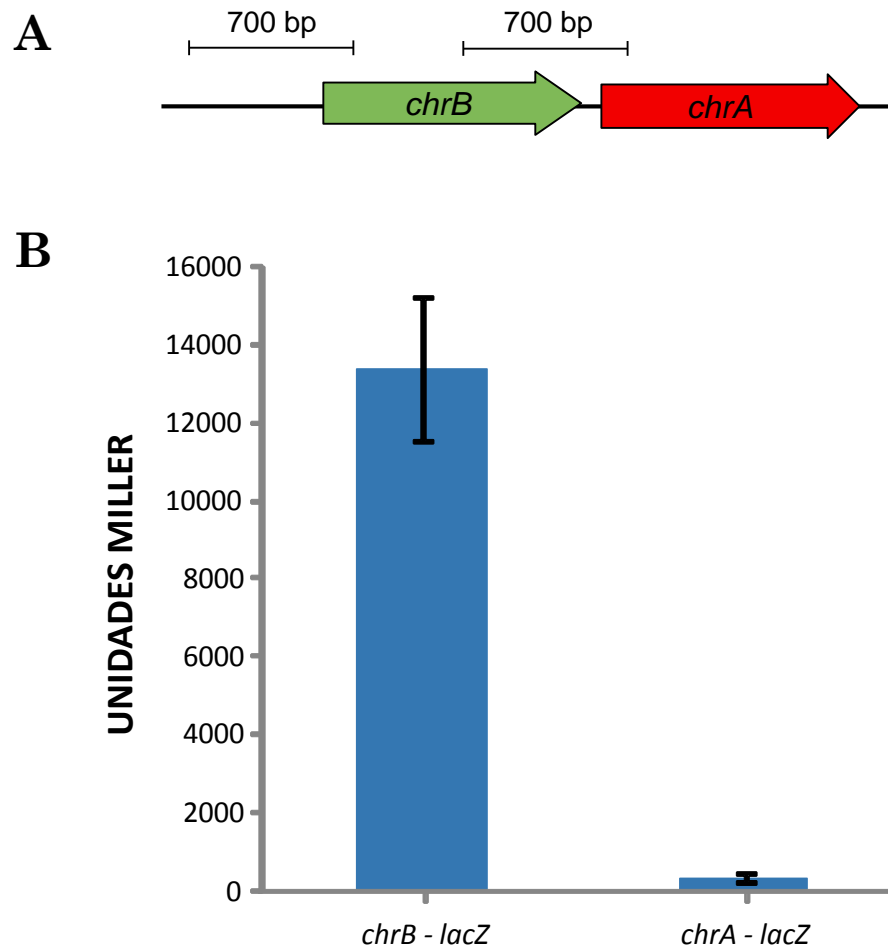


Figura 6. Actividad transcripcional del probable operón *chrA2BFC*. **A)** Las flechas representan los genes y la dirección de la transcripción. Las líneas por encima de los genes indican la ubicación y tamaños de las secuencias utilizadas para la construcción de las fusiones transcripcionales. **B)** Actividad enzimática de LacZ (expresada en Unidades Miller) obtenida a partir de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 con las fusiones indicadas. La actividad de LacZ fue medida a partir de cultivos crecidos en CN a 37°C con agitación constante por 4 h. Modificado de Salinas-Herrera, 2012.

organismo en donde se ha analizado la expresión de genes *chr* es en la bacteria *Ochrobactrum tritici* 5bv11, que puede sobrevivir en concentraciones de cromato mayores a 50 mM. En el genoma de *O. tritici* 5bv11 se identificó el transposon TnOtChr, que contiene un conjunto de genes de resistencia a cromato, *chrB*, *chrA*, *chrC* y *chrF*, localizados entre genes que codifican una transposasa y una resolvasa. Se encontró que los genes *chrB* y *chrA* son esenciales para la resistencia a cromato en *O. tritici*, no así *chrF* y *chrC*. Además se determinó que el promotor localizado río arriba de *chrB* es fuertemente inducido por cromato o dicromato, mientras que el Cr(III), agentes oxidantes, sulfato u otros oxianiones no provocaron ningún cambio en su expresión (Branco y col., 2008). En el caso de la bacteria *Arthrobacter sp.* FB24, que presenta en su genoma un determinante de resistencia a cromato que consta de ocho genes localizados en un plásmido, que incluye a *chrA*, tres genes con similitud de secuencia de nucleótidos con *chrB* y tres genes que no han sido relacionados con resistencia cromato en otras bacterias: que codifican para una oxidorreductasa, una lipoproteína y una proteína de función desconocida, se encontró que la expresión de cada uno de los genes es inducida específicamente en respuesta a cromato, pero no por plomo, peróxido de hidrógeno o arseniato (Henne y col., 2009). Esta información sugiere que los genes *chr* se expresan de manera diferencial, respondiendo a diferentes factores como lo pueden ser las condiciones de sulfato y cromato en el medio ambiente.

III. JUSTIFICACIÓN

Los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400 confieren resistencia a cromato de manera diferencial cuando se clonan en *Escherichia coli*, en función de las concentraciones de sulfato en el medio. Por lo tanto, determinar el papel de sulfato y cromato en la expresión de los genes *chr* puede ayudar a entender el significado de la presencia de genes redundantes *chr* en el genoma de *B. xenovorans*.

IV. HIPÓTESIS

Sulfato y cromato regulan la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400.

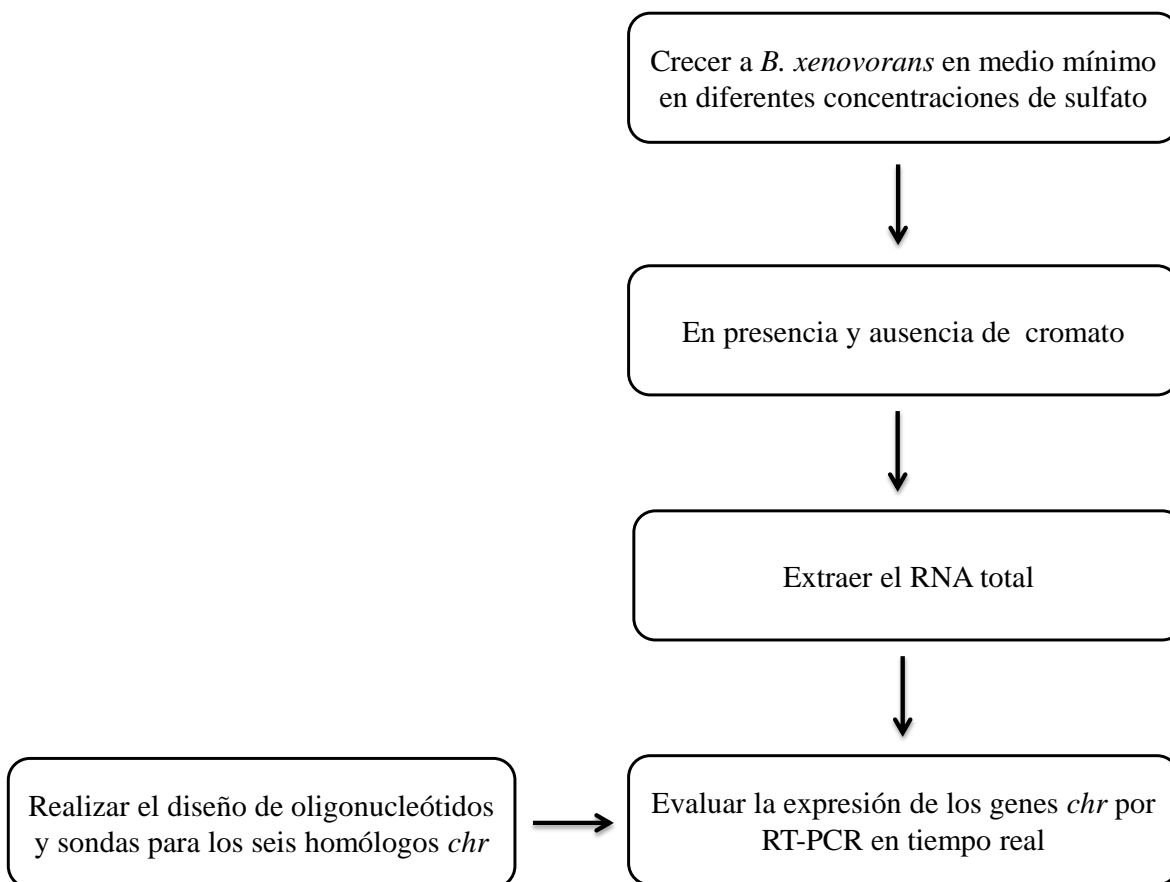
V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del sulfato y cromato en la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer los patrones de expresión de los genes *chr* en *B. xenovorans* crecida en diferentes niveles de sulfato.
2. Determinar el efecto del cromato sobre los patrones de expresión de los genes *chr* en *B. xenovorans*.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y medios de cultivo

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

- Caldo nutritivo (CN): peptona de gelatina 0.5% y extracto de carne de res 0.3%.
- Agar nutritivo (AN): al Caldo nutritivo se le agregó 1.5% de agar bacteriológico.
- Medio mínimo K1 (Goris y col., 2004): Stock K1 al 10 %, Elementos traza de Hutner 2 % y Glucosa 20 mM
 - Stock K1 (K_2HPO_4 182.5 mM, $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 25.6 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 93.47 mM, $Ca(NO_3)_2$ 0.6 mM y inositol 5 $\mu\text{g/ml}$, ácido nicotínico 4 $\mu\text{g/ml}$, biotina 5 $\mu\text{g/ml}$, riboflavina 10 $\mu\text{g/ml}$ y tiamina 10 $\mu\text{g/ml}$)
 - Elementos traza de Hutner ($MgSO_4 \times 7H_2O$ 17.1 M, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 22.6 mM, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 24H_2O$ 7.5 μM , $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0.35 mM y 5 % de 44 metales ($ZnSO_4 \times 7 H_2O$ 12.6 μM , $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 17.9 mM, $MnSO_4 \times H_2O$ 9.1 mM, $CuSO_4 \times 5 H_2O$ 0.5 mM, $Co(NO_3)_2 \times 6 H_2O$ 0.85 mM, $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$ 0.5 mM).

2. Cepa empleada

- *Burkholderia xenovorans* LB400 (Goris y col., 2004). Esta cepa fue donada por el Dr. Jesús Caballero Mellado† del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

3. Cinéticas de crecimiento

Se promovió el crecimiento de las cepas, realizando una dilución 1:50 de un cultivo crecido durante la noche a 30°C en matraces con 25 ml de medio K1m y concentraciones crecientes de sulfato (MgSO_4), en ausencia y presencia de cromato de potasio (K_2CrO_4). Los tubos se incubaron a 30°C con agitación y el crecimiento de los cultivos se registró a intervalos en función de la absorbencia a 590 nm.

4. Aislamiento de RNA

Se resuspendió el cultivo de *B. xenovorans* en 1 ml de reactivo TRI (Ambion) por cada 5×10^6 células, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente se adicionaron 150 μl de cloroformo, se mezcló bien, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionaron 500 μl de isopropanol, se agitó, se incubó 8 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 8 min y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 7500 rpm por 5 min, se removió el etanol y se secó la pastilla de RNA. Por último, se resuspendió la pastilla en 50 μl de agua libre de nucleasas. El RNA total fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) utilizando una unidad por μg de RNA. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 h. Posteriormente se adicionó 1 μl de solución de paro y se procedió a incubar a 65°C durante 5 min para inactivar la DNasa. Las muestras fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5% y se almacenaron a -70°C.

4.1. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de RNA se realizó en geles de agarosa a una concentración de 1.5 % (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal conteniendo el amortiguador adecuado. Las muestras de RNA se mezclaron con buffer de carga (Orange G, 800 µl formamida y 20 µl EDTA 20 mM) y se depositaron en los pozos del gel. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 80 voltios durante 45 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min. Las bandas teñidas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products. Inc.), y posteriormente se fotografiaron.

5. Transcripción reversa-PCR (RT-PCR) en tiempo real

5.1. Diseño de oligonucleótidos y sondas

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes *chr* y *16S rRNA* de *B. xenovorans* LB400 en la base de datos del NCBI para diseñar los oligonucleótidos a utilizar para los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Los oligonucleótidos se diseñaron siguiendo los siguientes criterios: un número de nucleótidos de 18-24 y con una T_m muy cercana entre el oligonucleótido directo y reverso. Las sondas de hibridación se diseñaron con una T_m mayor con respecto a la de los oligonucleótidos directo y reverso. Las sondas poseen un fluoróforo y un captador de fluorescencia, FAM (5-6- carboxifluoresceína) y BHQ-1 (Black Hole Quencher®), respectivamente. Para su diseño se utilizó el programa RealTimeDesignTM de Biosearch Technologies (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos y sondas para RT-PCR tiempo real.

Genes	Sondas de fusión	Oligonucleótidos (D/R) ^b	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
	Secuencia 5'FAM → BHQ-1 3' ^a	Secuencia 5' → 3'	
<i>chrA1a</i>	TCTGTCGGATGCGAACTCGCT	CGCGTTTGCTTATGGCTTCAC	78
		ACCGCCGCGATCTTCAGT	
<i>chrA6</i>	ATGTGCCGTTTCAGGCCGGTCTA	GGCCGTGTTTCGGATTGC	78
		AAGCACATGGCGGAGAATAGC	
<i>chr1NCa</i>	CGTTCTGCTCGCCACGGTGTTT	TGCCGCCTATGGTGGTGAT	91
		GCCACGCCTTCGAGAAACTC	
<i>chrA1b</i>	TCGGATTTCCAGCAACGGCCAC	TGCGCTGTTTCGTTGTGTTG	85
		GGCCTCGAATACATTGATCGTC	
<i>chr1NCb</i>	CCTGCTGGGCCTCTGCCAGTT	TGAGCGCCGACAAATTCAC	82
		ACGGCCACCGAAAGATTGATC	
<i>chrA2</i>	TTCAAGAAGTTGCCGGAGCCGA	TGCTGCCTTGCTTTGGAA	79
		GACGACCAGCCCAATCAGT	
<i>16S</i>	CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG	CCCGAAAGGGAGCCATAACAC	76
		GCGGGACTTAACCCAACATC	

^a FAM: 5-6-carboxifluoresceína; BHQ-1: Black Hole Quencher® captador de fluorescencia

^b D/R: Directo/Reverso

5.2. Amplificación

El RT-PCR en tiempo real se realizó con el RNA total (50 ng) aislado y empleando el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron las siguientes condiciones de RT-PCR en tiempo real, un ciclo a 50°C por 30 min para la síntesis de DNAc, un ciclo a 94°C por 2 min para la inhibición de la transcriptasa reversa y 45 ciclos a 95°C, 30 seg (desnaturalización), 60°C, 30 seg (alineamiento) y 68°C, 30 seg (elongación), para lo cual se empleó el termociclador Roche LightCycler 480. El equipo genera una curva de amplificación a partir de la que se obtiene el valor de C_T que es el ciclo de interacción de la curva de amplificación y el umbral de fluorescencia (Figura 7).

5.3. Curva estándar y curva de eficiencia de amplificación

A partir de una muestra de RNA total de concentración conocida, 1 mg para los genes *chr* y 1 ng para el gen *16S rRNA*, se llevaron a cabo cinco diluciones en decimales de 10. Cada una de las diluciones de RNA total se sometió a ensayo de RT-PCR en tiempo real y a partir de las curvas de amplificación obtenidas de dichas diluciones (curva estándar) se obtuvieron los valores de C_T que se graficaron contra el log de la concentración de RNA, obteniendo de esta forma la curva de eficiencia de amplificación, de la que se obtuvo el valor de la pendiente. Este valor se empleó para calcular la eficiencia de amplificación, a partir de la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Donde E es la eficiencia de amplificación y m es el valor de la pendiente.

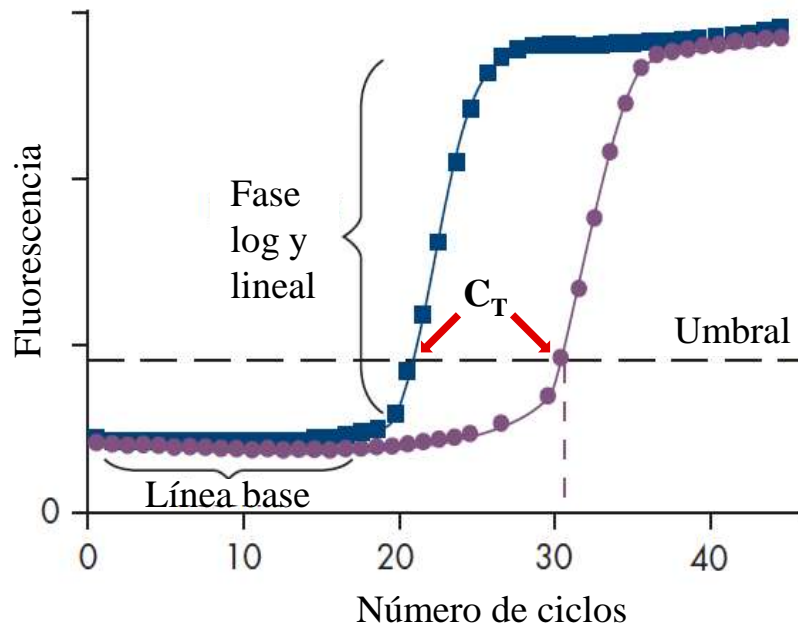


Figura 7. Curva de amplificación. Evaluación del nivel expresión de dos genes. Gen con mayor (Línea azul) y menor (Línea morada) número de copias de RNAm. Línea basal: no existen cambios detectables de fluorescencia. Umbral: cambio detectable de fluorescencia. En flechas rojas se indica el C_T : ciclo en el que se supera el umbral para cada una de las muestras (Tomado de Real Time PCR, 2010).

5.4. Cuantificación relativa

Para determinar la expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans*, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{16S})^{C_T 16S}}{(E_{chr})^{C_T chr}}$$

Donde, E_{16S} o chr es la eficiencia de amplificación del gen normalizador *16S rRNA* o de los genes blanco *chr* (*chrA1a*, *chrA6*, *chrINCa*, *chrA1b*, *chrINCb* o *chrA2*) y $C_T 16S$ o chr es el ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia del gen normalizador *16S rRNA* o de los genes blanco *chr* (Modificado de Pfaffl y col., 2001)

6. RT-PCR

6.1. Diseño de oligonucleótidos

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes *chrBACF* de *B. xenovorans* LB400 en la base de datos del NCBI para diseñar los oligonucleótidos que se utilizaron para los ensayos de RT-PCR semicuantitativo. Los oligonucleótidos se diseñaron con los siguientes criterios: un número de nucleótidos de 20-22, con un porcentaje de G-C muy cercano entre el oligonucleótido directo y reverso. Para su diseño se utilizó el programa RealTimeDesign™ de Biosearch Technologies (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos para RT-PCR.

Genes	Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
<i>chrB-chrA2</i>	chrBA2-D	CCATGGTGCATGCGCTCGAC	374
	chrBA2-R	AGTCGCGATCCATGTAGCCGG	
<i>chrA2-chrC</i>	chrA2C-D	CGGAGCCGTGGTAGTTATCGGG	334
	chrA2C-R	GCGCCGGTGTAGTTATTCGCG	
<i>chrC-chrF</i>	chrCF-D	CCCGTCCTTGTGTATTGCGTGC	280
	chrCF-R	GTTGGCGGTTTTTCAGCACCTCG	

6.2. Amplificación

El RT-PCR se realizó con el RNA total y con el Kit Access RT-PCR System (Promega) de un solo paso, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron las siguientes condiciones para el ensayo de RT-PCR, un ciclo a 50°C por 30 min para la síntesis de DNAc, un ciclo a 94°C por 2 min para la inhibición de la transcriptasa reversa y 35 ciclos a 95°C, 30 seg (desnaturalización), 60°C, 30 seg (alineamiento) y 62°C, 30 seg (elongación). Los productos del RT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) y se sometió a un corrimiento electroforético a un voltaje constante de 125 voltios durante 30 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min. Las bandas teñidas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products. Inc.), y posteriormente se fotografiaron.

IX. RESULTADOS

1. Condiciones para el análisis de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400.

1.1. Modificación del medio de cultivo K1

Uno de los factores a analizar fue el efecto del sulfato sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*. Como el medio de cultivo K1, que se emplea para promover el crecimiento de esta cepa, presenta un exceso de sulfato (5 mM), fue necesario; la modificación del este medio sustituyendo las fuentes de sulfato. El MgSO₄ se empleó para regular la concentración de sulfato en el medio, por su correspondiente cloruro, a este medio se le denominó K1modificado (K1m).

1.2. Determinación de las concentraciones de sulfato

Con el fin de determinar el requerimiento mínimo de sulfato para el crecimiento óptimo de *B. xenovorans* LB400, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento (como se describe en Materiales y Métodos) en los medios K1 y K1m adicionado con concentraciones crecientes de 0 a 50 µM de sulfato. En el medio K1m adicionado con concentraciones de 0 a 40 µM de sulfato la cepa de *B. xenovorans* presentó un crecimiento disminuido en comparación con el observado en el medio K1, sin embargo, el crecimiento de la cepa LB400 en el medio con 50 µM de sulfato fue similar al observado en el medio K1 (Figura 8, panel A), así como los tiempos de generación (Tg), los cuales fueron de 3.8 ± 0.09 y 3.74 ± 0.07 h, respectivamente. Por lo que se estableció que 50 µM de MgSO₄ es la concentración mínima de sulfato que permite un crecimiento óptimo de *B. xenovorans*. También se realizaron cinéticas de crecimiento empleando concentraciones excesivas de sulfato de 200 y 800 µM

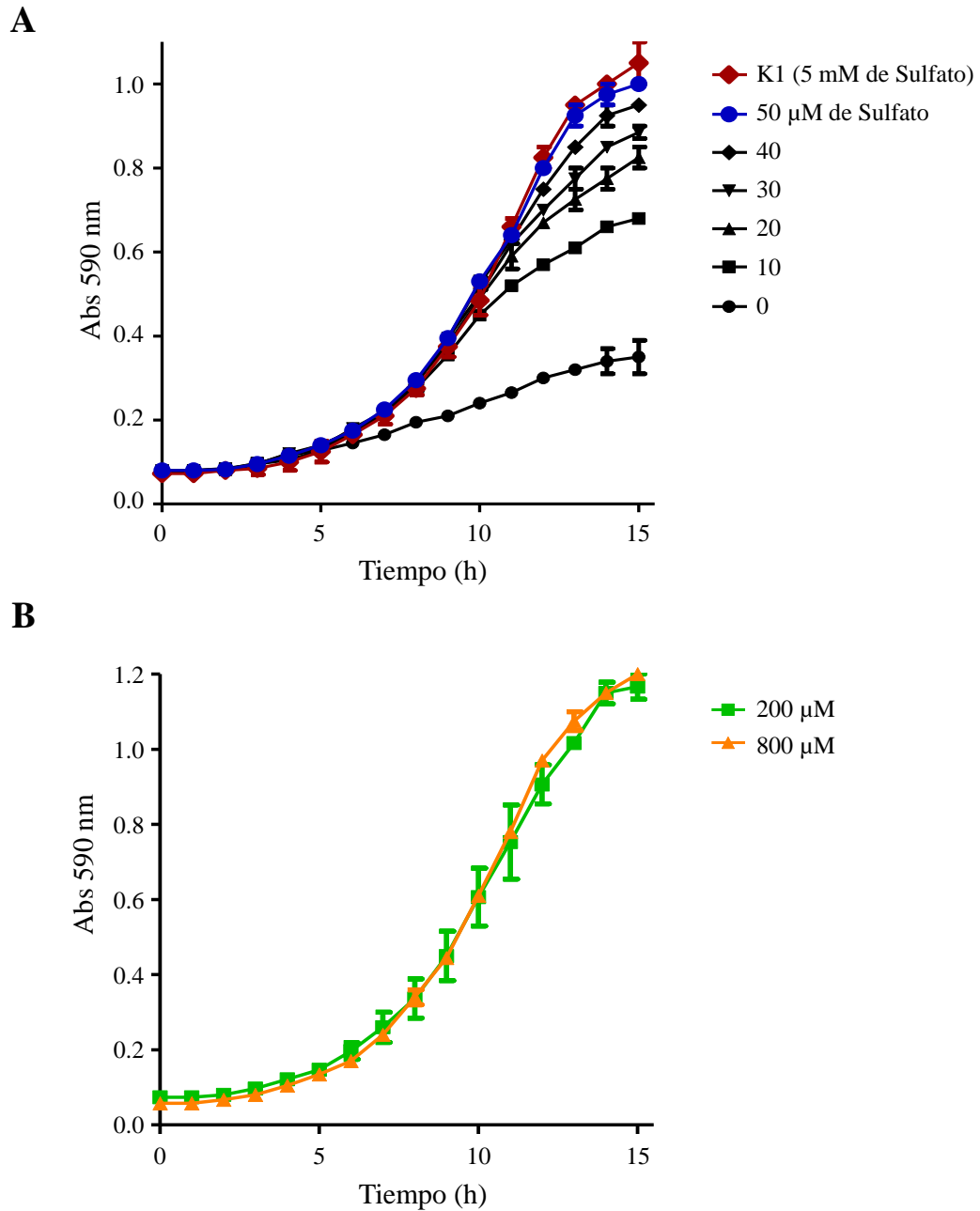


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m a las concentraciones de sulfato indicadas a 30°C. **A)** Requerimiento mínimo de sulfato **B)** Condiciones de excesos de sulfato.

donde se obtuvieron Tg de 3.7 ± 0.13 y 3.66 ± 0.25 h, respectivamente (Figura 8, panel B), los cuales son similares al obtenido en el medio K1 ya mencionado. Por lo tanto 50, 200 y 800 μM de sulfato, se eligieron como las condiciones de sulfato en las que se llevaron a cabo los análisis de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*.

1.3. Determinación de la concentración subinhibitoria de cromato

Para determinar la concentración máxima de cromato que no afecte el crecimiento (concentración subinhibitoria de cromato) de *B. xenovorans* LB400, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en las diferentes concentraciones de sulfato (50, 200 y 800 μM) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de cromato. La cepa LB400 en el medio con 50 μM de sulfato en presencia de 2 μM de cromato presentó un crecimiento similar al que se observó en ausencia de cromato, con un Tg de 3.89 ± 0.15 h, y en presencia de concentraciones mayores de 4 a 20 μM cromato, se observó una disminución en su crecimiento (Figura 9, panel A). En el medio con 200 μM de sulfato en presencia de 8 μM de cromato, *B. xenovorans* mostró un crecimiento similar que en ausencia de cromato, con un Tg de 3.71 ± 0.18 , mientras que ante una exposición a concentraciones mayores de 12 y 16 μM de cromato, se observó una disminución en su crecimiento (Figura 9, panel B). Y en el medio con 800 μM de sulfato con 16 μM de cromato, *B. xenovorans* presentó un crecimiento similar que en ausencia de cromato, con un Tg de 3.68 ± 0.14 (Figura 9, panel C), pero en presencia de concentraciones de 24 y 32 μM de cromato, se presentó una disminución en su crecimiento. Los Tg obtenidos en presencia de concentraciones de cromato, que no generaron efectos negativos sobre el crecimiento de *B. xenovorans*, fueron similares a los valores obtenidos en ausencia de cromato, antes mencionados. Por lo que se

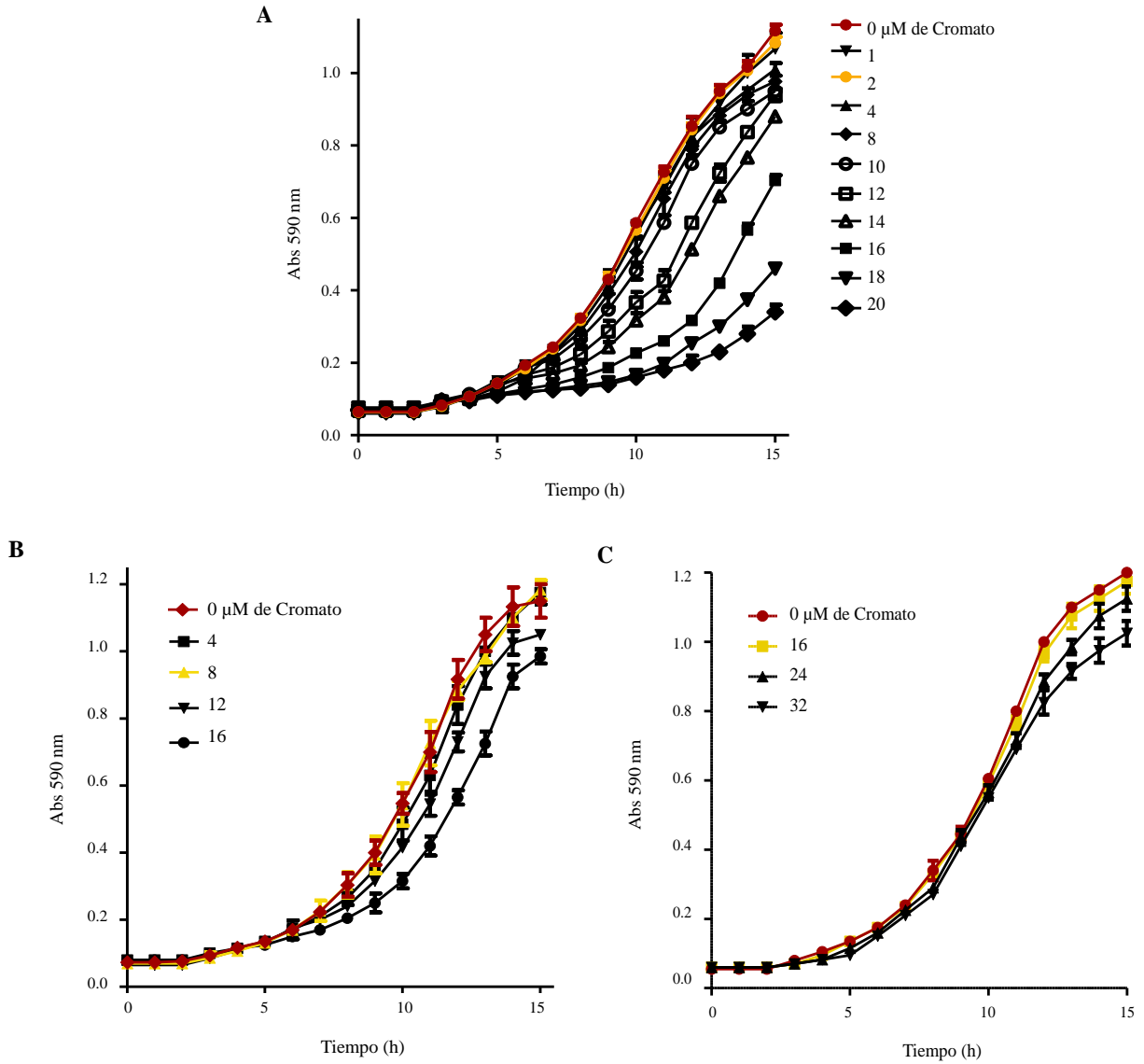


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *B. xenovorans* LB400. Se crecieron los cultivos en medio K1m en ausencia y presencia de las concentraciones de cromato indicadas a 30°C. **A)** En un requerimiento mínimo de sulfato (50 μM) y en excesos de sulfato. **B)** 200 μM y **C)** 800 μM .

consideró que en el medio K1m con 50, 200 y 800 μM de sulfato, 2, 8 y 16 μM son las concentraciones subinhibitorias de cromato, respectivamente.

2 Estandarización del RT-PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*.

2.1. Eficiencia de amplificación

Con la finalidad de determinar la eficiencia de amplificación de la reacción de RT-PCR para cada una de las parejas de oligonucleótidos de los genes *chr* y del gen normalizador *16S rRNA*, se llevaron a cabo curvas estándar, en las que partir de una muestra de RNA de concentración conocida se llevaron a cabo cinco diluciones seriadas 1:10 y se sometieron a reacción de RT-PCR en tiempo real. En la figura 10, panel A, se muestra la curva estándar obtenida para el gen *16S rRNA*, en la que se observa que al aumentar la dilución de RNA total, se requieren un mayor número de ciclos de amplificación, para superar el umbral de fluorescencia. A partir de los valores de C_T de la curva estándar, se construyó la curva de eficiencia de amplificación (Figura 10, panel B), la recta obtenida presentó una pendiente de -3.46; con este valor se calculó la eficiencia de amplificación para el gen *16S rRNA* (como se describe en materiales y métodos), la cual fue del 94.1 %. De igual manera se llevaron a cabo curvas estándar y curvas de eficiencia de amplificación para el resto de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400, los cuales presentaron rectas con pendientes de -3.8755 a -3.334 y se obtuvieron eficiencias de amplificación de entre 81.1 y 99.2 % (Figura 11 y Tabla 5).

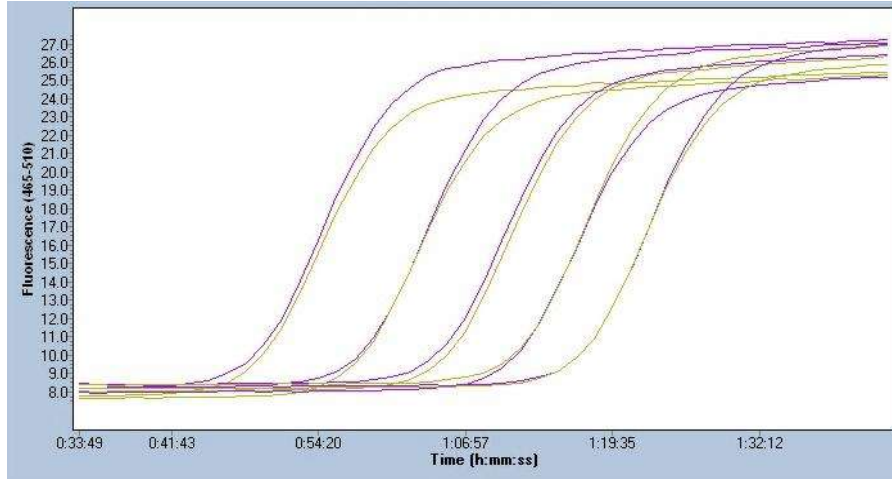
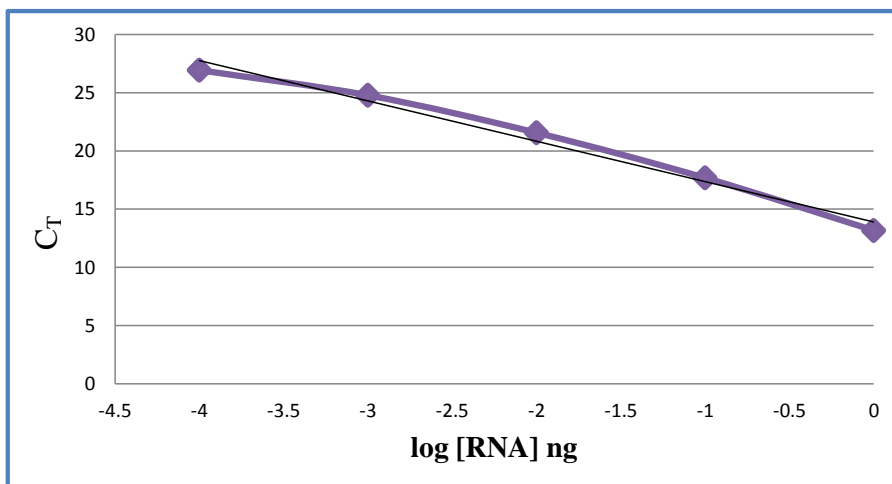
A**B**

Figura 10. Eficiencia de amplificación del gen *16S rRNA* de *B. xenovorans* LB400. Se llevaron a cabo curvas de amplificación por RT-PCR en tiempo real, empleando una serie de diluciones a partir de RNA de 10 ng. Los valores de C_T obtenidos de dichas curvas se graficaron contra el log de la concentración de RNA. A) Curva estándar y B) Curva de eficiencia de amplificación para el gen *16S rRNA*. Los valores son el promedio de un duplicado.

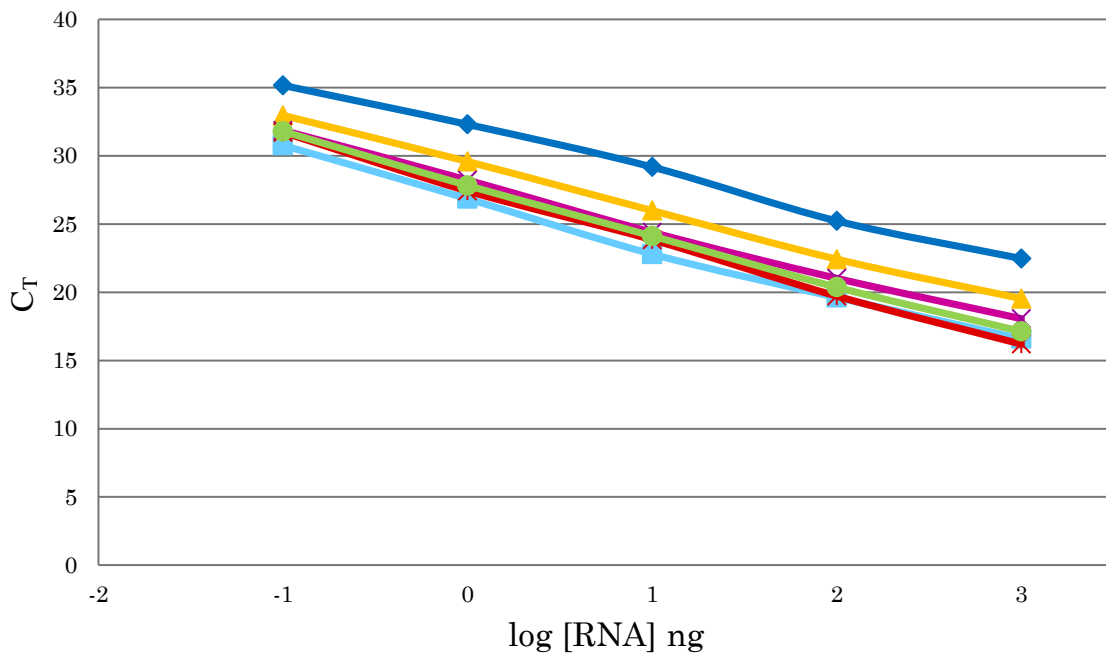


Figura 11. Curvas de eficiencia de amplificación de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400. Se llevaron a cabo curvas de amplificación por RT-PCR en tiempo real, empleando diluciones en decimales de 10 partiendo de una muestra de RNA de 1 μ g. Los valores de C_T obtenidos de dichas curvas se graficaron contra el log de la concentración de RNA. *A1a* (azul marino), *A6* (azul cielo), *INCa* (amarillo), *A1b* (rosa), *INCb* (rojo) y *A2* (verde). Los valores son el promedio de un duplicado.

Tabla 5. Eficiencia de amplificación de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400.

Genes <i>chr</i>	Eficiencia	% Eficiencia
<i>1a</i>	1.992	99.2
<i>A6</i>	1.91	91.0
<i>INCa</i>	1.995	99.5
<i>1b</i>	1.833	83.3
<i>INCb</i>	1.811	81.1
<i>A2</i>	1.887	88.7

La eficiencia de amplificación fue calculada como se indica en Materiales y Métodos.

2.2. Expresión del gen 16S *rRNA*

Una de las características de un buen gen normalizador es que su expresión se mantenga relativamente constitutiva en las diferentes condiciones de crecimiento en las que se analizarán los genes blanco (genes *chr*). Para determinar si esta característica la cumplía el gen *16S rRNA*, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de RNA total obtenido de cultivos de *B. xenovorans* crecidos en diferentes condiciones. El gen *16S rRNA* mostró niveles de expresión similares en todas las condiciones de crecimiento analizadas (Figura 12), lo que indica dicho gen presenta una expresión relativamente constitutiva, por lo tanto se concluyó que el gen *16S rRNA* puede ser usado como normalizador para el análisis de la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*.

3. Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400

3.1. Expresión de los genes *chr* en la fase exponencial

Para evaluar el patrón de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir de RNA total obtenido de cultivos crecidos a fase exponencial (D.O. de 0.6 nm) en diferentes condiciones de crecimiento. El nivel de expresión del gen *16S rRNA* se empleó como normalizador para evaluar la expresión de los genes *chr*.

3.1.1. Regulación de la expresión de los genes *chr* por sulfato

Con la finalidad de determinar si el sulfato tiene un efecto sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, se evaluó su expresión en diferentes condiciones de sulfato. Primeramente, en la concentración mínima de sulfato que permite un crecimiento óptimo (50 μ M) y en excesos de sulfato 200, 800 y 2000 μ M. Los genes *chr* de los cromosomas 1

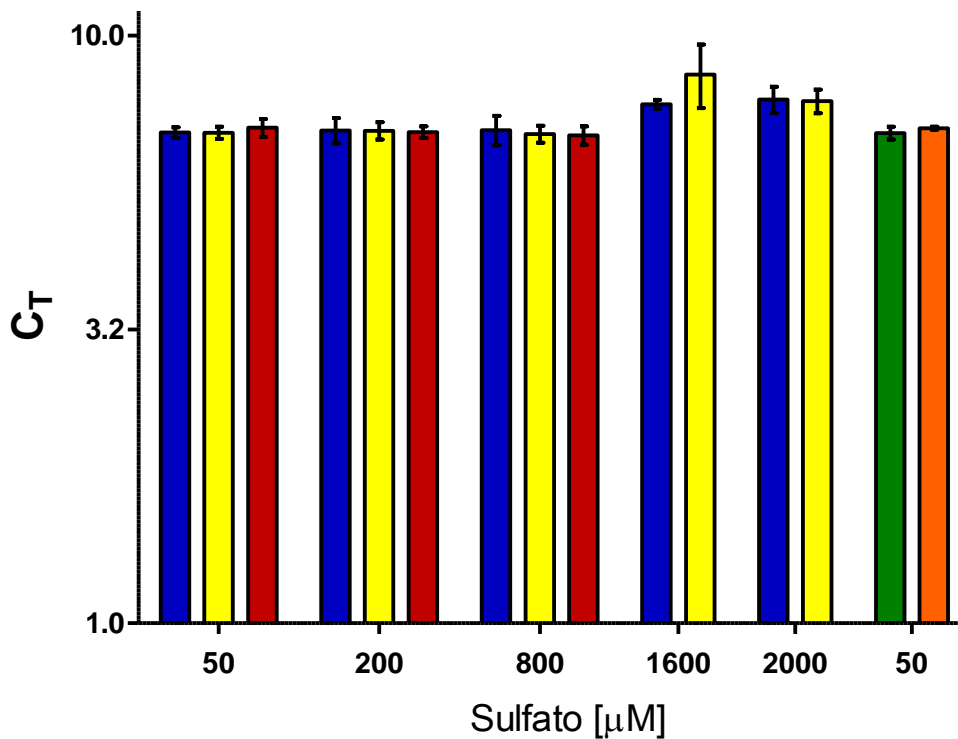


Figura 12. Expresión relativa del gen *16S rRNA*. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una densidad óptica (D.O.) de 0.6 (fase exponencial), con las concentraciones que se indican de sulfato en ausencia (barras azules) y presencia de cromato; exposición continua (barras amarillas) y exposición limitada (barras rojas). Para las concentraciones de sulfato 50, 200, 800, 1600 y 2000 μM se emplearon concentraciones de cromato 2, 8, 16, 32 y 40 μM , respectivamente. Por otra parte, se crecieron cultivos a una D.O. de 1.1 (fase estacionaria), en 50 μM de sulfato en ausencia (barra verde) y presencia de 2 μM de cromato (barra naranja). (n=3) Se muestran las barras de desviación estándar.

y 2 (*Ia*, *A6*, *INCa*, *Ib* y *INCb*) no presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión en las diferentes condiciones de sulfato (Figura 13 y 14, barras azules), por lo que se concluyó que el sulfato no tiene ningún efecto sobre la expresión de estos genes. La expresión del gen *chrA2*, ubicado en el megaplásmido, se evaluó en las condiciones de sulfato ya mencionadas, además de una concentración adicional de 1600 μM de sulfato. *chrA2* presentó una ligera disminución (tres veces) en su nivel de expresión en 200 y 800 μM sulfato con respecto a 50 μM , pero este efecto se perdió a concentraciones mayores de 1600 y 2000 μM de sulfato, donde su nivel de expresión fue similar al observado en 50 μM de sulfato, por lo que probablemente el sulfato tiene un moderado papel dual sobre la expresión del gen *chrA2* (Figura 15, barras azules).

Ya que de manera individual es complicado comparar los niveles de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* entre sí, porque cada uno se graficó bajo una escala diferente, en la figura 16 se graficaron la expresión de los genes *chr* bajo una misma escala ($\times 10^{-6}$). Al comparar los niveles de expresión entre los genes *chr* de *B. xenovorans*, se observa que éstos presentan diferentes niveles de expresión entre sí; los genes *chr* localizados en el cromosoma 1, *chrA1a* y *chrINCa*, presentaron niveles bajos de expresión de 0.2 y 0.6, respectivamente; los genes *chrA6*, localizado en el cromosoma 1, y *chrA2*, ubicado en el megaplásmido, mostraron niveles moderados de expresión de 46 y 19, respectivamente; finalmente, los genes *chr* localizados en el cromosoma 2, *chrA1b* y *chrINCb*, presentaron niveles de expresión altos de 94 y 113, respectivamente (Figura 16, barras azules). Con estos resultados se concluye que los genes *chr* de *B. xenovorans* se expresan de manera diferencial entre sí.

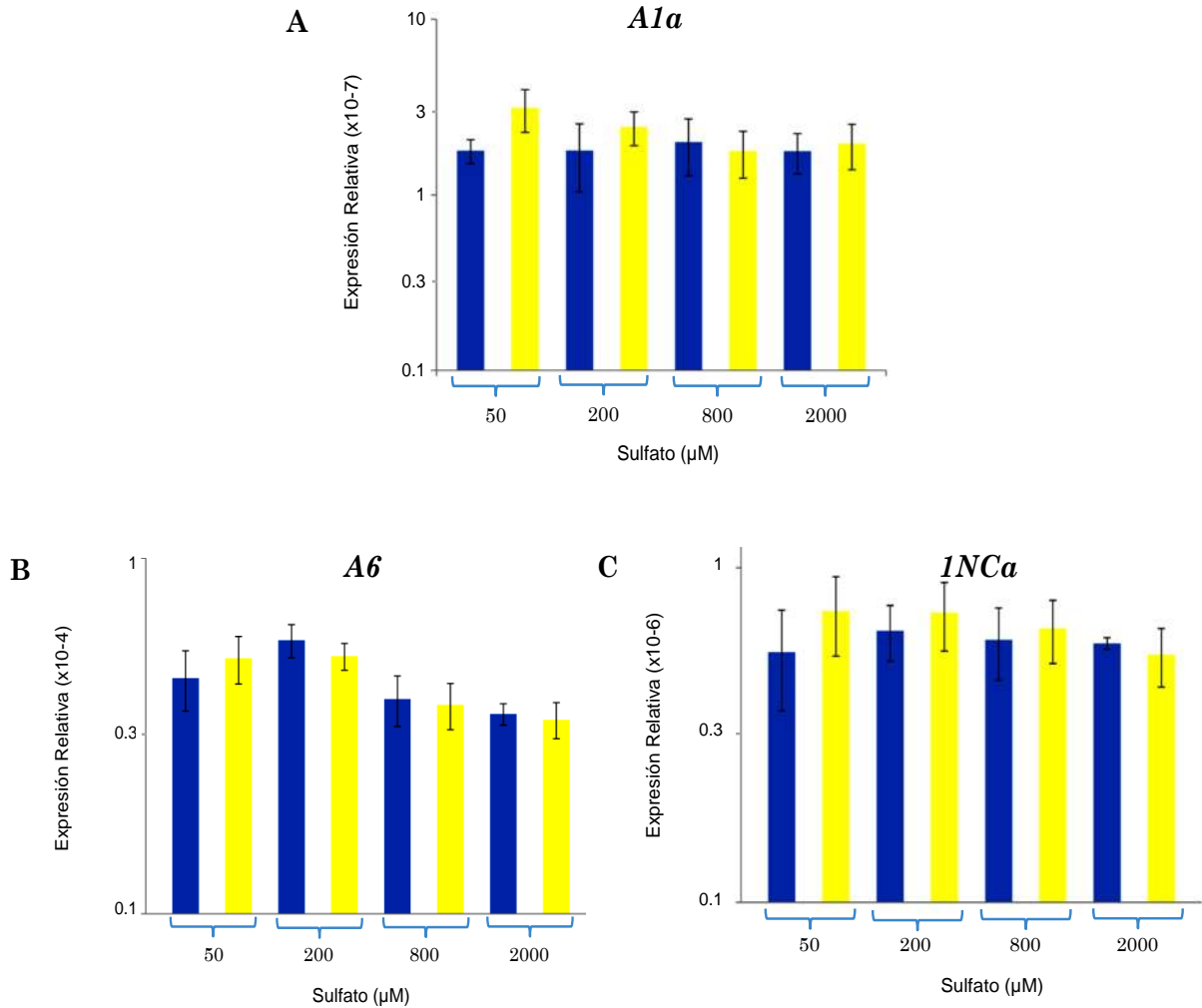


Figura 13. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* del cromosoma 1. A) *chrA1a*, B) *chrA6* y C) *chr1NCa*. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una D.O. de 0.6, a las concentraciones de sulfato que se indican, en ausencia (barras azules) y presencia de cromato (barras amarillas). Para cada concentración de sulfato 50, 200, 800 y 2000 μM se empleó una concentración de 2, 8, 16 y 40 μM de cromato, respectivamente. La expresión del gen *16S rRNA* se usó como normalizador. (n=3) Se muestran la barras de desviación estándar.

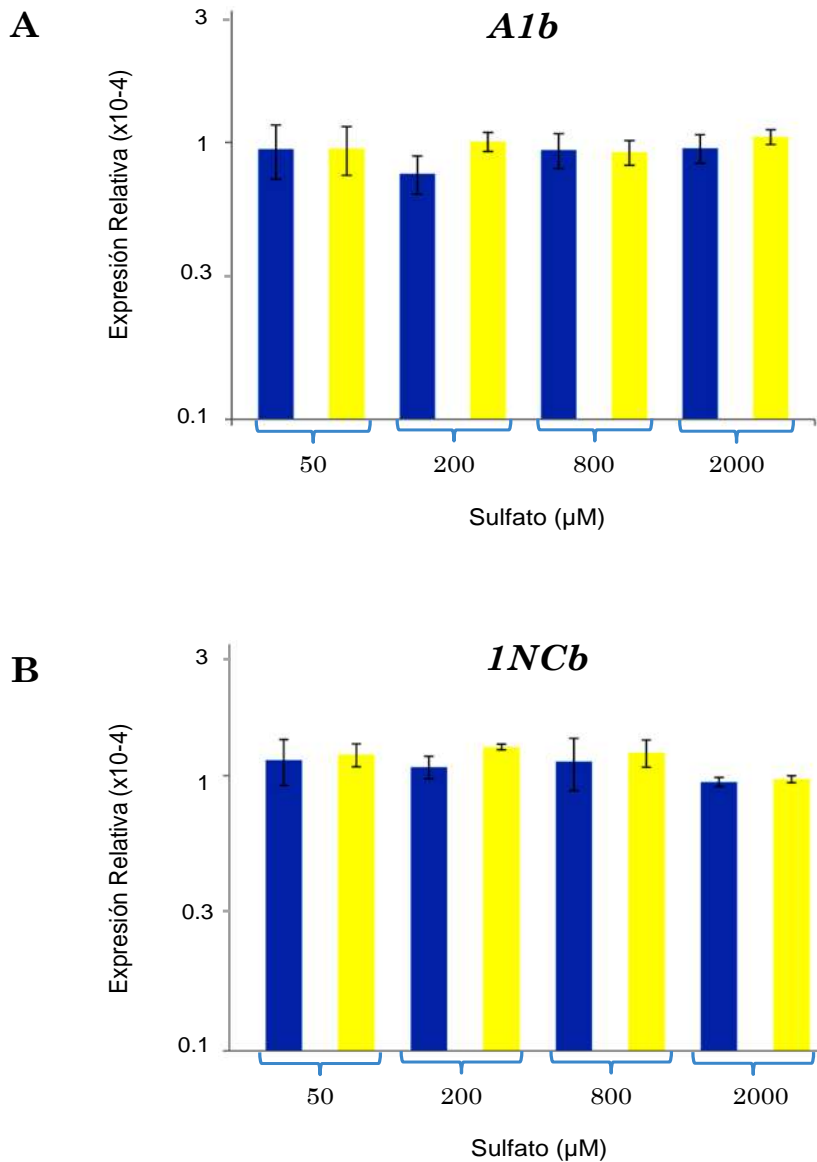


Figura 14. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* del cromosoma 2. A) *chrA1b*, y B) *chrINCb*. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una D.O. de 0.6, a las concentraciones de sulfato que se indican, en ausencia (barras azules) y presencia de cromato (barras amarillas). Para cada concentración de sulfato 50, 200, 800 y 2000 μM se empleó una concentración de 2, 8, 16 y 40 μM de cromato, respectivamente. La expresión del gen *16S rRNA* se usó como normalizador. (n=3) Se muestran las barras de desviación estándar.

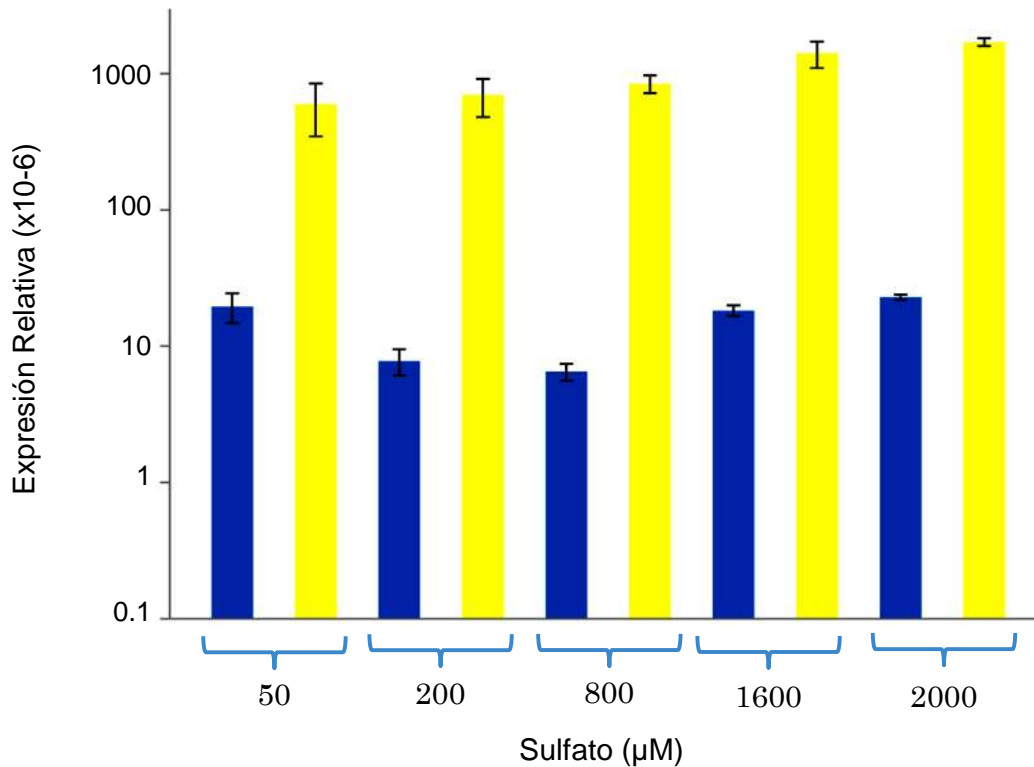


Figura 15. Expresión relativa del gen *chrA2* de *B. xenovorans* del megaplásmido. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una D.O. de 0.6, a las concentraciones de sulfato que se indican, en ausencia (barras azules) y presencia de cromato (barras amarillas). Para cada concentración de sulfato 50, 200, 800, 1600 y 2000 µM se empleó una concentración de 2, 8, 16, 32 y 40 µM de cromato, respectivamente. La expresión del gen *16S rRNA* se usó como normalizador. (n=3) Se muestran las barras de desviación estándar.

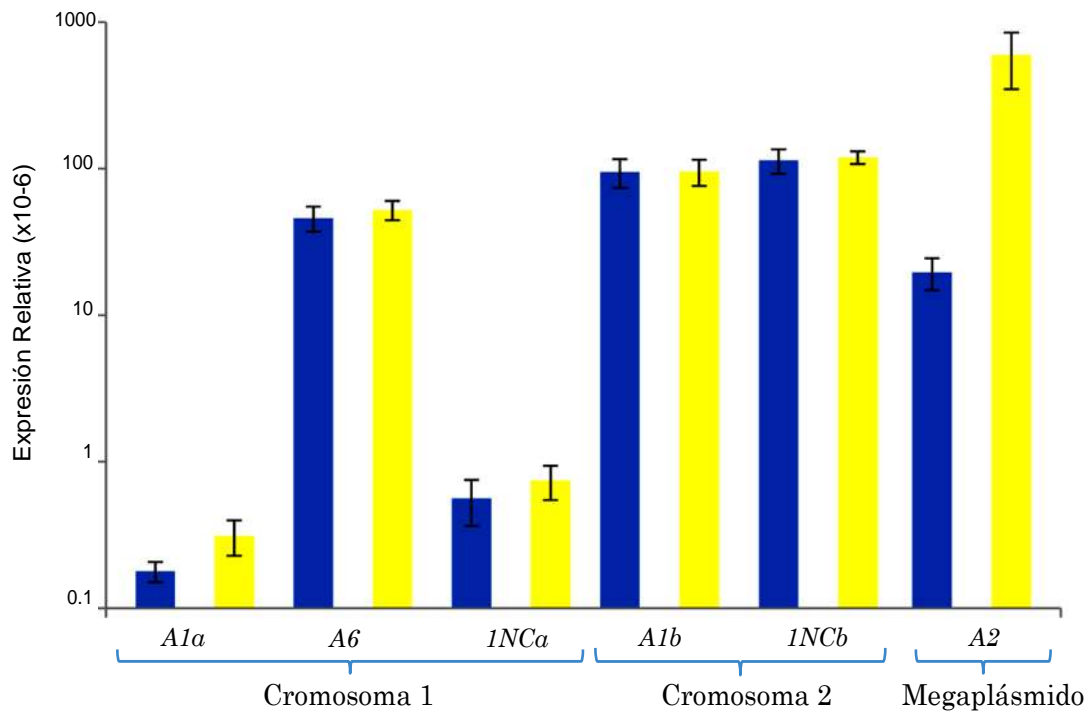


Figura 16. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* durante la fase exponencial. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una D.O. de 0.6, en 50 μM de sulfato en ausencia (barras azules) y presencia de 2 μM de cromato (barras amarillas). En el eje de las X se indican los genes *chr* y su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*. La expresión del gen *16S rRNA* se usó como normalizador. (n = 3) Se muestran las barras de desviación estándar.

3.1.2. Efecto del cromato sobre la expresión de los genes *chr*

Para determinar si el cromato tiene un efecto sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, se evaluó la expresión de dichos genes *chr* en las diferentes concentraciones de sulfato 50, 200, 800, 1600 y 2000 μM , en presencia de concentraciones subinhibitorias de cromato, 2, 8, 16, 32 y 40 μM , respectivamente. Con la finalidad de determinar si el tiempo de exposición a cromato tenía un efecto sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, la presencia de cromato se evaluó en dos condiciones. Exposición continua en la cual, el cultivo se sometió a cromato desde tiempo cero, y exposición limitada, donde el cultivo se sometió a cromato por un tiempo de 30 minutos. El nivel de expresión de los genes *chr* fue similar en ambas formas de exposición (datos no presentados), por lo que en lo sucesivo se omitirán los resultados de expresión ante una exposición limitada. Los genes *chr* del cromosoma 1 y 2 de *B. xenovorans* (*chrA1a*, *chrA6*, *chrINCa*, *chr1b* y *chrAINCb*) no presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión en presencia de cromato (Figura 13 y 14, barras amarillas), por lo que se concluyó que el cromato no tiene ningún efecto sobre la expresión de los genes *chr* del cromosoma 1 y 2 de *B. xenovorans*. En contraste, el gen *chrA2* ubicado en el megaplásmido aumentó su nivel de expresión de 30 a 130 veces en presencia de cromato (Figura 15, barras amarillas), lo que indica que el gen *chrA2* responde a la presencia de cromato.

3.2. Expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* en la fase estacionaria del crecimiento

Para determinar el efecto que tiene la fase crecimiento sobre la expresión de los genes *chr* se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir de cultivos crecidos en medio mínimo con 50 μ M de sulfato, a fase estacionaria (D.O. de 1.1), en presencia y ausencia de cromato. Durante la fase estacionaria de crecimiento los genes *chr* presentaron el siguiente patrón; los genes *chrA1a* y *chrINCa* presentaron niveles de expresión bajos de 0.03 y 0.12, respectivamente; los genes *chrA6* y *chrA2* mostraron niveles moderados de 7.6 y 16, respectivamente; y los genes *chrA1b* y *chrINCb* presentaron niveles altos de 41 y 23, respectivamente (Figura 17, barras verdes). En presencia de cromato la mayoría de los genes *chr* no presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión, a excepción del gen *chrA2* que presentó un aumento significativo en su nivel de expresión de alrededor de 50 veces en presencia de cromato (Figura 17, barras naranjas). Al comparar el nivel de expresión de los genes *chr* durante la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial, se observó que a excepción del gen *chrA2*, el cual mantuvo un nivel de expresión similar al observado en la fase exponencial, el resto de los genes *chr* presentaron una disminución de 2.3-6.7 veces en su nivel de expresión (Figura 18), por lo que la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* parece ser moderadamente dependiente de la fase de crecimiento

4. Expresión de los genes *chrBACF* de *B. xenovorans* LB400

Para determinar si los genes *chrBACF* de *B. xenovorans* LB400 localizados en el megaplásmido se expresan a través de un RNA policistrónico, formando un operón, se

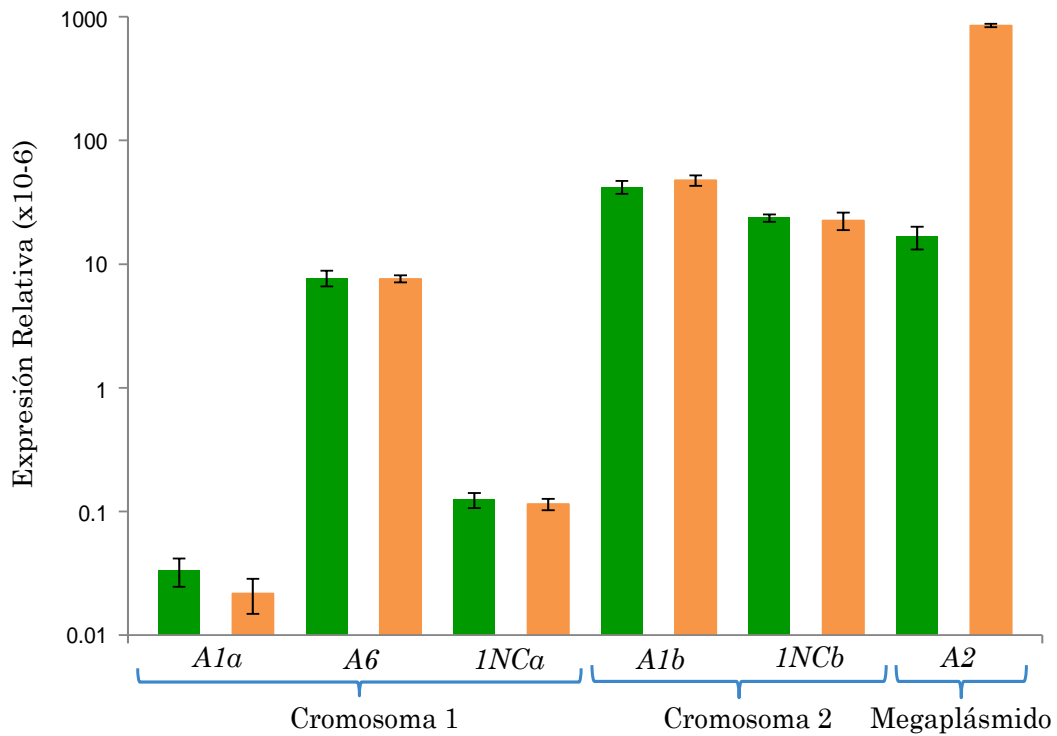


Figura 17. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* durante la fase estacionaria. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una D.O. de 1.1, en 50 μM de sulfato en ausencia (barras verdes) y presencia de 2 μM de cromato (barras naranjas). En el eje de las X se indican los genes *chr* y su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*. La expresión del gen *16S rRNA* se usó como normalizador. (n = 3) Se muestran las barras de desviación estándar.

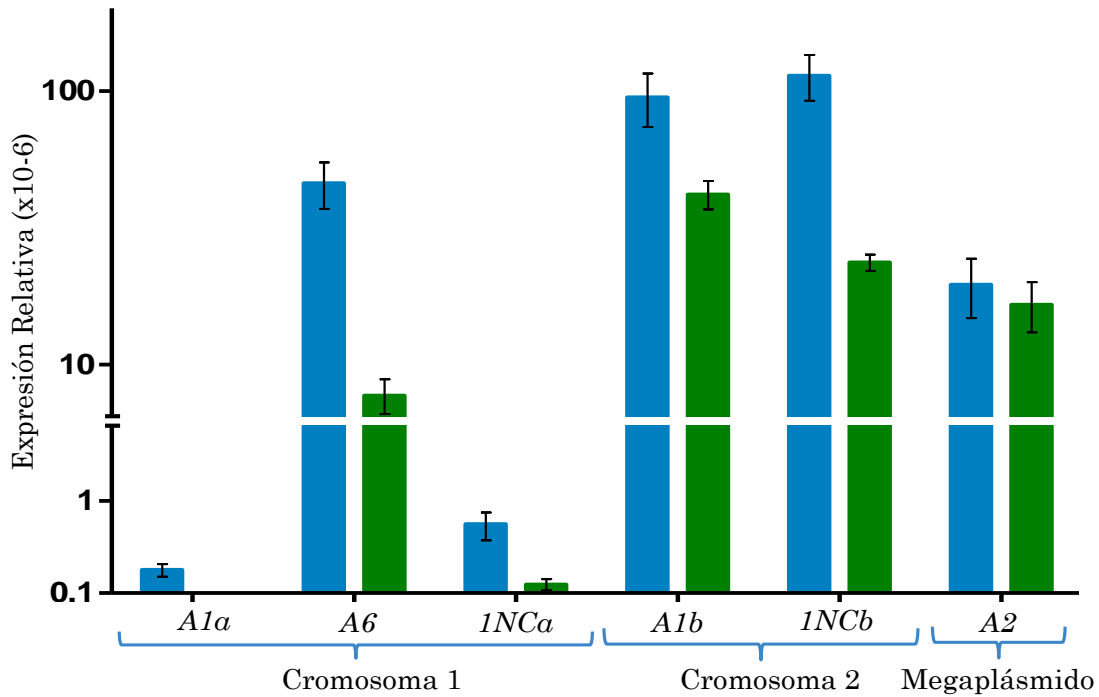


Figura 18. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* durante las fase crecimiento. Se crecieron los cultivos en medio K1m con 50 μ M de sulfato a una fase exponencial, D.O. de 0.6 (barras verdes) o fase estacionarias, D.O. de 1.1 (barras azules). En el eje de las X se indican los genes *chr* y su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*. La expresión del gen *16S rRNA* se usó como normalizador. (n = 3) Se muestran las barras de desviación estándar.

realizó un análisis de la expresión los genes *chrBACF* mediante RT-PCR, a partir de cultivos de LB400 crecidos en medio K1m en 50 μ M de sulfato en ausencia y en presencia de 2 μ M de cromato. Se emplearon oligonucleótidos que amplifican las regiones intergénicas de los genes *chrBACF* (Figura 19, panel A). En ausencia de cromato no se detectaron bandas de amplificación, sin embargo, en presencia de cromato se obtuvieron bandas de amplificación del tamaño esperado, para los fragmentos de las regiones intergénicas del conjunto de genes *chrB-chrA2*, *chrA2-chrC* y *chrC-chrF*, lo que indica que los genes *chrBACF* de *B. xenovorans* se transcriben en un RNA policistrónico formando un operón, cuya expresión es inducida en presencia de cromato (Figura 19, panel B).

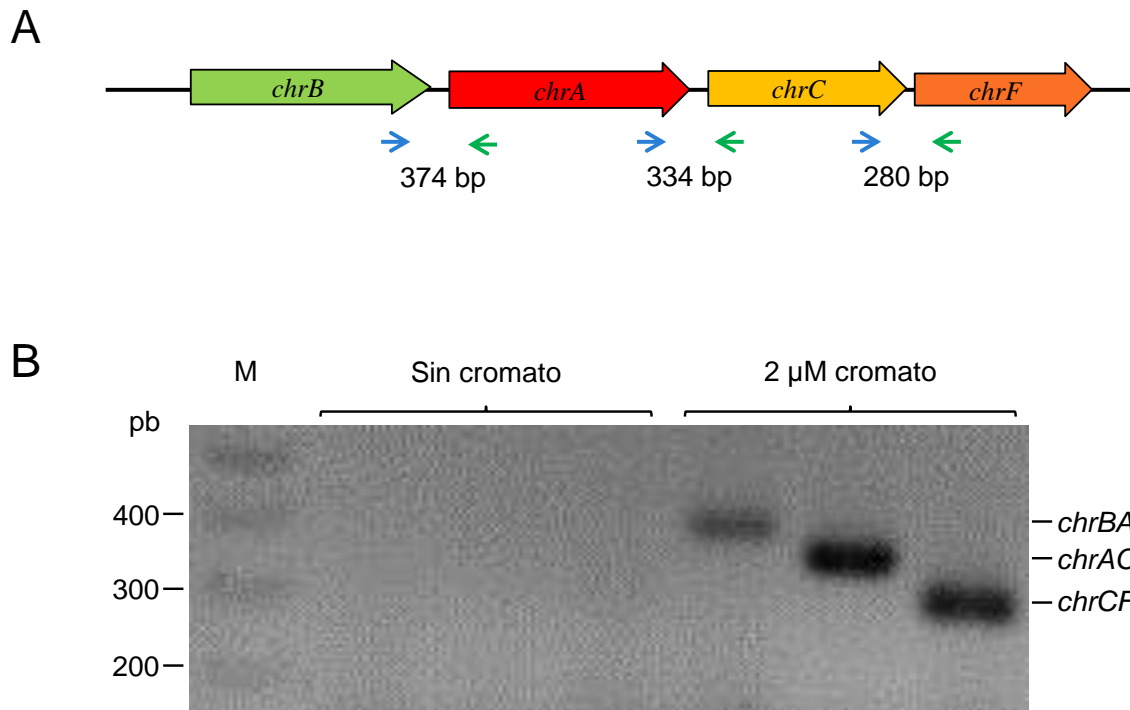


Figura 19. Expresión de los genes *chrBACF* de *B. xenovorans*. **A)** Las flechas grandes representan los genes *chrBACF* de *B. xenovorans* y las flechas pequeñas indican los oligonucleótidos directos (flechas azules) y reversos (flechas verdes) empleados en los ensayos de RT-PCR. Se indican los tamaños de los productos de amplificación esperados. **B)** Ensayo de RT-PCR a partir de RNA total de cultivos de *B. xenovorans* crecidos en medio K1m con 50 μ M de sulfato a una D.O. de 0.6, en ausencia y presencia de 2 μ M de cromato. Los productos de amplificación, que se indican a la derecha, se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 %. Carril M, marcador de tamaño molecular (en pares de bases). Resultado representativo de $n = 2$. }

X. RESUMEN DE RESULTADOS

- Los genes *chr* de *B. xenovorans* mostraron diferentes niveles de expresión relativa en la fase exponencial (0.2-114), aunque no presentaron cambios en su expresión en las diferentes condiciones de sulfato analizadas.
- El gen *chrA2*, localizado en el megaplásmido, fue el único gen *chr* que mostró un aumento en su expresión relativa (30-130 veces) en presencia de cromato.
- Con excepción del gen *chrA2*, el nivel de expresión relativa de los genes *chr* disminuyó (2-7 veces) durante la fase estacionaria del crecimiento.
- Los genes *chrBACF* constituyen un operón cuya expresión es inducida por cromato.

XI. DISCUSIÓN

La superfamilia CHR consta de transportadores de membrana que confieren resistencia a cromato mediante un sistema de expulsión. *B. xenovorans* LB400 posee en su genoma seis genes *chr* que codifican para cuatro proteínas grandes (ChrA1a, ChrA1b, ChrA6 y ChrA2) y dos proteínas pequeñas (Chr1NCa y Chr1NCb). Cuando los homólogos CHR se clonaron y expresaron de manera individual en *E. coli*, éstos confirieron resistencia a cromato de forma diferencial, dependiendo de las concentraciones de sulfato en el medio. Los homólogos ChrA1a y ChrA1b confirieron resistencia a cromato en condiciones de alto sulfato, ChrA6 y Chr1NCb sólo confirieron resistencia en condiciones de bajo sulfato, mientras que Chr1NCa y ChrA2 confirieron resistencia a cromato en ambas condiciones, alto y bajo sulfato. Este resultado sugirió que el sulfato pudiera estar regulando la expresión de los genes *chr* en *E. coli*, y esto también podría estar sucediendo en *B. xenovorans* (León-Marquez y col., 2011). El objetivo de este trabajo consistió en analizar la participación del cromato y el sulfato en la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400. Todos los organismos requieren azufre para su crecimiento, debido a que este es necesario principalmente como un componente de los aminoácidos cisteína y metionina, para la síntesis de proteínas (Kertesz, 2000). El sulfato inorgánico es la principal forma de azufre para los microorganismos. Inicialmente se determinó el requerimiento mínimo de sulfato para un crecimiento óptimo de *B. xenovorans*, mediante cinéticas de crecimiento en concentraciones crecientes de sulfato encontrando que 50 μM es el requerimiento mínimo (Figura 8). Los medios de cultivo donde generalmente se crece a las bacterias en el laboratorio contienen altos niveles de sulfato, el medio mínimo estándar contiene de 1.5 a 2

mM de sulfato, pero en el ambiente las concentraciones de sulfato son mucho menores, por lo tanto los microorganismos son capaces de crecer en condiciones de bajo sulfato, como lo es 50 μM (Kertesz, 2000).

Con la finalidad de determinar las concentraciones subinhibitoria de cromato a las que fueron expuestos los cultivos de *B. xenovorans* para posteriormente analizar su efecto sobre la expresión de los genes *chr*, se realizaron cinéticas de crecimiento en concentraciones crecientes de cromato (Figura 9). Se establecieron concentraciones subinhibitorias de cromato para cada una de las concentraciones de sulfato empleadas, esto debido a la competencia que existe entre estos dos oxianiones para ingresar a la célula vía el transporte de sulfato (Ramírez-Díaz y col. 2008). Para cada concentración de sulfato 50, 200, 800, 1600 y 2000 μM , la concentración subinhibitorias de cromato establecida fue de 2, 8, 16, 32 y 40 μM , respectivamente.

Para llevar a cabo los ensayos de expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, fue necesario determinar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos para el gen *16S rRNA* y para los genes *chr*, mediante curvas de eficiencia (Figuras 10 y 11). Para el gen *16S rRNA* se obtuvo una eficiencia del 94.1%, valor que se encuentra en el rango recomendado de eficiencia para un gen normalizador que es del 90 – 110% (Pinto y col., 2012). Para genes blanco cuyo nivel de expresión se desea evaluar, la eficiencia de amplificación puede variar en un rango de 80 -100 % (Ramakers y col., 2003). En el caso de los genes *chr* de *B. xenovorans* se obtuvieron valores de eficiencia de amplificación del 81.1 – 99.5 % (Tabla 4), valores que se encuentran dentro del rango aceptable.

Un gen normalizador se emplea rutinariamente como un medio para la cuantificación de la expresión génica, idealmente debe presentar un nivel de expresión constante y no ser influenciado por tratamientos exógenos (Hu y col. 2009). Para determinar la estabilidad de la expresión del gen *16S rRNA* a emplear como gen normalizador, se evaluó su expresión bajo los diferentes tratamientos en los que se iba a analizar la expresión de los genes *chr*. El gen *16S rRNA* presentó niveles de expresión relativamente constantes bajo todos los tratamientos (Figura 12), por lo que se empleó como gen normalizador de la expresión de los genes *chr* a lo largo del trabajo.

Para determinar el efecto del sulfato sobre la expresión de los genes *chr*, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir de RNA total de *B. xenovorans* crecida en medio K1m en diferentes concentraciones de sulfato. Los genes *chr* no mostraron cambios significativos en sus niveles de expresión en las diferentes concentraciones de sulfato ensayadas (Figuras 13-15), por lo que se concluyó que el sulfato no regula expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*. Esto coincide con los resultados observados con los genes *chr* presentes en el genoma de *O. tritici*, cuya expresión se evaluó en condiciones de alto y bajo sulfato, y éste no tuvo ningún efecto sobre la expresión de dichos genes (Branco y col., 2008). Caso contrario se observó en los genes *chr* presentes en el plásmido pMOL28 de *C. metallidurans*, sobre los cuales el sulfato sí tuvo un efecto positivo sobre su expresión (Juhnke y col., 2002).

Al comparar la expresión entre los diferentes genes *chr* de *B. xenovorans*, se encontró que estos presentan diferentes niveles de expresión entre sí; los genes *chrA1a* y *chrINCa*, presentaron niveles bajos, *chrA6* y *chrA2* mostraron niveles moderadamente altos y, finalmente, *chrA1b* y *chrINCb* presentaron niveles altos de expresión (Figura 16). Esta

diferencia en los niveles de expresión de los genes *chr*, se debe posiblemente a que diferentes factores de transcripción están involucrados en la expresión de dichos genes. Las especies bacterianas con genomas grandes tienen un mayor número de sistemas de regulación para controlar con éxito el extenso repertorio metabólico, que con frecuencia se expresa bajo diferentes condiciones de crecimiento. Además, la presencia de genes redundantes implica una mayor complejidad en los mecanismos de regulación (Cases y col., 2003; Konstantinidis y Tiedje 2004). Este es el caso de la cepa LB400 que presenta un genoma relativamente grande (9.7 Mpb) con una redundancia génica del 17.6 %, dedicando una gran proporción de su genoma (7.7% de los genes) a una compleja red de regulación transcripcional (Chain y col. 2006).

Los homólogos *chr* codificados en el cromosoma 2 y el megaplásmido presentaron niveles de expresión de moderados a altos, así como también el gen *chrA6* del cromosoma 1 mostró un nivel de expresión moderadamente alto. Esto coincide en que para estos cuatro genes *chr* se identificaron posibles regiones promotoras dependientes del factor sigma 70 (Tabla 4). El factor sigma 70 está implicado en la expresión de la mayoría de los genes durante el crecimiento exponencial (Buck y col., 2000). En el resto de los homólogos, *chrA1b* y *chrINCb*, que presentaron niveles de expresión bajos, se identificaron posibles regiones promotoras dependientes del factor sigma 54 (Tabla 2). El factor sigma 54 controla la expresión de genes relacionados con el metabolismo de nitrógeno y con otras variadas funciones (Reitzer y Schneider, 2001). Por lo tanto, es posible que los genes *chrA1b* y *chrINCb* se expresen en *B. xenovorans* bajo condiciones específicas, aun no identificadas.

Interesantemente que los genes que codifican proteínas CHR de la misma subfamilia (*chrA1a/chrA1b* y *chrINCa/chrINCb*), localizados en los dos cromosomas, presentaron

diferentes tipos de posibles promotores (Tabla 2) y mostraron niveles de expresión contrarios, los homólogos *chr* del cromosoma 2 presentaron mayores niveles de expresión en comparación con los del cromosoma 1 (Figura 16). Los cromosomas 1 y 2 juegan funciones distintas dentro del genoma de *B. xenovorans*, el cromosoma 1 lleva las funciones celulares principales y es considerado el cromosoma central de *B. xenovorans*, mientras que el cromosoma 2 se considera un replicón adaptativo determinante del estilo de vida de LB400 (Chain y col., 2006). Las grandes diferencias en los niveles de expresión de los genes *chr* pueden deberse a su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*, es posible que la expresión de los genes de los replicones adaptativos, cromosoma 2 y megaplásmido, sea más eficiente que la del cromosoma central; al menos en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo.

La presencia de los seis homólogos CHR en *B. xenovorans* LB400 coincide con su fenotipo de resistencia a cromato, en comparación con cepas de referencia como *E. coli* W3110 y *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 4). Además en resultados previos, cuando el cultivo de *B. xenovorans* se expuso previamente a una concentración subinhibitoria de cromato, aumentó su nivel de resistencia a este oxianión, en comparación de un cultivo que no se trató con cromato; por lo tanto el fenotipo de resistencia a cromato es inducido por una exposición previa, este resultado sugiere que el cromato regula la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*. Para determinar si el cromato tiene un efecto sobre la expresión de los genes *chr* de LB400, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir de RNA total de *B. xenovorans* crecida en diferentes concentraciones de sulfato en presencia de concentraciones subinhibitorias de cromato. La mayoría de los genes *chr* de *B. xenovorans* no presentaron cambios significativos en su expresión en presencia de cromato (Figuras 13

y 14), a excepción del gen *chrA2* localizado en el megaplásmido, que presentó un notorio aumento en su expresión de hasta 130 veces en presencia de cromato (Figura 15), por lo que se concluyó que el cromato induce la expresión del gen *chrA2*. Cuando varios genes de resistencia a metales pesados altamente relacionados están presentes en una bacteria, por lo general solo uno es inducible por el metal, mientras que el resto se encuentran silenciados o expresados constitutivamente (Nies y col., 2006; Moraleda-Muñoz y col., 2010). Posiblemente esto es lo que sucede con los múltiples homólogos *chr* de *B. xenovorans*, donde sólo la expresión de uno de ellos, en este caso el gen *chrA2* del megaplásmido, se induce en presencia de cromato, mientras que el resto presentan una expresión constitutiva.

Las bacterias rara vez viven en ambientes que permiten largos periodos de crecimiento exponencial. El crecimiento típicamente está limitado por el agotamiento de nutrientes, entrando así en una fase estacionaria del crecimiento, durante la cual las células bacterianas se someten a una variedad de cambios morfológicos y fisiológicos (Tani y col., 2002; Lacour y Landini, 2004). Para determinar el efecto que tiene la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes *chr* de *B. xenovorans*, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR en tiempo real a partir de cultivos crecidos a fase estacionaria en ausencia y presencia de cromato. Los genes *chr* mostraron un patrón de expresión similar al observado durante la fase exponencial (Figura 17), a excepción de que su nivel de expresión fue de 2 a 7 veces menor durante la fase estacionaria (Figura 18). Esta disminución en el nivel de expresión de los genes *chr* en la fase estacionaria se puede deber a que durante esta fase las bacterias canalizan su energía hacia actividades del metabolismo secundario u otros sistemas de protección contra el estrés (Lacour y Landini, 2004; Alvarez-Martinez y col., 2006). En un análisis del patrón de expresión de todo el genoma *B. xenovorans* LB400, se observó que

los genes relacionados con la función de transporte tuvieron un mayor cambio en su expresión después de la transición a la fase estacionaria; durante esta fase la mayoría de los genes de transporte presentaron una regulación hacia la baja en su expresión (Deneff y col., 2004). El gen *chrA2* del megaplásmido fue el único cuya expresión no fue afectada de forma significativa por la fase de crecimiento del cultivo (Figura 18). Al parecer el sistema de regulación del gen *chrA2* no es objeto del efecto represor que se genera durante la fase estacionaria del crecimiento sobre el resto de los homólogos *chr*.

Al evaluar el contexto genómico de los genes *chr* de *B. xenovorans*, se encontró que la mayoría de los genes *chr* presentaban genes aledaños que anteriormente no se les ha relacionado con resistencia a cromato, a excepción del gen *chrA2*, localizado en el megaplásmido, que presenta genes aledaños que si se han asociado con resistencia a cromato en otros organismos (*C. metallidurans* y *O. tritici*). Rio arriba del gen *chrA2* se encuentra el gen *chrB*, el cual codifica un posible regulador transcripcional, y rio abajo se encuentran los genes *chrC* y *chrF*, que codifican posiblemente para una superóxido dismutasa y una rodonasa, respectivamente (Juhnke y col., 2002; Branco y col., 2008) (Figura 19, panel A). Para determinar si el conjunto de genes *chrBACF* están formando un operón, se realizó un ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo a partir de RNA total de *B. xenovorans* crecida en medio mínimo en ausencia y presencia de cromato. Se encontró que en efecto los genes *chrBACF* forman un operón, cuya expresión es inducida en presencia de cromato (Figura 19, panel B). En otros organismos se han identificado conjuntos de genes similares a *chrBACF*, como en el plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* (Juhnke y col., 2002) y en un transposon de *O. tritici*; la expresión de estos genes *chr* también es inducida por cromato (Branco y col., 2008). Las secuencias de las proteínas codificadas por el

operón *chrBACF* de LB400 y *C. metallidurans* comparten 61, 66, 43 y 70% de identidad, respectivamente. El análisis de secuencia del operón *chrBACF* de LB400 sugiere que éste forma parte de un elemento transponible (León-Márquez, 2009).

El gen *chrA2* de *B. xenovorans* LB400 confirió un fenotipo de resistencia a cromato cuando se expresó en *E. coli*, presentó un nivel de expresión relativamente alto durante las fases exponencial y estacionaria del crecimiento, y se encontró que forma parte del operón *chrBACF*, cuya expresión responde a la exposición de cromato. Estos resultados sugieren fuertemente que en las condiciones experimentales de este trabajo *chrA2* es el principal responsable del fenotipo de resistencia a cromato de la cepa LB400.

XII. CONCLUSIONES

- Los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 se expresan de manera diferencial, entre sí y en función de la fase de crecimiento.
- La resistencia a cromato en *B. xenovorans* LB400 es proporcionada principalmente por el gen *chrA2*, que se localiza en el megaplásmido formando parte del operón *chrBAFC*, cuya expresión es inducida en presencia de cromato.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Martinez C. E., Baldini R. L. y Gomes S. L. (2006). A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *J. Bacteriol.* 188: 1835-1846.
2. Bopp L. H. (1986). Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1: 23-29.
3. Branco R., Chang A. P., Johnston T., Gurel V., Morais P. y Zhitkovich A. (2008). The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element Tn*OtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. *J. Bacteriol.* 190: 6996-7003.
4. Buck M., Gallegos M. T., Studholme D. J., Guo Y. y Gralla J. D. (2000). The bacterial enhancer-dependent σ_{54} (σ_N) transcription factor. *J. Bacteriol.* 182: 4129-4136.
5. Cases I., de Lorenzo V. y Ouzounis C. A. (2003). Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends Microbiol.* 11: 248-253.
6. Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J. C. y Moreno-Sánchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 335-347.
7. Cervantes C. y Campos-García J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria In: Nies D. H. y Silver S. (Eds) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin pp 407-402.
8. Chain G. P. S., Deneff V. J., Konstantinidis K. T., Vergez L. M., Agullo L., Reyes L. V., Hauser L., Córdova M., Gómez L., González M., Land M., Lao V., Larimer F., LiPuma J. J., Mahenthiralingam E., Malfatti S. A., Marx C. J., Parnell J. J., Ramette

- A., Richardson P., Seeger M., Smith D., Spilker T., Sul W. J., Tsoi T. V., Ulrich L. E., Zhulin I. B. y Tiedje J. M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mpb genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 15280-15287.
9. 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.
10. Denev V. J., Park J., Tsoi T. V., Rouillard J. M., Zhang H., Wibbenmeyer J. A. y Tiedje J. M. (2004). Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4961-4970.
11. Ehrlich H. L. (2002). *How microbes mobilize metals in ores: A view of current understandings and proposals for further research. Miner. Metall. Proc.* 19: 220-224
12. Goris J., De Vos P., Caballero Mellado J., Falsen E., Quensen J. F., III, Tiedje J. M. y Vandamme P. (2004). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400(t) and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1677-1681.
13. Henne K. L., Nakatsu C. H., Thompson D. K. y Konopka A. E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiol.* 9: 1-14.
14. Hu R., Fan C., Li H., Zhang Q. y Fu Y. F. (2009). Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Mol. Biol.* 10: 1-12.

15. Jiménez–Mejía R., Campos–García J. y Cervantes C. (2006). Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 262: 178–184.
16. Juhnke S., Peitzsch N., Hubener N., Grobe C. y Nies D. H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. Arch. Microbiol. 179: 15-25.
17. Kadiiska M. B., Xiang Q. H. y Mason R. P. (1994). In vivo free radical generation by chromium (VI): An electron resonance spin-trapping investigation. Chem. Res. Toxicol. 7: 800-805.
18. Kertesz M. A. (2000). Riding the sulfur cycle–metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 24: 135-175.
19. Konstantinidis K. T. y Tiedje J. M. (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 3160-3165.
20. Lessie T. G., Hendrickson W., Manning B. D. y Devereux R. (1996). Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. FEMS Microbiol. Lett. 144: 117-128.
21. McGrath S. P. y Smith S. (1990). Chromium and nickel. In: *Heavy Metals in Soils Alloway B. J. (Ed). Wiley, New York pp. 125–150.*
22. Marx C. J., Miller J. A., Chistoserdova L. y Lidstrom M. E. (2004). Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungorum* LB400. J. Bacteriol. 186: 2173-2178.

23. Moraleda-Muñoz A., Pérez J., Extremera A. L. y Muñoz-Dorado J. (2010). Differential regulation of six heavy metal efflux systems in the response of *Myxococcus xanthus* to copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6069-6076.
24. Nies D. H., Koch S., Wachi S., Peitzsch N. y Saier M. H. Jr. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180: 5799–5802.
25. Nies D. H., Rehbein G., Hoffmann T., Baumann C., y Grosse C. (2006). Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11: 82-93.
26. Lacour S. y Landini P. (2004). σ S-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of σ S-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* 186: 7186-7195.
27. Luna-Luna M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de maestría. IIQB-UMSH.
28. León-Márquez Y. L. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
29. León-Márquez Y. L., Ramírez-Díaz M. I. y Cervantes C. (2011). Clonación y expresión funcional de proteínas bacterianas de la familia LCHR. *Ciencia Nicolaita* 53: 36-47.
30. Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 29: 45-45.
31. Pimentel B. E., Moreno-Sánchez R. y Cervantes C. (2002). Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol Lett.* 212: 249-254.

32. Pinto F., Pacheco C. C., Ferreira D., Moradas-Ferreira P. y Tamagnini P. (2012). Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria. *PLoS one* 7: 1-9.
33. Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. L. y Moorman A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339: 62-66.
34. Real-time PCR Brochure. Qiagen. (2010). Critical Factors for Successful Real-Time PCR. <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=23490>.
35. Reitzer L. y Schneider B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 422-444.
36. Salinas-Herrera K. (2011). Análisis de la regulación de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de licenciatura. UMSNH.
37. Seeger M., Timmis K. N. y Hofer B. (1995). Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas sp.* strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2654-2658.
38. Shanker A. K., Cervantes C., Loza-Tavera H. y Avudainayagam S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31: 739-753.
39. Tani T. H., Khodursky A., Blumenthal R. M., Brown P. O. y Matthews R. G. (2002). Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 13471-13476.
40. 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.

41. Zhitkovich A. (2005). Importance of Chromium–DNA Adducts in Mutagenicity and Toxicity of Chromium (VI). Chem. Res. Toxicol. 18: 3-11.