



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Caracterización parcial de una
mutante en el gene *ygcB* de
Escherichia Coli

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACION

BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

JOSÉ PONCE CORIA



m. 349455

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo ha sido desarrollado bajo la dirección del Dr. Jorge Membrillo Hernández, en el Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

José Ponce Coria

Dr. Jorge Membrillo Hernández
Investigador Titular "B" de T. C.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Ponce Coria

FECHA: 20 octubre 2005

FIRMA: José Ponce Coria

A mis padres

José Ponce Guerrero

Paulina Coria Figueroa

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México, que ha permitido desarrollarme académicamente y de manera integral de la mejor manera, a lo largo de estos ya casi 8 años desde mi ingreso al bachillerato en aquellas aulas de la Escuela Nacional Preparatoria 6 “Antonio Caso”.

A mi padre José Ponce Guerrero y a mi madre Paulina Coria Figueroa, quienes me han enseñado a luchar por mis más anhelados sueños, a cada día ser una mejor persona, a aprender de mis errores y a levantarme de mis tropiezos.

No tengo palabras para expresar la gratitud que siento por su generosidad, su fe y su inestimable ayuda al Dr. Jorge Membrillo Hernández quien me acogió con los brazos abiertos para formar parte de su laboratorio y grupo de investigación y quien ha sido parte fundamental en mi crecimiento académico.

Deseo asimismo expresar mi gratitud a todos aquellos miembros del laboratorio Marcela Méndez, Elizabeth Hernández, Alondra Díaz, Tecilli Cabellos, Nora Urrea, Miguel Páez Silva y a la Dra. Martha Contreras así como a la Dra. Carmen Gómez Eichelmann por su valioso tiempo y comentarios críticos para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado para el examen profesional Dra. Laura Camarena Mejía, Dr. Salvador Uribe Carvajal, Dra. Gloria Soberón Chávez y la Dra. Beatriz Gómez García por sus sugerencias y críticas a este trabajo.

Al técnico académico del laboratorio M. en C. Luis Delgado Olivares por su ayuda y comentarios críticos.

A las instituciones que otorgaron los donativos que hicieron posible la realización de este proyecto. Al CONACYT proyecto 42580-Q y al PAPIIT-UNAM proyecto 207703.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1 <i>Escherichia coli</i>	17
1.1.1 Descripción e importancia	17
1.1.2 Estructura del genoma	18
1.2 Estrés oxidativo en <i>Escherichia coli</i>	18
1.2.1 Especies Reactivas de oxígeno.....	19
1.2.2 Respuesta al estrés oxidativo en <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.2.1 El regulón SoxRS	
1.2.2.2 El regulón OxyR	
1.3 Estrés nitrosativo en <i>Escherichia coli</i>	25
1.3.1 Óxido nítrico	25
1.3.2 Respuesta al estrés nitrosativo en <i>Escherichia coli</i>	26
1.3.2.1 NorV y NorW Flavorubredoxin oxidoreductasa	
1.4 Hemoglobinas bacterianas	27
1.4.1 Hemoglobinas de un solo dominio	28
1.4.2 Hemoglobinas truncadas	28
1.5 Flavohemoglobinas	29
1.5.1 La flavohemoglobina de <i>Escherichia coli</i> HMP	30
1.5.2 Hmp y su actividad de paraquat diaforasa	32
1.5.2.1 Paraquat diaforasas en <i>Escherichia coli</i>	
1.6 Objetivo de esta tesis	34
1.6.1 Objetivo general	34

1.6.2 Objetivo particular	34
1.7 Hipótesis	34
 2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Generalidades	36
2.1.1 Cepas bacterianas usadas en este estudio	36
2.1.2 Bacteriófagos utilizados	36
2.1.3 Oligonucleótidos	37
2.1.4 Medios de cultivo	37
2.1.5 Condiciones de cultivo	38
2.1.6 Preservación y mantenimiento de bacterias y fagos	38
 2.2 Métodos genéticos	39
2.2.1 Transformación	39
2.2.1.1 Preparación de células competentes	
2.2.1.2 Transformación de células competentes	
2.2.2 Transducción generalizada mediante el bacteriófago P1_{vir}	40
2.2.2.1 Obtención de los lisados del bacteriofago P1 _{vir}	
2.2.2.2 Transducción al genoma mediada por P1 _{vir}	
2.2.3 Mutagénesis	43
2.2.3.1 Mutagénesis por inserción de un elemento transponible	
2.2.3.2 Preparación del lisado con fago λ	
2.2.3.3 Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10	
2.2.3.4 Construcción de una mutante en el gene <i>ygcB</i>	
2.2.4 Manipulación y análisis de DNA	47
2.2.4.1 Obtención de DNA genómico	

2.2.4.2	Obtención de DNA plasmídico	
2.2.4.3	Manipulación enzimática del DNA	
2.2.4.4	Endonucleasas de Restricción	
2.2.4.5	DNA ligasa del bacteriófago T4	
2.2.4.6	Secuenciación de DNA	
2.2.4.7	Resolución y purificación de fragmentos de DNA	
2.2.4.7.1	Separación de fragmentos de DNA en gel de agarosa	
2.2.4.7.2	Purificación de fragmentos de DNA en solución	
2.2.4.7.3	Purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa	
2.3	Métodos bioquímicos	56
2.3.1	Medición de la actividad de β-galactosidasa	56
2.3.2	Análisis tipo Southern blot	58
2.3.2.1	Procesamiento del gel de agarosa	
2.3.2.2	Transferencia de DNA a la membrana	
2.3.2.3	Marcado de la sonda	
2.3.2.4	Hibridación y lavado de la membrana	
2.3.2.5	Generación y detección de la señal luminosa	
2.3.2.6	Revelado de película autoradiográfica	
2.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	64
2.4	Otros ensayos	66
2.4.1	Ensayo de Paraquat diaforasa en placas de ELISA	66
2.4.2	Ensayo de Paraquat diaforasa en viales	67
2.4.3	Ensayo de formación de biofilm	68
2.4.3.1	Detección y cuantificación de biofilm	
2.4.4	Ensayo de nado	69
2.4.5	Ensayo de sensibilidad a H_2O_2 en agar	69

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de una mutante en <i>Escherichia coli</i> ausente de actividad de paraquat diaforasa	72
3.2 Mapeo del sitio de inserción de la mutación en JMH0733	73
3.2.1 Determinación de la expresión del gene <i>hmp</i> en la mutante aislada JMH0733	75
3.2.2 PCR inverso para identificar al gene interrumpido por el transposón en la cepa JMH0733	76
3.2.3. Análisis tipo Southern Blot para corroborar la inserción de transposón miniTn5 en el promotor del gene <i>ygcB</i> en la cepa JMH0733.....	83
3.3 Construcción de una mutante en $\Delta ygcB::kan$ en <i>Escherichia coli</i>	85
3.4 Evaluación de la actividad de paraquat diaforasa de la cepa JMH1260	86
3.5 Transducción de la mutación <i>ygcB::Tn5</i>	87
3.6 Caracterización parcial de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$	88
3.6.1 Curvas de crecimiento de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$	89
3.7 Evaluación de la motilidad y formación de biofilm en la cepa JMH1722 $\Delta ygcB::kan$	90
3.8 Evaluación de la sensibilidad a H ₂ O ₂ de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$	91
3.9 Evaluación de la expresión de <i>hmp</i> en un fondo genético $\Delta ygcB::kan$	92

3.10 Evaluación de la sensibilidad a ácido nalidíxico de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$	93
4. CONCLUSIONES	94
5. PERSPECTIVAS	95
6. BIBLIOGRAFÍA	96

Resumen

Escherichia coli posee una flavohemoglobina de 44 kDa codificada por el gene *hmp* involucrada ampliamente en la respuesta contra el estrés nitrosativo impuesto por el óxido nítrico (NO), en condiciones aeróbicas y de microaerobiosis.

La expresión del gene *hmp* es regulada de manera positiva por nitrato, nitrito pero particularmente por NO⁻ y el agente redox cíclico liberador de superóxido denominado metil viológeno (C₁₂H₁₄N₂) o paraquat (PQ), esta regulación es independiente del sistema global de respuesta SoxRS. Consistente con su participación en la defensa frente a un estrés nitrosativo, mutantes nulas en el gene *hmp* de *Escherichia coli* son hipersensibles al tratamiento con agentes liberadores de NO⁻ como el nitroprusiato de sodio (SNP) Na₂[Fe(CN)₅]NO.

Un fenotipo experimentalmente útil de cepas mutantes en el gene *hmp* de *Escherichia coli* es que son incapaces de reducir al paraquat (PQ), en otras palabras carecen de actividad de paraquat diaforasa. Debido a la ausencia de actividad de paraquat diaforasa, al tratar un cultivo de una cepa mutante en el gene *hmp* con PQ en condiciones anaeróbicas en medio LB, el cultivo permanece color paja, mientras que un cultivo de una cepa silvestre adquiere coloración azul, debido a la acumulación de la forma reducida del PQ.

Si se lograra aislar una mutante en *Escherichia coli* que después de ser tratada con PQ en condiciones anaeróbicas permanezca color paja (carente de actividad de paraquat diaforasa) la mutante probablemente estará afectada en: el gene *hmp*, en algún gene relacionado con la regulación de la expresión de *hmp*, o en otra paraquat diaforasa.

El objetivo del presente estudio fue el avanzar en el conocimiento de la regulación transcripcional del gene *hmp* en *Escherichia coli* y de manera específica identificar al factor transcripcional responsable de la inducción de la transcripción de *hmp* en presencia de NO⁻. De manera particular, el presente estudio se enfocó en aislar una mutante por transposición en *Escherichia coli* ausente de actividad de paraquat diaforasa.

Después de analizar aproximadamente 4550 cepas mutantes, se aisló a la cepa JMH0733 que al ser tratada con PQ en condiciones anaeróbicas permanecía color paja. Al mapear el sitio de la mutación, se pudo establecer que el sitio de inserción del transposón se encontraba 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB*, el cual es un marco abierto de lectura que codifica para una hipotética proteína de 888 aminoácidos.

Al construir una mutante por reemplazo del gene *ygcB* con un cassette de resistencia a kanamicina y evaluar su actividad de paraquat diaforasa, para nuestra sorpresa a diferencia de la mutante aislada JMH0733 su actividad de paraquat diaforasa no estaba alterada.

De manera consistente, al transducir la mutación inducida por el transposón de la cepa JMH0733 a un fondo genético fresco parental, las transductantes obtenidas no conservaban el fenotipo de ausencia de actividad de paraquat diaforasa.

Por todo lo anterior se pudo establecer que la mutación inducida por el transposón en la cepa JMH0733 no estaba ligada al fenotipo, en otras palabras una mutación adicional era la responsable de la ausencia de actividad de paraquat diaforasa.

Al llevar a cabo un SDS-PAGE de extractos totales de la cepa JMH0733 se pudo observar que a diferencia de una cepa silvestre, la mutante JMH0733 carece de dos proteínas, una de alrededor de 17 kDa y otra de 70 kDa, quizás la ausencia de actividad de paraquat diaforasa se deba a la carencia de estas dos proteínas.

Al caracterizar a la mutante JMH1724 $\Delta ygcB::kan$ no se pudo observar ningún fenotipo, ya que no está afectada en velocidad de crecimiento, sensibilidad a H_2O_2 , formación de biofilm, motilidad, expresión de *hmp* ni en replicación de su material genético.

Abstract

Escherichia coli possesses a 44 kDa flavohaemoglobin Hmp protein encoded by the gene *hmp* which has been involved in the protective responses to nitrosative stress imposed by nitric oxide (NO) under both aerobic and microaerobic growth conditions.

Nitrate, nitrite but particularly nitric oxide (NO) and methyl viologen (C₁₂H₁₄N₂), a redox cyclic agent [paraquat (PQ)], upregulate *hmp* expression, interestingly this occurs in a SoxRS independent manner, consistently *Escherichia coli hmp* null mutants are hypersensitive to NO[•] releasers such as sodium nitroprusside (Na₂[Fe(CN)₅]NO) or SNP.

A useful phenotype of *hmp* mutants is their failure of reducing PQ. This can be easily tested under anaerobic conditions, where a PQ treated culture of an *hmp* mutant remains straw coloured in contrast to a wild type strain culture which acquires blue colouration. The reduction of paraquat yields a blue monocation radical which is stable anaerobically.

If we could isolate an *Escherichia coli* mutant, which remains straw coloured after the treatment with PQ under anaerobic conditions, it might be affected in the *hmp* gene, a gene involved in the regulation of the expression of *hmp*, or another paraquat diaphorase.

The goal of this project was to increase our knowledge on the transcriptional regulation mechanisms of the *hmp* gene in *Escherichia coli*, more specifically to determine the transcriptional factor(s) responsible for the induction of *hmp* gene in the presence of NO[•].

A random mutagenesis was carried out in order to isolate an *Escherichia coli* mutant impaired in its paraquat diaphorase activity. After testing 4550 transposon induced mutant strains, one mutant, JMH0733 remained straw coloured. We then mapped the site of transposon insertion and could establish that the transposon was inserted 102 base pairs upstream from the translational start site of the *ygcB* gene which is an open reading frame that codes for a 888 aa long protein, still with an unknown function.

To our surprise, after constructing a $\Delta ygcB::kan$ mutant and testing its paraquat diaphorase activity we could notice that, in contrast to the isolated mutant JMH0733, its paraquat diaphorase activity was not altered, indicating that an additional mutation to the transposon insertion in JMH0733 was responsible for the absence of paraquat diaphorase activity. Consistently, when transducing the transposon induced mutation to a fresh parental genetic background none of the transductants conserved the parental phenotype.

Therefore we could establish that the transposon induced mutation in the strain JMH0733 was not linked to the phenotype, and perhaps an additional mutation was the responsible for the absence of paraquat diaphorase activity.

After performing a SDS-PAGE of total cell extracts we could observe the absence of two proteins of around 17 and 70 kDa in the strain JMH0733, perhaps the absence of these two proteins explain the absence of paraquat diaphorase activity.

While characterizing the mutant JMH1724 $\Delta ygcB::kan$ we could establish that it is neither affected in growth rate, H_2O_2 resistance, biofilm formation, motility, *hmp* expression nor in the replication of its genetic material.

Abreviaturas

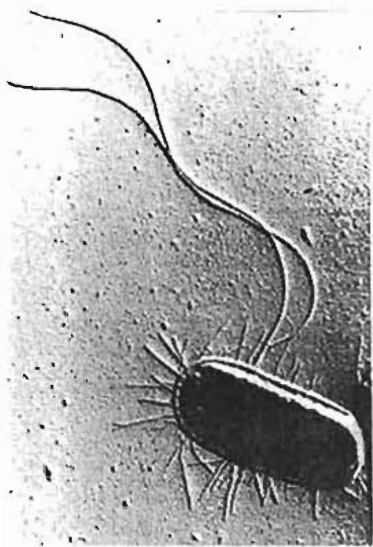
pb	Pares de bases
ONPG	<i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosido
MOPS	3- <i>N</i> -morfolino propano sulfonato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PQ	Paraquat (Metil viológeno)
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosido
TA	Temperatura ambiente
DO	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Da	Dalton
aa	Aminoácidos
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
rpm	Revoluciones por minuto
psi	Libras por pulgada cuadrada
SNP	Nitroprusiato de sodio
UV	Ultravioleta
Kan^r	Kanamicina resistente
Tet^r	Tetraciclina resistente

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 *Escherichia coli*

1.1.1 Descripción e importancia



Escherichia coli, originalmente conocida como *Bacterium coli commune*, fue identificada en 1885 por el médico alemán, Theodor Escherich. *Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa que se encuentra ampliamente distribuida en el intestino de mamíferos, donde representa al microorganismo anaerobio facultativo predominante formando parte de la flora intestinal que mantiene la fisiología del hospedero (Fig. 1).

Fig. 1. Micrografía por transmisión de electrones de una célula de *Escherichia coli*
Tomada de
<http://wwwuser.gwdg.de/~mho pper/al.htm>

Escherichia coli es una γ -proteobacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual incluye microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, y *Yersinia*. A pesar de que

la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* no son clasificadas como patógenos, existen subpoblaciones que actúan como patógenos ocasionando infecciones en hospederos inmunocomprometidos.

Escherichia coli ha llegado a ser un organismo modelo para el estudio de procesos de vida esenciales en parte debido a su rápida tasa de crecimiento y simples requerimientos nutricionales, así como por el creciente número de herramientas bioquímicas, genéticas y moleculares que facilitan su estudio.

1.1.2 Estructura del genoma de *Escherichia coli* K-12

El genoma de diversas cepas de *Escherichia coli* ha sido secuenciado y estudiado en detalle. La secuencia completa del genoma de *Escherichia coli* cepa K-12 fue reportada en septiembre de 1997 por Blattner y colaboradores (Blattner *et al.*, 1997). El genoma de *Escherichia coli* K-12 consiste en una doble cadena circular de DNA la cual contiene 4,639,221 pb. El análisis detallado del genoma completo de *Escherichia coli* dio a conocer que el número de genes es de 4,401 de los cuales 4,285 codifican para proteínas y 116 codifican para RNAs (Serres *et al.*, 2001).

1.2 Estrés oxidativo en *Escherichia coli*

El estrés oxidativo se define como la pérdida del balance existente entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes, a favor de los pro-oxidantes (Sies, 1985), por lo que elevados niveles de especies reactivas de oxígeno o la disminución de moléculas antioxidantes o enzimas constituyen un estrés oxidativo (Fig. 2).



Fig. 2. Visión general de estrés oxidativo como un desbalance entre agentes oxidantes y prooxidantes a favor de estos últimos

1.2.1 Agentes pro-oxidantes

1.2.1 Especies reactivas de oxígeno

Especies reactivas es el término que se aplica colectivamente a las moléculas químicas radicales y no radicales que actúan como agentes oxidantes.

Las especies reactivas han sido clasificadas en tres grupos principales (Tabla 1):

- o Especies reactivas de Oxígeno
- o Especies reactivas de Nitrógeno
- o Especies reactivas de Cloro

Durante el crecimiento exponencial celular bacteriano la principal fuente endógena de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proviene de la autooxidación de componentes de la cadena respiratoria (González-Flecha *et al.*, 1997).

La utilización del oxígeno a nivel celular permite que una pequeña fracción de éste sea convertida a radicales libres.

Reducción Químico-Biológica del oxígeno molecular

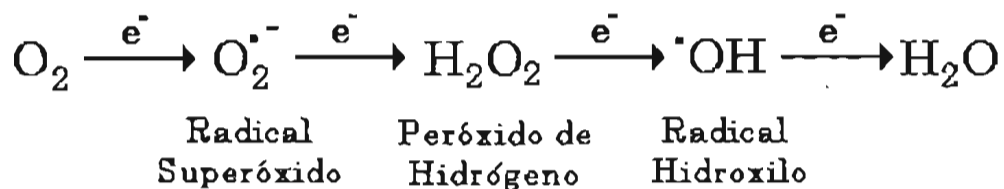


Fig. 3. Generación de especies reactivas de oxígeno durante la reducción de oxígeno a agua en la cadena respiratoria.

Tabla 1. Clasificación de las especies reactivas

	Radicales	No radicales
Especies Reactivas de Oxígeno	Hidroxilo OH [•] Superóxido O ₂ ^{•-} Monóxido de nitrógeno NO [•] RS [•] Peroxilo RO ₂ [•] Alcoxilo RO [•] Hidroperoxilo HO ₂ [•] Lípido peroxilo LOO [•]	Peroxinitrito ONOO ⁻ Ácido Hipocloroso HOCl Peróxido de Hidrógeno H ₂ O ₂ Oxígeno Singulete ¹ Δ _g (⁻¹ O ₂) Ozono O ₃ Ácido Hipobromoso HOBr Lípido Peróxido LOOH
Especies Reactivas de Nitrógeno	Óxido Nítrico NO [•] Dióxido de Nitrógeno NO ₂ [•]	Peroxinitrito OONO ⁻ A. peroxinitroso ONOOH Nitroxilo NO ⁻ Cloruro de Nitrilo NO ₂ Cl Nitrosilo NO ⁻ Trióxido de Nitrógeno N ₂ O ₃ Ácido Nitroso HNO ₂
Especies Reactivas de Cloro	Cloro Cl [•]	Cloruro de nitrilo NO ₂ Cl Ácido Hipocloroso HOCl

El proceso de reducción del oxígeno molecular ocurre en cuatro etapas que involucran, cada una de ellas, la incorporación de un electrón a la molécula. Así se forma el radical libre superóxido. Posteriormente se forma el peróxido de hidrógeno, que aunque no es un radical libre, es de gran reactividad. Un nuevo proceso de reducción transforma el peróxido de hidrógeno en el radical libre hidroxilo (•OH), y finalmente se forma como producto final el agua.

El radical superóxido es poco reactivo y tiende a reaccionar consigo mismo dando origen a un proceso conocido como dismutación, que lo transforma en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El aspecto más relevante de

esta reacción es que el radical superóxido puede además reaccionar con el producto de su propia dismutación (el peróxido de hidrógeno), formando, entre otros productos, el radical libre hidroxilo, considerado como uno de los productos más reactivos del oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno, son dañinas a las células ya que ocasionan daño a toda clase de macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

En los lípidos es donde se produce el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, el cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, y por tanto se altera la permeabilidad de la membrana celular.

La peroxidación lipídica puede ser desencadenada por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

En proteínas el daño consiste principalmente de la oxidación de aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, formación de grupos carbonilo y entrecruzamientos de cadenas peptídicas.

El daño ocasionado al DNA está representado por mutaciones que generalmente ocasionan la pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gene específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones etc.

Los genes de enzimas con actividad antioxidante así como de proteínas involucradas en la defensa contra un estrés oxidativo se encuentran ampliamente distribuidos en la mayoría de los genomas secuenciados.

1.2.2 Respuesta al estrés oxidativo en *Escherichia coli*

Se ha encontrado que la respuesta adaptativa de *Escherichia coli* al H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ depende en gran medida de los sistemas regulatorios constituidos por

las proteínas SoxRS y OxyR, involucrados en la respuesta adaptativa a estos agentes oxidantes.

1.2.2.1 El regulón SoxRS

Este regulón está involucrado principalmente en la respuesta contra el estrés oxidativo y nitrosativo provocados respectivamente por el radical superóxido y por el óxido nítrico. El mecanismo de regulación es el siguiente: SoxR es una proteína de 17 kDa que se encuentra presente de manera constitutiva en la célula, pertenece a la familia MerR de reguladores bacterianos y posee un motivo de unión a DNA hélice vuelta hélice en el extremo amino.

SoxR tiene un centro $[2Fe-2S]$ y se encuentra como homodímero en solución. El mecanismo de activación de SoxR radica en la oxidación de su forma reducida $[2Fe-2S]^{+1}$ a la forma oxidada $[2Fe-2S]^{+2}$ (Fig. 2).

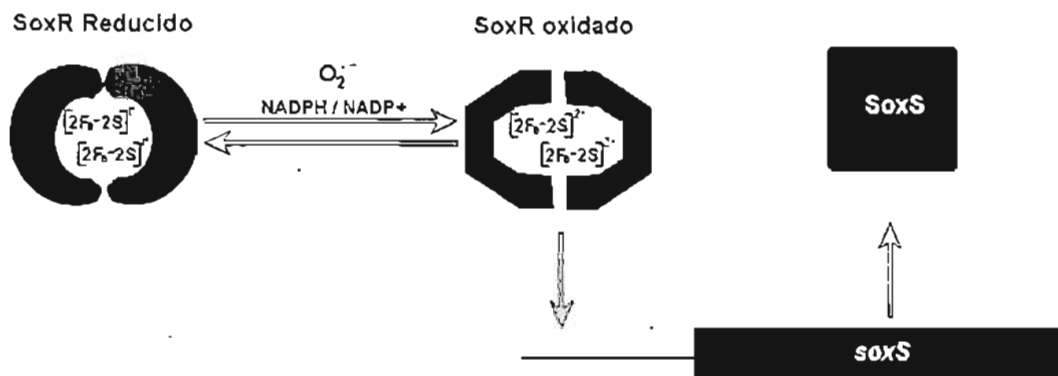


Fig. 2. Mecanismo de activación del Regulón SoxRS

La activación del regulón SoxRS en respuesta al anión superóxido y al óxido nítrico ocurre en dos etapas, en primer lugar la proteína SoxR tiene que ser activada mediante oxidación de su centro $[2Fe-2S]$, una vez en su estado oxidado, SoxR regula positivamente la transcripción del gene *soxS* que codifica para un factor transcripcional positivo de los genes del regulón

involucrados en la respuesta y defensa contra un estrés oxidativo impuesto por O_2^- (Tabla 2).

Tabla 2. Algunos genes regulados por el sistema SoxRS

Gene	Proteína y/o función
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>zwf</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>acnA</i>	Aconitasa A
<i>tolC</i>	Proteína de membrana externa
<i>fur</i>	Represor global de genes para la adquisición de Fe
<i>micF</i>	RNA regulatorio de <i>ompF</i>
<i>agn43</i>	Proteína de membrana externa
<i>acrAB</i>	Bomba de salida de diversas drogas
<i>nfsA</i>	Nitroreductasa A
<i>fpr</i>	Ferredoxin/flavodoxin reductasa
<i>fldA</i>	Flavodoxina
<i>fldB</i>	Flavodoxina
<i>ribA</i>	GTP ciclohidrolasa

Tomada de Sies 1985

1.2.2.2 El regulón OxyR

Este regulón se encuentra involucrado en la respuesta contra el estrés oxidativo impuesto por el peróxido de hidrógeno.

OxyR es un factor transcripcional homotetramérico perteneciente a la familia de reguladores bacterianos LysR con un peso molecular de 34 kDa que utiliza como dominio de unión a DNA un motivo hélice vuelta hélice localizado en su extremo amino.

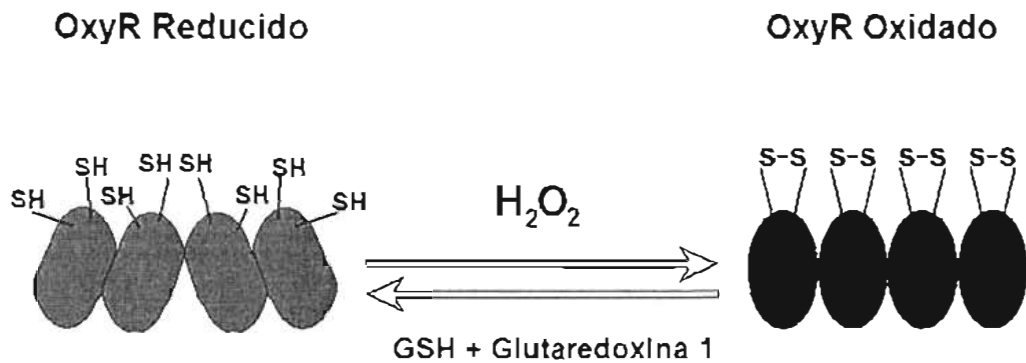


Fig. 4. Mecanismo de activación de OxyR

La oxidación de OxyR ocasiona la formación de un puente disulfuro entre la cisteína 199 y la cisteína 208.

OxyR puede encontrarse en estado oxidado o reducido, al ser oxidado, OxyR activa la transcripción de numerosos genes con claras actividades antioxidantes involucrados en la respuesta ante un estrés oxidativo impuesto por H_2O_2 (Fig. 4; Tabla 3).

La oxidación de OxyR ocasiona la formación de un puente disulfuro entre la cisteína 199 y la cisteína 208. Las dos formas oxidada y reducida hacen diferentes contactos con el DNA, en estado oxidado OxyR reconoce cuatro secuencias ATAGnt en cuatro surcos mayores continuos, mientras que en su estado reducido reconoce cuatro surcos mayores separados por una vuelta (Fig. 4).

Tabla 3. Algunos genes regulados por el sistema OxyR :

Gene	Proteína y/o función
<i>katG</i>	Hidroperoxidasa I
<i>ahpCF</i>	Alquil hidroperóxido reductasa
<i>fur</i>	Represor global de genes para la adquisición de Fe
<i>dps</i>	Proteína de unión no específica a DNA
<i>gorA</i>	Glutación reductasa
<i>grxA</i>	Glutaredoxina I

<i>fhuF</i>	Reductasa férrica
<i>oxyS</i>	Pequeño RNA regulatorio
<i>agn43</i>	Proteína de membrana externa

Tomada de Sies 1985

Además de participar en la respuesta ante el estrés oxidativo provocado por H_2O_2 . Algunos de los genes activados por OxyR participan en la resistencia al ácido hipocloroso (HOCl), disolventes orgánicos y especies reactivas de nitrógeno.

1.3 Estrés Nitrosativo

El estrés nitrosativo es una subdivisión del estrés oxidativo. El estrés nitrosativo mediante las especies reactivas de nitrógeno provoca un desbalance entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes, a favor de los pro-oxidantes.

1.3.1 Óxido Nítrico

El óxido nítrico ($NO\cdot$) también conocido como monóxido de nitrógeno es un radical lipofílico que actúa como molécula de señalización y defensa en los sistemas biológicos (Cooper, 1999). Es capaz de difundir a través de membranas lipídicas e inhibir enzimas así como ocasionar daño al material genético (Watmough *et al.*, 1999).

El óxido nítrico es comúnmente producido durante la combustión de compuestos nitrogenados así como durante la descomposición de materia orgánica. La generación de elevadas concentraciones de óxido nítrico por células fagocíticas del sistema inmune inhibe la invasión de microorganismos patógenos al dañar oxidasas terminales, proteínas con grupo hemo y principalmente proteínas con centros [Fe-S].

Los efectos tóxicos del óxido nítrico se deben en gran medida a la nitración de residuos proteicos como la tirosina y la fenilalanina, así como a la potencial formación del agente oxidante anión peroxinitrito (OONO^-) mediante la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido.

1.3.2 Respuesta al estrés nitrosativo en *Escherichia coli*

Muchos microorganismos han desarrollado mecanismos para el metabolismo del óxido nítrico y su detoxificación. *Escherichia coli* además de el regulón SoxRS posee dos actividades detoxificantes de NO prominentes, una óxido nítrico reductasa (NorVW) y la flavohemoglobina Hmp.

1.3.2.1 NorV y NorW Flavorubredoxin oxidoreductasa

NorR es un activador transcripcional positivo dependiente del factor sigma alternativo σ^{54} . El gene *norR*, se transcribe de manera divergente y es requerido para la expresión del operón *norVW* en respuesta a NO, nitrato, nitrito y al anión $[\text{Fe}(\text{Cn})_5(\text{NO})]^{2-}$ ó nitroprusiato de sodio, SNP (donador de NO).

Los genes *norV* y *norW* que codifican para una flavorubredoxina y una NADH(flavo) rubredoxina óxidoreductasa respectivamente, actúan de manera conjunta con una actividad de NO[•] reductasa para metabolizar al NO[•] hacia óxido nitroso (N₂O) y detoxificar a la célula del NO[•] en condiciones anaeróbicas. Mutantes en *norR* y *norVW* son significativamente más sensibles al tratamiento con SNP (Hutchings *et al.*, 2002) (Fig. 4).

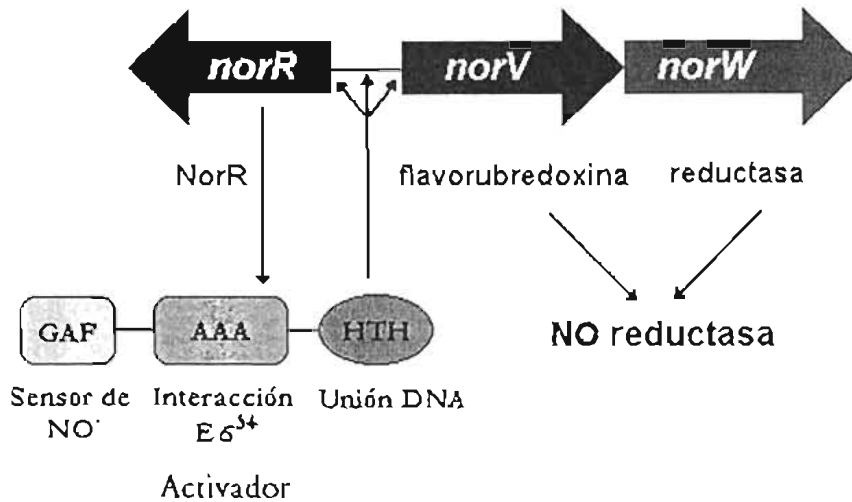


Fig. 4. Organización genética de *norR* y *norVW* en *Escherichia coli*.
 El gene *norR* es transcrito de manera divergente de los genes *norVW* que codifican para la flavorubredoxin oxidoreductasa involucrada en la respuesta celular hacia un estrés impuesto por el NO[•] en condiciones anaeróbicas.

NorR al igual que otros activadores transcripcionales dependientes de σ^{54} , posee una estructura modular con un dominio central AAA⁺ por sus siglas en inglés (ATPase associated with various cellular activities) el cual es requerido para la interacción con σ^{54} y la hidrólisis de ATP necesaria para la formación del complejo abierto durante el inicio de la transcripción (Zhang *et al.*, 2002). En el extremo carboxilo se encuentra un dominio de unión a DNA tipo hélice vuelta hélice (HTH), mientras que en el extremo amino se encuentra el dominio GAF por sus siglas en inglés de (cGMP specific and stimulated phosphodiesterases, Anabaena adenylate cyclases and Escherichia coli FhlA) el cual probablemente sea el responsable de detectar al NO[•] (Gardner *et al.*, 2003).

1.4 Hemoglobinas bacterianas

Durante mucho tiempo, se creyó que las hemoglobinas únicamente se encontraban en organismos superiores, sin embargo hoy en día se sabe que se encuentran presentes en una gran variedad de microorganismos, como bacterias, levaduras, hongos y protozoarios (Wu *et al.*, 2003).

Las hemoglobinas bacterianas se encuentran estructuralmente relacionadas a las hemoglobinas de vertebrados, en el sentido que poseen el mismo plegamiento característico de las globinas y en que el grupo hemo está ligado a la cadena polipeptídica con un residuo de histidina.

A la fecha, las hemoglobinas presentes en los microorganismos se han dividido en tres grupos que pueden ser identificados con base a su estructura de la siguiente manera: (Tabla 4).

- De un solo dominio
- Flavohemoglobinas
- Truncadas

1.4.1 Hemoglobinas de un solo dominio

Poseen un sólo dominio, donde el único centro redox es el grupo hemo. Un ejemplo de hemoglobina bacteriana de un solo dominio es la proteína Vgb de *Vitreoscilla* la cual carece de un dominio reductasa, y fue la primer globina bacteriana identificada y secuenciada (Wakabayashi *et al.*, 1986).

1.4.2 Hemoglobinas truncadas

Son globinas pequeñas de sólo cuatro α -hélices con una longitud de entre 20 y 40 aminoácidos que están involucradas tanto en el suministro de oxígeno a patógenos, como en la resistencia contra un estrés nitrosativo (Wittenberg *et al.*, 2002). Por ejemplo, la hemoglobina truncada de *Mycobacterium bovis* HbN confiere protección a la respiración aeróbica de los efectos tóxicos del óxido nítrico (Pathania *et al.*, 2002).

1.5 Flavohemoglobinas

Comprenden proteínas con dos dominios, un dominio globina unido a un grupo hemo homólogo a las globinas clásicas regularmente localizado en el extremo amino ligado a un dominio similar a las ferredoxin-NADP⁺ reductasas con sitios de unión para NAD(P)H y FAD en el extremo carboxilo.

A pesar de que la función fisiológica de las globinas microbianas durante mucho tiempo permaneció sin comprenderse, a la fecha su función se ha relacionado al metabolismo del oxígeno y del óxido nítrico.

Tabla 4. Ejemplos de los tres grupos de hemoglobinas presentes en microorganismos

Grupo 1 Hemoglobinas de un solo dominio	Grupo 2 Flavohemoglobinas (dos dominios)	Grupo 3 Hemoglobinas truncadas
Bacterias <i>Vitreoscilla</i> <i>Campilobacter jejuni</i>	Bacterias <i>Ralstonia eutrophus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Rhizobium meliloti</i>	Bacterias <i>Mycobacterium bovis</i>
Cianobacterias <i>Nostoc commune</i>		Cianobacterias <i>Synechocystis</i> <i>Nostoc commune</i>
Protozoarios <i>Paramecium caudatum</i> <i>Tetrahymena pyriformis</i> <i>Tetrahymena thermophila</i>	Levaduras <i>Candida norvegensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Protozoarios <i>Paramecium caudatum</i>

1.5.1 La flavohemoglobina de *Escherichia coli* HMP

Hmp es la flavohemoglobina mejor estudiada, y juega un papel importante en la detoxificación del NO (Wu *et al.*, 2004). Al menos dos mecanismos involucran a Hmp en la resistencia al NO.

Aeróbicamente, Hmp con actividad de óxido nítrico dioxigenasa o desnitrosilasa cataliza la reacción en la cual el NO se transforma al ion inocuo nitrato (NO₃⁻). Por otro lado, en condiciones anaeróbicas, Hmp reduce al NO a N₂O con su actividad de óxido nítrico reductasa.

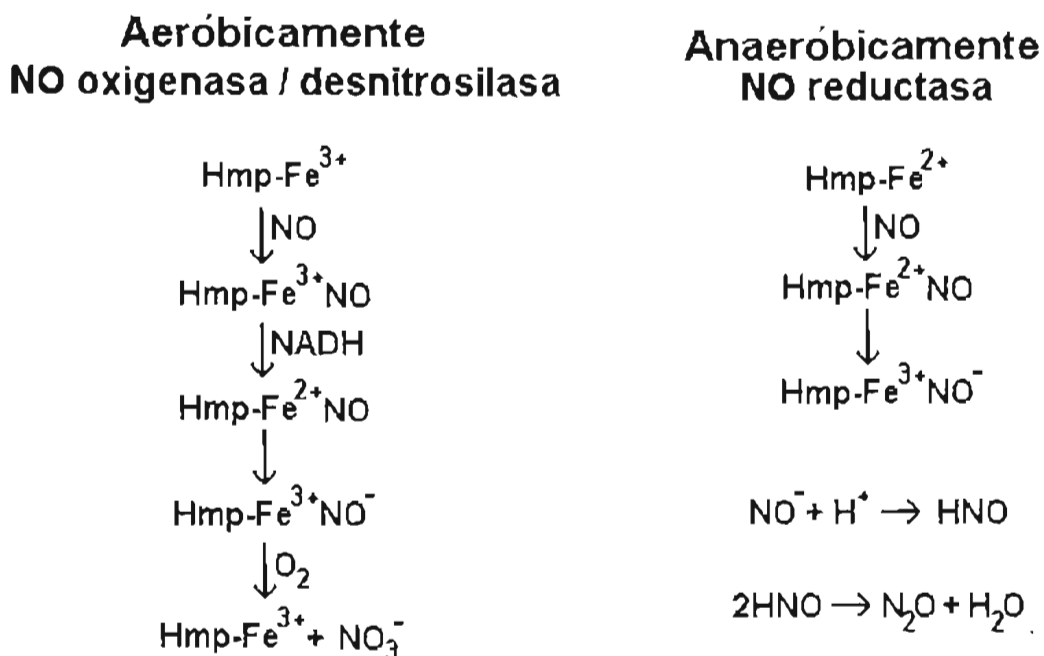


Fig. 5. Metabolismo del NO por la flavohemoglobina Hmp en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

Al estudiar la expresión de *hmp* mediante el empleo de una fusión genética $\Phi(\text{hmp-lacZ})$ integrada al cromosoma en el sitio *attB*, donde la región promotora de *hmp* está fusionada al gene reportero *lacZ*, se ha podido establecer que el gene *hmp* es regulado de manera positiva e independiente

de los sistemas SoxRS y NarLP por nitrato, nitrito pero particularmente por óxido nítrico (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999).

La expresión del gene *hmp* también es regulada de manera positiva y dependiente del factor sigma alternativo σ^s durante la fase estacionaria de crecimiento (Membrillo-Hernández *et al.*, 1997a).

Anaeróbicamente el regulador global Fnr, también está involucrado en la regulación de *hmp*. En la región promotora de *hmp* existen dos cajas de unión a Fnr (Membrillo-Hernández *et al.* 1997b ; Cruz-Ramos *et al.*, 2002) existe evidencia que establece que una mutación en *fnr* aumenta la expresión de la fusión $\Phi(hmp-lacZ)$ 1 (Poole *et al.*, 1996) por lo que se cree que la nitración de Fnr ocasiona la liberación de la represión y por tanto la expresión de *hmp* en presencia de NO.

Adyacente a *hmp* y transcrito de manera divergente, se encuentra el gene *glyA* el cual es activado por MetR, factor transcripcional de la familia LysR que utiliza homocisteina como cofactor. Ya que las regiones promotoras de *glyA* y *hmp* en *Escherichia coli* se encuentran sobrelapadas, elevados niveles de homocisteina disminuyen la expresión de *hmp*. Agentes nitrosativos pueden disminuir los niveles intracelulares de homocisteina al nitrarla, por lo que se postula que en su presencia se intensifica la unión de MetR hacia el sitio de unión proximal a *hmp* regulando positivamente su transcripción (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999) (Fig. 6).

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *hmp*.

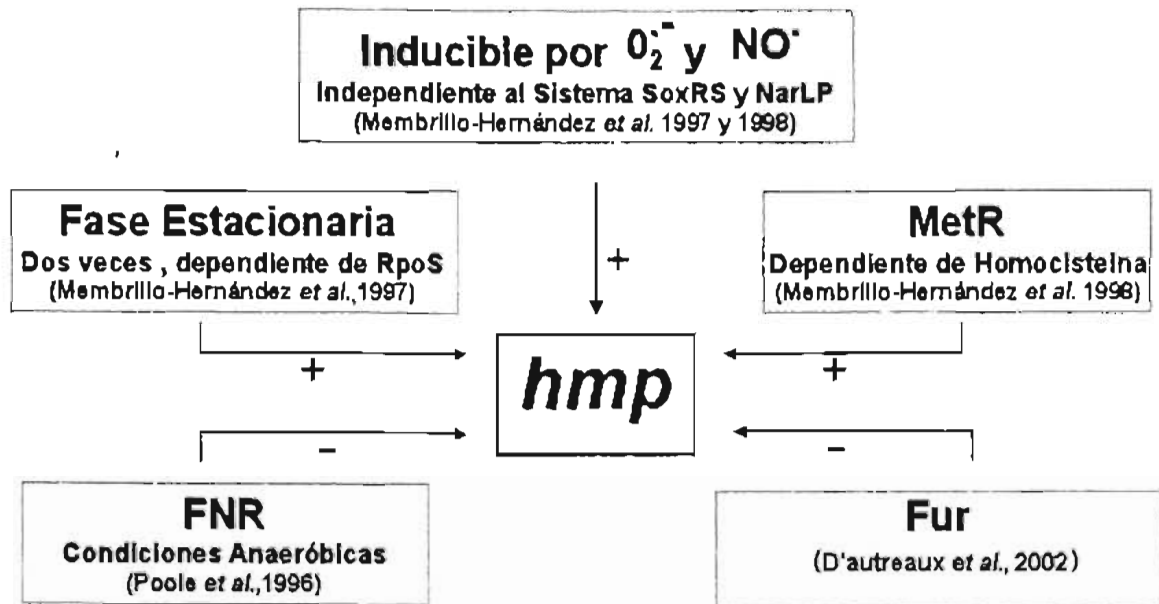


Fig. 6. Regulación de la expresión del gen *hmp* que codifica para una flavohemoglobina en *Escherichia coli*

Consistente con el papel en la respuesta hacia un estrés impuesto por NO^- , mutantes nulas en el gen *hmp* son hipersensibles al tratamiento con NO^- tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

1.5.2 Hmp y su actividad de paraquat diaforasa.

Hmp posee actividad de paraquat diaforasa, enzima capaz de reducir al catión paraquat (PQ^{2+}) (Membrillo-Hernández et al., 1999). Un fenotipo experimentalmente útil de mutantes en el gen *hmp* es el que a diferencia de una cepa silvestre, son incapaces de reducir al paraquat.

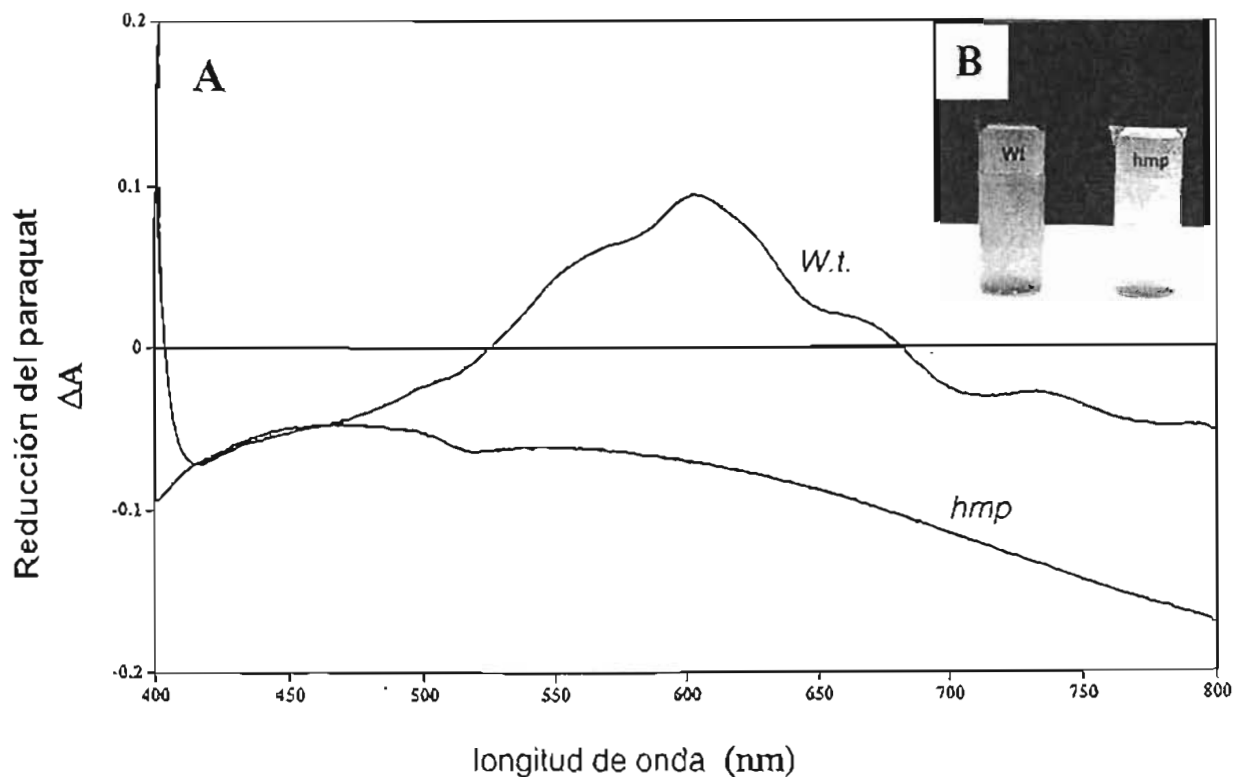


Fig. 7. (Tomada y modificada de Membrillo-Hernández *et al.*, 1999.)

A) Espectro de absorción de cultivos anaeróbicos en presencia de paraquat.

B) Diferencia en coloración en cultivos anaeróbicos de cepa silvestre y mutante en *hmp* en presencia de paraquat.

y puede ser fácilmente observable ya que al tratar un cultivo de una cepa mutante en *hmp* con PQ a 37 °C durante 24 horas en condiciones anaeróbicas este permanece color paja, mientras que un cultivo de una cepa silvestre adquiere coloración azul, el espectro de absorción de los cultivos revela un pico a 605nm correspondiente a la forma reducida del PQ (Jones *et al.*, 1977) en el cultivo de la cepa silvestre, el cual está ausente en el cultivo de la cepa mutante en *hmp* (Fig. 7).

1.5.2.1 Paraquat diaforasas en *Escherichia coli*

Extractos solubles de *Escherichia coli* contienen al menos tres NAD(P)H: paraquat diaforasas (Liochev *et al.*, 1994a). Una de éstas es identificada como tioredoxina reductasa la cual es responsable del 25% de actividad en

una cepa silvestre. Otra paraquat diaforasa es la NADPH:ferredoxin reductasa cuya expresión se induce en presencia de paraquat y es dependiente del sistema SoxRS y por último la sulfito reductasa (Liochev *et al.*, 1994b).

1.6 Objetivo de esta Tesis

1.6.1 Objetivo General

El objetivo del presente fue identificar al factor transcripcional responsable de la inducción de la expresión del gene *hmp* en presencia de NO[•] en *Escherichia coli*.

1.6.2. Objetivo particular

El objetivo particular de esta tesis es aislar una mutante por transposición en *E. coli* con baja o nula actividad de paraquat diaforasa

1.7 Hipótesis

Una mutante en *Escherichia coli* que al ser tratada con PQ en condiciones anaeróbicas y permanezca color paja (carente de actividad de paraquat diaforasa) estará afectada en; el gene *hmp*, en algún gene relacionado con la regulación de *hmp*, o en otra paraquat diaforasa (Fig. 8).

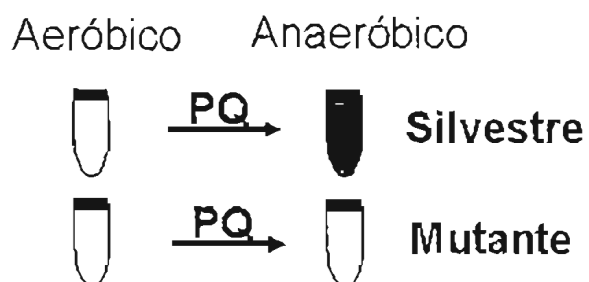


Fig. 8. Al aislar una mutante ausente de actividad de paraquat diaforasa, ésta podrá estar afectada en algún gene relacionado con la regulación de la expresión de *hmp*

CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. Material y métodos

2.1 Generalidades

2.1.1 Cepas bacterianas usadas en este estudio

Cepa	Genotipo relevante	Procedencia
MC4100	F' <i>araD139 ΔlacU 169 rpsL 150 relA1 fib-5301 deoC1 pts F25 rbsR</i>	Colección del laboratorio
W3110	F' <i>lam- ln (rrnD-rrnE)1 rph-1</i>	Colección del laboratorio
ZK408	<i>flaI, araD ΔlacU169 strA thiA pyrC46 nslA thyA his</i>	Dr. Roberto Kolter
RKP4545	VJS676 <i>hmp::Tn5</i>	Membrillo-Hernandez <i>et al.</i> , 1999
XL1-Blue	F' <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i>	Stratagene
JMH1722	W3110 <i>ΔygcB::kan</i>	Este trabajo
JMH1723	RKP2178 <i>ΔygcB::kan</i>	Este trabajo
JMH1260	MC4100 <i>ΔygcB::kan</i>	Este trabajo
JMH0734	<i>ygcB::miniTn5 (JMH0733) X P1 MC4100</i>	Este trabajo
JMH0733	MC4100 <i>ygcB::miniTn5</i>	Este trabajo
RKP2178	VJS676 pero $\Phi(hmp-lacZ)1$	Poole <i>et al.</i> , 1996
JC7623	<i>recB21 recC22 sbcB15 sbcC201</i>	Dr. Robert Gennis
JMH1752	MC4100 / $p\Phi(hmp-lacZ)$	Colección del laboratorio
JMH1753	JMH0733 / $p\Phi(hmp-lacZ)$	Este trabajo
VJS676	$\Delta(argF-lacZ)U169$	Dr. Valley Stewart

2.1.2 Bacteriófagos utilizados

P1 _{vir}	Miller, 1972
-------------------	--------------

λ NK1105 (λ miniTn5)	Kleckner <i>et al.</i> , 1990
λ NK1098 (λ miniTn10)	Kleckner <i>et al.</i> , 1990

2.1.3 Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'	T _m °C
HMPC1	GCT TAG ATC TCC GCA TCT CCT GAC TCA G	51
HMPC2	ACC GCC GCG GGG GTT GCC GGA TGT TTC CAT C	59
MINITN5	GCG CAG GGC TTT ATT GAT TCC ATT TTT ACA	47
mTn10-A	CCA AAA TCA TTA GGG GAT TCA TCA G	43
mTn10-B	TAA GGT GGA TAC ACA TCT TGT C	39
YgcBL-1	CCA GAA GCT TTG GTT TTC CGT ATG T	44
YgcBL-2	CGG GGT CGA CTG TTA TCA ATG ACG A	48
YgcBR-1	CGG GGT CGA CTT CGA TGC TGC TCA T	51
YgcBR-2	CGC AGA ATT CCG CTG GCG GAA ACT A	49
YgcB1	GCC AGG CCT TCA CCC TCT GT	46
YgcB2	GGA GCG CTT ACG AAT TGC GG	44

2.1.4 Medios de cultivo

Los medios líquidos se prepararon por disolución de los solutos indicados en agua destilada y posterior esterilización a 15 psi y 121 °C por 20 min, cuando el medio estaba suplementado con MOPS, el tiempo de esterilización disminuyó a 15 min. Los medios sólidos se prepararon por adición de agar al 1.5% (w/v) a los medios líquidos y posterior esterilización bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Se utilizó medio LB (Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0% y triptona 1.0%) para cultivos en medio líquido. Para los ensayos de formación de biofilm se usó medio LB suplementado con 100mM MOPS. El pH de los medios se ajustó a 7.0 antes de esterilizar.

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración usando filtros de membrana MF™ (Millipore Acrodisk) de 0.45 µm y adicionados al medio bajo condiciones de esterilidad a una temperatura del medio de cultivo menor a 50 °C. Las concentraciones de antibiótico fueron las siguientes: ampicilina 200 µg/ml, cloramfenicol 25 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y tetraciclina 25 µg/ml. Cuando fue necesario se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM y X-gal al 0.4% (w/v).

2.1.5 Condiciones de cultivo

Los cultivos aeróbicos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer, el volumen del cultivo no fue mayor al 20% de la capacidad del matraz. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 225 rpm. Los cultivos anaeróbicos se llevaron a cabo en tubos de ensayo con tapa de rosca llenados al máximo volumen e incubados sin agitación.

Las incubaciones anaeróbicas se llevaron a cabo en jarras de anaerobiosis, usando sistemas anaeróbicos GasPak™ (BBL Microbiology Systems) que generan una atmósfera compuesta por hidrógeno y dióxido de carbono. La condición anaeróbica fue comprobada mediante el uso de tiras de anaerobiosis (BBL).

El crecimiento celular bacteriano fue monitoreado midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech).

2.1.6 Preservación y mantenimiento de bacterias y fagos

Las cepas bacterianas se mantuvieron en placas de agar con su respectivo antibiótico a 4 °C hasta por mes y medio. Para almacenamientos a largo plazo, se guardaron 500 µl de un cultivo saturado en viales con medio y 15% de glicerol a -70 °C.

2.2 Métodos genéticos

2.2.1 Transformación

Mediante el proceso de transformación se puede introducir DNA plasmídico en células competentes, es decir, células que han sido sometidas a un tratamiento por medio del cual, la membrana se permeabiliza y permite el paso del DNA presente en el medio al interior de la bacteria. El protocolo que se siguió esta basado en el método de transformación por CaCl_2 , descrito en Sambrook *et al.*, (1974).

2.2.1.1 Preparación de células competentes

Protocolo:

1. Cultivar células a saturación a 37 °C a 225 rpm en medio LB.
2. Diluir el cultivo 1:100 en 20 ml de LB e incubar a 37 °C, 225 rpm por 2 h.
3. Transferir a un tubo cónico de 50 ml y centrifugar por 10 min a 3000 rpm a 4 °C y descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet celular en 20 ml de CaCl_2 100 mM frío e incubar en hielo por 45 min.
5. Centrifugar por 10 min a 3000 rpm a 4 °C y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 1 ml de CaCl_2 100 mM frío.

2.2.1.2 Transformación de células competentes

Protocolo:

1. Mezclar 100 μ l de células con 2 μ l de DNA plasmídico a una concentración aproximada de 10 μ g/ μ l.
2. Incubar sobre hielo por 1 h.
3. Incubar a 43°C por 90 s.
4. Agregar 1 ml de LB e incubar a 37 °C a 225 rpm por 1.5 h.
5. Centrifugar por 3 min a 13,000 rpm y decantar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 80 μ l de MgSO₄ 10 mM.
7. Plaquear en medio sólido selectivo.

2.2.2 Transducción generalizada mediante el bacteriófago P1_{vir}

La transducción es un proceso por el cual se transfiere material genético usando como vehículo de entrega de DNA a bacteriófagos. Se utilizó el bacteriófago P1_{vir} que es una variedad del fago P1 incapaz de formar lisógenos.

2.2.2.1 Obtención de los lisados del bacteriofago P1_{vir}

Protocolo:

1. Crecer un cultivo saturado de la cepa donadora a 37 °C a 225 rpm en medio LB suplementado con CaCl₂ 5 mM más el antibiótico correspondiente.

2. Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en la mitad del volumen original con una solución de $MgSO_4$ 10 mM.
4. Mezclar 200 μ l de células con 200 μ l de bacteriófago $P1_{vir}$, usar como control células sin fago.
5. Incubar a 37°C sin agitación por 20 min.
6. Agregar 2 ml de LB suplementado con $CaCl_2$ 5 mM y agitar con vortex.
7. Incubar a 37 °C, 225 rpm por 4 h, hasta observar que el cultivo con fagos se clarifica mientras que el cultivo control crece normalmente.
8. Remover los restos celulares por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
9. Repetir el paso 8.
10. Adicionar al sobrenadante 2 gotas de cloroformo y agitar con vortex. Almacenar los lisados a 4 °C.

2.2.2.2 Transducción al genoma mediada por $P1_{vir}$

Protocolo:

1. Crecer un cultivo saturado de la cepa receptora a 37°C, 225 rpm en medio LB suplementado con $CaCl_2$ 5 mM más el antibiótico correspondiente.

2. Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 5 min. y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en la mitad del volumen original con una solución de MgSO₄ 10 mM.
4. Diluir los lisados obtenidos a 10⁻⁴ con una solución de MgSO₄ 10 mM.
5. Mezclar 100 µl de cultivo con 100 µl de lisado.
6. Utilizar como controles muestras de sólo células y sólo fagos, para observar que las células receptoras no sean resistentes a antibiótico y que los lisados no tengan células.
7. Incubar a 37 °C por 20 min.
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min. y descartar el sobrenadante.
9. Resuspender en 1 ml de LB, repetir paso 8 y 9.
10. Agregar 1 ml de LB e incubar a 37 °C, 225 rpm por 1-2 h.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min. y descartar el sobrenadante.
12. Resuspender el pellet en 80 µl de MgSO₄ 10 mM.
13. Platear en medio selectivo.

2.2.3 Mutagénesis

2.2.3.1 Mutagénesis por inserción de un elemento transponible

La mutagénesis es uno de los métodos más ampliamente usados en la genética molecular. Uno de los métodos utilizados para la obtención de mutantes es el uso de elementos transponibles que se insertan al azar en el cromosoma, ocasionando generalmente la pérdida total de la función del gene en el cual se insertaron. En este trabajo se utilizaron los transposones mini-Tn5 (λ NK1105) y mini-Tn10 (λ NK1098) que confieren resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente. El método que se siguió se basa en el protocolo descrito por Kleckner y colaboradores (1990).

2.2.3.2 Preparación del lisado con fago λ

Protocolo:

1. Cultivar células a saturación de la cepa C600 (ésta contiene una mutación en el supresor *supE* que permite insertar glutamina en los codones de término tipo ámbar) a 37 °C, 225 rpm en medio LB.
2. Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min. y resuspender en la mitad del volumen original con una solución de MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM.
3. Mezclar 50 μ l de células con 50 μ l del lisado de fagos.
4. Incubar 10 min. a TA.
5. Agregar 2 ml de LB MgSO₄ 10 mM precalentado a 37 °C.
6. Incubar 3 h a 37 °C, 225 rpm.

7. Una vez que el cultivo se lise agregar 2 gotas de cloroformo.
8. Colectar los restos celulares por centrifugación.
9. Remover el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo, agregar 2 gotas de cloroformo.
10. Almacenar el lisado a 4 °C.

2.2.3.3 Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10

Protocolo:

1. Crecer un cultivo saturado de la cepa silvestre MC4100 a 37 °C, 225 rpm en medio LB.
2. Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min. y resuspender en la mitad del volumen original con una solución de MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM.
3. Mezclar 100 µl de células con 100 µl del lisado de fagos.
4. Incubar 10 min a TA.
5. Agregar 2 ml de LB MgSO₄ 10 mM.
6. Incubar a 37°C sin agitación por 1 h.
7. Plaquear diluciones seriales en medio sólido selectivo.
8. Incubar a 37°C.

2.2.3.4 Construcción de una mutante en el gene *ygcB* de *Escherichia coli*

Para construir una mutante en el gene *ygcB* mediante su reemplazo con un cassette de resistencia a kanamicina se diseñaron dos pares de oligonucleótidos *ygcBL-1*, *ygcBL-2* y *ygcBR-1*, *ygcBR-2* (ver sección 2.1.3), los cuales alinean en las regiones adyacentes a la secuencia codificante del gene *ygcB*, con el propósito de amplificar mediante una PCR dos fragmentos, L y R de alrededor de 1 kpb (Fig. 9).

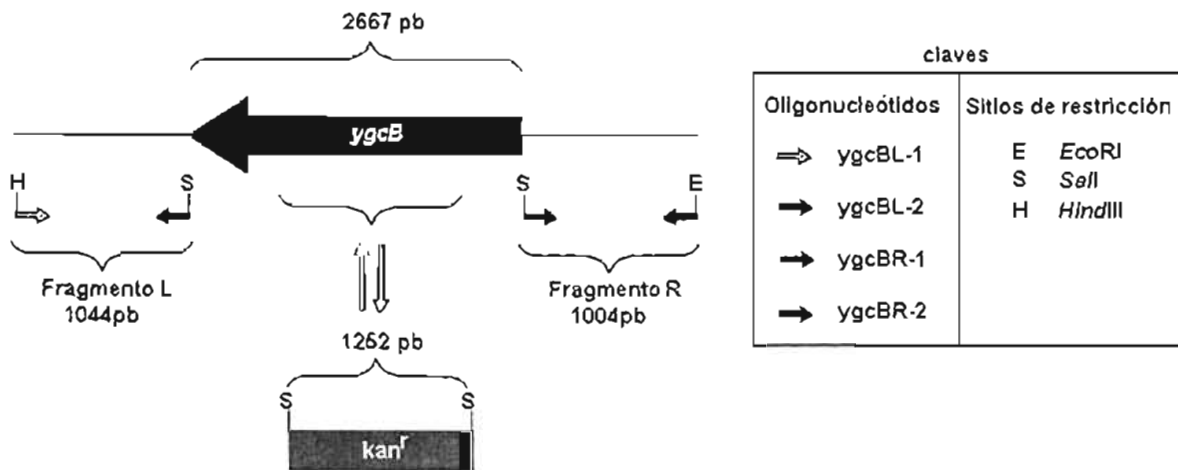


Fig. 9. Construcción de una mutante en el gene *ygcB* mediante su reemplazo con un cassette de resistencia a kanamicina.

Los fragmentos amplificados L y R fueron separados en un gel de agarosa, y extraídos con el kit de Qiagen como se describe en la sección 2.2.4.7.3.

El fragmento L una vez purificado fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *Sall* y ligado con en el vector pUC18 (también digerido con *HindIII* y *Sall*) (Fig. 10).

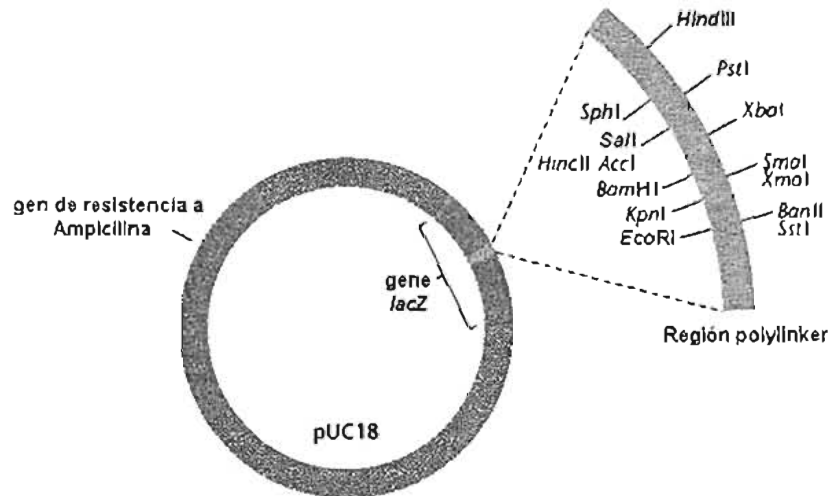


Fig. 10. Representación del vector pUC18 utilizado para clonar los fragmentos L y R en los sitios *HindIII-SalI* y *SalI-EcoRI* respectivamente

Una vez clonado el fragmento L en los sitios *HindIII* y *SalI*. Se digirió el fragmento R con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI* para ligarlo con el vector pUC18 que ya contiene al fragmento L en los sitios *EcoRI* y *SalI*.

Por otra parte se extrajo del plásmido pUC4K el cassette de resistencia a kanamicina mediante su digestión con la enzima de restricción *SalI*. El cassette de resistencia a kanamicina de 1252 pb fue separado mediante su electroforesis y purificado del gel de agarosa para ser clonado en los sitios *SalI* del pUC18 que contiene a los fragmentos L y R (Fig. 11).

Esta construcción que contiene al cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por los fragmentos L y R en pUC18 fue transformada por el método de CaCl_2 a la cepa JC7623 con el fin de facilitar mediante un evento de recombinación homologa de las secuencias L y R, el reemplazo del gene *ygcB* por el cassette de resistencia a kanamicina en el cromosoma.

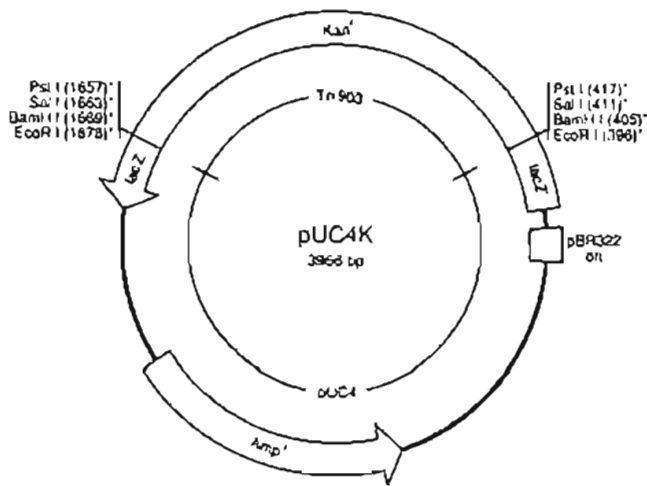


Fig. 11. Representación del plásmido pUC4K de donde se extrajo el cassette de resistencia a kanamicina mediante su digestión con *Sall*

2.2.4 Manipulación y análisis de DNA

2.2.4.1 Obtención de DNA genómico

La purificación del DNA genómico se llevó a cabo siguiendo el método de extracción por Fenol-Cloroformo, como se describe a continuación:

Protocolo:

1. Inocular un cultivo de la cepa requerida en 50 ml de LB e incubar a 37 °C con agitación a 225 rpm.
2. Colectar las células a una DO_{600nm} de 0.8 a 1.0 mediante la centrifugación del cultivo a 13,000 rpm durante 10 min.
3. Resuspender el pellet en 10 ml de buffer TE (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).
4. Adicionar 10 mg de lisozima e incubar 15 min. a 30 °C.
5. Adicionar 1 ml de SDS al 20% (w/v), mezclar usando una pipeta por 15 s. La solución se verá viscosa.

6. Adicionar 10 ml de fenol (saturado con buffer TE, tomar la fase oleosa) y 1.5 ml de NaCl 5 M. Invertir el tubo rápidamente a TA por 20 min.
7. Separar las fases por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min.
8. Remover la fase superior con una pipeta despuntada y transferirla a un tubo limpio.
9. Adicionar 1 volumen de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) y mezclar invirtiendo el tubo por 10 min.
10. Repetir los pasos 7 y 8.
11. Adicionar 1 volumen de cloroformo y mezclar invirtiendo durante 10 min.
12. Repetir los pasos 7 y 8.
13. Adicionar 1 volumen de isopropanol (agregar el isopropanol de tal manera que escurra por las paredes del tubo, se forman dos fases)
14. Mezclar suavemente la interfase utilizando una varilla de vidrio para recoger el DNA en forma de fibras.
15. Lavar el DNA con 100 ml de etanol al 70% frío.
16. Secar el DNA a TA.
17. Resuspender el DNA en 1 ml. de TE, hasta disolver totalmente.

18. Adicionar RNasa a una concentración final de 20 µg/ml e incubar a 50 °C por 1 h.
19. Adicionar Proteinasa K disuelta a una concentración final de 100 µg/ml. Incubar a 37°C por 1 h.
20. Adicionar TE para ajustar el volumen a 5 ml.
21. Adicionar 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1). Mezclar invirtiendo por 10 min.
22. Centrifugar y recuperar la fase superior.
23. Adicionar un volumen de cloroformo. Mezclar invirtiendo por 10 min.
24. Centrifugar y recuperar la fase superior.
25. Repetir los pasos 13, 14, 15, 16 y 17.
26. DNA listo para corte enzimático.

2.2.4.2 Obtención de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó usando el kit de purificación de DNA de QIAGEN™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el protocolo "*QIAprep Spin Miniprep Kit*", que permite la purificación de más de 20 µg de DNA plasmídico.

El protocolo se basa en la lisis de las células bajo condiciones alcalinas (NaOH, SDS). El SDS solubiliza los componentes fosfolipídicos y proteínicos de la membrana celular, permitiendo la lisis y liberación del

contenido celular. El NaOH desnatura tanto el DNA cromosomal y de plásmido, como las proteínas.

El tiempo óptimo de lisis permite la máxima liberación del DNA de plásmido de la célula sin permitir la salida del DNA cromosomal, minimizando a su vez la exposición del plásmido a una desnaturación irreversible. El RNA se degrada por acción de la RNasa A: Las proteínas, el DNA cromosomal y los restos celulares son precipitados debido a la alta concentración de sales.

El DNA plasmídico es adsorbido en una columna de resina de intercambio aniónico, constituida por Dietilaminoetanol (DEAE), en condiciones ácidas la resina se carga positivamente e interacciona con los grupos fosfatos del DNA. a través de interacciones electrostáticas, las endonucleasas y sales son removidas mediante lavados. El DNA se eluye a pH básico (7.0-8.0).

Protocolo:

1. Colectar un cultivo saturado por centrifugación. Resuspender las células en 250 μ l de buffer P1 (100 μ g/ml RNasa A; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA) hasta obtener una solución homogénea.
2. Agregar 250 μ l de buffer P2 [200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)] a la suspensión celular, mezclar invirtiendo el tubo hasta obtener una solución viscosa y clara.
3. Agregar 350 μ l de buffer N3 (3.0 M CH_3COOH , pH 5.5), mezclar invirtiendo el tubo.
4. Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm.
5. Transferir el sobrenadante a una columna QIAprep.

6. Centrifugar de 30 a 60s y descartar el flujo.
7. Lavar la columna agregando 500 μ l de buffer PB y centrifugando de 30 a 60s Descartar el flujo.
8. Lavar la columna agregando 750 μ l de buffer PE (80% etanol) y centrifugando de 30 a 60s.
9. Descartar el flujo y centrifugar por 1 min más para remover residuos del buffer de lavado.
10. Colocar una columna QIAprep en un tubo de microcentrífuga limpio. Para eluir añadir 50 μ l de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o H₂O al centro de la columna, incubar por 1 min y centrifugar por 1 min.
11. Almacenar los plásmidos obtenidos a -20 °C.

2.2.4.2 Manipulación enzimática del DNA

2.2.4.3 Endonucleasas de Restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas a partir de levaduras o bacterias, éstas cortan el DNA exógeno de cadena doble, mediante la hidrólisis de enlaces fosfodiéster generando extremos 3'-OH y 5'-fosfato. La secuencia de reconocimiento generalmente es palindrómica y puede variar en tamaño de acuerdo a la enzima utilizada. Si el sitio de corte coincide en ambas cadenas, se generan extremos romos, mientras que si el sitio de corte no coincide en ambas cadenas se generan extremos cohesivos.

Dado que los sitios de restricción en una molécula de DNA son constantes, se puede obtener un patrón de restricción definido. Esto permite obtener mapas de restricción característicos de cada molécula. El uso de las enzimas

de restricción utilizadas en este trabajo, se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de digestión se purificaron siguiendo el protocolo de Purificación de productos de PCR de QIAGEN™ “*QIAquick PCR Purification Kit*”.

2.2.4.5 Reacciones de ligación utilizando a la DNA Ligasa del bacteriófago T4

En este trabajo se utilizó la DNA Ligasa del bacteriófago T4; esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 3'-OH y 5'-fosfato. Para la unión de extremos cohesivos, se requiere que éstos se hayan generado por la misma enzima; este no es el de los extremos romos. La enzima se utilizó siguiendo el protocolo del fabricante.

2.2.4.6 Secuenciación de DNA

Se utilizó el servicio de secuenciación automatizada de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Empleando el Secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems, basado en un sistema automatizado de electroforesis capilar, con una capacidad de lectura de 400-600 nm.

2.2.4.7 Resolución y purificación de fragmentos de DNA

2.2.4.7.1 Separación de fragmentos de DNA en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método que permite la separación de fragmentos de DNA de acuerdo a tamaño. La detección del DNA se realizó por visualización de Bromuro de Etidio, que es una molécula plana que se intercala entre las bases del DNA y que emite fluorescencia al ser irradiado con luz UV.

El peso molecular de los fragmentos analizados se determinó por comparación con un marcador de fragmentos de DNA con pesos conocidos.

Se utilizó generalmente el marcador de 1 kpb de Invitrogen™ que contiene 12 fragmentos que van de 1,018 a 12,216 pb.

Protocolo:

1. Pesar la agarosa necesaria para obtener una concentración final de 1% (w/v).
2. Disolver la agarosa por calor en buffer TBE 1X (Trizma base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM, pH 8.3).
3. Añadir la agarosa disuelta a un conformador de geles sin olvidar colocar el peine para formar los pozos en el gel. Permitir que solidifique.
4. Preparar las muestras de DNA diluyendo en H₂O y buffer de carga 6x (EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25% y glicerol 30% en agua destilada) a una concentración final 1X.
5. Montar el gel en la cámara de electroforesis (sistema de Bio-Rad subcell GT™) utilizando buffer TBE 1X.
6. Realizar la electroforesis a un voltaje constante (100 V por 45 min).
7. Teñir el gel en una solución de bromuro de etidio (5 µg/ ml).
8. Observar la separación de los fragmentos de DNA en el gel utilizando un transiluminador (Hoefler).
9. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital DC290 ZOOM (Kodak) y se prepararon con el programa 1D versión 3.5.4.

2.2.4.7.2 Purificación de fragmentos de DNA en solución

Para limpiar los fragmentos o plásmidos digeridos de enzimas y otros reactivos que pudiesen afectar pasos subsecuentes en su manipulación, los productos de digestión fueron purificados mediante el “*QIAquick™ PCR Purification Kit*”. Este protocolo se basa en la purificación de fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble, provenientes de reacciones de PCR u otras reacciones enzimáticas. Mediante este método se puede purificar fragmentos de 100 pb a 10 kpb por adsorción a una resina que depende de la concentración de sales y de pH. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

Protocolo:

1. Agregar 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen de la muestra de PCR o producto de digestión y mezclar.
2. Colocar una columna QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.
3. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar de 30 a 60 s, para unir el DNA.
4. Descartar el flujo. Colocar la columna QIAquick en el tubo de recolección.
5. Lavar la columna con 750 µl de buffer PE y centrifugar de 30 a 60 s
6. Descartar el flujo, colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad.
7. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

8. Para eluir, agregar 50 μ l de buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ó H₂O al centro de la membrana y centrifugar por 1 min.

2.2.4.7.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa

Este proceso se llevó a cabo usando el kit comercial “*QIAquick™ Gel Extraction Kit*” de QIAGEN. El método se basa en el mismo principio que el protocolo para purificación de fragmentos de DNA en solución. Este protocolo esta diseñado para extraer y purificar DNA de 70 pb a 10 kpb.

Protocolo:

1. Tomar el fragmento de DNA del gel de agarosa utilizando una espátula.
2. Pesar el fragmento de agarosa en un tubo de centrifuga. Agregar 3 volúmenes de buffer QG a 1 volumen del gel (100 mg ~ 100 μ l).
3. Incubar a 50°C por 10 min (hasta que el gel se haya disuelto por completo). Para facilitar el proceso mezclar con vortex cada 2 o 3 min durante la incubación.
4. Una vez que el gel se disuelva por completo, checar que el color de la mezcla sea amarillo (similar al buffer QG sin agarosa disuelta).
5. Agregar el mismo volumen que el peso del gel de isopropanol y mezclar.
6. Colocar una columna QIAquick en un tubo de recolección.
7. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min, para unir el DNA.

8. Tirar el sobrenadante. Colocar la columna QIAquick en el tubo de recolección.
9. Lavar la columna con 500 μ l de buffer QG y centrifugar por 1 min a 14000 rpm.
10. Lavar la columna con 750 μ l de buffer PE y centrifugar por 1 min a 14000 rpm.
11. Tirar el sobrenadante, colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección. Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm.
12. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.
13. Para eluir, agregar 50 μ l de buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) o H₂O al centro de la membrana y centrifugar por 1 min.

2.3 Métodos Bioquímicos

2.3.1 Medición de la actividad de β -galactosidasa

Uno de los genes reporteros utilizados mas ampliamente en estudios sobre regulación genética, es el gene *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. El substrato de ésta enzima es la lactosa, pero también puede actuar sobre análogos de esta molécula, uno de ellos es el cromóforo *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), cuya hidrólisis puede detectarse mediante una reacción colorimétrica, midiendo absorbancia a 420 nm. Para monitorear la actividad de un gene, se pueden construir fusiones uniendo la región promotora del gene de interés con la región codificante del operón *lacZ* y midiendo la expresión del gene de interés mediante la actividad de la β -galactosidasa.

Para calcular la actividad de β -galactosidasa se usa la fórmula de Miller:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 [\text{DO}_{420\text{nm}} - (1.75 \cdot \text{DO}_{550\text{nm}})]}{t \cdot v \cdot \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

donde:

$\text{DO}_{600\text{nm}}$ = Densidad óptica de la suspensión celular.

$\text{DO}_{420\text{nm}}$ y $\text{DO}_{550\text{nm}}$ son las medidas de absorbancia del ensayo.

t = Tiempo de reacción (min)

v = Volumen del cultivo celular usado (ml)

La $\text{DO}_{420\text{nm}}$ mide la absorbancia debida a la hidrólisis de ONPG; mientras que la $\text{DO}_{550\text{nm}}$ mide la dispersión de la luz debida a los restos celulares y la turbidez. Para estos experimentos se usó un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech).

El ensayo de β -galactosidasa se llevó a cabo como se describe por Miller (Miller, 1972) y se realizó por triplicado para cada muestra.

Protocolo:

1. Medir la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de la muestra.
2. Emplear 30, 50 y 100 μl de cada muestra y aforar a 1 ml con buffer Z (Na_2HPO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, NaH_2PO_4 , H_2O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM).
3. Ajustar el pH a 7.0. Adicionalmente, emplear una muestra sin células que recibirá el mismo tratamiento que los tubos con células y que será el control del experimento.

4. Lisar las células resuspendidas en buffer Z agregando 40 μ l de cloroformo y 20 μ l de SDS al 0.1 % (w/v), mezclar con vortex durante 10 s.
5. Incubar a TA por 10 min.
6. Agregar 200 μ l de ONPG (0.4% en buffer Z) a cada tubo, a intervalos de 30 s, mezclar con vortex durante 10 s (mismo tiempo y velocidad para cada tubo).
7. Incubar a TA o hasta que la mezcla del ensayo, inicialmente incoloro, cambie a amarillo por la hidrólisis del ONPG.
8. Agregar 0.5 ml de una solución Na_2CO_3 1M a intervalos de 30 s, para detener la hidrólisis del ONPG.
9. Registrar el tiempo de reacción para cada muestra. Medir la absorbancia a 420nm y 550nm.

2.3.2 Análisis tipo Southern blot

El DNA es digerido y los fragmentos son separados por tamaño en un gel de agarosa. El DNA es desnaturalizado y transferido del gel a una membrana de nylon. Una vez en la membrana, el DNA se hibrida a una sonda acoplada a un sistema de detección. La sonda es una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia en el DNA cromosomal.

Se siguió el protocolo descrito por la casa comercial Amersahm Pharmacia Biotech™ y se usó el kit "*ECL™ direct nucleic acid labelling and detection system*", que se basa en un ensayo de quimioluminiscencia.

2.3.2.1 Procesamiento del gel de agarosa

Previa digestión del DNA de la muestra a analizar y separación de los fragmentos en un gel de agarosa mediante electroforesis se toma una fotografía usando un transiluminador de luz UV, colocando una regla fluorescente a lo largo del gel, de tal manera que el comienzo de la graduación coincida con los pozos.

Protocolo:

1. Colocar el gel en un recipiente y cubrirlo con solución depurinizadora (HCl 250 mM).
2. Incubar en agitación de 10 a 12 min, hasta que el azul de bromofenol del frente de corrida torne a amarillo.
3. Decantar la solución depurinizadora y enjuagar el gel con agua bidestilada.
4. Cubrir el gel con solución desnaturalizadora (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5M) e incubar en agitación por 25 min hasta que el azul de bromofenol torne a azul.
5. Decantar la solución y enjuagar con agua bidestilada.
6. Cubrir con solución neutralizadora (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, ajustar pH a 7.5) y agitar por 30 min.

2.3.2.2 Transferencia de DNA a la membrana

Protocolo:

1. Montar un dispositivo como se indica en la **Figura 12**. Usar pinzas y guantes al manipular la membrana. Evitar que se formen burbujas entre la membrana de nitrocelulosa y el gel. Usar buffer SSC 20X (Citrato Na_3 0.3M, NaCl 3M, pH 7.0) Incubar por 15 h.
2. Desmantelar el dispositivo y remover la membrana y el gel juntos. Marcar los carriles en la membrana y colocarla sobre papel Whatman™ 3MM.
3. Observar el gel con el transiluminador para verificar que el DNA ha sido transferido.
4. Colocar la membrana sobre una hoja de papel Whatman™ 3MM (con la cara que contiene el DNA hacia arriba), fijar el DNA a la membrana por luz UV a 120 mJ (UV1800 Stratalink, Stratagene).
5. Preparar el buffer de hibridación (ECL Gold Hybridization Buffer, preparar siguiendo instrucciones del fabricante), se requieren 0.25 ml por cada cm^2 de la base del recipiente en el que se llevará a cabo la hibridación.
6. Incubar la membrana con buffer de hibridación (previamente calentado a 42°C) por 1 h a 42°C.

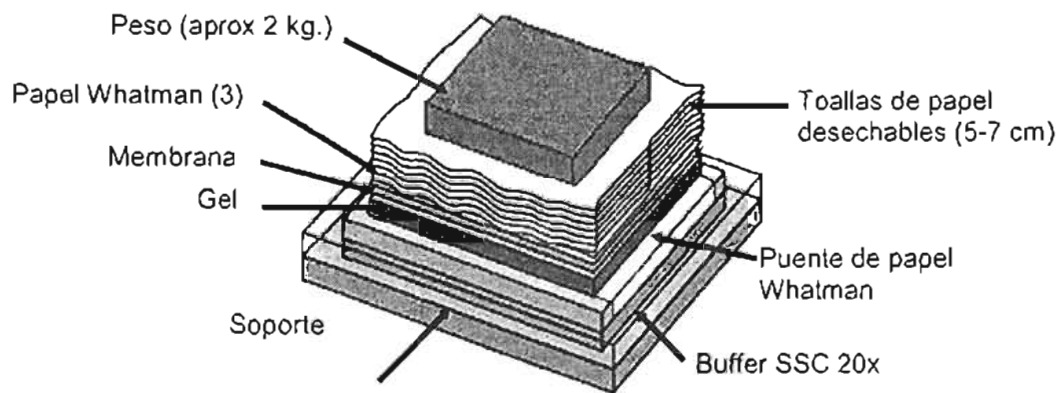


Fig. 12. Transferencia de DNA a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad.

2.3.2.3 Marcado de la sonda

El DNA que fue utilizado como sonda, se obtuvo mediante digestión del plásmido pUC4K que contiene un cassette de kanamicina entre los sitios de restricción de la enzima *BamHI*, o mediante amplificación del fragmento requerido. Los fragmentos de DNA fueron purificados mediante “*QIAquick™ PCR Purification Kit*”

1. Ajustar la concentración del DNA usado como sonda a una concentración aproximada de 10 ng/ μ l.
2. Desnaturalizar 100 ng de DNA por calentamiento a 100°C en un baño de agua hirviendo por 5 min.
3. Incubar en hielo inmediatamente por 5 min y centrifugar por 10 s para coleccionar todo el contenido en el fondo del tubo
4. Agregar 1 volumen del agente de marcaje (kit ECL, este contiene peroxidasa en complejos con carga positiva). Resuspender con micropipeta y centrifugar por 10 s.

5. Agregar medio volumen de solución glutaraldehído, mezclar y centrifugar para coleccionar el contenido. De esta forma la proporción DNA:agente de marcaje:glutaraldehído es 1:1:1.
6. Incubar 10 min a 37°C. Cuando se usan ácidos nucleicos menores a 300 pb, el tiempo de incubación debe aumentarse a 20 min.
7. Usar de inmediato o incubar en hielo por máximo 15 min.

2.3.2.4 Hibridación y lavado de la membrana

Protocolo:

1. Agregar la prueba marcada por las paredes del recipiente en el que se colocó la membrana con el buffer de hibridación. No añadir la sonda directamente sobre la membrana. Incubar a 42 °C toda la noche.
2. Precalentar el buffer primario de lavado a 55 °C (SDS 0.4%, SSC 0.5X).
3. Colocar las membranas en un recipiente con 5 ml/cm² de buffer primario de lavado.
4. Incubar por no más de 10 min a 55 °C.
5. Retirar el buffer y repetir el lavado.
6. Colocar la membrana en un contenedor limpio y agregar buffer secundario de lavado en exceso (SSC 2X).
7. Incubar 5 min a TA. Retirar el buffer y repetir el lavado.

2.3.2.5 Generación y detección de la señal luminosa

Protocolo:

1. Mezclar volúmenes iguales del reactivo de detección 1 (contiene peróxido) con el reactivo de detección 2 (luminol) en suficiente volumen para cubrir la membrana (aprox. 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Preparar al momento.
2. Eliminar el exceso de buffer secundario en la membrana con papel Whatman™ 3MM
3. Colocar la membrana en un recipiente limpio, manteniendo la cara que contiene el DNA hacia arriba.
4. Agregar el reactivo de detección directamente sobre la membrana e incubar por 1 min a TA. La reacción que ocurre al mezclar los agentes de detección ocasiona la reducción de peróxido por peroxidasa, la cual provoca una oxidación del luminol y consecuentemente la producción de luz azul.
5. Colocar la membrana escurrida entre 2 acetatos al tamaño del cassette, con la cara que contiene el DNA hacia arriba. Trabajar tan rápido como sea posible.
6. Colocar una película autoradiográfica sobre los acetatos que contienen la membrana en un cuarto oscuro. Se usó la película Hyperfilm-ECL™ que es sensible a luz azul.
7. Incubar toda la noche y revelar.

2.3.2.6 Revelado de película autoradiográfica

La solución de revelado y fijadora KODAK™ se usaron bajo las instrucciones del fabricante.

Protocolo:

1. Colocar la película en un recipiente con solución reveladora e incubar hasta que comiencen a aparecer bandas oscuras, agitar durante la incubación.
2. Lavar la película con agua.
3. Incubar en solución fijadora por 5 min.

2.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Protocolo:

1. Crecer un cultivo de la cepa en cuestión en 3 ml de medio LB a 37 °C, 225 rpm hasta una $DO_{600nm} = 0.6$
2. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min 1ml del cultivo en un tubo eppendorf.
3. Resuspender el pellet en 1ml de $MgSO_4$ 10 mM.
4. Tomar 50 μ l del cultivo resuspendido en $MgSO_4$ 10 mM y centrifugar durante 5 minutos a 14,000 rpm.
5. Resuspender el pellet en 20 μ l de buffer colorante Laemmli con 5 % de β -mercaptoetanol.

6. Realizar una electroforesis (PAGE-SDS) con las muestras en geles de poliacrilamida de 1mm de grueso utilizando cámaras MINI-PROTEAN de BioRad.

7. Preparar el gel separador al 9% de la siguiente manera:

Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.5 ml
Tris 1.5M pH 8.8	1.25
SDS 10%	50 μ l
H ₂ O destilada	2.15 ml
Persulfato de Amonio 10%	80 μ l
TEMED	8 μ l

8. Vaciar en la cámara de electroforesis hasta 1 cm antes de los pozos y agregar un poco de isopropanol para quitar las burbujas.

9. Dejar polimerizando por 45 min y remover el isopropanol con ayuda de un papel filtro.

Preparar el gel concentrador al 5%

Acrilamida/Bisacrilamida al 30 %	500 μ l
Tris 0.5M pH 6.8	750 μ l
SDS 10%	60 μ l
H ₂ O destilada	1.7 ml
Persulfato de Amonio 10%	40 μ l
TEMED	4 μ l

10. Dejar polimerizar 45 min, quitar el peine y enjuagar los pozos con agua.

11. Poner los geles en la cámara y llenarla con Buffer Laemmli IX (10g SDS, 30.3 g Tris y 144.1 g glicina en un litro de agua para una solución 10X).
12. Preparar las muestras para la electroforesis de la siguiente manera:
 - a. Agregar 50 μ l de buffer colorante Laemmli a cada muestra poniéndole al buffer 5% de β -mercaptoetanol.
 - b. Poner las muestras en agua hirviendo por 2 minutos.
 - c. Cargar en el gel cada muestra y el marcador de peso molecular.
13. Correr la electroforesis a 70 V por aproximadamente 15 minutos ó hasta que las muestras hayan pasado el gel concentrador, posteriormente correr a 200 V durante 45 min o hasta que las muestras lleguen al final del gel separador.
14. Quitar los geles de la cámara para teñirlos en solución de Coomassie por aproximadamente 10 min.
15. Desteñir el gel con solución desteñidora (90 ml metanol, 90 ml agua, 10 ml ácido acético glacial) por 45 min dos veces.
16. Pegar los geles en papel Watmman, cubrirlos con un acetato y secarlos a 80° C en un secador de vacío por 1 hora.

2.4 Otros Ensayos

2.4.1 Ensayo de paraquat diaforasa en placas de ELISA

Para analizar de manera masiva la actividad de paraquat diaforasa de un banco de mutantes, se emplearon placas de ELISA (cortadas a la mitad para facilitar su colocación dentro de la jarra anaeróbica). El protocolo usado fue el siguiente.

Protocolo:

1. Colocar 150 μ l de LB a cada uno de los pozos
2. Inocular cada pozo con una mutante, con ayuda de un replicador.
3. Incubar sin agitación a 37°C durante 24 h.
4. Agregar a cada pozo 150 μ l de LB + 2mM de PQ.
5. Incubar anaeróticamente a 37°C durante 24 horas las placas de ELISA empleando jarras anaeróbicas.
6. Extraer las placas de ELISA e identificar al pozo ausente de coloración azul, indicador de ausencia de actividad de PQ diaforasa (el análisis visual debe llevarse a cabo de la manera más rápida posible ya que la coloración se pierde en presencia de oxígeno)
7. Cada experimento fue repetido al menos en tres ocasiones

2.4.2 Ensayo de Paraquat Diaforasa en viales

Para evaluar la actividad de paraquat diaforasa de cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo el siguiente protocolo.

Protocolo:

1. En viales de vidrio de 2ml marca Wheaton se agregó 2 ml de un cultivo saturado.

1. Se agregó 200 μ l de PQ para lograr una concentración final de 2mM. (De esta manera se llena el vial hasta el tope favoreciendo la anaerobiosis).
2. Se incubaron a 37 °C en jarras anaeróbicas durante 48 h.
3. La ausencia de coloración azul en el medio indica ausencia de actividad de paraquat diaforasa.

2.4.3 Ensayo de formación de biofilm

Para los ensayos de formación de biofilm se utilizó el método descrito por O'Toole y Kolter con ciertas modificaciones (O'Toole *et al.*, 1999; Corona-Izquierdo *et al.*, 2002).

Protocolo:

1. Diluir un cultivo saturado de la cepa W3110 a una DO_{600nm} de 0.1 en LB suplementado con MOPS 100mM pH 7.0.
2. Inocular 150 μ l por pozo en placas de cloruro de polivinilo (PVC, 96-well vinyl assay plates. Costar Cambridge MA).
3. Incubar a 37°C en presencia o ausencia de oxígeno. Cubrir las placas de microtitulación con jasa plásticas para prevenir la evaporación.

2.4.3.1 Detección del biofilm mediante tinción por cristal violeta

Protocolo:

1. Lavar los pozos 3 veces con agua para remover las células que no se adhirieron.

2. Detectar el biofilm formado mediante una tinción con cristal violeta al 1% e incubar por 20 min.
3. Lavar los pozos con H₂O para remover el cristal violeta no adherido a superficies bióticas.
4. Cuantificar la cantidad de biofilm formado eluyendo el colorante en cada pozo con 200 µl de una solución 80% etanol 20% acetona e incubando por 20 min a 4 °C.
5. Medir la absorbancia a 590 nm. La cantidad de biofilm formado se reportó en unidades arbitrarias (U.A.) una U.A. corresponde a la absorbancia medida para el control usado.

2.4.4 Ensayo de nado

Los ensayos de nado se llevaron a cabo en placas de agar suave (agar, 0.3% w/v, triptona 1.3% w/v y NaCl 0.7% w/v). En algunos experimentos las placas fueron suplementadas con glucosa (0.2% w/v). Se utilizó un cultivo saturado de la cepa a analizar, se inocularon 20 µl del cultivo en una placa de agar suave y se incubó por 8 h (aeróbicamente) o por 12 h (anaeróbicamente). Las células que nadan forman un halo alrededor del punto de inoculación.

2.4.5 Ensayo de sensibilidad a H₂O₂ en agar

Protocolo:

1. A partir de un cultivo saturado en 3 ml de LB de la cepa silvestre MC4100 y de la cepa JMHI260 $\Delta ygcB::kan$ se tomaron 100 µl y se colocaron en dos tubos de ensayo de la siguiente manera:

Tubo a) 100 μ l de cultivo de MC4100

Tubo b) 100 μ l de cultivo de JMH1260 $\Delta ygcB::kan$

2. A cada tubo se le añadió 4 ml de agar suave LB fundido a 40° C, se mezcló y vaciaron en cajas de medio sólido.
3. Una vez solidificado el agar suave, se colocó con pinzas en el centro de la placa un círculo de papel filtro con 30 μ l de H₂O₂ al 30%.
4. Se incubaron a 37° C toda la noche.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de una mutante en *Escherichia coli* carente de actividad de paraquat diaforasa

Para aislar una mutante de *Escherichia coli* con baja o nula actividad de paraquat diaforasa se llevó a cabo una mutagenesis al azar por transposición en la cepa silvestre de laboratorio MC4100 (ver material y métodos sección 2.1.1) empleando como vehículo de entrega de minitransposones a los bacteriofagos λ miniTn5 y λ miniTn10, los cuales confieren resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente.

Del banco de mutantes fueron seleccionadas colonias individuales y sembradas en forma ordenada en placas nuevas para facilitar su análisis de actividad de paraquat diaforasa en placas de ELISA como se describe en material y métodos (Fig. 13).

Después de analizar 4550 mutantes se pudo aislar una mutante resistente a kanamicina que al incubarse con 2mM de PQ en condiciones anaeróbicas no presentaba la coloración azul característica de la actividad de PQ diaforasa. A esta mutante se le denominó JMH0733 (Fig. 14).

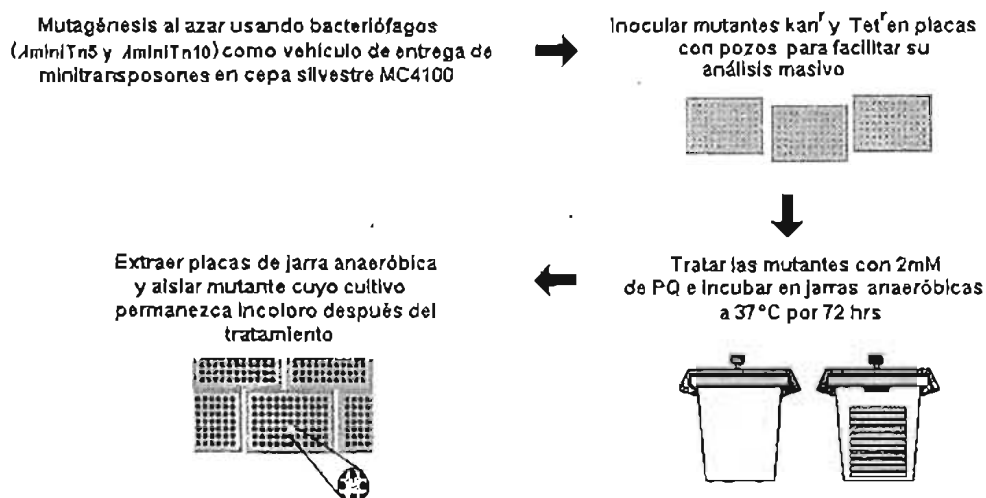


Fig. 13. Ensayo de paraquat diaforasa en placas de ELISA para aislar una mutante con baja o nula actividad de paraquat diaforasa mediante su ausencia de coloración azul después de un tratamiento con 2mM de PQ en condiciones anaeróbicas.

Como se puede observar en la **Figura 14**, al evaluar la actividad de paraquat diaforasa en viales de la mutante aislada JMH0733, ésta al igual que una cepa mutante en *hmp* (RKP4545) permanece incolora después de un tratamiento con 2mM de PQ en condiciones anaeróbicas.

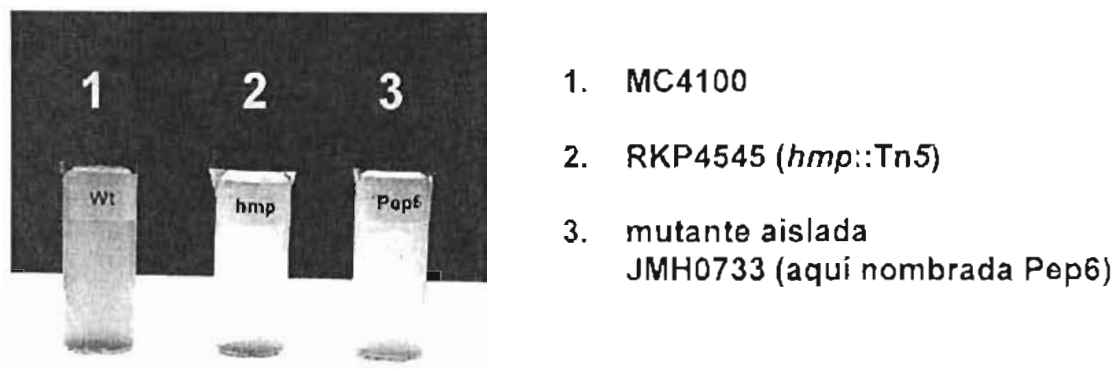


Fig. 14. Ensayo de paraquat diaforasa en viales

La mutante JMH0733 aislada al igual que una cepa mutante en *hmp* (RKP4545) carece de actividad de paraquat diaforasa.

3.2 Mapeo del sitio de inserción de la mutación en JMH0733

Como mencionamos anteriormente, la falta de actividad de paraquat diaforasa en la cepa JMH0733 puede deberse a una mutación en:

- o El gene *hmp*
- o Un regulador de *hmp*
- o Otra paraquat diaforasa

Para determinar si la mutación (inserción del transposón) causante de la ausencia de actividad de paraquat diaforasa se encontraba interrumpiendo a *hmp*, se purificó DNA cromosomal de las cepas MC4100 y JMH0733 por el método de extracción por fenol-cloroformo (ver material y métodos sección 2.2.4.1) y se realizó una PCR empleando los oligonucleótidos HMPC1 y HMPC2 para amplificar el gene *hmp* utilizando el siguiente programa:

95°C 5min } 1 ciclo
 94°C 1min }
 57°C 1.5 min } 40 ciclos
 72°C 2 min }
 72°C 10 min } 1 ciclo
 4°C ∞

Si la inserción del transposón se encontrara dentro de *hmp*, el tamaño del fragmento amplificado a partir de DNA de la cepa mutante JMH0733 sería 4.5kpb (la suma del transposón 2.9 kpb y de *hmp* 1.6 kpb) de lo contrario sería el mismo tamaño que el fragmento amplificado utilizando como template al DNA de la cepa silvestre MC4100, es decir de 1.6 kpb (Fig. 15).

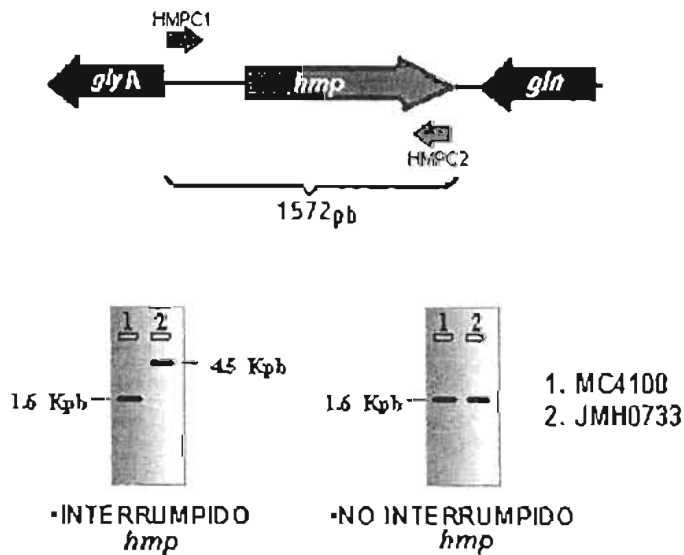
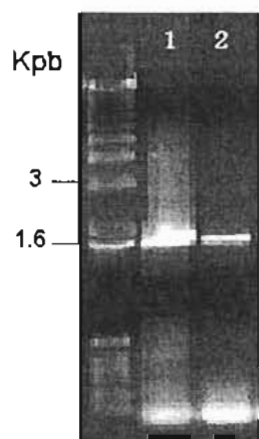


Fig. 15. Representación de los probables resultados si *hmp* estuviera interrumpido por el transposón en la cepa JMH0733

Al llevar a cabo la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% w/v en buffer TBE se pudo observar un fragmento amplificado de aproximadamente 1.6 kpb a partir del DNA de la cepa silvestre, MC4100, como de la cepa mutante JMH0733. A partir de este resultado se pudo establecer que la ausencia de actividad de paraquat

diaforasa de la cepa JMH0733 no se debía a la interrupción del gene *hmp* por el transposón (Fig. 16).



1. MC4100
(silvestre)
2. JMH0733
(mutante aislada)

Fig. 16. PCR para amplificar a *hmp*

El tamaño del fragmento amplificado en una cepa silvestre MC4100 como en la cepa mutante JMH0733 es el mismo (1.6 kpb). Por lo que el transposón no se encuentra interrumpiendo a *hmp*.

3.2.1 Determinación de la expresión del gene *hmp* en la mutante aislada JMH0733

Una vez demostrado que la ausencia de actividad de paraquat diaforasa en la cepa JMH0733 no se debía a una interrupción del gene *hmp*. Existía la posibilidad de que la ausencia de actividad de paraquat diaforasa se debiera a una alteración de la expresión de *hmp*, o quizás a que el paraquat no estaba entrando a la célula.

Para descartar lo anterior, se transformó a la cepa mutante JMH0733 con un plásmido (obtenido de la cepa JMH1752 ver material y métodos) que contiene una fusión genética del promotor de *hmp* fusionado al gene reportero *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, obteniendo a la cepa JMH1753.

Al evaluar la actividad de β -galactosidasa de la cepa JMH1763 de cultivos tratados con paraquat (PQ) y nitroprusiato de sodio (SNP), ambos inductores de la expresión del gene *hmp* a una concentración final de 200 μ M (Figura 17) se pudo observar que la expresión de *hmp* reflejada en la

actividad de β -galactosidasa de la cepa JMH1753 no está alterada al compararla con la de la cepa silvestre parental JMH1752, por lo que la ausencia de actividad de paraquat diaforasa de la cepa mutante aislada (JMH0733) no se debe a:

- A) Una mutación en algún gene que codifique para un factor transcripcional que modifique la expresión del gene *hmp*
- B) Al no ingreso del paraquat a la célula.

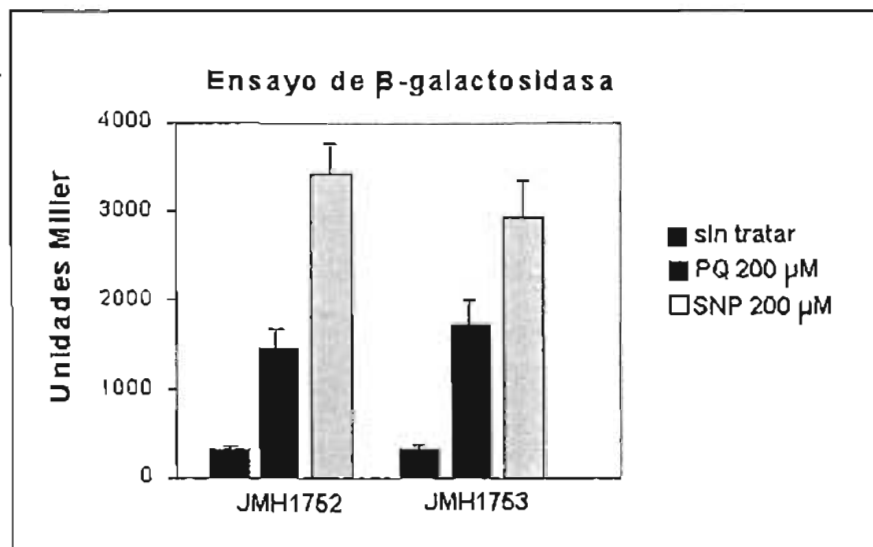


Fig. 17. Evaluación de la expresión de *hmp* en la mutante ausente de actividad de paraquat diaforasa JMH1753.
La expresión de una fusión $\Phi(hmp-lacZ)$ en la mutante JMH1753 (deficiente en paraquat diaforasa) es igual a la de una cepa parental JMH1752.

3.2.2 PCR inverso para identificar al gene interrumpido por el transposón en la cepa JMH0733.

Una vez descartada la posibilidad de que la ausencia de la actividad de paraquat diaforasa en la cepa JMH0733 se debiera a la interrupción del gene *hmp*, o a la alteración de su expresión, se llevó a cabo la técnica de PCR inverso para mapear el sitio de inserción del transposón.

Se decidió buscar un fragmento de DNA que contuviera al transposón y pudiera ser clonado para la identificación del gene mutado, para esto, se extrajo DNA cromosomal de la cepa JMH0733 por el método de extracción por fenol cloroformo para ser digerido con la endonucleasa *Hind*III, y llevar a cabo un ensayo tipo Southern blot utilizando como sonda el cassette de resistencia a kanamicina (Fig. 18).

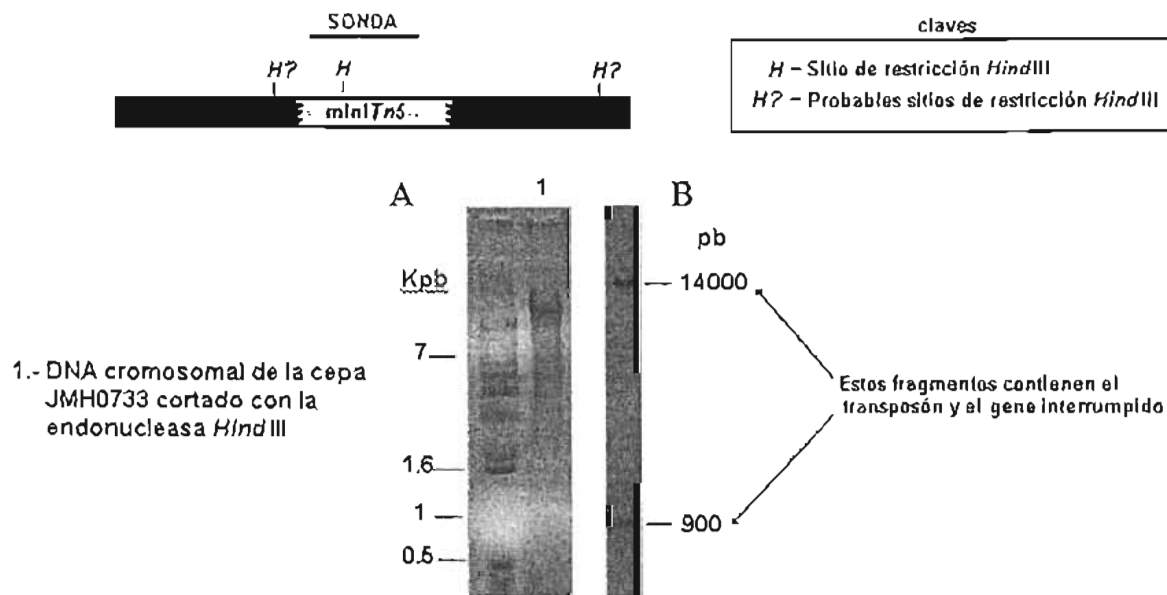


Fig. 18. Mapeo de la mutación en la mutante JMH0733

A) DNA cromosomal de la cepa JMH0733 digerido con la endonucleasa *Hind*III

B) Southern Blot utilizando como sonda el cassette de kanamicina

Como se puede observar en la Figura 18 al digerir el DNA cromosomal de la cepa JMH0733 con la endonucleasa *Hind*III y posteriormente hibridarlo con una sonda de kanamicina, se obtienen dos fragmentos, uno de aproximadamente 14,000 pb y otro de 900 pb que deben de llevar un fragmento del transposón. Dado que dentro del transposón solo existe un solo sitio de restricción para la endonucleasa *Hind*III estos fragmentos también contienen un fragmento del gene interrumpido.

Para identificar al gene interrumpido por el transposón, a partir del DNA cromosomal de la cepa JMH0733 digerido con la endonucleasa *Hind*III se

realizó una reacción de ligación con la ligasa T4 para permitir la unión intramolecular de todos los fragmentos, entre ellos el de 900 pb y el de 14 kpb para que pudieran ser utilizados como templates para una PCR empleando los oligonucleótidos mTn10-A y mTn10-B que alinean en las regiones IS en el extremo del transposón (Figuras 19 y 20) (debemos aclarar que el círculo de DNA formado por el fragmento de 14 kpb no se amplifica bajo las condiciones de PCR aquí utilizadas).

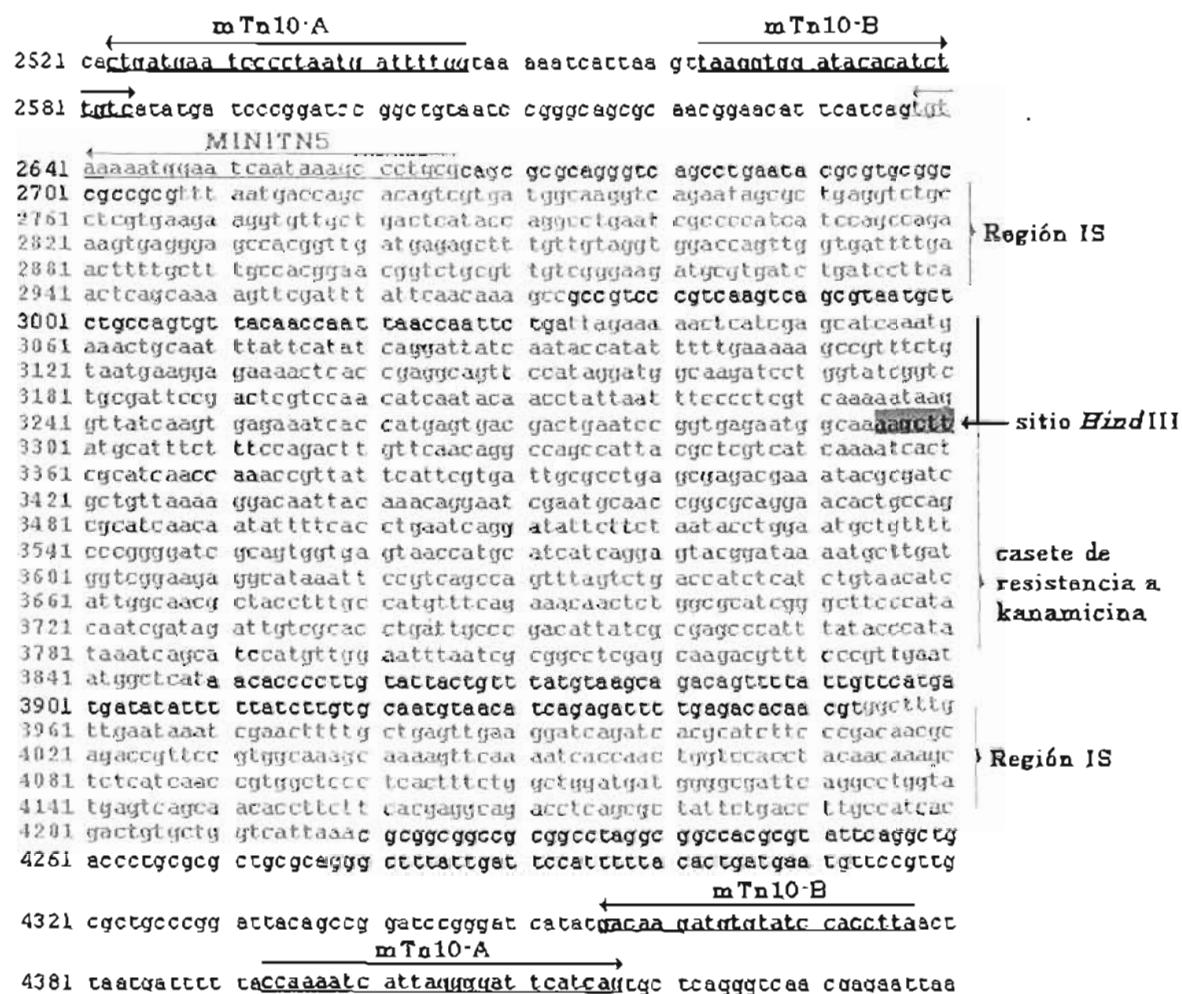


Fig. 19. Secuencia del transposón y alineamiento de los oligonucleótidos utilizados para mapear su sitio de inserción en el cromosoma de la cepa JMH0733

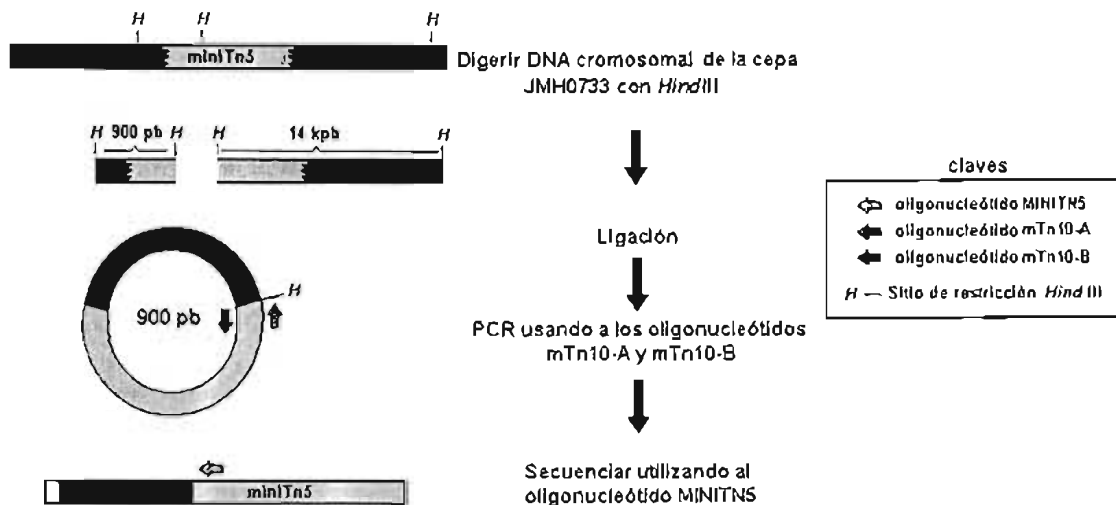


Fig. 20. Representación del PCR inverso para identificar al gene interrumpido en la mutante JMH0733

Después de realizar la electroforesis del producto de la PCR en un gel de agarosa, y verificar la amplificación con los oligonucleótidos mTn10-A y mTn10-B de un fragmento de aproximadamente 900 pb (Figura 21), se extrajo la banda de DNA de 900 pb del gel usando el kit comercial “QIAquick™ Gel Extraction Kit” de QIAGEN como se describe en material y métodos para secuenciarlo utilizando el oligonucleótido MINITNS (Fig. 22).

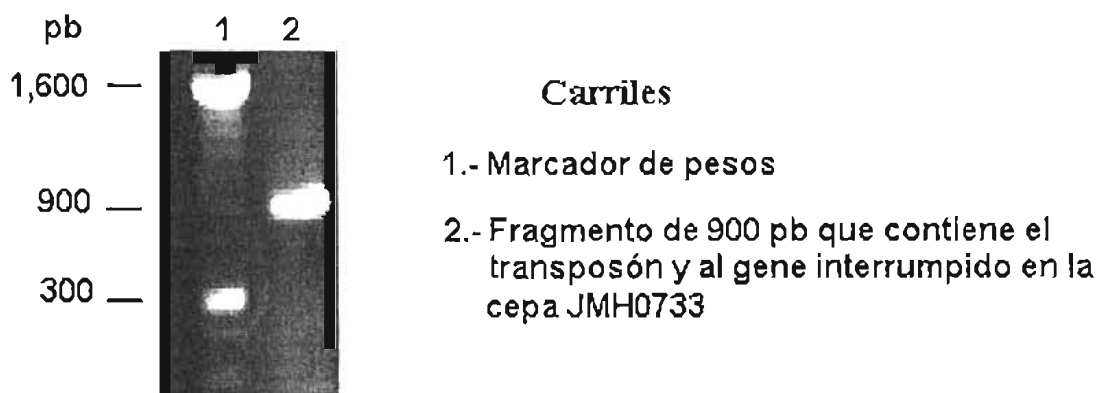


Fig. 21. Amplificación mediante una PCR usando los oligonucleótidos mTn10-A y mTn10-B del fragmento de 900 pb que contiene al transposón y al gene interrumpido en la cepa mutante aislada JMH0733



Fig. 22. La secuenciación a partir del oligonucleótido MINITN5 permitió establecer la secuencia del gene interrumpido por el transposón.

Al analizar la secuencia obtenida (Fig. 23) mediante un BLAST (Basic Local Arrangement Tool) en la dirección electrónica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> el cual es un programa que permite comparar secuencias nucleotídicas o proteicas con secuencias reportadas en bases de datos, se pudo establecer que el transposón se había insertado 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB* en la cepa JMH0733 ausente de actividad de paraquat diaforasa (Fig. 24).

Región intergénica *cysN* - *ygcB*

```

atattgc cggaca aat taaac gcctc tgc agaaat gat gggg ycg tttt tttt tttt gcgag cagca ttc tgc attt caaac
gtgaac gccgg ggaaga attatc aggtac agaa tggcg tggg tgc tttg aggc tgc tggc gta agca ttcgc gaggtt
ccagat ggaca aagc cccag gccg tttt cctat caacc tga ggc cagc cttc caac ccaaca attc gaat gtt agtc tc
ttc tttc caggg aggc aagac atgt at atca tga aattc gat at tta ggc cagc atc gaaa aat agc cccg ct gat at
tggc gaa abact taaaaaac aggg aggt at tta
    
```

Region codificante de *ygcB*

```

at ygaac ttt taaat at at at ggc att act ggg gaaa at cc tcaaaa agc ttg acg aag gaa at gat att c atc t g t t a
att t at c at tgc ctt gat att gct gct t tgc ag at tgc t gct ggc at caat caat g t at tgc aaaa at act ttt tgc ca
aat gaa at gct at caaa ac ag aggt gaa ggc ct gct gtt at ttt tca t tgc ttt tca t gat att g gaa at t t gat at
gg att c ca at at aat cag caga aat tgg ct ga aat taa at c t g ca ac ca at c at c c t taa t g g t c c at ca ac ca aat g
tgc c g taa a t t ca at c at ggt g c ag c g g t c t g t at t g g t t ca acc ag g at t c at t t c ag ag ca a t t c t c g g g g at t t
    
```

secuencia obtenida a partir de MINITN5

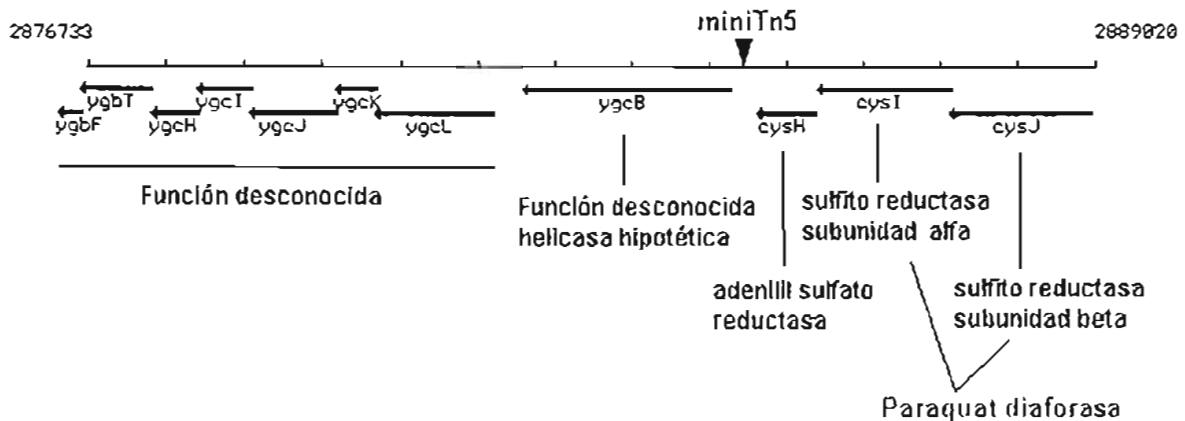


Fig. 24. Al analizar la secuencia obtenida de la secuenciación con el oligonucleótido MINITN5 se estableció que el transposón se encuentra 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB* en la mutante ausente de actividad de paraquat diaforasa (JMHO733). (tomada y modificada de <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

De manera interesante, el gene *ygcB* en *Escherichia coli* es un marco abierto de lectura que codifica para una proteína hipotética de función desconocida de alrededor de 100.5kDa (Tabla 5).

Primary Annotation for b2761	
Primary Locus Name:	b2761
TIGR Locus Name:	NT01EC3277
SWISS-PROT/TrEMBL AC:	P38036
Putative identification:	orf, hypothetical protein
Gene Symbol:	ygcB
Comment:	product=orf, hypothetical protein function=orf, Unknown
Coordinates:	2885242 to 2882576
DNA Molecule Name:	Chromosome Escherichia coli K12-MG1655
Gene length:	2667
Protein length:	888
Molecular Weight:	100544.82
pI:	5.4180
Percent GC:	44.74%
Kingdom:	Bacteria
Family:	Proteobacteria

Tabla 5. Datos generales del gene *ygcB* tomados de <http://www.tigr.org>

3.2.3. Análisis tipo Southern Blot para corroborar la inserción de transposón miniTn5 en el promotor del gene *ygcB* en la cepa JMH0733.

Con el fin de corroborar que en la cepa JMH0733 ausente de actividad de paraquat diaforasa, el transposón miniTn5 se había insertado 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB*, se llevó a cabo un análisis tipo Southern blot utilizando como sonda un fragmento de 419 pb del gene *ygcB* amplificado mediante PCR a partir de DNA cromosomal de la cepa silvestre MC4100 empleando los oligonucleótidos YgcB1 y YgcB2 (ver material y métodos).

Como se puede observar en la **Figura 25** al digerir DNA cromosomal de la cepas JMH0733 con la endonucleasa *HindIII* y posteriormente hibridarlo con la sonda mencionada, debido a la inserción del transposón en la región promotora del gene *ygcB* se obtienen dos fragmentos, uno de alrededor de

8000 pb y otro de 900 pb. De manera consistente, debido a la inserción del transposón 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB*, al digerir el DNA cromosomal de la cepa JMH0733 con la endonucleasa *Bam*HI y posteriormente hibridarlo con la misma sonda, se obtiene un fragmento de aproximadamente 3500 pb. El mismo patrón de hibridación se observó a partir de DNA cromosomal de la cepa JMH0734.

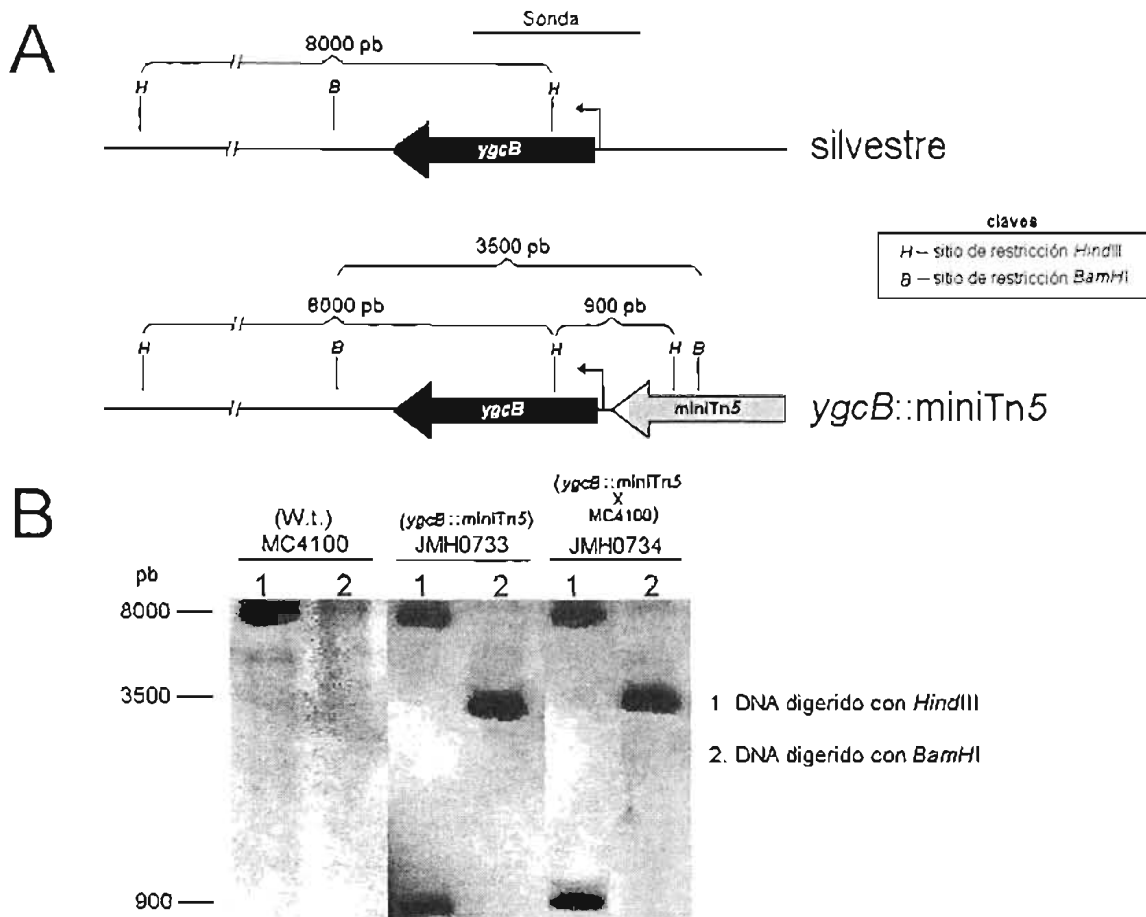


Fig. 25. Análisis tipo Southern Blot para corroborar la inserción del transposón *miniTn5* 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB* en la cepa JMH0733 (deficiente en la actividad de paraquat diaforasa).

A) Mapa de restricción y fragmentos esperados al digerir DNA cromosomal con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III en la cepa silvestre y la cepa JMH0733.

B) Southern blot utilizando como sonda un fragmento del gene *ygcB* en la cepa silvestre MC4100 y las cepas JMH0733 y JMH0734

Como primer paso para poder establecer una posible función para la proteína YgcB en *Escherichia coli*, se alineó *in silico* la secuencia de aminoácidos de YgcB contra todas las secuencias de proteínas codificadas en los genomas de organismos procariotes secuenciados a la fecha, reportadas en la base de datos del Instituto para la Investigación Genómica (The Institute for Genomic Research) <http://www.tigr.org>. Como se puede observar la proteína YgcB presenta similitud con proteínas con actividad de helicasa involucradas en el metabolismo y reparación de DNA (Tabla 6).

Organism	% Identity	% Similarity	Evalue	Putative identification	TIGR Cellular role(s)
<i>Escherichia coli</i> K12-HG1635	100.0%	100.0%	0	orf, hypothetical protein	Hypothetical proteins, Conserved
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	47.9%	63.7%	1.3e-209	CRISPR-associated helicase Cas3	Mobile and extrachromosomal element functions, Other
<i>Photobacterium profundum</i> SS9	38.0%	55.1%	1.8e-108	conserved hypothetical protein	Protein synthesis, Translation factors
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi Ty2	35.0%	49.2%	1.1e-75	conserved hypothetical protein	Mobile and extrachromosomal element functions, Other
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi CT18	35.0%	49.2%	1.1e-75	conserved hypothetical protein	Hypothetical proteins, Conserved
<i>Salmonella typhimurium</i> LT7 SGSC1412	30.6%	47.9%	4.8e-75	putative helicase	DNA metabolism, DNA replication, recombination, and repair
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	29.7%	46.3%	6.5e-71	orf hypothetical protein	Mobile and extrachromosomal element functions, Other
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 VT2-Sakar	29.7%	46.3%	6.5e-71	hypothetical protein	Hypothetical proteins, Conserved
<i>Photobacterium luminescens</i> TTO1	30.4%	47.0%	1.1e-68	unnamed protein product	Mobile and extrachromosomal element functions, Other
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM14863	35.6%	49.4%	8.1e-56	putative helicase	DNA metabolism, DNA replication, recombination, and repair
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	29.9%	47.5%	6.1e-53	conserved hypothetical protein	DNA metabolism, DNA replication, recombination, and repair
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	29.6%	43.8%	2.1e-46	CRISPR-associated helicase Cas3	Mobile and extrachromosomal element functions, Other
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC13129	28.9%	44.9%	4.5e-45	putative helicase	DNA metabolism, DNA replication, recombination, and repair

Tabla 6. Análisis tipo BLAST del gene *ygcB*.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

El gene *ygcB* posee homología con genes que codifican para proteínas con dominios de helicasa involucradas en el metabolismo de DNA.

3.3 Construcción de una mutante en $\Delta ygcB::kan$ en *Escherichia coli*

Con el propósito de saber si una mutación en el gene *ygcB* con función desconocida era responsable de la ausencia de actividad de paraquat diaforasa en la mutante JMHO733, se construyó una mutante sin el gene *ygcB* mediante su reemplazo con un cassette de resistencia a kanamicina como se describe en material y métodos (ver sección 2.2.3.4).

Para comprobar la obtención de la mutante $\Delta ygcB::kan$ denominada JMH1260 se extrajo DNA de la cepa JMH1260 y MC4110 por el método de fenol:cloroformo como se describe en material y métodos y se llevó a cabo una PCR con los oligonucleótidos *ygcBL-1* y *ygcBR-2* que alinean 1 kpb río abajo y río arriba de la secuencia codificante para *ygcB* respectivamente, esperando un fragmento amplificado a partir de DNA de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ de 3300 pb debido al reemplazo del gene *ygcB* por un cassette de resistencia a kanamicina, mientras que a partir de DNA de una cepa silvestre MC4100 un fragmento de 4705 pb. Como se observa en la Figura 26 la construcción de la mutante $\Delta ygcB::kan$ denominada JMH1260 fue exitosa.

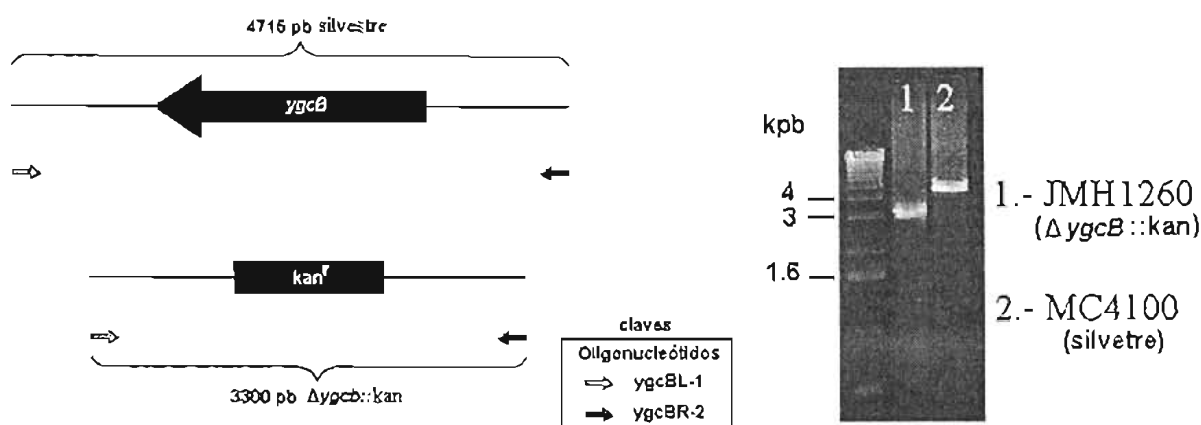


Fig. 26. Evidencia molecular de la construcción de una mutante en el gene *ygcB* mediante su reemplazo con un cassette de resistencia a kanamicina

3.4 Evaluación de la actividad de paraquat diaforasa de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$

Para nuestra sorpresa al evaluar la actividad de paraquat diaforasa en viales de la mutante JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ ésta no estaba afectada como en la mutante aislada JMH0733 *ygcB::Tn5* (Fig. 27).

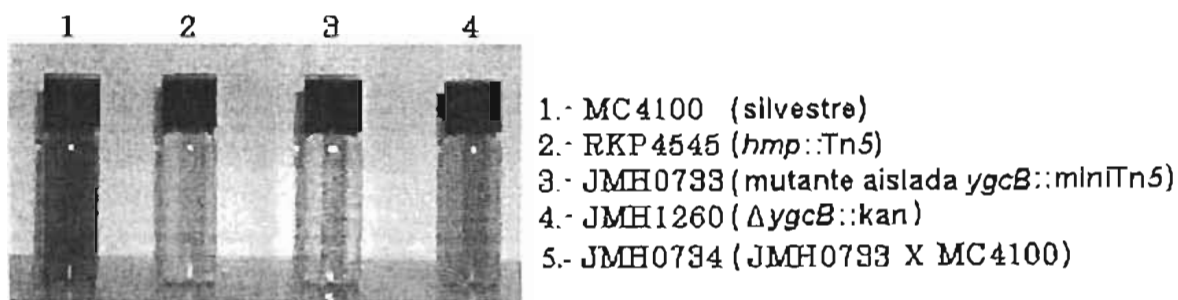


Fig. 27. Ensayo de Paraquat diaforasa

Una cepa mutante en $\Delta ygcB::kan$ (JMH1260) no esta afectada en su actividad de paraquat diaforasa

3.5 Transducción de la mutación $ygcB::miniTn5$ de JMH0733 a un fondo genético parental fresco

Con el fin de establecer que una sola mutación era responsable del fenotipo de ausencia de actividad de paraquat diaforasa en la cepa JMH0733, se transdujo la mutación inducida por el transposón a un fondo genético fresco mediante el bacteriófago $P1_{vir}$. Al analizar la actividad de paraquat diaforasa en viales de la transductante obtenida denominada JMH0734, se pudo observar que esta no conservaba el fenotipo de ausencia de actividad de paraquat diaforasa, por lo que se concluyó que la mutación inducida por la inserción del transposón en la cepa JMH0733 no estaba ligada al fenotipo (Fig. 28).

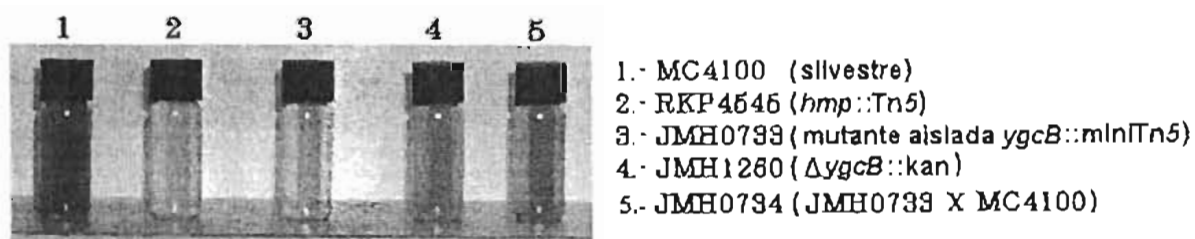


Fig. 28. Ensayo de paraquat diaforasa

Al transducir la mutación inducida por el transposón de la cepa JMH0733 a un fondo genético fresco parental, se observa que la mutación no está ligada al fenotipo de ausencia de actividad de paraquat diaforasa.

Una vez que se estableció que la ausencia de actividad de paraquat diaforasa no estaba ligada a la mutación inducida por el transposón en la región promotora del gene *ygcB*, se decidió realizar un gel de proteínas de extractos totales para evaluar si pudieran existir diferencias en el patrón proteico de la cepa JMH0733 comparada con la cepa silvestre parental MC4100.

Como se puede observar en la Figura 29 a diferencia de la cepa silvestre MC4100 la cepa mutante aislada JMH0733 carece de dos proteínas, una de alrededor de 70 kDa y otra de 17 kDa, muy probablemente su ausencia sea responsable de la falta de actividad de paraquat diaforasa.

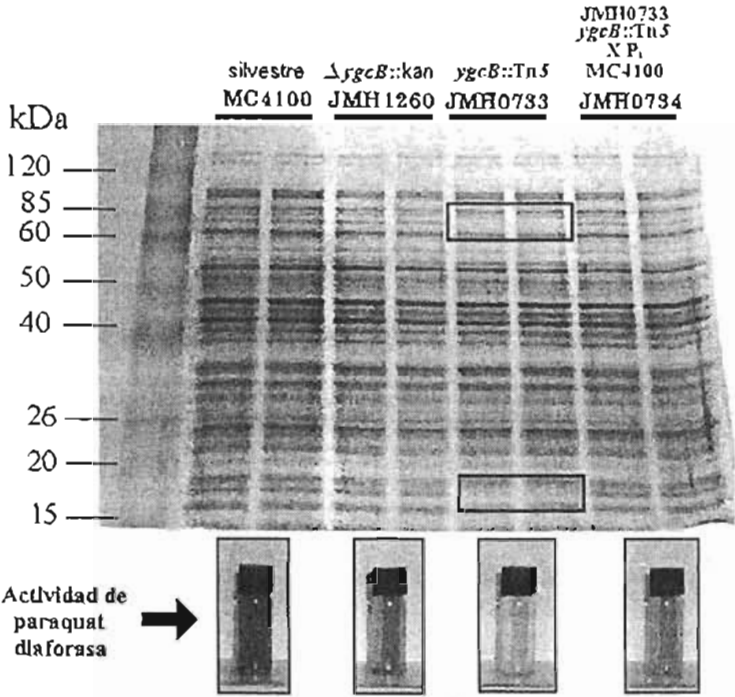


Fig. 29. Diferencias en el patrón proteico entre JMH0773 $\Delta ygcB::kan$ y MC4100.

La cepa mutante aislada JMH0733, (ausente de actividad de paraquat diaforasa), a diferencia de una cepa silvestre MC4100 carece de dos proteínas de alrededor de 70 kDa y 17 kDa

3.6 Caracterización parcial de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$

3.6.1 Curvas de crecimiento de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$

Como primer paso para caracterizar a la mutante JMH1260 $\Delta ygcB::kan$, y evaluar si una mutación en *ygcB* pudiera estar afectando su velocidad de crecimiento. Se llevaron a cabo curvas de crecimiento en tanto medio LB

como medio mínimo suplementado con glucosa al 0.2% (w/v). Como se puede observar en la Figura 28 entre la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ y la cepa parental MC4100 no existen diferencias en su velocidad de crecimiento.

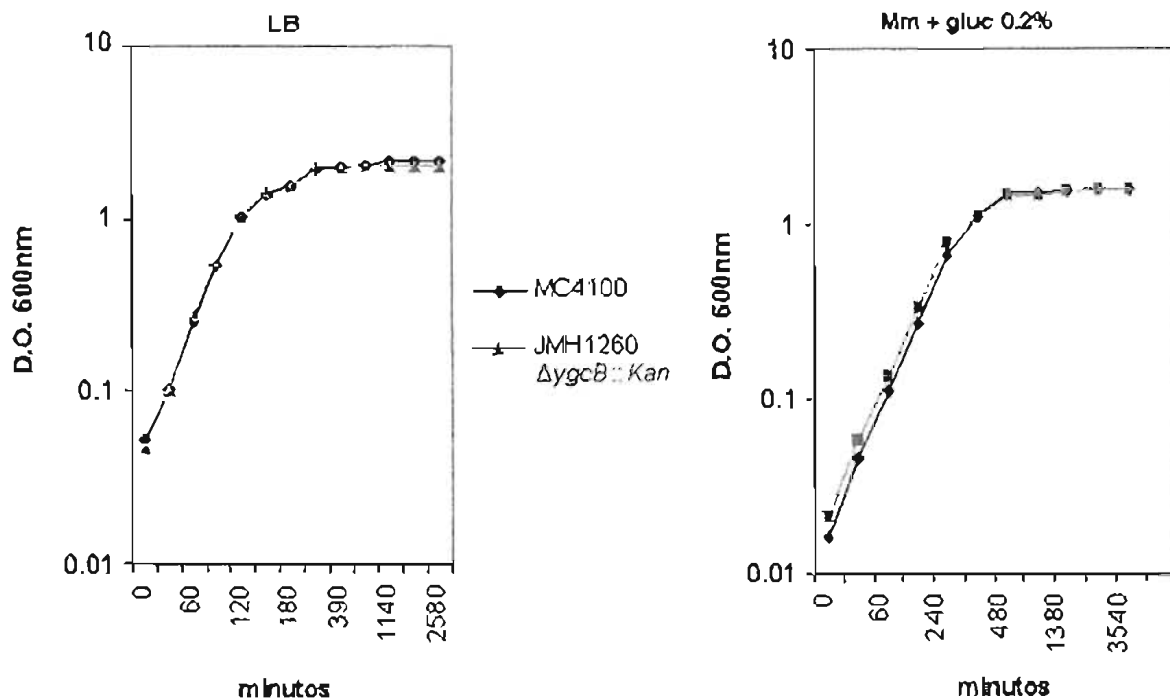


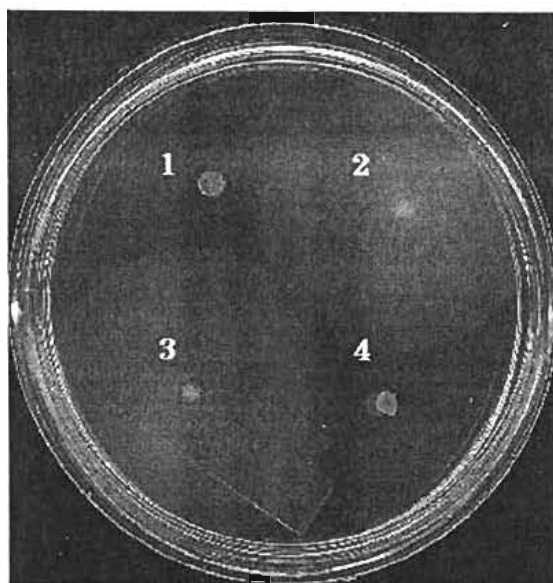
Fig. 30. Curvas de crecimiento de las cepas JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ y MC4100. La cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ no está afectada en velocidad de crecimiento en LB ni en Mm + glucosa al 0.2%

3.7 Evaluación de la motilidad y formación de biofilm en la cepa JMH1722 $\Delta ygcB::kan$

Con el fin de establecer si una mutación en el gene *ygcB* podía estar afectando la motilidad y la formación de biofilm de cepas de *Escherichia coli*, se transdujo la mutación $\Delta ygcB::kan$ de la cepa JMH1260 a la cepa W3110 por medio del bacteriófago P1_{vir} , obteniendo la cepa JMH1722. Cabe señalar que se utilizó la cepa W3110 porque estudios previos en el laboratorio han demostrado que es una cepa con buena formación de biofilm y motilidad (Corona-Izquierdo *et al.*, 2002).

Se evaluó la capacidad de nado de la cepa JMH1722 en placas de agar suave (ver materia) y métodos), donde la capacidad de nado se puede observar por la formación de un halo alrededor del punto de inoculación, mientras que la formación de biofilm se estudió en pozos de PVC como se describe en materia) y métodos y fue detectada mediante el método de tinción por cristal violeta. La formación de biofilm se observa como un anillo en la interfase aire líquido. La cuantificación de la formación de biofilm en pozos de PVC se llevó a cabo como se describe en materia) y métodos mediante su elución con una solución de etanol 80% y acetona 20%. Como controles negativos para el ensayo de nado y para la formación de biofilm se emplearon las cepas MC4100 Y ZK408 (*fh1C*) ambas afectadas en nado y formación de biofilm.

Como se puede observar en la Figura 31 la cepa JMH1722 $\Delta ygcB::kan$ no está afectada en motilidad.



1. MC4100
2. W3110 (silvestre)
3. JMH1722 ($\Delta ygcB::kan$)
4. ZK408 (*fh1C*)

Fig. 31. Ensayo de motilidad

La cepa JMH1722 $\Delta ygcB::kan$ no está afectada en su motilidad como se observa en esta placa de agar suave

De manera similar como se observa en la **Figura 32** al evaluar la formación de biofilm en PVC por el método de tinción por cristal violeta en tanto condiciones aeróbicas como anaeróbicas, se estableció que la formación de biofilm de la cepa JMH1722 $\Delta ygcB::kan$ es similar a la de la cepa parental W3110.

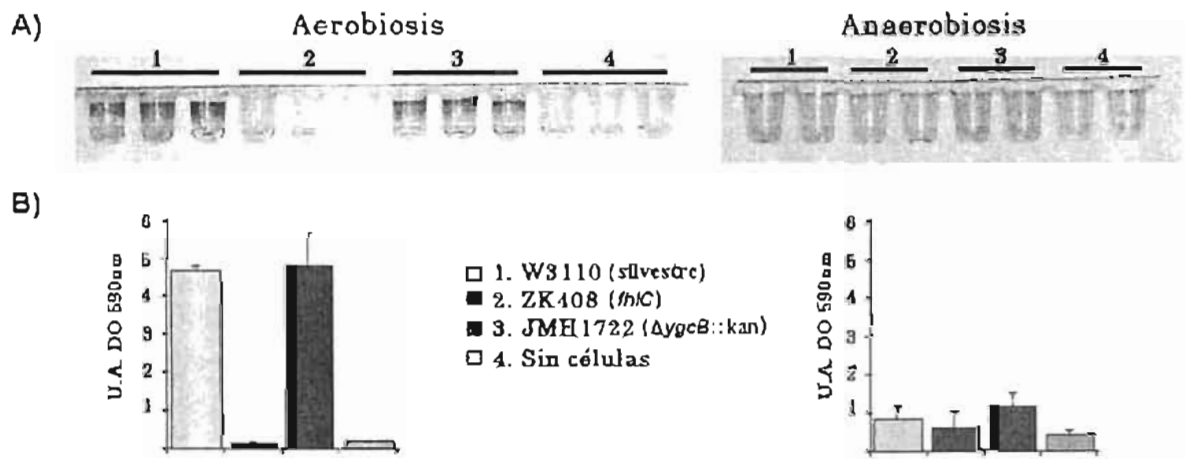


Fig. 32. Ensayo de formación de biofilm

A) La formación de biofilm en pozos de PVC de la cepa JMH1722 no está alterada ni en condiciones aeróbicas ni en anaeróbicas.

B) Cuantificación espectrofotométrica de la formación de biofilm en PVC mediante su elución con una solución de 80% de etanol y 20% de acetona.

3.8 Evaluación de la sensibilidad a H_2O_2 de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$

Con el fin de establecer si una mutación $\Delta ygcB::kan$ en *Escherichia coli* afecta la resistencia al H_2O_2 , se llevó a cabo un ensayo en agar usando las cepas JMH1260 y la cepa silvestre MC4100. Como se observa en la **Figura 33** la cepa JMH1260 no es más sensible al H_2O_2 que una cepa silvestre.

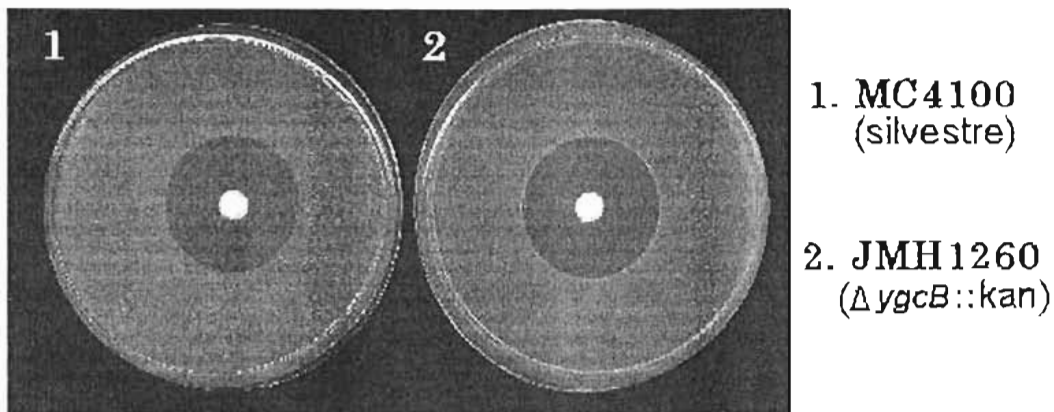


Fig. 33. Ensayo de resistencia al H_2O_2

La cepa JMHI260 $\Delta ygcB::kan$ es igual de sensible al H_2O_2 que una cepa silvestre parental.

3.9 Evaluación de la expresión de *hmp* en un fondo genético $\Delta ygcB::kan$

Con el fin de establecer si la ausencia de *ygcB* afectaba la expresión de *hmp*. Se transdujo por medio del bacteriófago $P1_{vir}$ la mutación $\Delta ygcB::kan$ de la cepa JMHI260 a la cepa RKP2178 que lleva en el cromosoma una fusión genética del promotor de *hmp* con el gene reportero *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa. De manera que la expresión del gene estudiado (*hmp*) está directamente relacionada con la actividad de la β -galactosidasa.

Al evaluar la actividad de β -galactosidasa de la cepa JMHI723 en presencia de PQ o SNP (Nitroprusiato de sodio) un donador de NO^- ambos inductores de la expresión de *hmp* a una concentración de 200 μM se observa que no existen diferencias en la expresión de *hmp* en la cepa JMHI723 $\Delta ygcB::kan$ comparada con la cepa parental RKP2178 (Fig. 34).

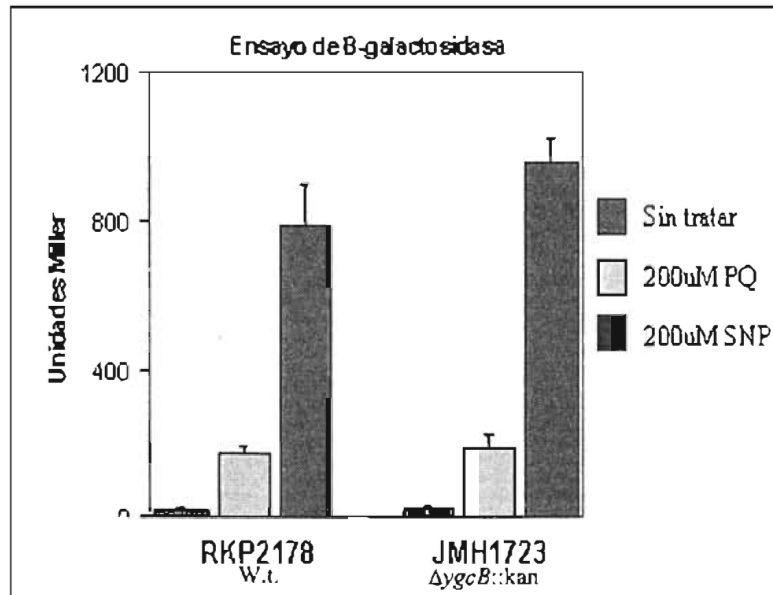


Fig. 34. Ensayo de β -galactosidasa de la cepa RKP2178 y JMH1723
La expresión de *hmp* en un fondo genético $\Delta ygcB::kan$ no se ve afectada.

3.10 Evaluación de la sensibilidad a ácido nalidixico de la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$

El ácido nalidixico pertenece a un grupo de antibióticos de amplio espectro denominados quinolonas. El ácido nalidixico se sabe inhibe la girasa, una proteína ampliamente involucrada en el mecanismo de replicación del material genético.

Ya que el producto del gene *ygcB* es una proteína con función aún desconocida pero con dominios de helicasa, y las helicasas también están ampliamente involucradas en el metabolismo del DNA. Nos preguntamos si una cepa mutante en *ygcB*, JMH1260, podría ser más sensible al tratamiento con ácido nalidixico. Como se puede observar en la Figura 35 al llevar a cabo un ensayo de cuentas viables de cultivos tratados con ácido nalidixico

a una concentración de 4µg/ml, la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ no es más sensible que una cepa silvestre MC4100.

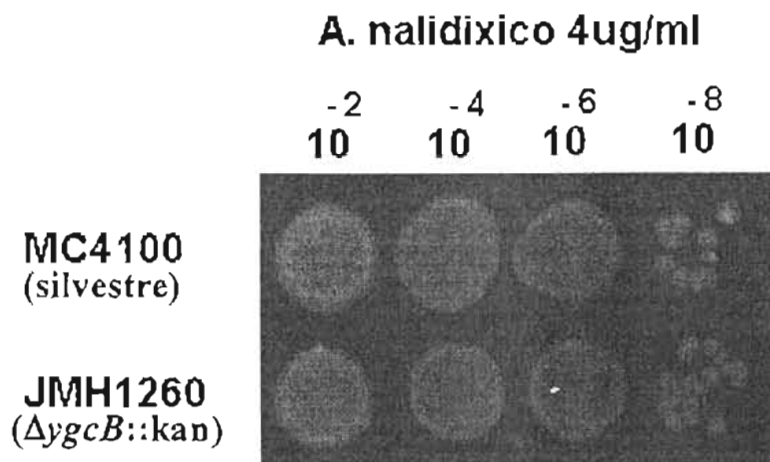


Fig. 35. Ensayo de cuentas viables en presencia de ácido nalidíxico. La cepa JMH1260 no está afectada en la resistencia a ácido nalidíxico.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se logró aislar una cepa mutante en *Escherichia coli* ausente de actividad de paraquat diaforasa denominada JMH0733.

Se estableció que la mutación inducida por el transposón 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB* en la cepa JMH0733 no es responsable de la ausencia de actividad de paraquat diaforasa.

Se estableció que la cepa JMH0733 ausente de actividad de paraquat diaforasa carece de al menos dos proteínas, una de alrededor de 17 kDa y otra de alrededor de 70kDa.

Al construir una cepa mutante en el gene *ygcB* mediante su reemplazo con un cassette de resistencia a kanamicina y caracterizarla de manera parcial, se pudo establecer que no se ve afectada en velocidad de crecimiento,

a una concentración de 4µg/ml, la cepa JMH1260 $\Delta ygcB::kan$ no es más sensible que una cepa silvestre MC4100.

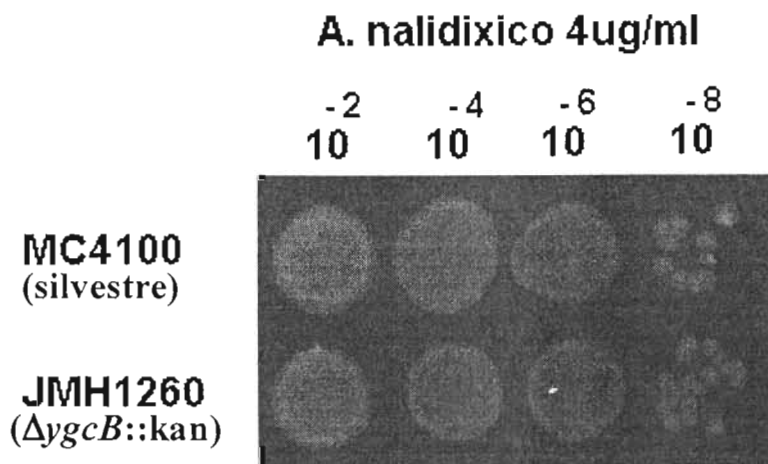


Fig. 35. Ensayo de cuentas viables en presencia de ácido nalidíxico.
La cepa JMH1260 no está afectada en la resistencia a ácido nalidíxico.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se logró aislar una cepa mutante en *Escherichia coli* ausente de actividad de paraquat diaforasa denominada JMH0733.

Se estableció que la mutación inducida por el transposón 102 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción del gene *ygcB* en la cepa JMH0733 no es responsable de la ausencia de actividad de paraquat diaforasa.

Se estableció que la cepa JMH0733 ausente de actividad de paraquat diaforasa carece de al menos dos proteínas, una de alrededor de 17 kDa y otra de alrededor de 70kDa.

Al construir una cepa mutante en el gene *ygcB* mediante su reemplazo con un cassette de resistencia a kanamicina y caracterizarla de manera parcial, se pudo establecer que no se ve afectada en velocidad de crecimiento,

formación de biofilm, motilidad, replicación de DNA, resistencia a H₂O₂, y expresión de *hmp*.

5. Perspectivas

Para comprender que mutación(es) es responsable de la ausencia de actividad de paraquat diaforasa en la cepa JMH0733 se podría realizar un gel proteínas de dos dimensiones, para identificar qué proteínas son las ausentes en la cepa JMH0733.

Como un primer paso para comprender el posible papel fisiológico del gene *ygcB* en *Escherichia coli*, se podría sobreexpresar mediante la clonación de su marco abierto de lectura río debajo de un promotor inducible por IPTG. De esta manera se podrían evaluar las posibles alteraciones fenotípicas en *Escherichia coli* causadas por un incremento en la concentración de esta proteína con función aun desconocida.

Para poder establecer bajo que condiciones la expresión del gene *ygcB* es mayor o menor, se podría construir una fusión genética entre el promotor de *ygcB* y el gene reportero *lacZ* que codifica para la β-galactosidasa y evaluar a lo largo de la curva de crecimiento la expresión de *ygcB*.

6. Bibliografía

Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GR, Gregor J, Davis NW, Heather A. Kirkpatrick, Goeden MA, Rose DJ, Mau B y Ying Shao. (1997) "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12". *Science*, **277**: 1453-1462

Cooper C.E. (1999) "Nitric oxide biochemistry". *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**: 217-488

Corona-Izquierdo FP y Membrillo-Hernández J. (2002) "A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth" *FEMS Microbiol. Lett.*, **221**: 105-110

Cruz-Ramos H, Crack J, Wu G, Hughes MN, Scott C, Thomson AJ, Green J y Poole RK. (2002) "NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp" *EMBO J.*, **21**: 3235-44.

Gardner AM, Gessner CR y Gardner PR. (2003) "Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. Role of NorR and sigma 54 in the nitric oxide stress response" *J. Biol. Chem.*, **278**: 10081-10086.

González-Flecha B y Demple B. (1997) "Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, **179**: 382-388

Hutchings MI, Mandhama N y Spiro S. (2002) "The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species" *J. Bacteriol.*, **184**: 4640-4643

Jones P y Dunford HB. (1977) "On the mechanism of compound I formation from peroxidases and catalases" *J Theor Biol.*, **69**: 457-470.

Kleckner N. (1990) "Regulation of transposition in bacteria" *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**:297-327

Liochev SI y Fridovich I. (1994a) "Paraquat diaphorases in *Escherichia coli*. Free Radic" *Biol Med.*, **16**: 555-559.

Liochev SI, Hausladen A, Beyer WF Jr. y Fridovich I. (1994b) "NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the *soxRS* regulon." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 1328-1331.

Membrillo-Hernández J, Cook GM y Poole RK. (1997a) "Roles of RpoS (σ^S), IHF and ppGpp in the expression of the *hmp* gene encoding the flavohemoglobin (Hmp) of *Escherichia coli* K-12" *Mol. Gen. Genet.*, **254**: 599-603

Membrillo-Hernández J, Coopamah MD, Anjum MF, Stevanin TM, Kelly A, Hughes MN y Poole RK. (1999) "The flavohaemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a 'nitric oxide releaser' and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress" *J. Biol. Chem.*, **274**: 748-754

Membrillo-Hernández J, Kim SO, Cook GM y Poole RK. (1997b) "Paraquat regulation of *hmp* (flavohemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12 is SoxRS independent but modulated by sigma S" *J. Bacteriol.*, **179**: 3164-3170

Miller J. (1972) "*Experiments in molecular genetics*". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB y Kolter R. (1999) "Genetic approaches to study of biofilms". *Methods Enzymol.*, **310**: 91-109

Pathania R, Navani NK, Gardner AM, Gardner PR y Dikshit KL (2002) "Nitric oxide scavenging and detoxification by the *Mycobacterium tuberculosis* haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*" *Mol. Microbiol.*, **45**:1303-14.

Poole RK, Anjum MF, Membrillo-Hernandez J, Kim SO, Hughes MN y Stewart V. (1996) "Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12" *J. Bacteriol.*, **178**: 5487-5492.

Sambrook J y Pollack. (1974) "Basic methodology for cell culture-cell transformation" *Methods Enzymol.*, **32**: 583-592.

Serres MH, Gopal S, Nahum LA, Liang P, Gaasterland T y Riley M. (2001) "A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome" *Genome Biol.*, **2**: 9

Sies H. (1985) "Oxidative stress". *Academic Press*, London.

Wakabayashi S, Matsubara H y Webster DA. (1986) "Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*" *Nature.*, **322**: 481-483.

Watmough NJ, Butland G, Cheesman MR, Moir JWB, Richardson DJ, y Spiro S. (1999) "Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption" *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**: 456-474

Wittenberg JB, Bolognesi M, Wittenberg BA, y Guertin M. (2002) "Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants" *J. Biol. Chem.* **277**: 871-874.

Wu G, Wainwright LM, Membrillo-Hernández J y Poole RK. (2004) "Respiration in Archea and Bacteria" *Kluwer Academic Publishers* **1**: 251-286

Wu G, Wainwright LM y Poole RK. (2003) "Microbial globins" *Adv Microb. Physiol.* **47**: 255-310.

Zhang X, Chaney M, Wigneshweraj SR, Schumacher J, Bordes P, Cannon W y Buck M. (2002) "Mechanochemical ATPases and transcriptional activation" *Mol. Microbiol.* **45**: 895-903