

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

160

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PAPEL DE RmrR EN LA REGULACION DE LOS  
GENES DE RESISTENCIA MULTIPLE DE  
*Rhizobium etli*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
ANA LAURA RAMOS VEGA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO  
CODIRECTOR DE TESIS: DRA. ISABEL MARIA LOPEZ LARA



2003



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A



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.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA



SECRETARÍA NACIONAL  
DE EDUCACIÓN PÚBLICA

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: El papel de RmrR en la regulación de los genes de resistencia múltiple de Rhizobium etli.

realizado por Ana Laura Ramos Vega

con número de cuenta 9531776-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Esperanza Martínez Romero

Codirector de tesis

Propietario Dra. Isabel María López Lara

Propietario Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente Dr. David René Romero Camarena

Suplente Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

*Esperanza Martínez Romero*

*Isabel María López Lara*  
*Víctor Manuel Valdés López*

*David René Romero Camarena*

*Daniel Piñero Dalmau*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

*[Firma]*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

B

## **AGRADECIMIENTOS**

### **ACADÉMICOS**

A la Dra. Esperanza Martínez, responsable principal de este proyecto, gracias por su apoyo todo este tiempo y por su siempre sabio y oportuno consejo.

A la Dra. Isabel López Lara que por ella este proyecto salió adelante, gracias por enseñarme como se deben hacer las cosas, por su constante consejo, por su apoyo y amistad y toda su paciencia.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología Molecular y Microbiana, en especial al Dr. Otto Geiger, al Dr. Pablo Vinuesa y al Dr. Ismael Hernández quienes con sus críticas y su ayuda permitieron el enriquecimiento de mi trabajo.

A la Dra. Katy Juárez y al Dr. Miguel Angel Ramírez, por quienes fue posible la realización de mis geles de retardamiento.

Al M. En C. Alejandro Martínez Mena, por su ayuda con las fotos de la tesis.

Al Dr. Daniel Piñero y al Dr. David Romero gracias por su toda su enseñanza, su consejo sabio, por el efecto que en mí ha tenido su pasión por la Genética y la Evolución.

A todos los miembros del Taller de Ciencias Genómicas: Esperanza, David, Georgina Hernández, Miguel Angel Cevallos, Guillermo Dávila y Julio Collado..

A mis profesores de la Facultad de Ciencias, en especial a Daniel Piñero, Claudia Segal, León, Alvaro Chaos, Guadalupe Vidal, Sigfrido Sierra, Sara Quiroz, Cecilia Vanegas, Julio Prieto, Tere Valverde y Lucía Almeida.

A mis profesores del CIFN Miguel Lara y Jesús Caballero

A la UNAM, por todo lo que me ha dado y me ha permitido realizar a la Facultad de Ciencias por el conocimiento y las experiencias que generó en mí y al Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, por ser mi casa.

Este proyecto fue apoyado por una beca de PROBETEL.

## **PERSONALES**

A mi mamá, por ser mi pilar, por todo su amor, su sabiduría, consejo y su ayuda. Gracias a ella ha sido posible que yo realice todo esto.

A Edgardo, mi mejor amigo, mi compañero de vida, por toda su confianza y por todos los momentos...

A Norma y María Antonieta, que son lo más grande que ha llegado a mi vida, gracias por crecer conmigo y ser más que mis hermanas.

A mis Abuelos, Anita, Toño, Manuela y Rubén, gracias por su cariño y su apoyo.

A mi Papá, a todos mis Tíos y Primos.

A Azucena, por todas las largas tardes en el cafecito mientras desciframos nuestras vidas, por estar siempre presente, por ser mi mejor amiga.

A mis grandes amigos de la Facultad de Ciencias: Germán, Eric, Brian, Paola, Laura, Sergio, Rodrigo y Mauricio.

A la UNAM, por todo lo que me ofrece, por ser mi casa, por la OFUNAM y el Taller Coreográfico.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>GENERALIDADES</b> .....	<b>4</b>
SIMBIOSIS ENTRE RIZOBIA Y LEGUMINOSA .....	4
EXUDADOS DE PLANTAS LEGUMINOSAS; FLAVONOIDES Y FITOALEXINAS .....	6
FLAVONOIDES .....	6
FITOALEXINAS .....	9
REGULACIÓN DE BOMBAS DE RESISTENCIA MÚLTIPLE POR PROTEÍNAS DE LA FAMILIA TETR-ACRR .....	14
<b>ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b> .....	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>22</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
CLONACIÓN DEL GEN <i>rmrR</i> .....	22
PLÁSMIDOS Y CEPAS .....	22
PLÁSMIDOS: EL SISTEMA PET .....	22
CEPAS .....	23
AMPLIFICACIÓN DEL GEN .....	24
CLONACIÓN EN PET16B .....	24
LIGACIÓN .....	24
TRANSFORMACIÓN .....	25
AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS .....	25
DIGESTIÓN .....	25
CLONACIÓN EN PET 9A .....	25
<b>EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RmrR</b> .....	<b>26</b>
TRANSFORMACIÓN .....	26
INDUCCIÓN DE PROTEÍNA .....	26
OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO .....	27
<b>PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RmrR</b> .....	<b>27</b>
SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS .....	27
DESNATURALIZACIÓN .....	27
RENATURALIZACIÓN .....	28
DIÁLISIS .....	28
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS .....	29
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	29
<b>ENSAYOS DE RETARDAMIENTO</b> .....	<b>29</b>
MARCAJE DE OLIGOS : KINACIÓN .....	29
AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DEL OPERADOR .....	30

ENSAYOS DE INTERACCIÓN DNA-PROTEÍNA.....	30
ENSAYOS DE RETARDAMIENTO CON PROTEÍNA PURA .....	31
ENSAYOS DE COMPETENCIA CON PROTEÍNA PURA Y CONTROLES DE DNA NO MARCADOS.....	31
ENSAYOS DE RETARDAMIENTO CON EXUDADOS DE RAÍZ DE FRIJOL.....	32
<b><u>RESULTADOS.....</u></b>	<b>34</b>
CLONACIÓN DE <i>rnrR</i> .....	34
EXPRESIÓN DE PROTEÍNA.....	35
GELES DE RETARDAMIENTO.....	39
ENSAYOS DE RETARDAMIENTO CON FLAVONOIDES.....	42
<b><u>DISCUSIÓN.....</u></b>	<b>45</b>
<b><u>APÉNDICE.....</u></b>	<b>53</b>
<b><u>REFERENCIAS.....</u></b>	<b>56</b>

## RESUMEN

### EL PAPEL DE RmrR EN LA REGULACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA MÚLTIPLE EN *Rhizobium etli*.

En la interacción *Rhizobium*-leguminosa, el primer intercambio de señales es iniciado por la planta a través de la exudación de compuestos orgánicos como flavonoides, isoflavonoides o fitoalexinas hacia la rizósfera. Los flavonoides e isoflavonoides inducen la expresión de genes críticos en el establecimiento de la simbiosis, las fitoalexinas, en cambio, constituyen un mecanismo de defensa de la planta en respuesta al estrés y en muchas ocasiones pueden ser tóxicos para las poblaciones bacterianas.

En la bacteria *Rhizobium etli* (el simbiote del frijol), se han encontrado un conjunto de genes organizados a manera de operón involucrados en la detoxificación de fitoalexinas. La secuencia de las proteínas es similar a proteínas de extrusión de antibióticos en bacterias patógenas. Dichos genes han sido denominados *rmrA*, *rmrB* y *rmrR*. Las proteínas putativas RmrAB son homólogas a proteínas de resistencia múltiple de la familia MFS (del inglés major facilitator family). Adyacente al operón y en dirección opuesta se encuentra un gen que codifica para una proteína designada RmrR, homóloga a proteínas reguladoras de la familia TetR-AcrR. Se ha encontrado también una secuencia similar a los factores  $\sigma$ -70 de *B. japonicum* y *E. coli* así como una secuencia palindrómica entre el 5' de *rmrA* y *rmrR*, es probable que en esta región se encuentre el operador de dichos genes. El gen *rmrR* abarca 357pb y la proteína es de 13 kDa, esta proteína presenta un motivo de unión a DNA hélice-vuelta-hélice (HTH) con aminoácidos altamente conservados entre las proteínas de la familia TetR.

Se ha clonado el gen *rmrR* en *E. coli* para su sobreexpresión y posteriormente se ha purificado la proteína RmrR. Por medio de ensayos de retardamiento de interacción DNA-proteína se ha demostrado *in vitro* que la proteína RmrR interactúa específicamente con la región intergénica de los genes *rmrA* y *rmrR*. Se ha determinado que la afinidad de la proteína por el DNA disminuye bajo concentraciones crecientes de exudado de frijol. Estos resultados constituyen la primera evidencia de que la proteína RmrR regula la transcripción de los genes de resistencia múltiple uniéndose al operador de los genes *rmrA*, *rmrB* y *rmrR* inhibiendo su transcripción. Es probable que la planta en los primeros estadios de colonización reconozca a *Rhizobium etli* como patógeno respondiendo con mecanismos de defensa como las fitoalexinas. El hecho de que la bacteria sea resistente a la respuesta de la planta podría constituir una ventaja en cuanto a la competencia por hábitat.

## GENERALIDADES

Los microorganismos son los pobladores más antiguos de la Tierra. Su tiempo de generación es corto y sus poblaciones son grandes, por lo que han evolucionado a una tasa más alta con respecto a otros organismos. El resultado de esto es que los microorganismos poseen una gran diversidad genética y de hábitat, por lo general se les encuentra interactuando con otras especies, tanto en relaciones mutualistas o patogénicas. Para que estas relaciones puedan iniciarse es necesaria la comunicación entre los interactuantes por medio de señales químicas, que inducen la expresión de genes específicos como respuesta, esto es lo que determinan el éxito de dicha interacción. Existen muchas bacterias asociadas a plantas, entre éstas destaca un grupo muy importante que es el de las bacterias capaces de fijar nitrógeno.

### **Simbiosis entre rizobia y leguminosa.**

El modelo más conocido de interacción entre microorganismo-planta es el de la simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias rizobias fijadoras de nitrógeno. El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes sobre la Tierra, sin embargo las plantas no pueden aprovecharlo en su forma elemental. La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es el proceso por el cual las bacterias convierten el nitrógeno libre a amonio de manera tal que pueda ser asimilado. En plantas leguminosas, este proceso se lleva a cabo en estructuras especializadas que reciben el nombre de nódulos. Las bacterias que son capaces de nodular a las leguminosas pertenecen al grupo rizobia que incluye a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y

*Mesorhizobium*. Las bacterias rizobias tienen una relación filogenética cercana. Recientemente se han encontrado otros géneros, en este caso  $\beta$ -proteobacterias (como *Ralstonia* y *Burkholderia*) capaces de nodular y fijar nitrógeno en simbiosis con plantas leguminosas. Se sabe también que *Frankia*, un actinomiceto Gram negativo fija nitrógeno asociado a plantas actinorrhizas.

Un requisito básico para la simbiosis Rhizobium-leguminosa es la existencia de un diálogo molecular entre las interactuantes. Las plantas exudan compuestos específicos que actúan como señales capaces de atraer a las bacterias, en algunos casos, los atrayentes son aminoácidos o flavonoides.

Durante la infección de la raíz, las bacterias se pegan a los pelos radiculares. La respuesta temprana de la planta incluye la deformación de los pelos radiculares, la inducción de fluctuaciones iónicas a través de membrana plasmática por entrada de calcio y salida de iones de cloro y potasio y la formación de espículas de calcio en el citosol (Giles *et al.* 2001). Las bacterias penetran por el hilo de infección a la vez que estimulan la formación de los meristemas de los nódulos en raíces. El acceso al citoplasma celular de la planta se da por endocitosis de la membrana adyacente al hilo de infección. Dentro de la célula vegetal, las bacterias quedan encapsuladas en la membrana de la planta (en una estructura denominada simbiosoma) en donde se diferencian posteriormente en bacteroides.

La FBN se lleva a cabo por los bacteroides por medio de la enzima nitrogenasa codificada en el operón *nifHDK*. Los bacteroides ya no son capaces de dividirse, sin

embargo, las poblaciones bacterianas que se encuentran en la rizosfera reciben el beneficio de nutrientes producidos por la planta.

## Exudados de Plantas leguminosas: Flavonoides y Fitoalexinas

### Flavonoides

El primer intercambio de señales entre la planta y el *Rhizobium* comienza con la exudación de compuestos orgánicos de la planta hacia la rizósfera entre los que se encuentran los flavonoides (Palumbo *et al.*, 1998). Los flavonoides constituyen un grupo de más de 4500 compuestos cíclicos de 15 carbonos cuya estructura basal consta de tres anillos modificados con enlaces dobles. El anillo A y el anillo B (Fig. 1) son básicamente bencenos y el anillo central es un éter. Los flavonoides frecuentemente están localizados en vacuolas de células epidérmicas.

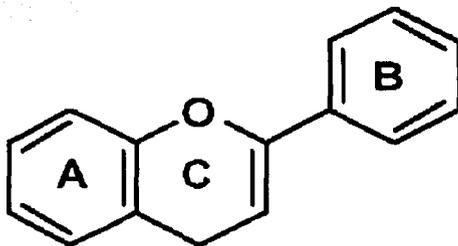


Fig.1 Estructura básica de un flavonoide. Los dos anillos en cada extremo se les ha denominado anillo A y B. El anillo B y los tres carbonos del anillo central son derivados de la vía del Fenil propanoide. El anillo A y el oxígeno del anillo central derivan de la acetil CoA (Kirsch, 2001).

El anillo B y tres carbonos del anillo central se sintetizan por la vía del fenilpropanoide, usando como sustrato la fenilalanina o la tirosina derivadas de la vía del ácido shikimico

(Salisbury and Ross, 2000); el anillo A y el oxígeno del anillo central derivan de unidades de acetato provenientes de la acetil CoA (Kirsch, 2001). La aparición de sustituyentes en cada anillo determina el tipo de flavonoide. Se conocen diversos grupos entre los que destacan las antocianinas (que funcionan como pigmentos), isoflavonoides (componentes de defensa y moléculas señalizadoras), chalconas, auronas, flavononas, flavonas, flavonoles, leucoantocianidinas, y catequinas (Buchanan, 2000).

Ciertas especies de plantas, de las que destacan los miembros de la familia Papilionoideae de las leguminosas acumulan isoflavonoides. Éstos difieren de los flavonoides en el anillo B, que está unido directamente al anillo central por un átomo de carbono; la estructura de los isoflavonoides es más bien parecida a la de los estrógenos de los animales (Salisbury and Ross, 1992).

El tipo de flavonoide varía según la leguminosa y según provenga de raíz o semilla, también depende de la bacteria con la que esté interactuando la leguminosa. La interacción entre alfalfa y *Sinorhizobium meliloti* está mediada por la luteolina y la metoxichalcona, la de trébol con *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* por la 4'-7-dihidroxi-flavona; la interacción entre soya- *Bradyrhizobium japonicum* por la daidzeína y genisteína y la del chícharo con *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* por el eriodictiol y la hesperetina. Los flavonoides más abundantes en la rizósfera del chícharo y la lenteja son la naringenina y la hesperetina (Ara Begum *et al.*, 2001), los exudados de alfalfa incluyen a los isoflavonoides formonolctina, cumestrol y medicarpina (la medicarpina es la principal fitoalexina exudada por alfalfa), así como saponinas, ácido medicagénico y hederagenina (Palumbo *et al.*, 1998).

Para el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris*) ya se había caracterizado que durante la interacción con sus simbiontes *Rhizobium tropici*, *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, la planta exuda principalmente los flavonoides cumestrol y daidzeína (Dakora *et al*, 1993). Posteriormente se encontró que los compuestos exudados más abundantes después de la inoculación por estas bacterias además de los antes mencionados, son los flavonoides genisteína, liquiritigentina, naringenina e isoliquiritigentina (Bolaños-Vázquez & Werner, 1997).

En la interacción rizobia-leguminosa, la función principal de los flavonoides radica en la inducción de la expresión de los genes *nod*, que codifican para las proteínas Nod, estas son las enzimas encargadas de la síntesis de los factores de nodulación (Nod). Los factores Nod son lipo-quito-oligosacáridos compuestos por oligómeros de 3-5 *N*-acetilglucosaminas que acarrean un ácido graso en el extremo no reductor y una variedad de sustituyentes (Oldroyd *et al*, 2001) (Fig. 2); los factores de nodulación son los inductores de la embriogénesis del nódulo en las raíces de las plantas. La expresión de los genes *nod* es regulada por la proteína Nod D (codificada por *nodD*) que en presencia de flavonoides induce la expresión de los genes *nod*. El flavonoide, forma un complejo con NodD y de esta manera se puede unir a las cajas *nod*; estas son secuencias conservadas en las que se encuentran las regiones promotoras de los genes *nod*. La estructura secundaria de NodD tiene 2 dominios, uno de unión al DNA y otro, específico para unión a flavonoides.

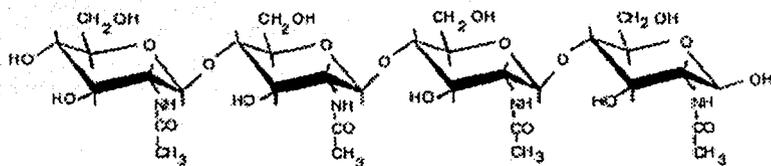


Fig. 2. Estructura general de los factores de nodulación.

En *S. meliloti* existen tres proteínas NodD (NodD1, NodD2 y NodD3), NodD1 y NodD2 son activas en presencia del exudado de la planta y NodD3 en su ausencia. La activación de los genes *nod* depende de que NodD1 forme un complejo con flavonoides (Yeh *et al*, 2002). En el caso de esta bacteria el compuesto inductor más activo es la luteolina (Peters, 1986). Se encontró además que GroESL, un sistema de chaperona ayudado por  $Mg^{++}$  y ATP, facilita el plegamiento de la proteína NodD estimulando su unión con la luteolina y su posterior unión al DNA (Yeh *et al*, 2002)

Los flavonoides además, son capaces de inducir otros procesos. Se ha encontrado que la incubación de *Azorhizobium caulinodans* en presencia de altas concentraciones de naringenina permite su penetración en células de raíz y coifa lateral de plantas de trigo (Webster *et al*, 1998).

### Fitoalexinas

Durante la colonización de las leguminosas, el *Rhizobium* es reconocido como patógeno. Las plantas, en condiciones de estrés continuamente desencadenan mecanismos de defensa, en este caso contra el ataque de bacterias, virus, hongos, invertebrados y otras plantas (Buchanan, 2000). Entre estos mecanismos están la respuesta localizada como la inducción de apoptosis en el sitio de infección, la degradación de las enzimas

excretadas por patógenos, la inducción de lisis en pared celular, la alteración en membranas de patógenos o la inactivación de ribosomas y la activación de vías metabólicas alternas, principalmente para la producción de fitoalexinas (Tarchevskii, 2001). Las fitoalexinas son componentes lipofílicos de bajo peso molecular, químicamente son muy diversos ya que son derivados de diferentes vías metabólicas secundarias, por ejemplo, pueden derivar de la del fenilpropanoide en la que está involucrada la enzima PAL (fenilalanina amonía liasa). Aunque existe mucha diversidad en su estructura química, se ha encontrado que plantas de la misma familia producen fitoalexinas que pertenecen a la misma clase química.

Debido a que las fitoalexinas derivan de vías metabólicas distintas, existe una gran riqueza de éstas ya que se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas. Por ejemplo, plantas de las familias *Solanaceae* y *Malvaceae* liberan fitoalexinas sesquiterpenoides, las plantas de tabaco y pimienta verde liberan capsidiol, el chécharo libera la pisatina, la zanahoria libera fitoalexinas derivadas de los policétidos, la avena, avenaluminas y la camalexina, es la fitoalexina característica de la planta *Arabidopsis thaliana* (Hammerschmidt, 1999).

Las fitoalexinas se producen en las plantas después de la liberación de sustancias de los patógenos lo que sugiere que algún producto del patógeno actúa como señal para la síntesis de fitoalexinas (Hammerschmidt, 1999). Se ha encontrado también que algunas células de plantas tienen receptores para estos productos inductores. Existen algunos casos en los cuales se conoce bien como la fitoalexina actúa contra el patógeno. Por ejemplo, la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* induce la producción de la

fitoalexina camalexina en *Arabidopsis thaliana*, la cual afecta la integridad de la membrana del patógeno (Rogers, 1996). La fragarina, un antibiótico producido por la fresa del tipo fitoanticipina (fitoalexinas involucradas en la "respuesta pasiva en plantas"), causa la disipación del potencial de membrana y el incremento en la permeabilidad de membrana de la bacteria *Clavibacter michiganensis* (Filippone, et al, 2001). En hongos oomicetes, bajo la presencia de fitoalexinas se observa un cambio en la localización de los filamentos de actina, de tubulina y chaperoninas (Porchewski, 2001).

A pesar de que para las bacterias las fitoalexinas pueden ser tóxicas, algunas son capaces de colonizar las plantas aún bajo la presencia de estos compuestos, esto es porque presentan mecanismos de resistencia que en la mayoría de los casos son inducibles. Se ha observado que al incubar bacterias bajo la presencia de flavonoides estas resisten a concentraciones tóxicas de fitoalexinas; casos de este estilo se encuentran en *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium fredii* que en presencia de genisteína y daidzeína crecen en altas concentraciones de gliceolina, una fitoalexina de soya (Parniske *et al.* 1991), en este caso no se sabe bien de que manera la bacteria es resistente.

Recientemente se encontró que los flavonoides pueden inducir la expresión de genes de resistencia múltiple en bacterias. En *Agrobacterium tumefaciens* por medio de mutagénesis se encontraron genes capaces de incrementar la competitividad de la colonización por la reducción de la acumulación de isoflavonoides exudados de alfalfa

en las células. Estos genes, organizados en operón se han denominado *ifeA*, *ifeB* e *ifeR* y muestran similitud con operones codificantes para bombas de extrusión que confieren resistencia múltiple en otras bacterias (Palumbo *et al*, 1998). Este no es el primer caso en el que una bomba de extrusión, se ve involucrada en la resistencia a fitoalexinas. Anteriormente se había demostrado que en el patógeno de papa *Giberella pulicaris* el gen *Gpabc*, que codifica para un transportador del tipo ABC (ATP-binding cassette), es necesario para la tolerancia a las fitoalexinas rishitina y lubimina y para la virulencia en la papa (Feiber *et al*, 2001).

Las bombas de extrusión son el mecanismo más común de resistencia a tetraciclina en varias especies de bacterias. Algunas bombas simples están en membrana plasmática y contienen proteínas transportadoras aunque estas resultan poco eficientes. Otras, tienen una estructura más compleja formada por una proteína transportadora que captura al sustrato (moléculas hidrofóbicas o anfifílicas) desde el citoplasma y lo saca a través de un canal formado por otra proteína de fusión de membrana (Hiroshi, 1998). Aunque las bombas de resistencia son muy semejantes en su diseño, aparentemente han evolucionado de forma distinta (Lewis, 1994).

**Tabla 1.** Familias de proteínas de resistencia múltiple a drogas y sus transportadores. Abreviaturas: EB: bromuro de etidio, AC: acriflavina, CP: Cloranfenicol, CCCP, carbonil cianid *m*-clorofenilhidrazona, CV: cristal violeta, NA: ácido nalidixico, QA: compuestos amino cuaternarios.

Familia	Transportadores	Organismo	Sustrato	Características
MFS  (Major facilitator superfamily)	QacA EmrB  Bcr Bmr  NorA	<i>Escherichia coli</i>   <i>Bacillus subtilis</i>   <i>Staphylococcus aureus</i>	clorhexidina, -BE, QA  Thiolactomicina, NA, CCCP  EB, AC, QA, FQ, R6G, puromicina  EB, AC, QA, FQ, puromicina	Usan motivos protonados. 12-14 Segmentos transmembranales
SMR  (Small multidrug resistance)	Smr  EmrE	<i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Escherichia coli</i>	BE, AQ, VC, TPP.	Proteínas que se expanden en la membrana y aparentemente forman oligómeros.
RND  (Resistance nodulation division family)	AcrA AcrE  MexAB OprM	AcrB TolC  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Casi todos los miembros de esta familia están involucrados en la secreción o excreción de múltiples ligandos 12 segmentos transmembranales.
MFP  (Membrane fusion proteins)	EmrA AcrF  MexA	<i>Escherichia coli</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
ABC  (ATP binding cassette)	P-glycoprotein PFMDR1	<i>Homo sapiens</i> <i>Plasmodium falciparum</i>		Las glicoproteínas-P tienen la habilidad de exportar muchos agentes anticancer.

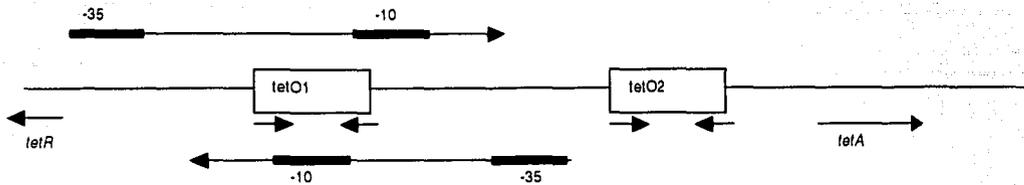
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Regulación de bombas de resistencia múltiple por proteínas de la familia TetR-AcrR.

La similitud funcional entre los sistemas de las bombas de resistencia múltiple en bacterias con el de mamíferos (glicoproteína-P) así como su presencia en importantes patógenos de humanos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycobacterium tuberculosis* hacen de la comprensión de los mecanismos moleculares de las bombas de resistencia múltiple un importante tema de investigación (Grjovick *et al*, 1998). Un punto considerable es el conocer los factores involucrados en la regulación de la síntesis de proteínas de transporte.

El modelo más conocido y estudiado de regulación de bombas de resistencia múltiple es el del control de la expresión de la proteína resistente a tetraciclina por la proteína TetR (de la familia de proteínas TetR-AcrR) en bacterias Gram negativas. El mecanismo de resistencia a tetraciclina está mediado por el gen *tetA*, que codifica para la proteína de extrusión que bombea al exterior el antibiótico y por *tetR*, que es el regulador; *tetA* y *tetR* están ordenados con una polaridad opuesta (el gene *tetA* en dirección 5'-3' y el gene *tetR* en dirección 3'-5'). En la región intergénica de *tetR* y *tetA* se encuentran sobrepuestos los promotores del regulador y del gen de resistencia además de dos operadores (op1 y op2) que son secuencias palindrómicas (Fig. 3).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 3.** Organización del operón de resistencia a tetraciclina. Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes *tetA* y *tetR*. Las regiones *tetO1* y *tetO2* son secuencias palindrómicas. Las regiones de unión de la RNA polimerasa se indican con líneas gruesas enumeradas como -10 o -35.

La proteína TetR es un homodímero (TetR)<sub>2</sub> con dos monómeros idénticos, donde cada uno está formado por 10  $\alpha$ -hélices:  $\alpha 1$ - $\alpha 10$  y  $\alpha 1'$ - $\alpha 10'$ . La molécula está dividida en dos dominios, el de unión al DNA en el extremo amino terminal y un dominio regulatorio con estructura globular. Los dominios de unión al DNA están formados por las hélices  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  y  $\alpha 1', \alpha 2', \alpha 3'$  donde las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 2'$  son de soporte y las hélices  $\alpha 3$  y  $\alpha 3'$  son los motivos de reconocimiento HTH (hélice-vuelta-hélice). En ausencia de tetraciclina cada dímero de la proteína se une a un operador bloqueando la transcripción de *tetR* y *tetA*. (Sacnger *et al.*, 2000)

Cuando la tetraciclina se difunde a través de la célula, se forman compuestos quelados de  $[Mg\ Tc]^+$  que se pegan a TetR reduciendo su afinidad por el operador (Fig. 4). La interacción involucra la formación de un "túnel" entre las hélices  $\alpha 4, \alpha 4', \alpha 8, \alpha 8'$  y  $\alpha 9, \alpha 9'$  de esta manera la proteína reduce su afinidad por los operadores.

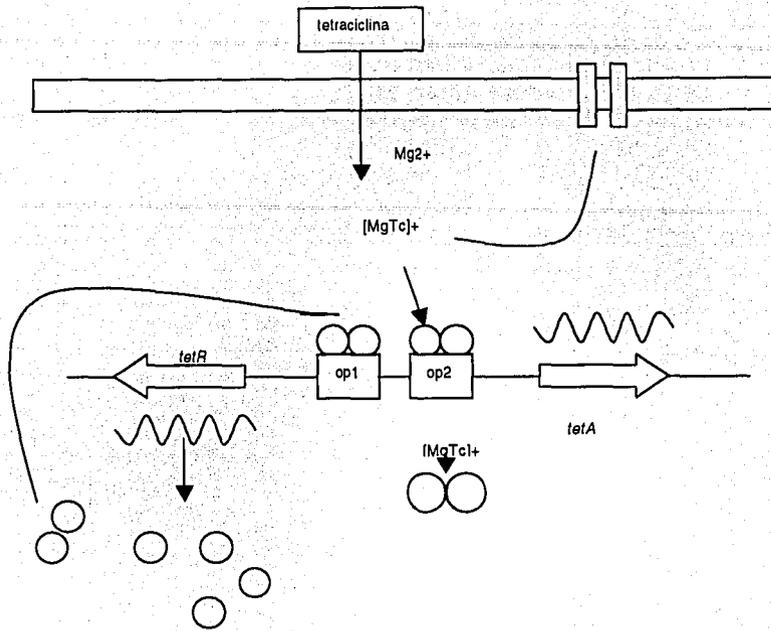


Figura 4. Mecanismo de resistencia a tetraciclina. TetR se pega a los operadores op01 y op02 impidiendo la transcripción de *tetA*. Cuando hay difusión de tetraciclina a través de la célula, de forma el complejo  $[Mg\ Tc]^+$  y la proteína se despegan de los operadores, es entonces cuando se transcriben los genes *tetR* y *tetA*

Existe otra proteína, QacR, que regula negativamente la expresión de la bomba de resistencia QacA de *Staphylococcus aureus*. QacR es una proteína más pequeña (de 23 kDa), forma un tetrámero (a diferencia de TetR que forma un dímero) al interactuar con el operador del gen *qacA* y además interactúa con diferentes cationes lipofílicos de los cuales algunos son sustratos de la proteína QacA (Schummacher *et al.*, 2002).

La transcripción de cada gen es iniciada por un elemento promotor simple, cada uno sobrelapado por sitios potenciales de unión a proteína (estos sitios están designados

como IR1 e IR2) que se encuentran en la región intergénica de los genes *qacA* y *qacR*. Al principio se pensaba que QacR, además de regular a QacA era capaz de autoregularse, sugiriendo que la expresión de *qacR* podía ser iniciada por múltiples promotores (ya sea IR1 o IR2). Posteriormente, por ensayos de retardamiento y de protección de DNA, se demostró que la proteína QacR solamente se une al sitio IR1 inhibiendo la transcripción del gen *qacA* mas no la suya, como sucede en el caso de otras proteínas de la familia TctR que autoregulan su transcripción (Grkovic, 1998).

### ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En *Rhizobium etli*, con el objetivo de encontrar genes inducidos por exudados de frijol, se hizo mutagénesis al azar de la cepa CFN42 utilizando el transposón Tn5-B30 (González-Pasayo & Martínez-Romero, 2000). Dichas mutantes fueron probadas en medio modificado PY bajo diferentes concentraciones de kanamicina, en presencia o ausencia de exudados de raíz, como la naringenina. De esta manera se obtuvo la cepa CFNEA31, que es capaz de crecer a una concentración de  $100\mu\text{g/ml}^{-1}$  de kanamicina en un medio enriquecido con alguno de estos exudados: naringenina ( $1.2\ \mu\text{M}$ ), genisteína ( $0.4\ \mu\text{M}$ ), quercetagenina ( $1.0\ \mu\text{M}$ ) o crisina ( $1.0\ \mu\text{M}$ ).

La localización del transposón fue determinada por medio de hibridación con el cósmido pCOS126 (que tiene clonado una parte de la secuencia del plásmido b de CFN42). Al analizar la secuencia, se encontró que el Tn5-B30 se insertó 299 pb antes de un marco abierto de lectura (ORF1) de 1,191pb que está precedido por un sitio potencial de unión al ribosoma. Este ORF codifica para una proteína de 41.8 kDa cuya secuencia es homóloga a la de las proteínas de resistencia múltiple EmrK y EmrA de *Escherichia*

*coli*, *VceA* de *Vibrio cholerae*, y *EmrA* de *Haemophilus influenzae*. Un segundo ORF (ORF2) de 1,581 pb se identificó después de ORF1 y con la misma orientación. Dicho ORF codifica para una proteína de aproximadamente 56.1 kDa que es similar a *VceB* de *V. cholerae*, *EmrB* de *E. coli*, *EmrB* de *H. influenzae* y *EmrY* de *E. coli*. En esta proteína se identificó un motivo altamente conservado entre exportadores de la familia MFS. En la cadena complementaria se encontró un tercer ORF (ORFR) localizado 136pb antes de ORF1, Este ORF tiene 357 pb, se transcribe en dirección opuesta a los otros dos y codifica para una proteína de 13 kDa. La probable proteína es similar a proteínas reguladoras de la familia TetR-AcrR, además se identificó un motivo de unión a DNA hélice-vuelta-hélice (HTH de helix-turn-helix) con aminoácidos altamente conservados en las proteínas de dicha familia.

A los ORF codificantes para las supuestas proteínas de resistencia múltiple se les designó *rmrA* (ORF1) y *rmrB* (ORF2) (*rmr* de *Rhizobium multiresistance*) y al que codifica para el probable regulador se le designó *rmrR* (ORFR) (de *Rhizobium multiresistance regulator*). Estos genes se encuentran organizados a manera de operón donde *rmrA* y *rmrB* se transcriben en dirección 5'-3' mientras que el gene *rmrR* tiene una polaridad opuesta y se transcribe en dirección 3'-5' (Fig. 5). También, entre los inicios de transcripción de los genes *rmrA* y *rmrR* se encontró una secuencia similar a la del factor  $\sigma^{-70}$  de *Bradyrhizobium japonicum*. El promotor de *rmrA* y *rmrB* está sobrepuesto al gene *rmrR* y el promotor de *rmrR* sobrepuesto a *rmrA*. Entre el -10 del operador de *rmrR* y el -10 del operador de *rmrA* existe una región palindrómica.

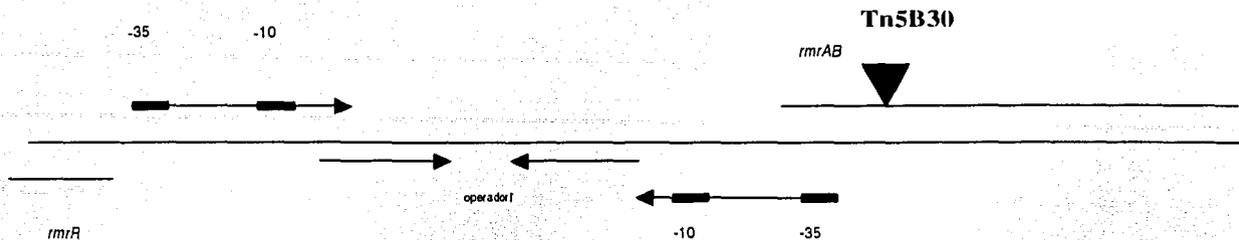
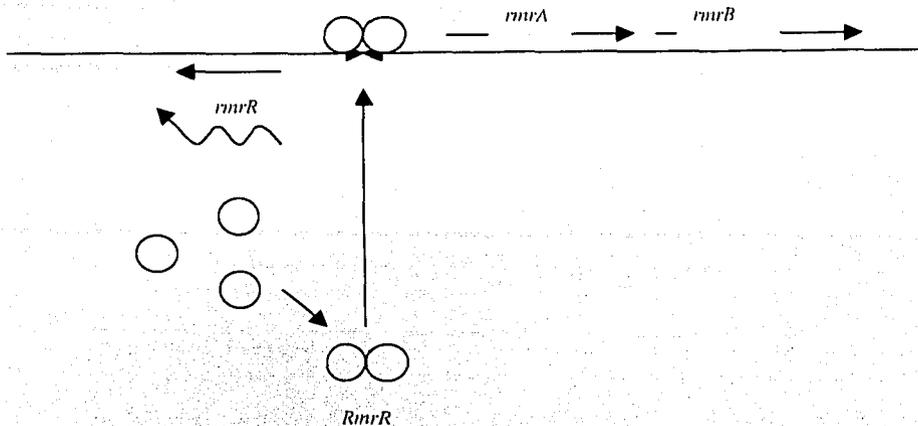


Figura 5. Organización de los genes de resistencia múltiple en *R. elli*. Las flechas indican la dirección de transcripción de los genes *rmrA* y *rmrR*. El probable operador es una secuencia palindrómica. Las regiones de unión de la RNA polimerasa se indican con líneas gruesas enumeradas como -10 o -35 (secuencias homólogas a las del factor  $\sigma$ -70 de *B.japonicum*).

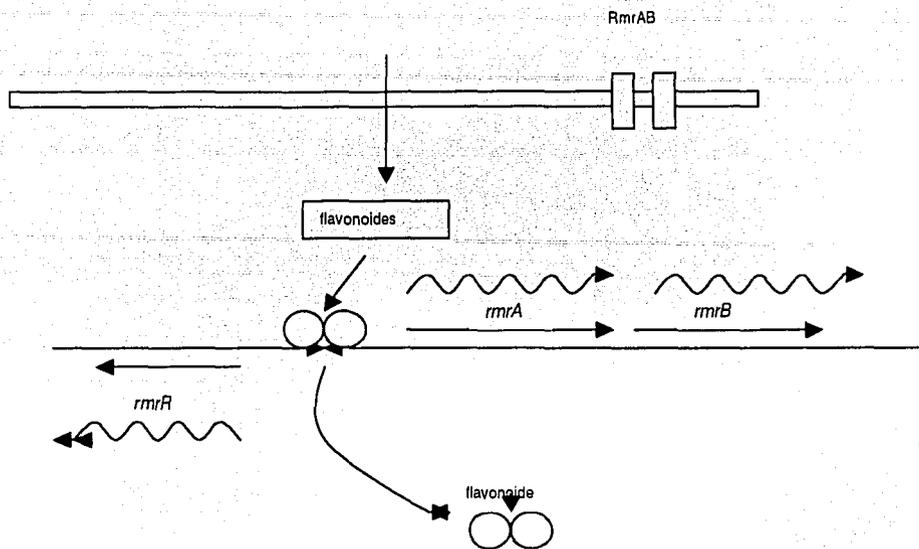
## HIPÓTESIS

La proteína RmrR es muy pequeña y sólo existe un motivo de unión HTH con respecto a TetR, sin embargo, se propone que debido a la homología de la proteína así como el orden de los genes y de sus promotores es probable que la proteína RmrR regule la transcripción de los genes *rmrA*, *rmrB* y del mismo gen *rmrR*. En este caso la proteína se uniría a la única región palindrómica (como sería en el caso de la regulación por QacR) bloqueando el pegado de la RNA polimerasa a los operadores de *rmrA* y *rmrR* (Fig. 6).



**Figura 6** Propuesta de regulación de los genes de resistencia múltiple en *R. etli*. Cuando el gene *rnrR* se traduce en la proteína RmrR, ésta se pega a la región palindrómica e impide la transcripción de *rnrA*, *rnrB* y *rnrR*

Se propone asimismo que la activación de los genes de resistencia en *R. etli* está mediada por flavonoides producidos por la planta de frijol; esto es porque estructuralmente son análogos a la tetraciclina (ambos son compuestos heterocíclicos con dobles enlaces) y por su capacidad de inducir genes en *Rhizobium* durante la interacción temprana con la bacteria. Cuando el flavonoide entra a la célula y se pega al complejo [operador RmrR] disminuye la afinidad de la proteína por el operador; es entonces cuando la polimerasa puede transcribir los genes de resistencia y el regulador (Fig. 7). Probablemente *R. etli* en el estado inicial de colonización es reconocido por la planta como patógeno, provocando mecanismos de respuesta. El que las bacterias rizobias poseyeran este mecanismo de defensa a componentes tóxicos de la planta les permitiría una colonización exitosa. Esto le daría a la bacteria ventaja adaptativa sobre otras, así como la posibilidad de usar como nicho ecológico a la planta.



**Figura 7.** Propuesta de expresión de los genes de resistencia múltiple en *R. etli*. Cuando el flavonoide entra a la célula, se pega al complejo [operador-RmrR] y la proteína con el flavonoide se despegan del operador. Es entonces cuando los genes de resistencia se transcriben.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## OBJETIVO

En este trabajo se estudiará *in vitro* si la proteína RmrR se pega a la región promotora de los genes *rmrA* y *rmrR* y si dicha unión es afectada por la presencia de flavonoides exudados del frijol. Proponemos la proteína RmrR actúa inhibiendo la unión de la RNA polimerasa a la región operadora de los genes *rmrA* y *rmrR*. Estos estudios proporcionarán información sobre el papel de la proteína RmrR en la regulación de los genes de la bomba de resistencia múltiple de *Rhizobium etli*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1.- Clonación del gen *rmrR*

#### 1.1.- Plásmidos y cepas

##### 1.1.1.- Plásmidos: El sistema pET.

Para clonar el gen *rmrR* se usaron plásmidos del tipo pET (Tabla 2). Estos plásmidos se caracterizan por la posesión del promotor T7, que permite la expresión directa de los genes clonados. Los plásmidos en primera instancia se construyen en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  donde hay control de expresión debido a la ausencia de la RNA polimerasa. T7 y, a que la polimerasa de esta cepa hospedera no reconoce al promotor T7.

Posteriormente, los plásmidos se transforman en *E. coli* BL21(DE3) (pLysS). Las cepas de *E. coli* del tipo  $\lambda$ DE3, tienen el gen para la RNA polimerasa de T7 que se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5* integrado en el cromosoma. Los plásmidos del tipo pET poseen 25 pb del operador *lac*, localizados 17 pb antes de la región promotora, la

unión del represor lac en este sitio disminuye la transcripción de la T7 RNA polimerasa. En este caso existe cierto grado de transcripción en estado no inducido, expresándose solamente genes cuyo producto es inocuo al crecimiento de la célula hospedera. Para el caso de que lleve el plásmido pLysS, este codifica para la lisozima T7 que es un inhibidor de la T7 RNA polimerasa y reduce la probabilidad de transcribir genes no inducidos con IPTG (Mierendorf *et al*, 1994).

**Tabla 2.- Plásmidos utilizados para la clonación del gen *rmrR***

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>
pET16b	Promotor T7, resistencia a carbenicilina (Cb), expresión de histidinas en extremo amino terminal
pET9a	Promotor T7, resistencia a kanamicina (Kn).

### 1.1.2.-. Cepas.

**Tabla 3.- Cepas utilizadas para la clonación y expresión de *rmrR***

<b>Cepa</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	Cepa silvestre	Segovia <i>et al</i> , 1993.
<i>Rhizobium etli</i> CFNEA31	CFN42 <i>rmrA</i> :Tn5B30, resistencia a tetraciclina	González-Pasayo & Martínez-Romero, 2000
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	Cepa receptora	
<i>E.coli</i> BL21DE3(pLysS)	Cepa receptora. Resistencia a cloranfenicol (Cm), plásmido pLysS, $\lambda$ (DE3)	

## 1.2.-Amplificación del gen

Se aisló DNA total de la cepa CFN42 utilizando el kit "Quantum Prep Aqua Pure genomic DNA kit" (Boehringer). Se diseñaron oligonucleótidos a los que se les insertaron sitios de restricción para las enzimas NdeI en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3' (Tabla3). Se amplificó un fragmento de 357 pb que incluye a *rmrR* usando la enzima *Pwo* polimerasa (Roche) usando la temperatura de fusión de 62°C y de extensión de 72°C.

Tabla 4.- Secuencia de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *rmrR*

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
<i>NdeI</i>	GGAATACATATGGTCCAAAATCACAAAATCG
<i>BamHI</i>	AAAGGATCCTCACTGTGATCGTGTGCGAGAG

## 1.3.-Clonación en pET16b

### 1.3.1.-Ligación.

El plásmido pET16b y el producto de PCR fueron digeridos con las enzimas NdeI y BamHI. El plásmido fue defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (CIP, New England Biolabs) (Apéndice) y tanto el plásmido como el fragmento se limpiaron utilizando el método de sílica. El plásmido y el inserto se ligaron usando la enzima T4 DNA ligasa (Boehringer) toda la noche a 16°C.

### 1.3.2.-Transformación

El producto de la ligación se usó para transformar a *E.coli* DH5 $\alpha$  (Apéndice). El cultivo obtenido se plaqueó en cajas de medio LB (Apéndice) con el antibiótico carbenicilina (Cb) (100  $\mu$ g/ml, concentración final)

### 1.3.3.-Aislamiento de plásmidos

Las colonias obtenidas se inocularon en medio líquido LB (apéndice) con Cb (a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml), se dejaron en incubación a 37°C toda la noche. Por medio de centrifugación se obtuvieron las pastillas celulares y se aislaron los plásmidos por medio del método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), de esta manera se obtuvo el plásmido pLRV03.

### 1.3.4.-Digestión

Para comprobar que el fragmento *NdeI-BamHI* se haya insertado en el plásmido pET16b, se hizo una digestión utilizando la enzima *SphI*, esta enzima corta una vez tanto al gen *rmrR* como al plásmido, si el gen se insertó, se espera un fragmento de 668 pb.

### 1.4.-Clonación en pET 9a

Se hizo digestión de los plásmidos pET9a y pLRV03 (para obtener el fragmento correspondiente a *rmrR*) con la enzimas *NdeI* y *BamHI*. El plásmido pET9a fué además defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (New England Biolabs), los fragmentos obtenidos se limpiaron con sílica y se ligaron a 16°C toda la noche. El producto se transformó en *E.coli* DH5 $\alpha$  y se sembró en placas con LB, Kn (50  $\mu$ g/ml, concentración final). Debido a que existía la posibilidad de que el plásmido pET16b (resistente a Cb) se

ligara a pET9a (resistente a Kn) se hizo una selección reseleccionando cada posible clona obtenida en dos placas: una de medio LB con los antibióticos Cb y Kn y la otra con LB y Kn; se eligieron las colonias resistentes sólo a Kn. Se purificaron los plásmidos por medio de minipreps alcalinas, finalmente, para comprobar que *rmrR* se haya insertado se hicieron digestiones con las enzimas *XbaI* y *EcoRI* esperando obtener un fragmento de 945 pb. Al plásmido resultante se le llamó pLRV06.

## **2.- Expresión de la proteína RmrR**

### **2.1.-Transformación**

Los plásmidos aislados por lisis alcalina se usaron para transformar a la cepa *E. coli* BL21(DE3) (pLysS). De esta manera se obtuvieron las cepas BL21DE3 (pLysS)pLRV03 y BL21(DE3) (pLysS)pLRV06.

### **2.2.-Inducción de proteína.**

Para sobreexpresar las proteínas se estiraron las cepas BL21(DE3) (pLysS) pLRV03 y BL21(DE3) (pLysS)pLRV06 en cajas con LB, Cb, Cm y LB, Kn, Cm respectivamente dejando en incubación a 37°C toda la noche. Se inoculó una colonia de cada placa en 2 ml de LB, Cb (100 µg/ml), Cm (100 µg/ml) y se dejó creciendo a 37°C en agitación por dos horas, 45 min. Se prepararon matraces con 30 ml de LB con Cb y Cm y se inocularon con 800 µl del cultivo anterior; se dejaron crecer a 37°C hasta que las células alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0.4 a 600nm. Se aplicó IPTG a una concentración final de 0.1 mM) y se dejó incubar a 37°C durante 4 horas. Al final, se

tomaron los cultivos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. a 4°C en un rotor sorvall SS34. Se desechó el sobrenadante, los sedimentos se resuspendieron en un buffer de 50 mM Tris HCl, 0.1 M KCl pH 6.8. El producto se analizó en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS 0.1% (apéndice). Las proteínas se tiñeron con azul de coomasie.

### **2.3.-Obtención de extracto crudo**

Para la obtención del extracto crudo se emplearon dos métodos. En el primero, se usó la prensa Francesa a una presión de 20,000 lbs/pulgada<sup>2</sup>. En el segundo las células se descongelaron a temperatura ambiente y se congelaron a -80°C tres veces. Se aplicaron 3µl de DNasaI incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos. En los dos casos, después de obtener el extracto, se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm a 4°C y se separaron pellet y sobrenadante en tubos diferentes. El producto se analizó en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS 0.1% (Apéndice). Las proteínas se tiñeron con azul de coomasie.

## **3.- Purificación de proteína RmrR**

### **3.1.- Solubilización de proteínas**

#### **3.1.1.- Desnaturalización**

Se hicieron tres lavados del extracto crudo con Tris HCl 50mM pH 8.0 y Tween 80 al 0.005% (apéndice). Se solubilizaron los cuerpos de inclusión en 5ml del buffer: 5M Guanidina HCl, 50mM Tris HCl, pH8.0, 0.005% Tween 80 incubando a 4°C toda la

noche. Al día siguiente se centrifugó a 14000 rpm para quitar los restos de proteína no soluble y se recuperó el sobrenadante.

### **3.2.-Renaturalización**

Se midió la DO a 280 nm, se ajustó la densidad óptica a aproximadamente 0.8 diluyendo el sobrenadante en 2.5 ml del buffer 1 (Apéndice). Se diluyó el producto en 22mL del buffer 2 (apéndice) para obtener una densidad óptica (DO 280nm) menor a 0.1, (el volumen final después de este paso fue de 26 ml y la DO fue de 0.08 ). Se incubó a 4°C durante 72 horas. Después del tiempo de incubación se ajustó el Tween 80 a una concentración de 0.05% agregando 260µl de Tween al 5%.

### **3.3.-Diálisis**

La muestra con la proteína se puso dentro de una membrana de diálisis (SIGMA, límite de exclusión de 12,000kDa) previamente esterilizada (hirviendo en agua tridestilada). La membrana se puso dentro de un vaso con buffer de diálisis (apéndice). Se incubó durante tres horas a 4°C. Después de este tiempo se dejó incubando en agitación lenta a 4°C toda la noche. Al día siguiente, todo el contenido de la parte interna de la membrana se puso en un tubo de centrifuga SS34. Se centrifugó 10 minutos a 7000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El producto se analizó en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS 0.1% (Apéndice). Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata.

### **3.4.-Concentración de Proteínas**

Las proteínas se concentraron 1/10 con respecto de su volumen inicial usando membranas Amicón (centriplus, 15 ml) con poro de 10,000 MWCO (molecular weight cut out) El producto se analizó en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS 0.1% (apéndice). Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata.

### **3.5.-Cuantificación de proteínas**

Las proteínas se cuantificaron en espectrofotómetro a una DO de 750 nm por el método de Dulley and Grieve (Dulley and Grieve,1975). Previamente se hizo una curva patrón con la proteína BSA (Bovine Serum Albumine).

## **4.- Ensayos de Retardamiento**

### **4.1.- Marcaje de oligos : Kinación**

Se diseñaron oligos para amplificar la región intergénica de los genes *rmrR* y *rmrA* que abarca 197 pb y que comprende la zona donde se encuentran los probables operadores de estos genes (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Secuencia de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región de operadores

<b><i>Oligonucleótido</i></b>	<b><i>Secuencia (5'-3')</i></b>
Upper primer	CGATTTGTGATTTGGACC
Lower primer	TGCGTTGTTGTTTCAGAGCCT

Se marcó el oligo "upper" en su extremo 5' con  $\gamma$ -CTP [ $^{32}$ P] usando la enzima T4 Polinucleótido Kinasa (Gibco) (Ver apéndice), se incubó a 37°C por 10 minutos, posteriormente se detuvo la reacción incubando a 65°C por 10 minutos.

#### **4.2.- Amplificación de la región del operador**

Se amplificó la región intergénica de 197 pb usando la enzima *Taq* polimerasa a una temperatura de fusión de 60°C.

#### **4.3.- Limpieza de DNA**

Para limpiar el producto de DNA se hizo pasar por columnas (Centrisep) con Sephadex G-50 (a 3000 rpm durante 4 minutos) previamente equilibrada con agua.

#### **4.4.- Ensayos de interacción DNA-Proteína**

Estos ensayos tienen el principio de que las proteínas de acuerdo a sus características de peso molecular, carga, punto isoeléctrico, etc. tendrán diferente movilidad en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Para el caso de la formación de complejos DNA-proteína, si el DNA y la proteína interactúan presentarán una movilidad característica, más lenta que la del DNA que no interactúa con ninguna proteína. Para poder observar esto, se hacen reacciones de DNA con o sin proteína a las que se le agrega un buffer el cual funge como catalizador, este buffer tiene compuestos necesarios para algunas interacciones DNA-proteína como  $Mg^{+2}$ , competidores no específicos como DNA de esperma de salmón o BSA y detergentes (Laniel *et al*, 2001).

Para estos ensayos se hicieron reacciones en las que se incubó DNA (de 197 pb marcado con [ $^{32}\text{P}$ ]) con o sin proteína y un buffer de pegado constituido por 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA (serum bovine albumin) y glicerol al 10 % (cantidades en un stock a 2X, la concentración final en cada reacción es de 1X), se añadieron además 50µg/ml de DNA de esperma de salmón en un volumen final de 20µl. Las reacciones se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente; después de este tiempo se analizaron en un gel de poliacrilamida el 4% en 0.5X de TBE a 4°C (antes de cargar las muestras, se pre corrió el gel por 30 minutos a 4°C). Después de que se completó la electroforesis se puso en papel Whatman, se cubrió con plástico (egapack) y se secó a 80°C durante 30 minutos. El gel se puso a exponer sobre una placa de rayos X en un cassette de autoradiografía.

#### **4.4.1.- Ensayos de retardamiento con proteína pura**

Se hicieron 10 reacciones en las que se usó DNA de 197 pb marcado con [ $^{32}\text{P}$ ], proteína RmrR03 ó RmrR06 y buffer de corrida. En la primera reacción se incubó el fragmento de DNA sin ninguna proteína, en la segunda se incubó DNA + BSA, a partir de la tercera el DNA fue incubado con cantidades crecientes de las proteínas RmrR03 o RmrR06. El buffer de pegado, así como las condiciones de incubación, corrimiento y secado del gel son las que se indican en el punto 4.4.

#### **4.1.2.- Ensayos de competencia con proteína pura y controles de DNA no marcados.**

Para demostrar que la interacción de la proteína con el DNA es específica, se hizo el siguiente experimento: Se utilizó DNA de 197 pb marcado con [ $^{32}\text{P}$ ] en la misma concentración que el experimento anterior, la proteína RmrR06 y dos controles de DNA,

uno es el fragmento de 357 pb que codifica para *rmrR* y otro es un fragmento que contiene el gen *nifD* de *R. etli*. Se hicieron diez reacciones, en la primera se puso DNA de 197 pb sin ninguna proteína, en la segunda, DNA + BSA y en la tercera DNA + proteína RmrR06 (de la misma manera que la sexta reacción del experimento anterior). A partir de la cuarta reacción se incubó la proteína con el fragmento de DNA de 197 pb + la proteína RmrR06 y el DNA de el gen *rmrR* en cantidades crecientes, en la novena y décima reacción se hizo lo mismo pero con el DNA de *nifD*. El buffer de pegado, así como las condiciones de incubación, corrimiento y secado son las que se indican en el punto 4.4. Este experimento se repitió con el DNA de 197 pb (región intergénica) no marcado como competidor, en lugar de *nifD*.

#### 4.5.-Ensayos de retardamiento con exudados de raíz de frijol

Se hicieron tres experimentos. En el primero se utilizó el DNA correspondiente a la región intergénica marcado con [<sup>32</sup>P], la proteína RmrR y naringenina a una concentración de 10µM. Se hicieron 8 reacciones, en la primera se puso el DNA sin ninguna proteína, en la segunda, el DNA + BSA como proteína, en la tercera DNA + proteína RmrR. A partir de la cuarta reacción se agregaron cantidades crecientes de naringenina (a unas concentraciones finales desde 0.5 µM hasta 2.0 µM). En el segundo experimento, se hicieron todas las reacciones ya mencionadas y se agregó CaCl<sub>2</sub> a todas a una concentración final de 10 mM. En el tercer experimento, en lugar de naringenina se adicionó exudado extraído directamente de frijol crecido en medio hidropónico, diluyéndolo en agua en proporciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Se hicieron 8 reacciones, donde las tres primeras son las mismas que en los dos experimentos anteriores. En la cuarta reacción se agregó exudado de raíz diluido 1:16, en la quinta se agregó la dilución 1:8,

en la sexta la dilución 1:4, en la séptima 1:2 y en la octava se agregó exudado no diluido.

En todas las reacciones además se agregó  $\text{CaCl}_2$  a concentración final de  $10 \mu\text{M}$ .

## RESULTADOS

### Clonación de *rmrR*

Se amplificó una región de 357 pb correspondiente al gen *rmrR*, para ser clonada en los sitios *NdeI* y *BamHI* del plásmido pET16b, de esta manera se obtuvo el plásmido designado pLRV03a. La clonación se comprobó por digestión con la enzima *SphI*, con la cual, se esperaban para el caso del plásmido con el inserto clonado fragmentos de 668 pb y aprox. 5 Kb y para el plásmido sin el inserto un fragmento de 5700 pb (Fig. 8A). A partir del plásmido obtenido se recuperó la región que contiene a *rmrR* y se clonó en los sitios *NdeI* y *BamHI* del plásmido pET9a obteniendo de esta manera el plásmido designado pLRV06. Tal clonación fue comprobada con digestión con las enzimas *XbaI* y *EcoRI*, con las cuales se esperaba un fragmento de 945 pb para el plásmido con el inserto (Fig. 8B).

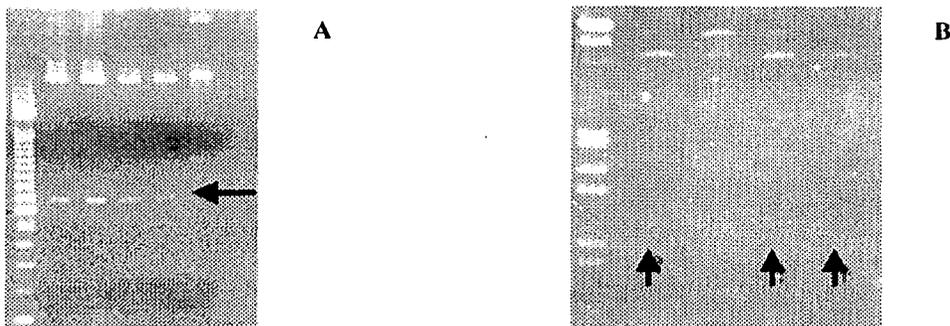


Fig. 8.- A.- Digestión de los plásmidos pET16b con el gen *rmrR* insertado. Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *SphI* a 37° C obteniendo unos fragmentos de 668 pb y 5 kb. La flecha indica la banda de 668pb. B.- Digestión de los plásmidos pET9a con el gen *rmrR* insertado. Los plásmidos fueron cortados con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* a 37° C obteniendo fragmentos de 945 pb y aprox. 4.3 kb. Las flechas indican las bandas de 945 pb.

Los plásmidos pLRV03 y pLRV06 se transformaron en la cepa *E.coli* BL21(DE3) pLysS para hacer la expresión de la proteína, de esta manera se obtuvieron las cepas que se describen en la Tabla 5.

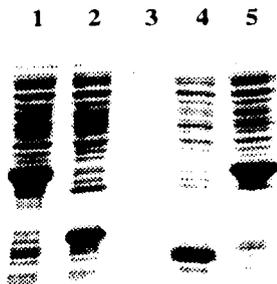
Tabla 5.- Cepas obtenidas después de la clonación de *mmrR* en los plásmidos pET

Cepa	Características
BL21(DE3)pLysD pLRV03	pET16b, 10histidinas, <i>mmrR</i> , Cb, Cm.
BL21(DE3)pLysD pLRV06	pET9a, <i>mmrR</i> , Kn, Cm.

### Expresión de proteína

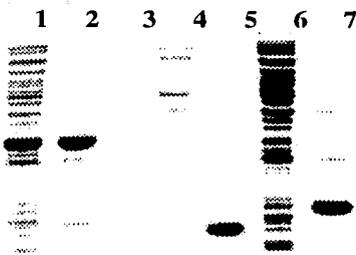
La expresión fue, como se indica en la metodología con 100  $\mu$ M de IPTG a 37°C, durante 4 horas de incubación. De esta manera, a partir de la cepa BL21(DE3)pLysS pLRV03 se sobreexpresó una proteína de aprox. 15 kDa con respecto al marcador de peso molecular y a partir de la cepa BL21(DE3)pLysS pLRV06 una proteína con peso molecular de aprox. 13 kDa (Fig. 9). El peso molecular concuerda con el predicho por el programa ExpASY tomando en cuenta que en la proteína producida a partir de BL21(DE3)pLysSpLRV03 se expresan una cola de 10 histidinas en el extremo amino terminal.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



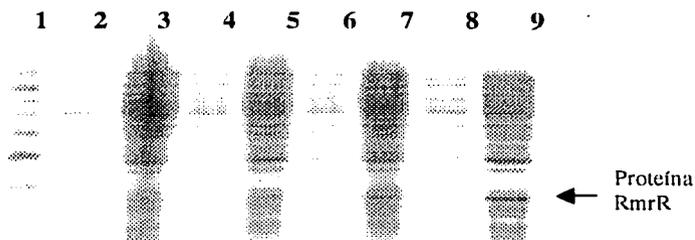
**Fig.9-**Expresión de proteínas a partir de las cepas BL21 (DE3) pLysS pLRV03 y BL21 (DE3) pLysS pLRV06. Carriles 1 y 5: Control negativo pTB5116 que expresa una proteína de 27 kDa (Nod G de *S. meliloti* sp N. 33). Carril 2: BL21 (DE3) pLysS pLRV03 (cepa que expresa RmrR con cola de histidinas). Carril 4: BL21 (DE3) pLysS pLRV06 (cepa que expresa RmrR sin cola de histidinas). Carril 3: Marcador de peso molecular.

El extracto crudo se separó en dos fracciones: una fracción no soluble (pellet) y una fracción soluble (sobrenadante). Podemos observar que las proteínas sobreproducidas (inducidas a partir de los vectores pET) se concentran prácticamente en la fracción no soluble mientras que en la fracción soluble no se observa la proteína sobreexpresada, es decir que las proteínas se sobreexpresan formando cuerpos de inclusión que son agregados de las moléculas como resultado de la formación de puentes disulfuro entre estas. (Fig.10)



**Fig.10.-**Extracto crudo de las proteínas *rmrR* sobreexpresadas. Carril 1: pellet del control pTB5116, Carril 2: sobrenadante del control pTB5116, Carril 3: Marcador de peso molecular, Carril 4: Sobrenadante de pLRV06, Carril 5: Pellet de pLRV06, Carril 6: Sobrenadante de pLRV03, Carril 7: pellet de pLRV03.

Al inicio del proyecto se había planteado que la proteína RmrR se purificaría por medio de una columna de níquel con afinidad a histidinas (a partir de la cepa BL21(DE3)pLysSpLRV03); sin embargo, para purificar por este método es necesario tener suficiente cantidad de extracto crudo con la proteína en estado soluble. Se probaron diversas condiciones de expresión de proteína como la reducción de la concentración de IPTG de 100  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ; la reducción del tiempo de incubación después de la inducción con IPTG de 4 horas a 2 horas, 1 hora y 30 minutos la reducción de la temperatura de inducción de 37°C a 30°C y 22°C. Solamente para el caso de la expresión bajo condiciones variables de IPTG se obtuvo cierta cantidad de proteína en estado soluble, no obstante esta no se consideró suficiente para hacer la purificación (Fig. 11).



**Fig.11.-**Gel de poliacrilamida al 15% con SDS 0.1% que muestra el extracto crudo de la proteína RmrR con cola de histidinas después de ser inducido con diferentes concentraciones de IPTG. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: Inducción sin IPTG, Carril 3: Pellet RmrR03 con 0.1 $\mu\text{M}$  IPTG, Carril 4: sobrenadante, Carril 5: pellet RmrR03 con 1 $\mu\text{M}$  IPTG, Carril 6: sobrenadante Carril 7: pellet RmrR con 10 $\mu\text{M}$  IPTG, Carril 8: sobrenadante, Carril 9: Pellet RmrR con 100 $\mu\text{M}$  IPTG.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se optó por solubilizar la proteína con un método de desnaturalización-renaturalización. Las fracciones no solubles de los extractos crudos se desnaturalizaron en 5 M de guanidina y renaturalizaron con glutatión oxidado y reducido y con arginina, se hizo una diálisis contra un gradiente de NaCl y se concentraron. El producto se analizó en un gel de acrilamida con SDS en el cual se observó que las dos proteínas ya se habían purificado. A las proteínas puras se les designó RmrR03 ( para la proteína con cola de histidinas ) y RmrR-06 (para la proteína sin cola de histidinas) (Fig.12). Las proteínas están a unas concentraciones de 225 µg/ml para RmrR06 y de 180 µg/ml para RmrR03.



Fig.12. Proteínas RmrR03 (carril 1) y RmrR06 (carril 3) puras. Carril 2: Marcador de peso molecular

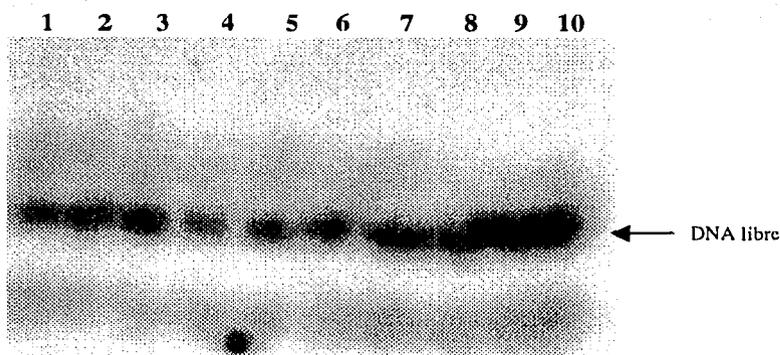
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Geles de Retardamiento

Los geles se hicieron con el objetivo de demostrar que existe interacción entre la proteína RmrR purificada y el fragmento de DNA correspondiente a la región intergénica (197 pb) entre los genes *rmrA* y *rmrR* donde se encuentra el palíndromo y el sitio homólogo al del factor  $\sigma$ -70 de *B. japonicum*.

El primer ensayo se hizo con el DNA intergénico de *rmrA* y *rmrR*, incubado con cantidades crecientes de las proteínas RmrR03 y RmrR06. Se utilizaron dos controles: uno de DNA sin proteínas y otro de DNA y BSA en lugar de la proteína.

En el ensayo de interacción RmrR03-DNA intergénico, no se detecta ninguna señal de retardamiento, todas las bandas, incluyendo las del DNA libre y la del DNA + BSA presentan la misma movilidad en el gel (Fig. 13).



**Fig.13.-**Gel de retardamiento para evaluar la interacción entre la región intergénica de los genes *rmrA* y *rmrR* y la proteína RmrR03 (con cola de histidinas). Carril 1:DNA sin proteínas, Carril 2: DNA y BSA, Carriles 3-10: DNA más concentraciones crecientes de proteína RmrR03

En el ensayo de interacción RmrR06-DNA intergénico, se detecta señal de retardamiento en todas las reacciones de DNA-RmrR con respecto a las de DNA sin proteínas y DNA y BSA (las dos últimas presentan la misma movilidad). Dicha señal se nota a partir del carril en el que corre el operador incubado con 0.5 $\mu$ l de la proteína RmrR06 y su intensidad se incrementa conforme va aumentando la cantidad de proteína hasta 8 $\mu$ l (Fig. 14). En el gel se observan principalmente dos bandas con diferente movilidad, lo que indica que la proteína puede estar formando diversos complejos al interactuar con el operador.

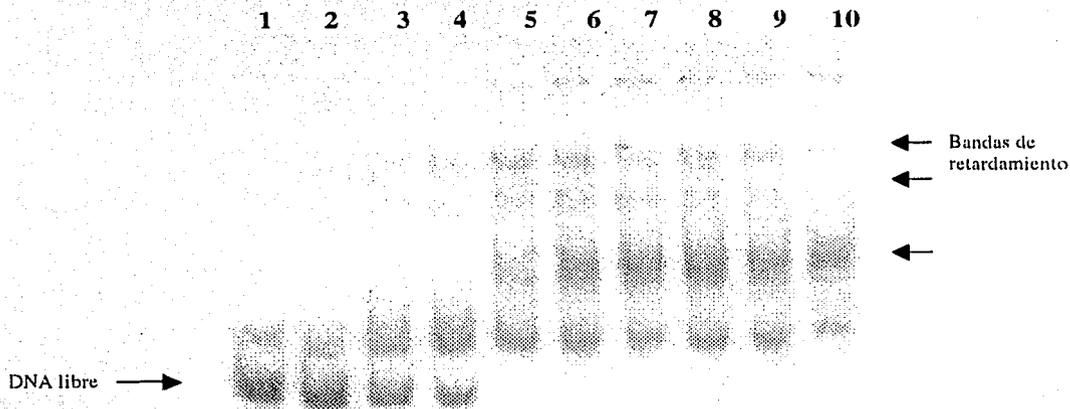


Fig. 14.-Gel de Retardamiento con DNA intergénico (*rmrR-rmrA*) y Proteína RmrR06. Carril 1: DNA sin proteína, Carril 2: DNA+BSA, Carriles 3 a 10: DNA + concentraciones crecientes de RmrR06. Las Flechas indican las 3 principales señales de retardamiento del DNA al ser incubado con la proteína RmrR06.

Con el objetivo de ver si existe pegado específico entre la región intergénica y la proteína RmrR se hicieron ensayos de competencia, se usó como DNA competidor al de 397 pb correspondiente al gen *rmrR* y otro DNA correspondiente al gen *nifD* que se aplicaron en cantidades crecientes. Los resultados muestran que el DNA competidor no

marcado es incapaz de alterar la señal de retardamiento provocada por el DNA intergénico con la proteína RmrR (Figs. 15A y 15B). En un segundo ensayo, solamente se observa disminución de la señal de retardamiento en las reacciones donde el competidor es el mismo DNA intergénico de 197 pb no marcado con [<sup>32</sup>P] que se aplicó en concentraciones crecientes. (Fig. 16).

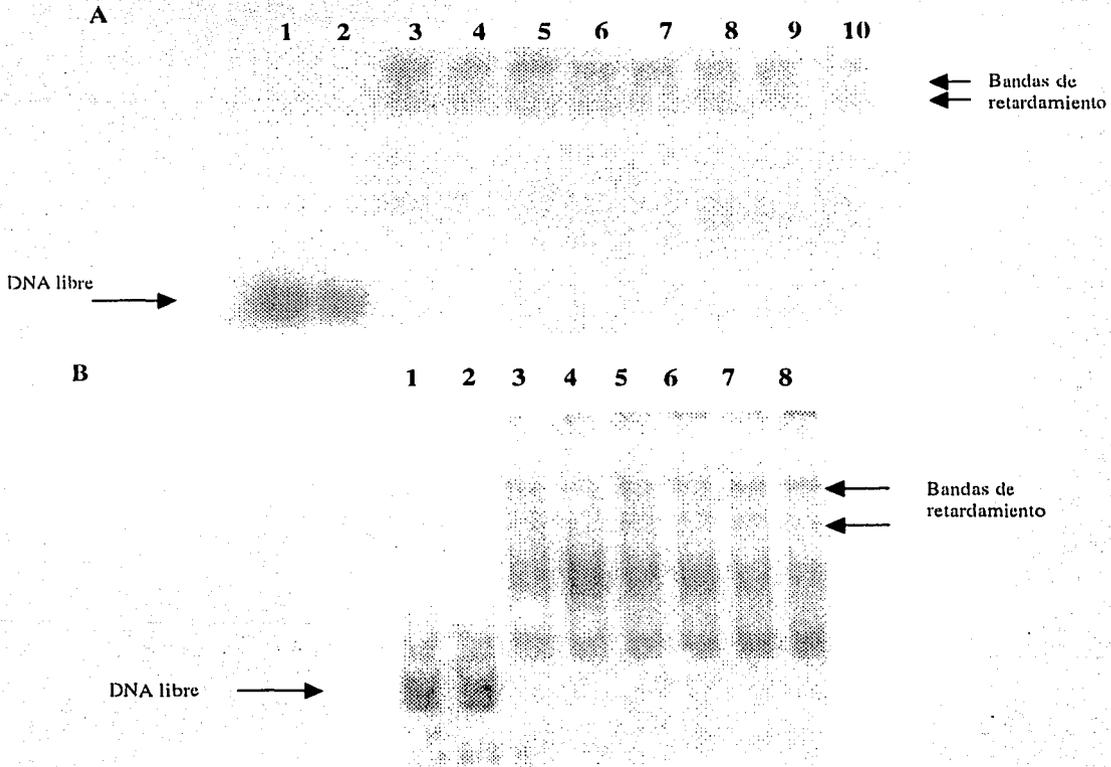
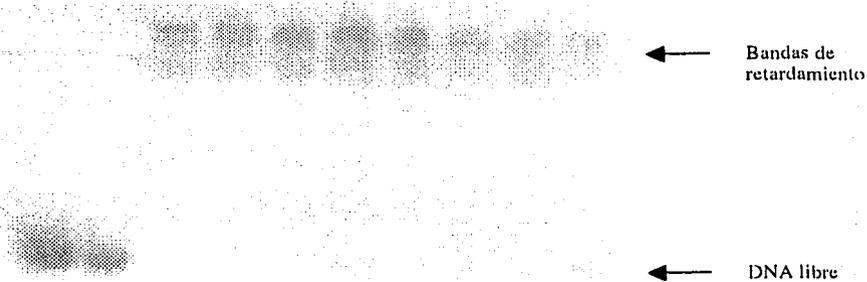


Fig. 15 A. Gel de retardamiento con DNA intergénico (marcado con P<sup>32</sup>), Proteína RmrR06 y como competidor un fragmento del gen *nifD* (sin marcar). Carril 1.- DNA intergénico, Carril 2.- DNA intergénico con BSA, carril 3.- DNA intergénico con RmrR06, carriles 4-10 DNA intergénico con proteína RmrR06 y DNA de *nifD* en concentraciones crecientes. B. Gel de retardamiento con DNA intergénico (marcado con <sup>32</sup>P), Proteína RmrR06 y como competidor, DNA del gen *rmrR* (sin marcar) . Carril 1.- DNA intergénico, Carril 2.- DNA intergénico con BSA, carril 3.- DNA intergénico con RmrR06, Carriles 4-8.- DNA intergénico con proteína RmrR06 y DNA del gen *rmrR*

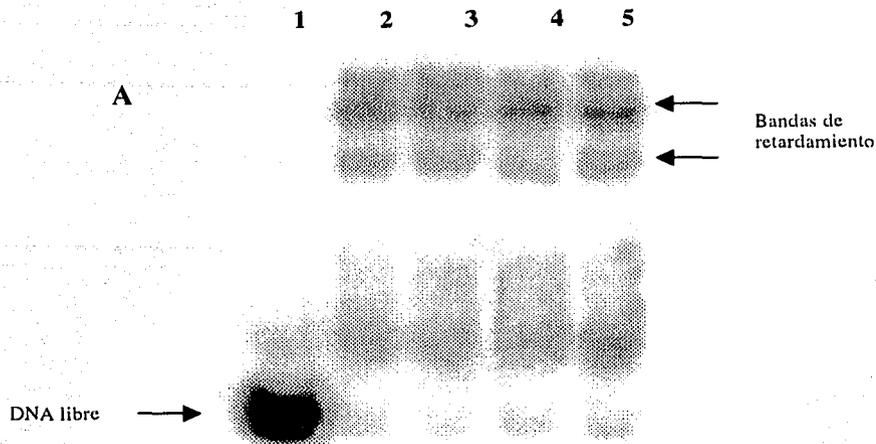
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



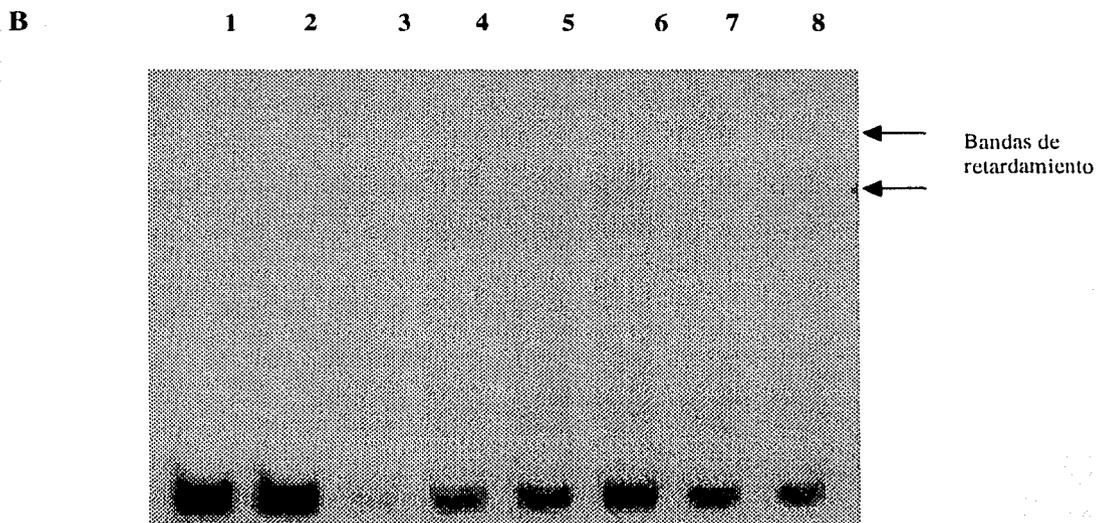
**Fig. 16.-**Gel de retardamiento de competencia con DNA intergénico (marcado con  $^{32}\text{P}$ ), DNA intergénico (frío) y proteína RmrR06. Carril 1. DNA intergénico, Carril 2.- DNA intergénico con BSA, Carril 3.- DNA intergénico con proteína Rmr06, Carriles 4-10.- DNA intergénico con proteína RmrR06 y concentraciones crecientes de DNA intergénico no marcado.

### **Ensayos de retardamiento con Flavonoides.**

Para conocer si algunos de los flavonoides presentes en exudados de frijol tienen efecto en la interacción de la proteína RmrR con la región intergénica de 197 pb, se hicieron ensayos de retardamiento en los que las reacciones, además de incluir la proteína RmrR y el DNA de 197pb- $^{32}\text{P}$ , se agregaron concentraciones crecientes del flavonoide naringenina. En el primer ensayo, aplicando solamente naringenina (ver materiales y métodos) no se observa efecto del flavonoide sobre la señal de retardamiento (Fig. 17A). En un segundo ensayo, además de naringenina se aplicó  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 10mM; en este caso se observa que la cantidad de DNA libre en las reacciones RmrR con DNA(op) y con flavonoide aumenta con respecto a la reacción RmrR con proteína conforme se incrementa la cantidad del flavonoide. No obstante la banda de retardamiento en estas reacciones no se ve alterada (Fig. 17B).

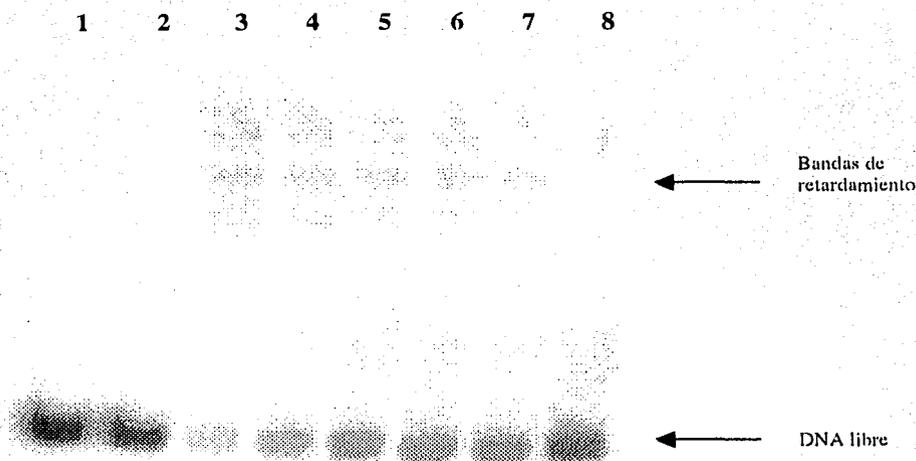


**Fig. 17 A.** Ensayos de retardamiento con DNA intergénico, proteína RmrR06 y concentraciones crecientes de naringenina. Carril 1: DNA, intergénico. Carril 2: DNA con proteína Rmr06, Carriles 3, 4 y 5: DNA con proteína RmrR06 y concentraciones crecientes de Naringenina.



**Fig. 17B.** Ensayo de retardamiento con DNA intergénico, proteína Rmr06, naringenina y  $\text{CaCl}_2$  (presente en todos los carriles). Carril 1: DNA sin proteína, Carril 2: DNA con BSA, Carril 3: DNA con RmrR06, Carriles 4-8: DNA con RmrR06,  $\text{CaCl}_2$  y concentraciones crecientes de naringenina.

Se realizó un tercer ensayo para el cual se agregó exudado de frijol, en este caso se utilizaron las siguientes concentraciones: diluciones 1:16, 1:8, 1:4, 1:2 y exudado sin diluir. Los resultados muestran que conforme se incrementa la concentración de exudado, la señal de DNA libre es mayor y la señal de retardamiento disminuye (Fig. 18) hasta llegar al punto en el que se aprecia sólo la banda correspondiente al DNA libre.



**Fig. 18.** Ensayo de retardamiento con DNA intergénico, proteína RmrR06 y exudado de raíz de frijol. Carril 1: DNA intergénico, Carril 2: DNA intergénico con BSA, Carril 3: DNA intergénico con proteína RmrR06, Carril 4: DNA intergénico, proteína RmrR06 y exudado de raíz diluido 1:16, Carril 5: DNA intergénico, RmrR06 y exudado de raíz diluido 1:8, Carril 6: DNA intergénico, RmrR06 y exudado de raíz diluido 1:4, Carril 7: DNA intergénico, RmrR06 y exudado de raíz diluido 1:2, Carril 8: DNA intergénico, RmrR06 y exudado de raíz no diluido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN

La comprensión de los mecanismos de regulación y funcionamiento de las proteínas de resistencia múltiple ha generado gran interés debido a que estas proteínas confieren a las bacterias la capacidad de sobrevivir en presencia de múltiples antibióticos y otros compuestos tóxicos, lo que ha constituido un grave problema de salud pública. En el caso de *Rhizobium etli*, estas parecen ser un factor crítico en la interacción específica de este simbionte con su hospedador. El descubrimiento de proteínas involucradas en la extrusión de compuestos tóxicos en *Rhizobium etli* (RmrA, RmrB y RmrR) revela que este mecanismo de defensa se encuentra ampliamente distribuido en microorganismos sin la necesidad de que estos sean patógenos. Este trabajo presenta la primera evidencia de que la proteína RmrR de *Rhizobium etli* está involucrada en la regulación de la expresión de los genes de resistencia múltiple *rmrA* y *rmrB*. Para demostrar lo anterior la estrategia utilizada fue la clonación del gen *rmrR* en *E. coli* para su sobreexpresión, la purificación de la proteína y la realización de ensayos de retardamiento que revelan la interacción DNA-proteína.

En primera instancia se había propuesto purificar la proteína RmrR haciendo pasar el extracto crudo a través de una columna de níquel que tiene afinidad a histidinas; por tal razón el gen *rmrR* fue clonado en el vector pET16b que añade histidinas en el extremo amino terminal. Sin embargo este método de purificación no fue posible ya que al hacer la inducción de la proteína esta se depositaba casi totalmente en el pellet (fracción no soluble) del extracto crudo formando cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados no solubles de las proteínas que se deben entre otras cosas a la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas (en este caso nuestra proteína presenta

una cisteína), a interacciones hidrofóbicas o la formación de puentes de sal de manera tal que la proteína presenta una conformación que en la mayoría de los casos no es funcional. La formación de cuerpos de inclusión es muy común cuando las proteínas se expresan en grandes concentraciones. La formación de cuerpos de inclusión también ha sido observada con la proteína de *Staphylococcus aureus* QacR que es el regulador de la expresión del gen de resistencia múltiple *qacA* (Gkovic *et al.*, 1998)..

Se decidió tratar a la proteína por un método de desnaturalización-renaturalización. La proteína fue desnaturalizada con guanidina HCl 6M; la guanidina actúa sobre la proteína a nivel de estructura secundaria, modificando su plegamiento a una proteína linearizada. Posteriormente la proteína fue renaturalizada con glutatión oxidado, glutatión reducido y con arginina. Se sabe que proporciones variables de glutatión son capaces de modular el repliegamiento de la proteína evitando la formación de puentes disulfuro y equilibrando las interacciones covalentes entre las proteínas. En cuanto a la arginina, aún no es claro el papel que pueda jugar en el establecimiento de una conformación correcta en la proteína. Finalmente se obtuvieron dos proteínas: La proteína RmrR con cola de histidinas cuyo tamaño es 15 kDa (denominada RmrR03) y la proteína RmrR sin cola de histidinas con tamaño de 13 kDa (denominada RmrR06). Para los dos casos el tamaño de la proteína es semejante al predicho, por tal razón se puede concluir que se purificó correctamente la proteína RmrR.

En la parte intergénica de los genes *rmrA* y *rmrR* existe una secuencia que posiblemente funciona como operador; aquí se encuentran las probables regiones promotoras -10 -35 de estos genes así como una secuencia palindrómica en la parte

media, por tal razón se ha propuesto que la proteína RmrR al pegarse a esta región es capaz de regular la expresión de *rmrAB* y de autorregular su expresión. Para demostrar que la proteína interactúa con el fragmento de DNA propuesto como el operador de los genes *rmrA* y *rmrR* se han hecho geles de retardamiento. Se amplificó la región intergénica de estos genes que comprende 197pb y se marcó en uno de sus extremos con  $^{32}\text{P}$ . Se utilizaron las dos proteínas puras obtenidas, así como los extractos crudos en los ensayos de retardamiento.

En primera instancia, los ensayos se hicieron en geles de poliacrilamida al 6%, sin embargo el resultado obtenido no fue claro ya que se formaban agregados entre las proteínas; en los geles parecía haber retardamiento pero no se observaba ninguna banda específica debido a que la proteína prácticamente no entraba en el gel (datos no presentados). No fue hasta que la concentración del gel se redujo a 4% que se obtuvieron resultados notables.

En el primer caso se evaluó si hay interacción entre el DNA intergénico y la proteína utilizando concentraciones crecientes de las proteínas RmrR03 y RmrR06. Solamente para el caso de la proteína sin cola de histidinas se ha encontrado señal de retardamiento. Mis resultados muestran que la proteína RmrR06 (purificada sin cola de histidinas) se pega a la región operadora de los genes de resistencia múltiple de *Rhizobium etli* y por lo tanto puede estar involucrada en su regulación. La posible explicación de por qué la proteína con cola de histidinas no interactúa con el DNA podría estribar en el método de purificación. Al renaturalizar una proteína con histidinas

adicionales, cabe la posibilidad de que estos aminoácidos hayan interferido en la conformación u oligomerización correcta de la proteína.

Nosotros proponemos que la proteína RmrR se une al palíndrome justo en la parte media de la región intergénica de *rmrA* y *rmrR*; sin embargo, aún existe la limitación de que el DNA usado en geles de retardamiento abarca toda la región intergénica y no es posible delimitar el sitio exacto de interacción con la proteína. La idea de que la proteína se pega a un palíndrome es reforzada por estudios que demuestran la unión de proteínas reguladoras de la familia TetR-AcrR a regiones palindrómicas de DNA. Para el caso de TetR (una proteína encontrada en bacterias Gram negativas), la proteína forma un dímero y se conoce que cada monómero se pega a un palíndrome (ya sea *op1* u *op2*) donde cada palíndrome tiene 6 nucleótidos (Saenger *et al.*, 2000) que se encuentra entre los genes *tetA* y *tetR*. Por otro lado la proteína QacR de *Staphylococcus aureus* forma un tetrámero que se pega a un palíndrome de 16 nucleótidos localizado río abajo al gen *qacA* (Grkovic *et al.*, 1998). Para comprobar que el palíndrome es el sitio específico de DNA al que se une la proteína es necesario hacer ensayos de protección de DNA ó experimentos de "footprinting".

En los ensayos de retardamiento del DNA con RmrR (sin cola de histidinas) se observan principalmente dos bandas de retardamiento. Este resultado se puede explicar de dos maneras: la primera es que la proteína al interactuar con el DNA está formando diferentes complejos, es decir que en algunos casos forma dímeros, en otros tetrámeros y que las bandas observadas en los ensayos de retardamiento muestran la diferente movilidad que presentan dichos complejos, la segunda explicación es que la interacción

de la proteína con el DNA en realidad no es muy fuerte; se ha reportado que algunas veces, cuando la proteína no se pega fuertemente al DNA se forma una banda principal que es la más intensa y bandas secundarias que son más débiles (Laniel *et al.*, 2001). Para conocer cómo es la interacción molecular de la proteína con el DNA, es decir, qué conformación tiene la proteína cuando se une al DNA se tendría que hacer la cristalografía de RmrR.

El segundo ensayo de retardamiento se llevó a cabo para demostrar que la interacción de la proteína es específica a un sitio concreto del DNA, es decir que nuestra proteína no se pega indiferentemente a cualquier región del DNA. Por esta razón se han hecho ensayos de competencia usando dos competidores de "DNA frío" (DNA no marcado), la primera, fue una región de aproximadamente 300 pb que abarca al gen *nifD* de *R. etli*, la segunda fue la región intergénica de los genes *rmrA* y *rmrR*. Sólo cuando se aplica un exceso de DNA frío de la región intergénica disminuye la afinidad de la proteína por el DNA marcado, demostrando que RmrR se une específicamente a la región intergénica de *rmrA* y *rmrR*. Algo notable del experimento de competencia contra el gen *rmrR* es el hecho de que si éste no compite por el pegado de la proteína descarta la probabilidad de que la proteína regule al gen uniéndose al sitio de inicio de traducción de este o que el operador se encuentre sobrelapado con el gen estructural *rmrR*; este resultado delimita más a la región intergénica como el sitio específico de unión de la proteína.

Se ha demostrado que los flavonoides exudados de frijol tienen la capacidad de inducir la expresión de genes de resistencia múltiple, otro caso ha sido descrito para A.

*tumefaciens* donde el cumestrol exudado de alfalfa induce la expresión de los genes de resistencia *ifeA*, *ifeB* e *ifeR* (Palumbo et al., 1998). Con base en los resultados obtenidos previamente (González-Pasayo & Martínez-Romero, 2000) en este trabajo se ha propuesto que los exudados de frijol naringenina y genisteína son capaces de inducir la expresión de los genes de resistencia múltiple de *Rhizobium etli*. Por tanto se diseñaron ensayos de retardamiento en los que se agregaron diferentes concentraciones de estos flavonoides, esperando que éstos se pegaran a la proteína y por lo tanto la proteína ya no se uniera al DNA. En los ensayos, donde únicamente se usa naringenina ó genisteína, se observó que ninguna concentración del flavonoide probada tiene efecto sobre la interacción del DNA por la proteína RmrR. En cambio al agregar  $\text{CaCl}_2$ , se observa que la marca de DNA libre se incrementa conforme crece la concentración del flavonoide con respecto a la marca de DNA libre en el control DNA con RmrR, no obstante se siguen observando con la misma intensidad las bandas de retardamiento. Si bien podemos concluir que los cationes divalentes como en este caso el calcio tienen efecto en la unión del flavonoide con la proteína, aún no es claro que un flavonoide por sí mismo disminuye la interacción del DNA con la proteína. Para explicar lo último existen diversas propuestas: la primera advierte que es necesaria la intervención de alguna chaperona que modifique la conformación de la proteína RmrR permitiendo la posterior unión del flavonoide como sería en el caso de la modificación de NodD por la chaperona GroESL que facilita la unión de la luteolina en *S. meliloti* (Yeh et al, 2002). La segunda propuesta se basa en que algún otro factor desconocido inducido durante el crecimiento de *Rhizobium* es capaz de modificar a la proteína o al flavonoide permitiendo la interacción entre estos dos. Otra explicación es que en el extremo 3' de la proteína se encuentre el dominio de unión a flavonoides. También se puede dar el caso de que más

bien la inducción de los genes este mediada por fitoalexinas; la expresión de algunas bombas de extrusión se presenta cuando el sustrato que necesita ser eliminado es el que se pega a la proteína reguladora como justamente sucede con la proteína TetR.

Un experimento posterior en el cual el competidor del DNA por la proteína es el exudado puro obtenido de raíz de frijol muestra que la proteína es capaz de perder su afinidad por el DNA si la concentración del exudado se incrementa. De esta manera se afirma que el compuesto o compuestos que pueden actuar como inductores de los genes *rmrA*, *rmrB* y *rmrR* son exudados de la raíz del frijol.

La región variable de las proteínas de la familia TetR determina su unión al sustrato, la proteína RmrR está formada por 4 hélices donde las hélices 1 y 3 conformarían el motivo de unión al DNA HTH. Probablemente la cuarta hélice (la hélice variable) esté relacionada con el pegado al sustrato. En el caso de TetR, la proteína forma un dímero con 10 hélices en cada monómero (Saenger *et al.*, 2000). Para el caso de RmrR de *Rhizobium etli* cabe la posibilidad de que esta proteína pequeña forme otro tipo de polímero como un tetramero y que las interacciones entre las hélices variables se conformen de alguna manera para pegar el sustrato, esta idea se apoya en el hecho de que la proteína QacR al ser muy pequeña se conforma a manera de tetramero para su unión al DNA (Schumacher *et al.*, 2002).

La proteína RmrR de *Rhizobium etli* presenta un motivo HTH altamente conservado entre las proteínas de la familia TetR; se han encontrado otras proteínas semejantes a RmrR en rhizobia como en el caso de *Mesorhizobium loti* (Número de

acceso NP\_105601), que ha sido denominado como probable regulador transcripcional de la familia TetR) y *Sinorhizobium meliloti* SMB20525. Es probable que la existencia de proteínas transportadoras de resistencia múltiple sea esencial en el establecimiento de una simbiosis efectiva con la planta hospedera y por tanto que el mecanismo de regulación por proteínas de la familia TetR-AcrR se encuentre ampliamente distribuido en bacterias rizobiales.

## APÉNDICE

### Defosforilación.

Se agrega al plásmido digerido 0.5  $\mu$ l de Fosfatasa alcalina.

-Incubación a 37° C durante 30 minutos.

-Incubación a 52° C durante 30 minutos.

-Se añade EGTA pH 8.0 a una concentración final de 20 mM (de una solución stock de 250 mM).

-Incubación por 20 minutos a 65° C.

### Ligación:

- En un tubo se pone el fragmento de DNA de 357 pb digerido con *NdeI* y *BamHI* (4 $\mu$ l)

-Se agrega el plásmido pET16b digerido con las enzimas *NdeI* y *BamHI* y defosforilado (8  $\mu$ l).

-Incubación a 65° C durante 5 minutos.

-Se agrega buffer de ligasa (de una solución stock concentrado al 10X) a una concentración final de 1X.

-Se agrega la enzima DNA ligasa (1  $\mu$ l con una concentración de 1U/ $\mu$ l)

-El volúmen final de la reacción es de 20  $\mu$ l.

-Incubación a 16° C toda la noche.

### Transformación:

El producto de la ligación se transformó en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  de la siguiente manera:

-Se pusieron 10µl del producto de ligación en 200 µl de células competentes *E. coli* DH5α.

- Incubación en hielo durante 30 minutos.

-Se hizo un choque térmico a 42° C durante dos minutos e inmediatamente se pasó a hielo.

- Se agregaron 800 µl de medio líquido Luria-Bertani (LB)\*.

-Incubación a 37° C en agitación durante 1 hora 30 minutos.

-El cultivo obtenido se plaqueó en cajas de medio Luria-Bertani con el antibiótico carbenicilina (Cb) (100µg/ml, concentración final).

\* Medio Luria Bertani:

Para 1 litro.

- Peptona de caseína	10 g.
-Extracto de levadura	5 g.
-NaCl	10 g.

Para medio sólido se añaden 15 g. de agar por litro.

#### Método de lisis alcalina:

-Resuspender el pellet en 100 µl de la solución I ( 50 mM de glucosa, 25 mM Tris HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)

-Incubación a temperatura ambiente por 5 minutos.

-Se añaden 200 µl de la solución II ( 0.2 N NaOH y 0.1% de SDS).

-Incubación en hielo durante 6 minutos.

-Se añaden 150 µl de la solución III (5 M de acetato de Potasio y 10 % de ácido acético glacial).

-Incubación por 10 minutos en hielo.

- Centrifugación a 14 000 rpm por 10 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
- Precipitar el DNA con dos volúmenes de etanol al 100%.
- Incubación por dos minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
- Remover el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm. Tirar el sobrenadante.
- Dejar secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender en 20  $\mu$ l de 1/10 Tris/EDTA pH 8.0.

Buffer de desnaturalización de Proteína:

5 M Guanidina HCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.005% Tween 80.

Buffer 1 para Renaturalización de Proteína:

50 mM Tris HCl pH 8.0, 0.005% Tween 80, 2.5 mM glutation reducido, 0.025 mM glutation oxidado.

Buffer 2 para Renaturalización de Proteína:

50 mM Tris HCl pH 8.0, 0.4 M arginina, 1 M guanidina HCl, 0.005% Tween 80, 2 mM glutation reducido, 0.02 mM glutation oxidado

## REFERENCIAS.

1. Ara Begum, A., Leibovitch, S., Migner, P., and Zhang. (2001). **Specific Flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments.** J. Exp. Bot. .52 (360): 1537-1543.
2. Aramaki, H., Yagi, N. and Suzuki M. (1995). **Residues Important for the Function of a Multihelical DNA Binding Domain in the New Transcription Factor Family of Cam and Tet Repressors.** Prot. Eng. Vol. 18 (12): 1259-1266.
3. Berens, C., Schnappinger, D. and Hillen W. (1997). **The Role of the Variable Region in Tet Repressor for Inducibility by Tetracycline.** J. Biol. Chem., 272 (11): 6936-6942.
4. Bolaños-Vásquez, M. C. and Werner D. (1997). **Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli* and *R. leuminosarum* by *phaseoli* on *nod* Gene-Inducing Flavonoids in Root Exudates of *Phaseolus vulgaris*.** MPMI. 10 (3): 339-346.
5. Brennan, R.G. (2001). **Introduction: Multidrug Resistance.** seminars in CELL and DEVELOPMENTAL BIOLOGY. Vol. 12. p.p. 201-204.
6. Dakora, F. D., Joseph, C. M. and Phillips D. (1993). **Common Bean Root Exudates Contain Elevated Levels of Daidzein and Coumestrol in Response to *Rhizobium* Inoculation.** MPMI. 6 (5). :665-668
7. Dullely and Grieve. (1975). Anal. Biochem. 64:136-141.

8. Filippone, M. P., Diaz-Ricci, A. P. and Ricardo N. Farias. (2001). **Effect of Fragarin On Cytoplasmic Membrane of the Phytopathogen *Clavibacter michiganensis***. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol 14. No 7. pp.925-928.
9. Feiber, A., Sopalla, A. and Klaus-Michael Weltring. (2001). **An ATP Binding Cassette Multidrug Resistance Transporter is Necessary for Tolerance of *Giberella pulicaris* to Phytoalexins and Virulence on Potato Tubers**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 15. pp.102-108.
10. Gonzalez-Pasayo, R. and Esperanza Martínez Romero. (2000). **Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42**. *Molecular Plant Microbe Interactions*. Vol.13 p.p.572-577
11. Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N.J., Paulsen, I.T. and Skurray, R.A. (1998). **QacR Is a Repressor Protein That Regulates Expression of the *Staphylococcus aureus* Multidrug Efflux Pump QacA**. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273:18665-18673.
12. Grkovic, S., Brown, M. and Ronald Skurray. (2001). **Transcriptional Regulation of Multidrug Efflux Pumps in Bacteria**. *seminars in CELL and DEVELOPMENTAL BIOLOGY*. Vol. 12. p.p. 225-237.
13. Hammerschmidt, R. (1999). **PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years?** *Annual Review of Phytopathology*. Vol 37. pp. 285-306.
14. Hammond-Kosack, K. and Jones, J.D.G. (2000) **Responses to Plant Pathogens**. in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B. Buchanan, W. Gruissem. R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.

15. Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M. Müller, A., Tovar, K., Hillen, W. and Wolfram Saenger. (1994). **Structure of the Tet Repressor-Tetracycline Complex and Regulation of Antibiotic Resistance.** Science. Vol. 264. p.p. 418-420.
16. Laniel, M.A., Beliveau, A., Guerin, S.L. (2001). **Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-Protein interactions.** Methodes in Molecular Biology. 148:13-30.
17. Lewis, K. (1994). **Multidrug Resistance Pumps in Bacteria: Variations of a theme.** TIBS. Vol. 19. p.p. 119-123.
18. Mierendorf, R. Yeager, K. and Robert Novy. (1994). **The pET system: Your Coice for Expression.** in Novations. Vol. 1 p.p. 1-3.
19. Nesterneko et al. (1994). J. Biochemical and Biophysical Methodes. 28: 239-242
20. Nikaido. H. (1998). **Multiple Antibiotic Resistance and Efflux.** Current Opinion in Microbiology. Vol. 1. p.p. 516-523.
21. Oldroyd, G. E. D., Mitra, R. M., Wais, R. J. and Sharon Long. (2001). **Evidence for Structurally Specific Negative Feedback in the Nod factor Signal Transduction Pathway.** The Plant Journal. Vol. 28(2). p.p. 191-199.
22. Palumbo, J. D., Kado, C. I. and Donald A. Phillips. (1998). **An Isoflavonoid-Inducible Efflux Pump in *Agrobacterium tumefaciens* Is Involved in Competitive Colonization of Roots.** Journal of Bacteriology. Vol.180. No. 12. p.p.3107-3113.
23. Porchewski, P., Specht, V., Stobner, S., Kindi, H. (2001). **A Novel Tetratricopeptide repeat-containing J-protein Localized in Plasma**

- Membrane-Bound Protein Complex of the Phytopathogenic Oomycete *Phytophthora megasperma*.** European Journal of Cell Biology. Vol. 80. No. 8. pp.527-538.
24. Pribnow, D. (1975). **Nucleotide Sequence of an RNA Polymerase Binding Site at an Early T7 Promoter.** PNAS. Vol. 72. p.p. 784-788.
25. Rogers, E., Glazenbrook, J. and Frederick M. Ausbel. (1996). **Mode of Action of *Arabidopsis thaliana* Phytoalexin Camalexin and Its Role in *Arabidopsis*-Pathogen Interactions.** Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol 9. pp. 748-757.
26. Saenger, W., Orth, P., Kisker, C., Hillen, W. and Winfried Hinrichs. (2000). **The Tetracycline Represor- A Paradigm for a Biological Switch.** Angewandte Chemie. Vol. 39. p.p. 2042-2052.
27. Salyers, A. A., Speer, B. S. and N. B. Shoemaker. (1990). **New Perspectives in Tetracycline Resistance.** Molecular Microbiology. Vol. 4(1). p.p. 151-156.
28. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.A. (1989) **Molecular Cloning: A laboratory Manual.** 2nd Ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
29. Segovia, L., Young, J. P. W. and Martínez-Romero E. (1993). **Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* Type I strains as *Rhizobium etli* sp.** Int. J. of Syst. Bacteriology. Vol. 43. p.p. 374-377
30. Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S. Brown, M. H. Skurray, R. and Richard Brennan. (2002). **Structural basis for cooperative DNA binding by**

**two dimers of the multidrug-binding protein QacR.** The EMBO Journal. Vol. 21. No. 5. pp.1210-1218.

31. Tarchevskii, I. A. (2001). **Pathogen-Induced Plant Proteins.** Prikl. Biokhim. Mikrobiol. Vol. 37. No 5. pp. 517-532.
32. Tielbel, B., Aung-Hilbrich, L. M., Schnappinger, D. and Wolfgang Hillen. (1998) **Conformational Changes Necessary for Gene regulation by Tet repressor Assayed by Reversible Disulfide Bond Formation.** The EMBO Journal. Vol. 17. No 17. p.p. 5112-5119.
33. Webster, G., Jain, V., Davey, M. R., Gough, C., Vasse, J., Denarié, J. and E. C. Cocking. (1998). **The Flavonoid Naringenin Stimulates the Intercellular Colonization of Wheat Roots by *Azorhizobium caulinodans*.** Plant, Cell and Environment. Vol. 21. p.p.373-383.
34. Yeh, K., Peck, M. and Sharon Long. (2002). **Luteolin and Gro ESL Modulate In Vitro Activity of NodD.** Journal of Bacteriology. Vol. 184., No. 2., p.p.525-530.