

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR QUE REGULA AL GEN MPC, (CATABOLISM OF METHYL PARATHION), POR PROTEÍNAS CRP Y CpxR.

Concepción CHINO-FLORES¹, Enrique SÁNCHEZ-SALINAS¹, Ma. Laura ORTIZ-HERNÁNDEZ¹, Rafael DÍAZ-MÉNDEZ², Miguel A. RAMÍREZ-ROMERO², Edgar DANTÁN-GONZALEZ¹. Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad #1001 Col. Chamilpa Cuernavaca Morelos ¹Laboratorio de Investigaciones Ambientales. ²Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Tel. 01777 329-7057 fax 01777 329-7030. Correo electrónico: chinofl@gmail.com

Palabras clave: *mpc*, regulación, hidrolasa.

Introducción. En los organismos, la respuesta a cambios ambientales, es coordinada a través de la regulación transcripcional, primordialmente al inicio ésta y está mediada comúnmente por proteínas reguladoras, ya sea para inhibirla o favorecerla, de acuerdo a las necesidades metabólicas de la célula (1). En el CEIB-UAEM, se aisló el gen *mpc* (Catabolism of Metil Parathion), ubicado en el cromosoma de *Enterobacter* sp., aislada de un consorcio bacteriano de suelos agrícolas contaminados con plaguicidas organofosforados. El gen *mpc* codifica para una proteína hipotética "Hidrolasa dependiente de metal" (HDM), con capacidad de hidrolizar al plaguicida Paratión Metílico (PM), cuenta con un promotor típico de *E. coli* reconocido por el factor sigma 70 y presenta secuencias consenso para la unión de proteínas reguladoras del catabolismo CRP y CpxR (2).

Objetivo: Determinar si el gen *mpc* está regulado por proteínas CRP, CpxR y la capacidad de hidrolizar al plaguicida PM.

Metodología. Se realizó una fusión transcripcional al amplificar el gen *mpc* con los oligos *mpcFW* 5'-GGAATTCATCATTCGCGCACCAGAATAC-3' y *mpcRV* 5'-GCCTCGAGCTCCGGTAAAATGAAG-3' con los sitios de restricción *EcoRI*/*XhoI*, respectivamente. El gen *mpc* se ligó en el vector pBBR1GUS(53) (*mpc5*). Para determinar que el gen *mpc* esta siendo regulado por proteínas CRP y CpxR, se transformó la cepa *E. Coli* (JW5702) Crp-, *E. Coli* (JW3883) CpxR-, la cepa silvestre con la fusión transcripcional *mpc5*. Se determinó la Actividad Específica (AE) del gen reportero de la β -glucuronidasa. Se llevó a cabo una cinética de crecimiento, para determinar la fase diauxica de la cepa de *Enterobacter* sp., en MM (Medio Mineral) con PM a 25 mg/L a 30° C. Se determinó la AE de la HDM de la cepa de *Enterobacter* sp., crecida en MM con PM a 25 mg/L a 30° C, en diferentes tiempos.

Resultados y discusión. Los datos de β -glucuronidasa sugieren fuertemente que el gen *mpc* está siendo regulado negativamente por CRP y CpxR, sin embargo la expresión de éste gen está siendo regulado negativamente por mecanismos más fuertes, incluso que CRP y CpxR.

La actividad de la proteína HDM puede aumentar al clonarla en un vector de expresión ya que se obtiene un aumento en la AE en la fase diauxica (Fig. 2). La cepa de *Enterobacter* sp, muestra una fase diauxica aproximadamente a las 48 horas (Fig. 1) y una AE de $0.311 \pm 0.069 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ prot. (Fig. 2).

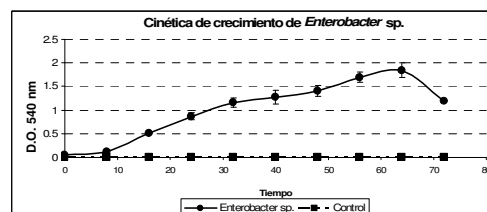


Fig. 1. Cinética de crecimiento de la cepa de *Enterobacter* sp., mostrando la fase diauxica aproximadamente a las 48 horas.

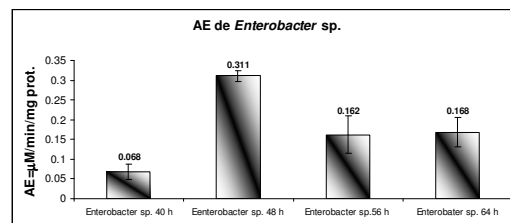


Fig. 2. AE ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ prot.) a diferentes horas, apreciándose un aumento en la actividad, en la fase diauxica.

Conclusiones. El gen *mcp* no está siendo regulado negativamente por proteínas CRP y CpxR. La cepa *Enterobacter* sp., tiene fase diauxica aproximadamente a las 48 horas. La AE sobre el PM aumenta en la fase diauxica. Se sabe que existe interferencia transcripcional entre promotores divergentes (3) y esta podría ser la razón por la que el gen *mpc* está siendo fuertemente regulado.

Bibliografía.

- Blackwel T. K. y Walke A. K. (2007) Transcription mechanisms. Edited by Thomas Blumenthal.
- Chino C. 2007. Clonación y expresión de fosfotriesterasas (FTE's) de un consorcio bacteriano aislado del suelo. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias biológicas: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, pp. 58.
- Sneppen K., Dodd IB., Shearwing KE, Palmer AC, Schubert RA, Callen BP, Egan JB. (2005) A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in Escherichia coli. *J Mol Biol.* 346: 399-409.