

00523
14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CONTROL POSTRANSKRIPCIONAL DEL GEN' adhE
QUE CODIFICA LA NAD+-DEPENDIENTE ETANOL
OXIDOREDUCTASA (EC. I.I.I.I.) EN *Escherichia coli*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C A
P R E S E N T A :
GRETA CORNEJO ALTUZAR



MEXICO D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.


PAGINACION DISCONTINUA

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

NOMBRE: GRETA CORNEJO

ALTUZAR

FECHA: 27/Marzo/2003

FIRMA: 

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. Homero Hernández Montes

Vocal: Profesora María del Carmen Parra González

Secretario: Dr. Jorge Membrillo Hernández

1^{er} Suplente: Profesora Gloria Gutiérrez Venegas

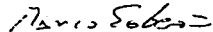
2^{do} Suplente: Profesora Ruth Edith Martín Fuentes

Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México

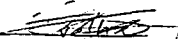
Asesor del Tema
Dr. Jorge Membrillo Hernández



Supervisor Técnico
Dr. Mario Soberón Chávez



Sustentante
Greta Cornejo Altuzar



Agradecimientos

A Pedro por ser y estar siempre, por hacerme tan feliz, te amo.

A mi mamá Luzma por amarme, apoyarme, hacerme independiente y responsable.

A mis papá Carlos por ser una fuente de amor, arte, superación y lógica.

A mis papás Fernando y Sonia por aceptarme en su casa como a una hija más.

A mis hermanos Layma, Virna y Sharad: los adoro y me hacen muy feliz.

A toda mi familia Cornejo y Altuzar por que siempre han estado en mi vida.

A mis primos que quiero tanto y han sido —o fueron— parte integral de mi vida: Karel,

Fernando, Mónica, Karla, Pame, Abril, Bombón, Romel, Luisa.

A Tita, Abuelita, Abuelito (q.e.p.d), tía Guichita por apapacharme tanto y enseñarme sus cualidades con amor como ejemplo.

A Pedro y Carmen por quererme y ser un gran apoyo; a Ursus mi ñuquis preferida.

A mi familia Villalón y Breña por aceptarme como parte de ellos.

A mis amigas Alicia, Carmen y Marilupe por seguir con nuestra amistad aunque nuestras vidas sigan caminos tan distintos.

A mis amigas de la U.N.A.M. Jimenita, Ekaterina, Alma, Luz Selene, Karina.

A mis amigas de tantos años: Lorell, Fabiola, Karol, Erika A., Maritere, Pilar, Gisel.

A Miss Lupita por mostrarme lo maravilloso y divertido que puede ser la ciencia.

A todos los maestros que me regalaron su tiempo y que me enseñaron en la Facultad de Química. Al profesor Edmund Lin por el tiempo para mostrarme la relevancia y belleza del proyecto.

Al Dr. Jorge Membrillo Hernández por ser un excelente asesor y maestro, y haberme introducido en el ámbito científico de forma tan amena.

A los que son y fueron miembros del laboratorio del Dr. Jorge Membrillo Hernández por enseñarme tantas cosas y apoyarme con la tesis: Martha, Elizabeth, Marcela, Paola, Pepe, Georgina, Maritrini, Licenciado, Juan, Marisela, Dolores.

Al Señor Miguel Páez y a todo el personal de apoyo en el IIB, por mostrarme como trabajar bien con una sonrisa en la cara.

A la U.N.A.M., al Instituto de Investigaciones Biomédicas por las instalaciones prestadas y por la oportunidad de estudiar y aprender ahí. A los proyectos IN205200 de la DGPA y J33369-N de CONACYT por el apoyo al proyecto de investigación de desarrollo en la tesis.

A Dios.

Abreviaturas

Las abreviaciones utilizadas en esta tesis se adoptaron para su uso, sin definición, por el Consejo Editorial de la Sociedad Real de Bioquímica del Reino Unido [*Biochem J* (1991) **273**: 1-19] y por la revista *Microbiology*.

LB	Medio Luria-Bertani
OD_{nm}	Densidad Óptica medida a ciertos nanómetros

Además, se utilizan las siguientes abreviaciones sin definición:

O.N.	Cultivo de 12 horas, "over night"
BSA	Albúmina de suero bovina
bp	Pares de bases
kb	1 000 pares de bases
Ab^{r/s}	Resistente/ sensible a un antibiótico
t.a.	Temperatura ambiente
MM	Medio mínimo

Todos las EC de las enzimas se tomaron de acuerdo a NCIUBMB

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Índice de Tablas

Título	Capítulo	Página
Tabla 1. Características de las citocromos oxidasas presentes en <i>E. coli</i> de acuerdo a la tensión de O ₂ presente	1	14
Tabla 2. Potenciales rédox estándar de los aceptores de electrones utilizados en <i>E. coli</i> .	1	16
Tabla 3. Estados de oxidación de componentes de la fermentación en <i>E. coli</i>	1	31
Tabla 4. Ribonucleasas más conocidas en <i>E. coli</i> .	1	40
Tabla 5. Transcritos afectados por la deficiencia de RNasa G.	1	43
Tabla 6. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	2	44-46
Tabla 7. Plásmidos de <i>E. coli</i> utilizados en este trabajo	2	47
Tabla 8. Concentración de antibióticos usados en los medios de cultivo	2	50
Tabla 9. Secuencia de oligo-nucleótidos usados en este trabajo.	2	67
Tabla 10. Programa utilizado en el PCR.	2	69
Tabla 11. Fenotipo observado en cepas con p(<i>trp(adhE'-lacZ)</i>) ó pALF1 en placas de LB suplementadas con X-gal.	4	77
Tabla 12. Ecuaciones determinadas de las curvas de crecimiento aeróbicas obtenidas en MM + casaminoácidos o LB.	4	85
Tabla 13. Ecuaciones determinadas de las curvas de crecimiento anaeróbicas obtenidas en MM + casaminoácidos o LB.	4	88
Tabla 14. Tamaño de los diferentes fragmentos amplificados de <i>adhE</i> .	6	103
Tabla 15. Coloración de cepas transformadas con cada plásmido al sembrar en LBxgal más antibióticos.	6	105

Índice de Figuras

Título	Capítulo	Página
Fig. 1. La cadena respiratoria de <i>E. coli</i>	1	15
Fig. 2. Vías sensoras rédox y de O ₂ en metabolismo anaeróbico en <i>E. coli</i> .	1	17
Fig. 3. Modelo de la señal de transducción por el sistema Arc	1	18
Fig. 4. Representaciones esquemáticas de ArcB y ArcA.	1	19
Fig. 5. Modelo para el control del regulador Fnr en respuesta a cambios rédox.	1	20
Fig. 6. Modelos de la estructura para el monómero de Fnr, basado en la estructura de Crp.	1	21
Fig. 7. Esquema de la fermentación de mezcla de ácidos.	1	26
Fig. 8. Secuencia de bases y localización de sitios regulatorios en la región promotora de <i>adhE</i> .	1	32
Fig. 9. Relación de la actividad transcripcional del gene <i>adhE</i> en aerobiosis y anaerobiosis.	1	33
Fig. 10. Representación esquemática de una fusión transcripcional y traduccional	1	34
Fig. 11. Representación esquemática de los dominios de la proteína AdhE	1	34
Fig. 12. Secuencia de aminoácidos de AdhE y probables sitios de unión.	1	35
Fig. 13. Modelos para el mRNA del gene <i>adhE</i> , que incluyen la región 5' no traducida.	1	36
Fig. 14. Clonas construidas que codifican para proteínas híbridas.	3	75
Fig. 15. Estructura secundarias probable del transcrito de <i>adhE</i> .	6	107
Fig. 16. Estructura secundaria probable de la fusión híbrida <i>adhE-lacZ</i> proveniente de la clona pFG1.	6	108
Fig. 17. Estructura secundaria probable de la fusión híbrida <i>adhE-lacZ</i> proveniente de la clona pFG2.	6	109
Fig. 18. Estructura secundaria probable de la fusión híbrida <i>adhE-lacZ</i> proveniente de la clona pFG3.	6	110
Fig. 19. Estructura secundaria probable de la fusión híbrida <i>adhE-lacZ</i> proveniente de la clona pFG4.	6	111

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Fig. 20. Estructuras secundarias de los transcritos de <i>adhE</i> de <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Escherichia coli</i> .	7	116
Fig. 21. Estructura secundaria del extremo 5' no traducido del mRNA de <i>adhE</i> de <i>Escherichia coli</i> .	7	117
Fig. 22. Estructura secundaria del extremo 5' no traducido del mRNA de <i>adhE</i> de <i>Salmonella typhimurium</i> .	7	118

Índice de Gráficas

Título	Capítulo	Página
Gráfica 1. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pALF1- (Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)) crecidas en LB a 37°C.	4	79
Gráfica 2. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pRS414 - (Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)) crecidas en LB a 37°C.	4	79
Gráfica 3. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pALF1 crecidas en MM casaminoácidos a 37°C.	4	80
Gráfica 4. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pRS414 -(Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)) crecidas en MM casaminoácidos a 37°C.	4	80
Gráfica 5. Actividades específicas de AdhE en cepas con pRS414-((Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)) crecidas en MM casaminoácidos.	4	81
Gráfica 6. Actividades específicas de AdhE en cepas transformadas con pALF1- (Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)) crecidas en MM casaminoácidos.	4	82
Gráfica 7. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas aeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pALF1, crecidas en MM casaminoácidos a 37°C.	4	86
Gráfica 8. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas aeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pRS414- (Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)), crecidas en MM casaminoácidos a 37°C.	4	86
Gráfica 9. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas aeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pALF1, crecidas en LB a 37°C.	4	87
Gráfica 10. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas aeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pRS414- (Φ (<i>adhE</i> '-' <i>lacZ</i>)), crecidas en LB a 37°C.	4	87
Gráfica 11. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas anaeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pALF1, crecidas en MM casaminoácidos a 37°C.	4	89

Gráfica 12. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas anaeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pRS414-($\Phi(adhE'$ - $lacZ)$), crecidas en MM casaminoácidos a 37°C.	4	89
Gráfica 13. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas anaeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pALF1, crecidas en LB a 37°C.	4	90
Gráfica 14. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas anaeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pRS414-($\Phi(adhE'$ - $lacZ)$), crecidas en LB a 37°C.	4	90
Gráfica 15. Promedio de células que crecieron en LB sólido anaeróbicamente con respecto a las que crecieron aeróbicamente.	5	94
Gráfica 16. Promedio de células que crecieron en MM casaminoácidos sólido anaeróbicamente con respecto a las que crecieron aeróbicamente.	5	95
Gráfica 17. Porcentaje de células que crecieron en MM casaminoácidos anaeróbicamente con respecto a las que crecieron aeróbicamente.	5	95
Gráfica 18. Actividades específicas de AdhE en cepas isogénicas de MC1061 con pRS414-($\Phi(adhE'$ - $lacZ)$) crecidas en MM casaminoácidos.	5	96
Gráfica 19. Actividades específicas de AdhE en cepas isogénicas de JRG780 y crecidas en MM casaminoácidos.	5	97

Índice de Geles y Diagramas

Título	Capítulo	Página
Diagrama 1. Obtención de cepas y caracterización de las mismas	3	73
Gel 1 y 2. SDS-PAGE de cepas crecidas en MM líquido glucosa casaminoácidos anaeróbicamente a 37°C.	4	83
Gel 3 y 4. SDS-PAGE de cepas crecidas en MM líquido glucosa casaminoácidos aeróbicamente a 30°C.	4	84
Gel 5 y 6. SDS-PAGE de mutantes supresoras transformadas con pALF1.	5	98
Diagrama 2. Obtención de los fragmentos de <i>adhE</i> y clonación de los mismos.	6	102
Gel 7. Fragmentos de <i>adhE</i> amplificados por PCR, cortados con enzimas de restricción y purificados.	6	104
Gel 8. Electroforesis que muestra los plásmidos obtenidos y su patrón de digestión.	6	104

Índice de Capítulos

Agradecimientos.....	3
Índice de Tablas.....	5
Índice de Figuras.....	6
Índice de Gráficas.....	7
Índice de Geles y Diagramas.....	8
Índice de Capítulos.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Introducción.....	12
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>, una Bacteria Facultativa.....	13
1.1.2 Sistemas Respiratorios.....	13
1.2 Mecanismos de Regulación Genética en la Respiración Aeróbica y Anaeróbica.....	16
1.2.1 Control Respiratorio Aeróbico: Sistema ArcA/B.....	16
1.2.2 Regulación de la Reducción del Fumarato y Nitrato: Fnr.....	18
1.2.3 Activador Transcripcional de Anaerobiosis: AppY.....	21
1.2.4 Activador de la Citrato Liasa: CitB/A (DpiA/B).....	22
1.2.5 Sistema de Aerotaxis: Aer.....	22
1.2.6 Direct Oxygen Sensor: DOS.....	23
1.2.7 La Flavohemoglobina Hmp.....	23
1.3 Fermentación.....	23
1.3.1 Fermentación en otras Bacterias.....	24
1.3.2 Fermentación en <i>E. coli</i>.....	25
1.3.3 Enzimas de la Fermentación y su Regulación.....	25
1.3.4 Alcohol Oxidorreductasa (EC 1.1.1.1).....	29
1.4 AdhE, Alcohol Oxidorreductasa.....	29
1.4.1 Estructura del Gene <i>adhE</i>.....	30
1.4.2 Regulación de la Expresión de <i>adhE</i>.....	31
1.4.3 Regulación Transcripcional de <i>adhE</i>.....	32
1.4.3.1 Estudios Utilizando Fusiones Transcripcionales y Traduccionales.....	33
1.4.4 Estructura de la Proteína.....	34
1.4.5 Regulación Post-Transcripcional de <i>adhE</i>.....	35
1.4.6 Regulación Post-Traduccionale de AdhE.....	36
1.4.6.1 Metal Catalyzed Oxidation: MCO.....	37
1.5 Objetivo de esta Tesis.....	38
1.5.1 Regulación Post-Transcripcional.....	38
1.5.1.1 La Transcripción del mRNA de <i>adhE</i> Requiere un Corte de la RNasa III en <i>E. coli</i>.....	38
1.5.1.2 La Regulación de la Expresión del gene <i>adhE</i> en <i>Escherichia coli</i>: Transcripción de un promotor río abajo y Regulación por Fnr y RpoS.....	38

1.5.1.4.2	¿Quién es la RNasa G?	42
1.5.1.5	Objetivo de la Tesis	42
2	MATERIAL Y MÉTODOS	44
1.1	Técnicas Bacteriológicas	44
2.1.1	Cepas Bacterianas y Plásmidos	44
2.1.2	Medio y Condiciones de Crecimiento	48
2.1.2.1	Suplementos a los Medios de Cultivos	49
2.1.2.2	Selección por Antibióticos	49
2.1.2.3	Preservación y Mantenimiento de Cepas Bacterianas, Bacteriófagos y Plásmidos	50
2.1.2.4	Condiciones de Crecimiento	50
2.1.2.5	Estudios de Expresión de Fusiones <i>lacZ</i>	51
1.2	Técnicas Bioquímicas	51
2.2.1	Preparación de Extractos Libres de Células	51
2.2.2	Determinación de Concentración de Proteína	51
2.2.2.1	Método de Bradford	51
2.2.3	Medición de Actividad de β -galactosidasa	52
2.2.4	Actividades Enzimáticas Específicas de <i>AdhE</i>	54
2.2.5	Electroforesis en Geles (SDS-PAGE)	55
2.2.6	Técnicas Espectrofotométricas	56
1.3	Manipulación y Análisis de DNA	57
2.3.1	Preparación de DNA Celular	57
2.3.1.1	Purificación de DNA de Plásmidos	57
2.3.2	Modificaciones Enzimáticas del DNA	58
2.3.2.1	Digestión con Endonucleasas de Restricción	58
2.3.2.2	Ligación de Fragmentos de DNA <i>in vitro</i>	59
2.3.3	Electroforesis con Geles de Agarosa	59
1.4	Técnicas Genéticas	60
2.4.1	Introducción DNA de Plásmido por Transformación	60
2.4.1.1	Preparación de Células de <i>E. coli</i> Competentes	60
2.4.1.2	Transformación de Células de <i>E. coli</i>	61
2.4.2	Introducción DNA de Plásmido por Electroporación	61
2.4.2.1	Preparación de Células Electrocompetentes	61
2.4.2.2	Electroporación	62
2.4.3	Técnica de Transducción por $P1_{vir}$	62
2.4.3.1	Preparación de Lisados Transducidos	63
2.4.3.2	Transducción por $P1_{vir}$	63
2.4.4	Transferencia de Fusiones <i>x-lacZ</i> de Plásmido a λ RS45	64
2.4.4.1	Aumentar el Título del Lisado de λ RS45 en una Cepa con el Plásmido con la Fusión	64
2.4.4.2	Transducción Cepa Receptora con Fago λ con $\Phi(adhE'-lacZ)$	65
2.4.5	Obtención de Mutantes Supresoras Espontáneas	65
2.4.5.1	Obtención de Mutantes Supresoras Espontáneas	66
2.4.5.2	Estadística de Mutaciones	66
1.5	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	67
2.5.1	Síntesis de Primers de Oligo-nucleótidos	67

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.5.2	Amplificación del DNA.....	68
2.5.3	Purificación de Productos de PCR.....	69
2.5.3.1	Purificación de Enzimas de PCR del Producto del PCR.....	69
2.5.3.2	Purificación de Enzimas de Restricción del Producto del PCR.70	
3	CONSTRUCCIÓN DE CEPAS.....	71
1.1	Introducción.....	71
1.2	Resultados e Interpretación.....	74
4	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.....	77
1.1	Resultados.....	77
4.1.1	Transformantes.....	77
4.1.2	Transductantes.....	78
4.1.3	Ensayos de β -galactosidasa y Actividad Enzimática AdhE.....	78
4.1.4	Electroforesis en Geles (SDS-PAGE).....	81
4.1.5	Curvas de Crecimiento.....	85
1.2	Interpretación.....	91
5	MUTANTES SUPRESORAS.....	92
1.1	Introducción.....	92
1.2	Resultados.....	93
5.2.1	Estadística de Mutaciones.....	93
5.2.2	Caracterización de Mutantes Supresoras.....	96
5.2.2.1	Actividades Específicas de AdhE.....	96
5.2.2.2	Electroforesis en Geles (SDS-PAGE).....	97
1.3	Interpretación.....	99
6	CLONAS.....	100
1.1	Amplificación por PCR de los fragmentos del gene que contengan la región reguladora de adhE y fragmentos de diferentes tamaños del gene estructural y su posterior clonación.....	100
1.2	Resultados.....	103
6.2.1	Amplificación de los Fragmentos del Gene <i>adhE</i> por PCR.....	103
6.2.2	Clonación de los Fragmentos en Plásmido pSK.....	103
6.2.3	Subclonación en Plásmido pRS414.....	105
6.2.4	Fenotipo de pFG's en Cepas Transformadas.....	105
1.3	Estructuras Secundarias de los Transcritos Híbridos Construidos.....	106
7	DISCUSIÓN GENERAL.....	112
1.1	Perspectivas.....	114
1.2	Conclusiones.....	115
8	REFERENCIAS.....	119

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Los primeros organismos que colonizaron la tierra fueron necesariamente anaeróbicos pues la atmósfera primitiva presentaba un carácter reductor. Hace 3 mil millones de años, como producto de la fotosíntesis de cianobacterias y otros organismos, se acumuló el O_2 en la atmósfera, volviéndola oxidante. Este cambio fue el inicio de uno de los mayores desastres ecológicos en la Tierra donde gran parte de la vida microbiana anaeróbica se extinguió (Dismukes, 2001).

El aumento en las concentraciones de O_2 en la atmósfera dio origen a la formación de la capa de ozono (O_3). La habilidad del O_3 y O_2 de filtrar parte de la radiación ultravioleta proveniente del sol, ayudó a los organismos a colonizar la tierra.

El nuevo ambiente oxidante de la atmósfera terrestre permitió la rápida capitalización de este útil oxidante como aceptor termodinámico (Poole y Cook, 2000). La vida no se limitó entonces solamente a la disponibilidad de luz y nutrientes, sino a la disponibilidad de donadores de electrones. Los organismos tuvieron que desarrollar mecanismos de obtención de energía con los cuales pudieran contender y utilizar el O_2 presente. El desarrollo de metabolismos respiratorios energéticos más eficientes fomentó la evolución de todos los organismos complejos, incluyendo a los humanos (Dismukes, 2001).

Algunos microorganismos restringieron su hábitat a lugares donde el O_2 no tuviera acceso, posiblemente de esta manera se originaron los organismos anaeróbicos estrictos. Otros optaron por utilizar el O_2 como único aceptor de electrones, y entonces surgieron los aeróbicos estrictos. Sin embargo, otros más evolucionaron para obtener energía en presencia o ausencia de O_2 , ellos probablemente dieron origen a los organismos facultativos.

El O_2 es moderadamente soluble: una solución acuosa saturada contiene 200 μM de O_2 a 37°C. En general se asume que el O_2 puede entrar a la célula por difusión. Sin embargo, los microorganismos obtuvieron una ventaja metabólica al expresar globinas microbianas, que en los organismos complejos facilitan el transporte o almacenaje del O_2 para la respiración aeróbica (Poole y Cook, 2000).

Aquellos microorganismos que supieron adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, aprovechando aquel aceptor de electrones presente que les diera la mayor ventaja energética, son los que han prevalecido en la mayoría de los nichos posibles (Dismukes, 2001). En esta discriminación metabólica, en caso de que varios oxidantes exógenos se encuentren disponibles, será preferentemente usado aquel con mayor potencial rédox.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Para esto, las bacterias facultativas han desarrollado mecanismos moleculares que aseguran la elección, tanto del mejor aceptor exógeno de electrones como de la fuente de carbono y energía más reducida. Un ejemplo de este tipo de microorganismos, es nuestro modelo de estudio, *E. coli*.

1.1.1 *Escherichia coli*, una Bacteria Facultativa

E. coli es una enterobacteria anaeróbica facultativa, en forma de bacilo y con mecanismos de motilidad, que forma parte de la flora intestinal. Su tiempo de replicación es de 20 min y es uno de los modelos más estudiados en bacterias, de hecho, gran parte de la genética molecular se ha desarrollado utilizando a *E. coli* como modelo.

Algunas cepas patógenas producen entero-toxinas. Igualmente pueden causar diarrea del viajero (cepa O157:H7), o infecciones del tracto urinario. La vía de transmisión es fecal u oral y se considera un causante oportunista de enfermedades.

De acuerdo a la disponibilidad de aceptores de electrones, *E. coli* puede seguir el metabolismo de respiración aeróbica (en presencia de O_2), respiración anaeróbica (utilizando aceptores de electrones diferentes a O_2) o por medio de la fermentación (en ausencia de aceptores de electrones). Al igual que otras bacterias, tales como *Salmonella typhimurium*, o *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* utiliza aceptores de electrones tales como (de menor a mayor potencial rédox): fumarato, N- óxido trimetilamina, dimetilsulfóxido, NO_2 , NO_3 u O_2 (Tabla 1; Lin e Iuchi, 1991).

1.1.2 Sistemas Respiratorios

Aunque la función primaria de la cadena respiratoria es la generación de la fuerza protón motriz, la cual es utilizada para la síntesis de ATP, la cadena respiratoria también es necesaria para reciclar NAD^+ a partir de NADH, eliminando el exceso de equivalentes reductores, muy importante bajo condiciones de crecimiento tales como glucólisis. Bajo ciertas condiciones de crecimiento, el sistema respiratorio puede ser importante para reducir el nivel basal de O_2 intracelular, protegiendo a enzimas sensibles al O_2 . Bajo estas condiciones, la tasa respiratoria puede ser más importante para la supervivencia celular, que la eficiencia del acoplamiento con la traslocación de protones (Contreras, 2000).

Así, en la respiración aeróbica se consume O_2 y se genera la fuerza protón motriz (Δp) a través de una membrana protón-impermeable (Poole y Cook, 2000). Los componentes de la cadena respiratoria están asociados asimétricamente a la membrana. En las bacterias Gram negativas, como *E. coli* esta asimetría permite a los eventos de transferencia de electrones, acumular el consumo neto de protones en el compartimiento citoplásmico y su liberación neta en el compartimiento extra-citoplásmico (Poole y Cook, 2000).

E. coli puede adaptar su cadena respiratoria para utilizarla con diferentes aceptores de electrones. En presencia de O₂, lo utiliza como aceptor de electrones (E°=+820 mV) y transforma sustratos como la glucosa hasta CO₂ por vías metabólicas que incluyen el ciclo de Krebs. Los electrones producidos en esta transformación son donados a la cadena de transporte de electrones que contiene quinonas, citocromos tipo *b* y una citocromo oxidasa ya sea citocromo *bo'* oxidasa o citocromo *bd'* oxidasa (Contreras, 2000). Las citocromo oxidasas se expresan dependiendo de la tensión de O₂ presente.

Quinol oxidasa	Km ^{O₂} (nM)	Condición en que se expresa
<i>bo'</i>	100	Aerobiosis; baja afinidad por O ₂ , pero una alta velocidad para consumirlo cuando es abundante
<i>bd'</i>	20	Microaerobiosis, afinidad por el O ₂ cien veces mayor que la <i>bo'</i> .

Tabla 1. Características de las citocromos oxidasas presentes en *E. coli* de acuerdo a la tensión de O₂ presente (D'mello *et al.*, 1995).

Mientras que la respiración aeróbica se da en tensiones de O₂ mayores a 5 mbar (5 μM O₂), la respiración anaeróbica ocurre en tensiones de O₂ entre 1–5 mbar (en la presencia de otros aceptores de electrones), y la fermentación se inicia a tensiones de O₂ menores a 1 mbar (Sawers, 1999).

El citocromo *bd'* se induce bajo condiciones de crecimiento desfavorables. Mutantes defectivas en este citocromo son sensibles al H₂O₂, a temperatura y a factores que excretan al medio, inhibiendo su crecimiento (Poole y Cook, 2000).

En la cadena respiratoria, los electrones son transferidos a la ubiquinona (UQ), posteriormente son dirigidos a una de las oxidasas más abundantes: citocromos *bo'* y *bd'*. Los electrones que van a ser transferidos a otras oxidasas terminales diferentes a las usadas con O₂, son transferidos a la menaquinona (MQ), y dirigidos entonces a una de las reductasas terminales más abundantes (Fig. 1). Como resultado de estas reacciones de transferencia de electrones, los protones son translocados afuera del citoplasma, generando la fuerza protón motriz (Δp; Poole y Cook, 2000).

Los genes conocidos como *cyxAB*, *appCB* y *cbdAB*, son parte de un operón en el min 22 del cromosoma de *E. coli* (*cyxAB appA*). El gene *appA* codifica para una fosfatasa ácida, mientras que *cyxAB* tiene una clara homología con el operón *cydAB*, que codifica dos subunidades del citocromo *bd'*. Los genes *cyxAB* se cotranscriben con los genes *appA*, de un promotor río arriba de *cyxA*.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

El gene *cyxA* se activa en condiciones de crecimiento anaeróbico, falta de fosfato, entrada en fase estacionaria y alta osmolaridad. AppY regula al promotor *cyx*. Para más detalles de AppY, ver sección 2.3. Las proteínas codificadoras de *cyxAB*, deben ser llamadas citocromo *bd-II*, pues tienen una función respiratoria (Atlung *et al.*, 1989).

En anaerobiosis, *E. coli* puede producir al menos cinco diferentes terminales donde el aceptor de electrones puede ser NO_3^- , NO_2^- , N-óxido trimetilamina (TMAO), dimetilsulfóxido (DMSO) ó fumarato (Fig. 1). Es necesaria la acción cooperativa de varios reguladores globales para asegurar la elección de la respiración anaeróbica sobre las vías fermentativas y la preferencia de la respiración con NO_3^- sobre las otras vías respiratorias anaeróbicas (Tabla 2).

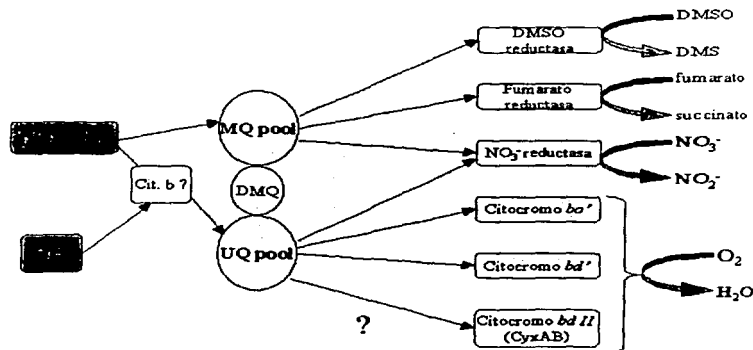


Fig. 1. La cadena respiratoria de *E. coli* es un paradigma para los sistemas de transporte de electrones de las bacterias facultativas. Las deshidrogenasas transfieren electrones de varios donadores de electrones (que pueden ser NADH, succinato, malato, lactato, hidrógeno, etc) al pool de quinonas (Q). Hay evidencia del papel intermediario de los citocromos *b*. Los electrones de la ubiquinona (UQ) van a las oxidasas terminales que utilizan O_2 o N_2 como último aceptor de electrones, mientras que los electrones de la menaquinona (MQ) son tomados por las reductasas que utilizan aceptores de electrones anaeróbicos. La dimetilquinona (DMQ) no es importante como un mediador del flujo de electrones, pero es un intermediario biosintético con baja afinidad en la respiración. El O_2 es reducido a H_2O vía los dos citocromos complejos oxidasas más abundantes: citocromos *bo'* y *bd'*. Una tercera oxidasa (*bd-II*) es similar a este último. Se muestran sólo dos de las otras muchas reductasas anaeróbicas que reducen, respectivamente dimetilsulfóxido (DMSO) a dimetilsulfido (DMS), y fumarato a succinato. NADH puede ser oxidado también por dos vías solubles de la transferencia de electrones del O_2 , uno de los que involucra a la flavohemoglobina Hmp (Fig. tomada de Poole y Cook, 2000).

Reacción	E° (mV)
Oxígeno/ Agua	820
Nitrato/ Nitrito	430
Nitrito/ Óxido nítrico	374
DMSO/ DMS	160
Trimetilamina N-óxido	130
Fumarato/ Succinato	30
Pinurato/ Lactato	-190

Tabla 2. Potenciales rédox estándar de los aceptores de electrones utilizados en *E. coli*. La célula prefiere usar al aceptor con mayor potencial rédox (Lin e Iuchi 1991).

1.2 Mecanismos de Regulación Genética en la Respiración Aeróbica y Anaeróbica

Las bacterias han desarrollado complejos mecanismos de transducción de señales que responden tanto al O₂ *per se* como a los diversos radicales que se liberan de éste en el metabolismo celular (Lin e Iuchi, 1991; Guest *et al.*, 1996). *Escherichia coli* elige la vía metabólica mas viable para la obtención de energía principalmente a través de los sistemas globales de regulación Arc y Fnr, los reguladores AppY, CitB/A, y las proteínas Aer, Dos, y Hmp.

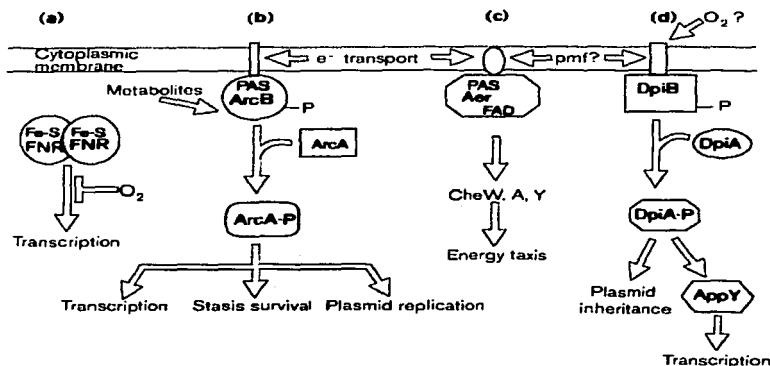
Tanto Fnr como ArcA son factores transcripcionales que activan ó reprimen genes al unirse a secuencias específicas en el DNA, en respuesta a la disponibilidad de O₂ (Sawers, 1999). Fnr es un regulador transcripcional que controla la expresión de la mayoría de los genes que participan en la obtención anaeróbica de energía. El sistema ArcA/B en *Escherichia coli* es un sistema de transducción de señales de dos componentes que detecta condiciones rédox de crecimiento aeróbico.

Ambos sistemas funcionan independientemente sobre varios genes y operones, traslapándose entre sí. Forman así una red de control que le permite a la bacteria responder rápida y eficientemente a los cambios en la concentración de O₂ (Sawers, 1999).

1.2.1 Control Respiratorio Aeróbico: Sistema ArcA/B

El regulón ArcB/ArcA es un sistema de dos componentes que comprende más de 30 operones, la mayor parte de la regulación involucra la represión anaeróbica de genes que codifican enzimas involucradas en la respiración aeróbica (Sawers 1999).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*



Current Opinion in Microbiology

2. Vías sensoras redox y de O_2 en metabolismo anaeróbico en *E. coli*. (a) Fnr interactúa directamente con O_2 . En ausencia de O_2 , Fnr está activo. (b) ArcB es una histidina-cinasa de membrana que monitorea cambios redox en el estado de transportadores de electrones tipo quinonas, es alterada también por metabolitos. ArcB controla el estado de fosforilación y actividad de ArcA. (c) Aer es una flavoproteína involucrada en aerotaxis (movimiento de la célula hacia el O_2) que responde a cambios en los niveles energéticos intracelulares siendo blanco de la cadena de transporte de electrones y de la fuerza protón motriz (estado redox celular). Actúa a través del sistema de quimiotaxis CheY, CheA y CheW, guiando a *E. coli* a ambientes donde se dispone de la mayor energía para crecer. (Rebbapragada *et al.*, 1997) (d) El sistema de dos componentes DpiB/DpiA regula la expresión del gene *appY* en respuesta al O_2 . Se indica la presencia del dominio PAS y los cúmulos hierro azufre se representan por Fe-S y la flavin-adenin-dinucleótido por FAD (Figura tomada de Sawers, 1999).

La transmisión de señales ocurre vía una cascada de fosforilación entre His-Asp-His-Asp de la proteína sensora (histidina-cinasa) ArcB al regulador de respuesta ArcA (Fig. 3), dando lugar a la regulación transcripcional de cerca de 30 operones. ArcA forforilado reprime así varios genes involucrados en el transporte de electrones, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la desviación a glioxalato. Además, activa genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo fermentativo. A diferencia de Fnr, ArcB no percibe el O_2 directamente; la oxidación de los acarreadores de electrones tipo quinona actúan como señales negativas directas que inhiben la autofosforilación de ArcB aeróbicamente (Georgellis *et al.*, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

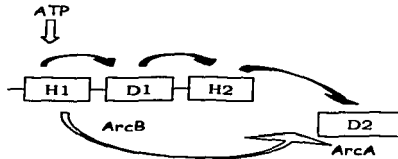


Fig. 3. Modelo para la señal de transducción por el sistema Arc. Las flechas indican la dirección de la transferencia del grupo fosfato y el grosor de las flechas indica las actividades relativas de cada alternativa, condiciones observadas *in vitro* (Fig. tomada de Georgellis *et al.*, 1997).

ArcB es un regulador de respuesta de 77kDa que pertenece al grupo de sensores histidina-cinasas que tienen tanto dominios transmisores como receptores (Georgellis *et al.*, 1997). ArcB cuenta con un dominio transmisor ortodoxo H1; un dominio receptor central D1, similar al dominio receptor D2 de la proteína ArcA, su COOH-terminal contiene al dominio H2, un dominio histidina fosfotransmisor (HPT) con actividad de auto fosforilación. ArcB tiene señalización dual (Fig. 3). Parece ser que el dominio transmisor ortodoxo D1, percibe el estatus metabólico de la célula, mientras que el dominio HPT siente cambios redox (Matsushika y Mizuno, 1998). ArcB parece tener también alguna relación con la proteína sensora de aerotaxis, Aer (Sawers, 1999; Fig. 2).

ArcA es un regulador de respuesta con un típico dominio receptor amino-terminal y un efector COOH-terminal que contiene un motivo de unión a DNA hélice-vuelta-hélice (HTH). El sistema Arc responde a cambios en la tensión de O₂.

1.2.2 Regulación de la Reducción del Fumarato y Nitrato: Fnr

Fnr, codificado por el gene *fnr*, es un regulador global responsable del control de la regulación del cambio entre el metabolismo aeróbico y el anaeróbico. Fnr regula cerca de 120 genes en *E. coli*. La mayor parte del modulón de Fnr sirve para optimizar la generación de energía anaeróbica (Guest *et al.*, 1996). Fnr es la proteína responsable de la inducción de genes de metabolismo anaeróbico además de reprimir varias enzimas de respiración aeróbica (Sawers, 1999).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

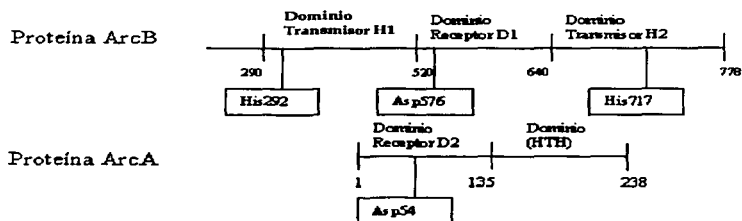


Fig. 4. Representaciones esquemáticas de ArcB y ArcA. Arriba: H1 (dominio transmisor ortodoxo con la His292). Se muestra D1 (dominio receptor) con Asp576, y H2 (segundo dominio transmisor) con la His717. Abajo: Se muestra ArcA con su dominio receptor NH₂-terminal con el Asp54 y su dominio COOH-terminal hélice-vuelta-hélice (HTH; Fig. adaptada de Georgellis *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que Fnr percibe el O₂ directamente a través de un centro hierro-azufre sensible al balance redox presente en la proteína. Se ha demostrado con diversas técnicas espectroscópicas tales como Mössbauer, UV/visible y EPR, que ante la exposición a niveles estequiométricos de O₂, los dos centros de hierro-azufre ([4Fe-4S]²⁺) en la proteína dimerica Fnr, se convierten en centros ([2Fe-2S]²⁺). La actividad de unión al DNA está asociada con la forma [4Fe-4S]²⁺ (Sawers 1999). El cambio conformacional de [4Fe-4S]²⁺ a [2Fe-2S]²⁺ explica la interconversión de Fnr entre su forma transcripcionalmente activa e inactiva, regulando la actividad de genes del metabolismo de *E. coli* (Sawers, 1999).

La secuencia de *fnr* es muy similar al gene *crp* que codifica para Crp ó proteína activadora de funciones catabólicas. Todos los elementos estructurales de Crp se observan en Fnr, incluso el motivo hélice-vuelta-hélice (HTH) en el dominio de unión al DNA, la serie de hebras β en el dominio de unión a nucleótidos y la gran hélice en la interfase del dímero (Guest *et al.*, 1996).

FNR

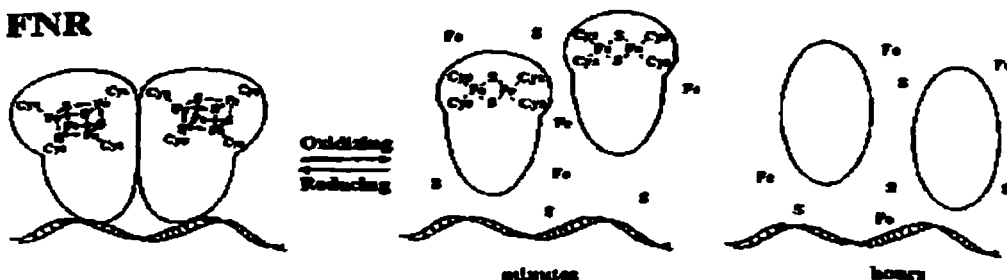


Fig. 5. Modelo para el control del regulador Fnr en respuesta a cambios redox. (Fig. tomada de Bauer *et al.*, 1999).

Entre las diferencias, Fnr es monomérico mientras Crp forma dímeros, los residuos aminoacídicos con los que Crp interactúa con AMP cíclico no están conservados, ni tampoco un grupo de residuos en la superficie expuesta del lazo β_9 - β_{10} de Crp que hace contacto activo con la RNA polimerasa, aunque su papel puede ser adoptado por los residuos del lazo β_3 - β_4 en Fnr. Fnr tiene una extensión NH_2 -terminal rica en cisteínas y está asociado con una cantidad variable de hierro, que las utiliza como ligantes (Bauer *et al.*, 1999). Los 22 pares de bases del sitio-Fnr consenso incluyen secuencias palindrómicas ($-\text{TTGAT}-\text{ATCAA}-$), que tiene un **TTGA** en lugar del motivo **GTGA** del sitio análogo consenso de Crp (Bauer *et al.*, 1999).

Hay dos modelos para el modo de acción de Fnr. La activación anaeróbica puede involucrar la conversión de Fnr a la forma transcripcionalmente activa por: a) ensamblaje del hierro ferroso que contiene el cofactor, o b) reducción del enlace cisteína-cofactor hierro férrico. Estudios recientes sugieren que la forma funcional de Fnr puede contener hasta 2 conglomerados reducidos (4Fe-4S) por cada dímico. Así, el cambio de regulación anaeróbica debe estar mediado por un incremento significativo en la afinidad de unión a DNA, que acompaña la reducción o ensamblaje del conglomerado (Guest *et al.*, 1996).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

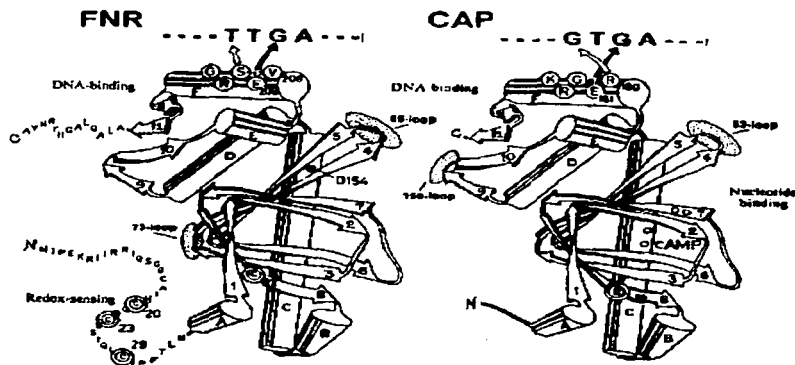


Fig. 6. Modelos de la estructura para el monómero de Fnr, basado en la estructura de Crp. El dominio de unión a DNA contiene el motivo hélice-vuelta-hélice, el dominio alostérico o de unión a nucleótidos contiene una serie de hebras beta antiparalelas y la interfase del dímero, y el dominio sensor-redox de Fnr contiene 4 residuos esenciales de cisteína, como se indica. Se muestran los sitios medios de Fnr y Crp con el centro consenso, así como las interacciones conservadas (flechas llenas) y discriminatorias (flechas vacías). También se muestra el sitio de la sustitución D154A en la proteína Fnr y las vueltas que hacen contacto con la RNA Polimerasa durante la activación transcripcional. (Fig. tomada de Guest *et al.*, 1996).

1.2.3 Activador Transcripcional de Anaerobiosis: AppY

AppY (codificado por el gene *appY* en el min 13) es un regulador global implicado en la respiración de *E. coli* en ausencia de O₂. El producto de *appY* es una cadena polipeptídica de 243 aminoácidos que se expresa débilmente. AppY tiene un fragmento de 20 aminoácidos que muestra una gran similitud con el dominio de unión al DNA de activadores y represores transcripcionales (Sawers, 1999).

AppY también regula al promotor *cyx*, tal que una mutación en *appY*, elimina o reduce la respuesta de *Cyx* a falta de fóstato, entrada a fase estacionaria y alta osmolaridad (Poole y Cook, 2000).

El gene *appY* es regulado por RpoS, Fnr y ArcA, lo que sugiere una regulación compleja en respuesta a diversos estreses ambientales. Se ha demostrado recientemente, que *appY* es regulado también en respuesta al O₂, a través de un nuevo sistema de dos componentes: CitB/CitA. Parece ser que este sistema previene la expresión de *appY* cuando hay O₂ disponible, lo que concuerda con el hecho de que el citocromo *bd'* es reprimido normalmente en anaerobiosis (Poole y Cook, 2000; Altung *et al.*, 1989).

1.2.4 Activador de la Citrato Liasa: CitB/A (DpiA/B)

CitB/A es un sistema regulador de dos componentes. CitB (DpiA) se identificó inicialmente en una búsqueda de genes que al sobre-expresarse, desestabilizaban la herencia del plásmido pSC101 (Ingmer *et al.*, 1998). Además de su efecto en la herencia de plásmidos, bajo condiciones aeróbicas, CitB inhibe la expresión del gene *appY*, que codifica para un regulador transcripcional involucrado en el metabolismo anaeróbico. Así, la síntesis de AppY, y de la hidrogenasa-1 son reguladas en respuesta al O₂ por CitB (Sawers, 1999).

Directamente río arriba del gene *citB* está el gene *citA*. CitA es una histidina-cinasa, que tiene una secuencia del extremo NH₂-terminal idéntica a CitA de *Klebsiella pneumoniae*. CitA activa la expresión de la vía de la citrato liasa en respuesta a anaerobiosis, presencia de citrato e iones Na⁺. CitA es la histidina-cinasa cognada de CitB, completando así la cascada reguladora. El sistema CitA/B está activo aeróbicamente, donde su función es prevenir la expresión del gene *appY* (Sawers, 1999; Kaspar y Bott, 2002).

1.2.5 Sistema de Aerotaxis: Aer

Se ha demostrado que para llevar a cabo la aerotaxis (movimiento de las células hacia o en contra de un gradiente de O₂) se requiere una cadena transportadora de electrones funcional. La proteína Aer es un sensor transductor de señales que responde a gradientes de O₂ en *Escherichia coli*. Tiene un dominio NH₂-terminal homólogo a un segmento de la proteína NifL; NifL es una flavoproteína reguladora en la fijación de N₂ de *Azotobacter vinelandii* que responde a O₂ y modula la actividad transcripcional de la proteína NifA. Tanto Aer como NifL poseen un dominio PAS que comprende una superfamilia de sensores de luz, O₂ y potenciales redox, presentes en las tres divisiones de vida celular: arquea, bacterias y eucariontes. Mediante el dominio NH₂-terminal, Aer posee la capacidad de unión a FAD (dinucleótido de flavin adenina) lo que le confiere un posible mecanismo de detección en cambios redox. El dominio COOH-terminal de Aer es similar a las proteínas metil-aceptoras de quimiotaxis que forman complejos ternarios con CheA y CheW para el control flagelar.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

1.2.6 Direct Oxygen Sensor: DOS

La proteína Dos de *Escherichia coli*, se identificó inicialmente por su alta homología con el dominio PAS de FixL de *Rhizobium meliloti*. Dos es un dímero que posee un grupo hemo por cada monómero de acuerdo al estudio de la proteína purificada, tiene una baja constante de disociación del O₂. A diferencia de la proteína FixL de *Rhizobium meliloti* que está asociada a una actividad de histidina-cinasa, Dos se encuentra asociada a un dominio de fosfodiesterasa (Delgado-Nixon *et al.*, 2000). Evidencia Bioquímica indica que es un sensor de O₂, sin embargo su función es aún desconocida.

1.2.7 La Flavohemoglobina Hmp

En *Escherichia coli* se identificó a la flavohemoglobina Hmp (codificada por el gene *hmp*). Hmp tiene un dominio hemo NH₂-terminal y un dominio flavin COOH-terminal (Vasudevan *et al.*, 1991). El nivel de reducción de FAD en Hmp al agregar NADH es dependiente de O₂. En presencia de O₂, FAD está predominantemente oxidado, hasta que la cantidad de O₂ disminuye y los niveles de reducción de FAD se incrementan abruptamente (Poole *et al.*, 1994). El efecto de unión a O₂ mantiene completamente oxidado a FAD, desviando el flujo de electrones del grupo flavin al grupo hemo o bien causando cambios conformacionales. Estos datos sugieren que Hmp podría servir para acoplar la presencia de O₂ a una reacción de óxido-reducción y servir como un sensor de O₂, sin embargo el estudio de esta proteína muestra que actúa principalmente en respuesta al estrés oxidativo por óxido nítrico (Membrillo-Hernández, 1996).

1.3 Fermentación

La fermentación fue originalmente descrita por Pasteur como "la vie sans air". Se conoce así a todas las vías metabólicas en las que el crecimiento ocurre sin ningún aceptor exógeno de electrones. Las reacciones de fermentación ocurren principalmente en el citoplasma, y el ATP se produce al nivel de la fosforilación del sustrato (Bock y Sawers, 1996).

Un ejemplo de fermentación, se da en la oxidación de hexosas, tales como glucosa a piruvato por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. Esta oxidación genera dos moléculas de NADH. Para mantener el flujo glicolítico, debe regenerarse NAD⁺, lo que se logra en la fermentación por la deposición de equivalentes reductores en intermedios metabólicos parcialmente oxidados, que son excretados por la célula (Bock y Sawers, 1996).

1.3.1 Fermentación en otras Bacterias

Las enterobacterias han evolucionado vías fermentativas no tan comunes como las seguidas por *E. coli* o *S. typhimurium*. Especies como *Klebsiella* y *Citrobacter* son capaces de fermentar glicerol, mientras que *Enterobacter* y *Klesiella ssp.* producen 2,3- butanediol (White, 1995).

Los tipos de fermentación conocidos son los siguientes:

- Fermentación de Propionato, utilizando la Vía del Acrilato. Llevada a cabo por el género *Clostridium*, un grupo de bacterias gram positivas, anaeróbicas, formadoras de esporas que no pueden usar al sulfato como aceptor final de electrones.
- Fermentación de Propionato, utilizando la Vía de Succinato- Propionato. Produce más ATP que la vía anterior. Vía utilizada por *Propionibacterium*, bacterias gram positivas, anaeróbicas, no esporuladoras, inmóviles, barras pleomórficas que son parte de la flora normal de los estómagos de los rumiantes, de la piel humana y de productos como el queso.
- Fermentación de Acetato (Acetogénesis). Algunas bacterias tales como *Clostridium thermoaceticum* o *Desulfotomaculum thermobenzoicum*, que en ausencia de sulfato utilizan al CO₂ como aceptor de electrones y lo reducen a acetato utilizando la vía de la Acetil-CoA.
- Fermentación de Lactato. La llevan a cabo un grupo heterogéneo de bacterias anaeróbicas aerotolerantes. Incluye los géneros *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Bifidobacterium*. Hay dos tipos de fermentación láctica: Homofermentativa (que sigue la vía de glicólisis) y Heterofermentativa (que sigue la vía de las pentosas-fosfato.)
- Fermentación de Butirato. Es llevada a cabo por clostridia, un grupo heterogéneo de bacterias anaeróbicas, esporulantes, que pueden aislarse de lodo, heces, y otros medios anaeróbicos.
- Fermentación tipo *Ruminococcus albus*. Es una bacteria que se encuentra en el rumen, puede fermentar glucosa a etanol, acetato, H₂, y CO₂. Ilustra el caso en que el crecimiento de poblaciones de bacterias heteroespecies afecta los productos finales de la fermentación.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

- Fermentación de Mezcla de Ácidos y de Butanediol. Las bacterias entéricas son facultativas anaeróbicas. La mezcla de ácidos pertenece a los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, y *Shigella*. Las tres pueden ser patógenas, al causar infecciones intestinales.

1.3.2 Fermentación en *E. coli*

E. coli lleva a cabo una vía fermentativa donde se produce una mezcla de ácidos, tales como D-lactato, etanol, acetato, formiato ($H_2 + CO_2$) y succinato. Estos productos tienen diferentes estados de oxidación. De acuerdo a la fuente de carbono inicial (ya sean hexitales, ácidos hexónicos o hexurónicos), *E. coli* modula su metabolismo, ajustando la proporción de cada compuesto producido. Es evidente la considerable flexibilidad celular con la que cuenta *E. coli* para resolver su equilibrio rédox (Bock y Sawers, 1996).

En tanto más reducida sea la fuente de carbono disponible (glucosa o glucitol), *E. coli* excretará productos de fermentación más reducidos, tales como etanol y succinato. Por el contrario, mientras más oxidada sea la fuente de carbono (gluconato o gluconato), se producirán menos equivalentes reductores (NADH; Bock y Sawers, 1996).

1.3.3 Enzimas de la Fermentación y su Regulación

- La *D-Lactato deshidrogenasa NAD-dependiente* (D-LDH) (EC 1.1.1.28)

La enzima citoplásmica LDH (codificada por *ldhA* en el min 30.5) cataliza la reacción de piruvato a D-lactato acoplado a la oxidación del NADH producido en la glicólisis (número 4 Fig. 7). La enzima se induce 10 veces en condiciones anaeróbicas a pH ácido y es extremadamente sensible a la oxidación (Lin e Iuchi, 1991). Hay otras LDHs en *E. coli*, sin embargo, éstas son flavoproteínas unidas a membrana que se acoplan a la cadena respiratoria, y son descritas mejor como lactato oxidasas.

Al igual que *adhE*, el gene *ldhA* no es regulado por Fnr; sin embargo su expresión se ve afectada por el sistema *ArcA/B* y por varios genes involucrados en el control del metabolismo de carbohidratos, incluyendo *Mlc*. *Mlc* actúa como un represor de varios operones que codifican proteínas del sistema Fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-dependiente (PTS), incluyendo a *ptsHI*, *ptsG* y *manXYZ* así como genes involucrados en el metabolismo de ciertas azúcares no-PTS, como la maltosa (Jiang *et al.*, 2001).

VÍAS FERMENTATIVAS DE *E. coli*: FERMENTACIÓN DE MEZCLA DE ÁCIDOS

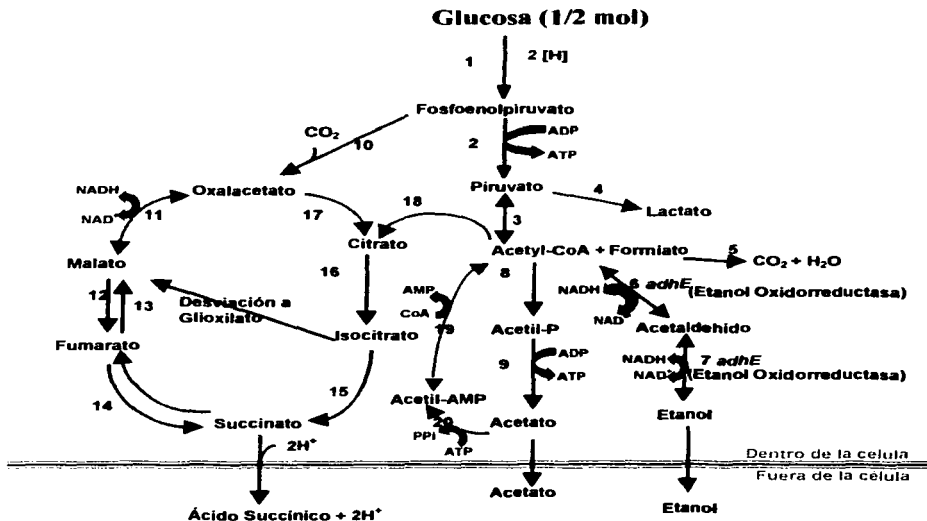


Fig. 7. Esquema de la fermentación de mezcla de ácidos. 1)Enzimas de la Glucólisis 2)Piruvato cinasa 3)Piruvato formiato liasa (*pf*) 4)Lactato deshidrogenasa (*ldh*) 5)Formiato-hidrógeno liasa (*fdhF*) 6)Alcohol oxidorreductasa (*adhE*) 7)Alcohol oxidorreductasa (*adhE*) 8)Fosfotransacetilasa (*pta*) 9)Acetato cinasa (*ackK*) 10)Fosfoenolpiruvato carboxilasa 11)Malato Deshidrogenasa (*mah*) 12)Fumarasa B (*fumB*) 13)Fumarasa A (*fumA*) 14)Fumarato reductasa (*frd*) 15)Succinato deshidrogenasa (*sdh*) 16)Citrato isomerasa 17) 18) 19)Acetil-CoA sintetasa (*ackA*) 20)Acetil CoA sintetasa (*acs*)

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

- La *Piruvato formiato liasa* (PFL) (EC 2.3.1.54)

PFL (codificada por *pfl*, min 20 es responsable de la conversión anaeróbica de piruvato a acetil-CoA y formiato. Representa el primer paso de la formación de los productos finales de la fermentación de mezcla de ácidos (número 3 Fig. 7). La síntesis de la enzima se incrementa considerablemente en anaerobiosis y en presencia de piruvato. Su expresión anaeróbica se reprime por NO₃⁻, debido a la acción de la proteína NarL (Lin e Iuchi, 1991).

Es regulada post-traduccionalmente de forma reversible entre sus formas activa e inactiva. La exposición a O₂ resulta en una inactivación irreversible debido al corte del enlace peptídico entre N-C α de la glicina⁷³⁴. Esta reacción es catalizada por AdhE (PFL deactivasa), a potenciales redox mayores a +100 mV (Kessler *et al.*, 1991; Kessler *et al.*, 1992).

YfiD, una proteína de 14 kDa con una gran similitud de secuencia con la región COOH-terminal de PFL, es un acarreador del radical glicilo. YfiD reemplaza el dominio COOH-terminal, dando lugar a un complejo enzimático donde el cofactor radical glicilo y el sitio catalítico están localizados en diferentes subunidades. Se ha especulado que YfiD evolucionó para ser utilizado para una rápida recuperación de la actividad PFL (para la generación de ATP) en células que hayan experimentado estrés oxidativo (Wagner *et al.*, 2001).

- La *Formiato hidrógeno-liasa* (El complejo *Formiato deshidrogenasa H-hidrogenasa 3*) (EC 1.2.1.2 y EC 1.12.1.2)

Este complejo enzimático membranar cataliza la descomposición del formiato a CO₂ + H₂. La *Formiato deshidrogenasa* (codificada por *fdhF* en el min 92) es un polipéptido que contiene una selenocisteína (número 5 Fig. 7). Se cree que las demás subunidades están codificadas por el operón *hyc* en la región del min 58-59. Tiene regulación post-traduccionar, pues el operón *hypABCDE* es necesario para la maduración de las tres isozimas hidrogenasas. La actividad del complejo disminuye notablemente en crecimiento aeróbico (Lin e Iuchi, 1991), y es responsable de la vigorosa formación de gas durante la fermentación de mezcla de ácidos (Stewart, 1988).

- Las *Hidrogenasas 1 y 2* (EC 1.12.1.2 y EC 1.18.99.1)

Estas dos isozimas membranales —al igual que la hidrogenasa 3— tienen un centro Ni/Fe, funcionan anaeróbicamente, y requieren iones níquel para su actividad. Se cree que la función de la *Hidrogenasa 1* (codificada por *hyaAB* en el min 21) está en el ciclo de protones; utiliza H₂ producido por la *Formiato hidrógeno liasa* para reducir metabolitos endógenos. Es inducida por formiato.

La Hidrogenasa 2 cataliza reacciones que involucran H₂ exógeno para la reducción de fumarato como aceptor exógeno de electrones. Es inducida por glicerol + fumarato o H₂ + fumarato. La expresión de ambas enzimas depende de Fnr y son reprimidas anaeróbicamente por NO₃⁻ (Lin e Iuchi, 1991).

- *Fosfoenolpiruvato Carboxilasa, Malato Deshidrogenasa, Fumarasa B, y Fumarato Reductasa* (EC 4.1.1.31, EC 1.1.99.16, EC 4.2.1.2 y EC 1.3.99.1)

El CO₂ se une a la fosfoenolpiruvato por la subunidad con actividad de carboxilasa (codificada por *ppc* en el min 89; número 10 Fig. 7). El oxalacetato formado se reduce a malato por la malato deshidrogenasa (codificada por *mdh* en el min 70.6; número 11 Fig.7). El malato es deshidratado a fumarato por la fumarasa B, (codificada por *fumB* en el min 93.5; número 12 Fig. 7), y el fumarato es reducido, finalmente, a succinato por la fumarato reductasa (codificada por *frd* en el min 94.4; número 14 Fig. 7). La ganancia neta es 4 equivalentes reductores. Los genes *fumB* y *frd* son inducidos anaeróbicamente por Fnr en el cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas (Lin e Iuchi, 1991).

- *Fosfotransacetilasa, acetato cinasa, y Alcohol oxidorreductasa* (EC 2.3.1.8, EC 2.7.2.1 y EC 1.1.1.1)

La Acetil-CoA que se produce de piruvato puede usarse para generar ATP a partir de ADP por conversión a acetato, ó para disponer de los equivalentes reducidos extras por la conversión de etanol (Lin e Iuchi, 1991).

El primer proceso depende de la acción consecutiva de la Fosfotransacetilasa (codificada por *pta* en el min 50; número 8 Fig. 7) y acetato cinasa (codificada por *ackA* en el mismo min 50; número 9 Fig. 7). Se produce un intermediario inestable de alta energía, acetil-fosfato. Ambas reacciones enzimáticas son reversibles y tienen un papel catabólico crítico en la fermentación de la mezcla de ácidos. Las células utilizan esta vía de baja afinidad para activar altas concentraciones de acetato (Kumari *et al.*, 2000). Ambas enzimas están presentes en cultivos aeróbicos, donde probablemente median la asimilación del acetato (Stewart, 1988).

El segundo proceso involucra la reducción consecutiva del grupo acetyl de acetyl-CoA a acetaldehído, y de acetaldehído a etanol a expensas de NADH. La reacción es catalizada por un solo polipéptido codificado por el gene *adhE* en el min 27.9 (número 6, 7 Fig. 7). La cercanía de los dos sitios de reducción minimiza el escape del acetaldehído, que es químicamente reactivo. La Alcohol oxidorreductasa es reprimida anaeróbicamente por NO₃⁻. (Lin e Iuchi, 1991).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

- **Acetil-CoA Sintetasa (EC 6.2.1.1)**

Cuando se inicia la transición a fase estacionaria, las células activan un cambio metabólico. En vez de excretar acetato, lo reabsorben, activándolo a acetil-CoA a través de la acción de Acetil-CoA Sintetasa (codificada por *acs*; número 20 Fig. 7). Ésta produce el intermediario acetiladenilato que se une a la enzima: Acetil-AMP (Kumari *et al.*, 2000).

La célula utiliza Acetil-CoA para generar energía y componentes biosintéticos a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la desviación a glioxilato, respectivamente. (Kumari *et al.*, 2000). La transcripción de *acs* ocurre en función a la actividad de σ^{70} , aumento en los niveles de cAMP (en función directa a Crp), menor presión parcial de O₂ y el flujo de carbono a través de vías asociadas a acetato (Kumari *et al.*, 2000).

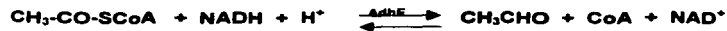
1.3.4 Alcohol Oxidorreductasa (EC 1.1.1.1)

El gene *adhE* de *E. coli*, localizado en su cromosoma en el min 27.9, codifica para la Etanol oxidorreductasa bifuncional NAD-dependiente, y es responsable de la conversión de acetil coenzima-A a etanol durante el crecimiento fermentativo. Esta proteína funciona también como deactivasa de la Piruvato formiato liasa. (Lin e Iuchi, 1991).

La expresión de la etanol oxidorreductasa es regulada a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. La expresión de *adhE* es cerca de 10 veces mayor durante crecimiento anaeróbico que durante crecimiento aeróbico (Lin e Iuchi, 1991).

1.4 AdhE, Alcohol Oxidorreductasa

Durante crecimiento anaeróbico y en ausencia de aceptores externos de electrones, la bacteria Gram negativa facultativa *E. coli* lleva a cabo el proceso fermentativo como generador de energía. En la fermentación tiene como productos finales una mezcla de ácidos como el lactato, formiato, acetato, succinato y etanol. Éste último se obtiene a partir de la reducción consecutiva del Acetil coenzima-A (CoA) a Acetaldehído (reacción 1) y de Acetaldehído a Etanol (reacción 2; Membrillo-Hernández, 1999).



Reacción 1



Reacción 2

Ambas reacciones enzimáticas son catalizadas por una misma enzima bifuncional (AdhE) NAD-dependiente, codificada por el gene *adhE* que se localiza en el min 27.9 del cromosoma de *E. coli*. Esta reducción es esencial para la disposición del exceso de equivalentes reductores cuando las vías respiratorias no logran mantener el balance redox (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999). Así, una mutante en *adhE* no puede crecer en glucosa en ausencia de un aceptor exógeno de electrones, lo que nos demuestra que esta vía es esencial para regenerar NAD⁺ durante el crecimiento fermentativo (Stewart, 1988).

AdhE parece ser el producto evolutivo de una fusión genética. La región NH₂-terminal de esta proteína es muy homóloga a la familia de aldehído: NAD⁺ oxidorreductasas, mientras que la región COOH-terminal es homóloga a la familia de los alcoholes Fe²⁺-dependiente: NAD⁺ oxidorreductasas (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

Recientemente se ha demostrado que la alcohol oxidorreductasa tiene una tercera función, desactivando los radicales libres de la PFL (Piruvato formiato liasa). Tanto las funciones anteriores conocidas de la enzima como esta, están asociadas con el proceso redox y son dependientes de iones hierro y de piridina (un nucleótido). La actividad desactivadora de la PFL también requiere NAD⁺ y CoA (Membrillo-Hernández y Lin, 1999).

1.4.1 Estructura del Gene *adhE*

La región que codifica para AdhE (Alcohol oxidorreductasa) consta de 891 codones. La alcohol deshidrogenasa típica contiene 390 aminoácidos, y las aldehído deshidrogenasas (ADH) conocidas constan de 500 aminoácidos. Por mucho tiempo se consideró que las dos reducciones eran catalizadas por diferentes enzimas, acetaldéhido deshidrogenasa (ACDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH). Sin embargo, diversos análisis bioquímicos y genéticos han demostrado que en *E. coli*, ambas reacciones son catalizadas por un homopolímero bifuncional (EC 1.1.1.1.). Goodlove *et al.* (1989) fueron los primeros en proponer que *adhE* proviene de una fusión genética.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Compuesto	Fórmula	Estado de Oxidación ^b	Equivalentes Reducidos ^c (H) Producidos (+) ó Consumidos(-)
Substratos			
❖ Glucitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	-1.0	+ 6 (H)
❖ Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.0	+ 4 (H)
❖ Ác. Glucónico	C ₆ H ₁₂ O ₇	+1.0	+ 2 (H)
❖ Ác. Glucurónico	C ₆ H ₁₀ O ₇	+2.0	0 (H)
Productos			
❖ Ác. Acético	C ₂ H ₄ O ₂	0.0	0 (H)
❖ Etanol	C ₂ H ₆ O	-2.0	- 8 (H)
❖ Ác. Fórmico	CH ₂ O ₂	+1.0	- 4 (H)
❖ Ác. Láctico	C ₃ H ₆ O ₃	0.0	- 4 (H)
❖ Ác. Succínico ^d	C ₄ H ₆ O ₄	+1.0	- 8 (H)

Tabla 3. Estados de oxidación de componentes de la fermentación en *E. coli*.

^a Tabla obtenida de Bock y Sawers, 1996.

^b En el cálculo del estado de oxidación de un compuesto, se le ha dado al hidrógeno un valor arbitrario de -0.5 y al O₂ se le da un valor de +1.0.

^c Los equivalentes reducidos consumidos están calculados sobre la base de que C₆ producen C₃ + C₃.

^d En este cálculo, se asume que el succinato se forma subsecuentemente a la carboxilación del fosfoenolpiruvato para formar oxaloacetato.

El gene *adhE* es un homopolímero que comprende entre 20 y 60 subunidades. El gene tiene dos sitios probables de inicio transcripcional: uno en -292 y otro en -188 del codón ATG (Membrillo-Hernández y Lin, 1999).

1.4.2 Regulación de la Expresión de *adhE*

Aunque las dos reacciones catalizadas por AdhE son reversibles, *E. coli* no puede crecer en etanol como única fuente de carbono y energía. Esto se debe principalmente a dos razones. La primera, es que el gene *adhE* no se expresa en alta cantidad aeróbicamente. Segundo, la vida media catalítica de la proteína AdhE se ve altamente disminuida durante el metabolismo aeróbico por un proceso conocido como oxidación catalizada por un metal (MCO). En este proceso, la cadena de aminoácidos de AdhE es atacada de forma covalente por los radicales hidroxilos, altamente reactivos y se generan grupos carbonilos. De hecho, AdhE es uno de los mayores blancos de la oxidación de proteínas en *E. coli* (Tamarit *et al.*, 1998; Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

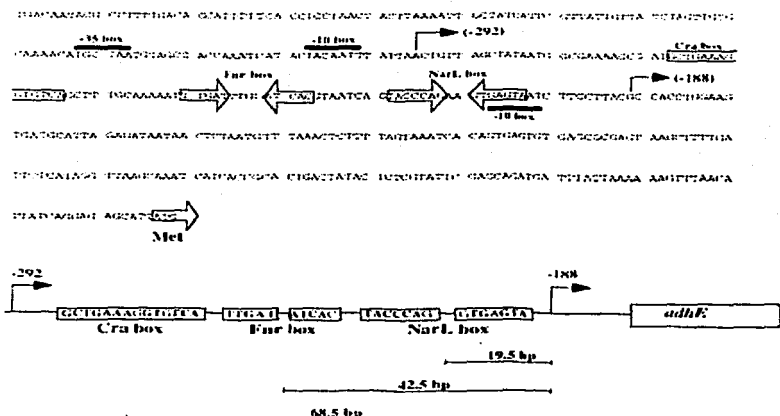


Fig. 8. Secuencia de bases y localización de sitios regulatorios en la región promotora de *adhE*. La distancia entre las probables secuencias regulatorias y el sitio de inicio transcripcional de -188, se indica abajo. (Fig. tomada de Membrillo-Hernández y Lin, 1999).

En la regulación post-transcripcional del gene *adhE* están involucradas al menos dos RNasas: RNasa G, que degrada específicamente el transcrito de *adhE* (Umitsuki *et al.*, 2001), y la RNasa III, que digiere el mRNA cambiando la estructura secundaria de éste y permitiendo su traducción al liberar el sitio de unión al ribosoma (RBS; Aristarkhov *et al.*, 1996). Esto se discutirá más adelante.

1.4.3 Regulación Transcripcional de *adhE*

La actividad transcripcional de *adhE* bajo condiciones anaeróbicas es 10 veces mayor a la observada aeróbicamente. Sin embargo, la regulación de *adhE* es independiente de ArcA/B y de Fnr (Membrillo-Hernández y Lin, 1999). Resultados de dos estudios independientes sugieren que la señal transcripcional que regula la expresión de *adhE* está influenciada por el potencial redox interno de la célula. La relación de equivalentes NADH/NAD⁺ puede ser la señal redox que controle la regulación transcripcional de *adhE* (Chen y Lin, 1991; Leonardo *et al.*, 1996; Membrillo-Hernández y Lin, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

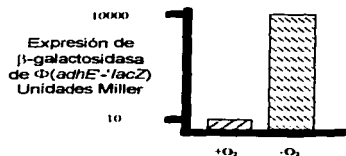


Fig. 9. Relación de la actividad transcripcional del gene *adhE* en aerobiosis y anaerobiosis.

Se han identificado tres proteínas involucradas en la expresión de *adhE*, pero ninguna es directamente responsable de la regulación redox. La primera proteína, NarL, reprime la expresión de *adhE*, pero sólo en presencia de NO₃⁻. La segunda proteína, Cra (catabolite represor activator), reprime la expresión de *adhE*, pero este regulador transcripcional es funcional solamente cuando está acompañado con fructosa-1-fosfato o fructosa-1,6-bisfosfato como efector. La tercera proteína, Fis (factor for inversion stimulation), se necesita para la transcripción de *adhE* – de hecho, *adhE* cuenta con tres sitios potenciales de unión a Fis-, pero no se conoce que Fis requiera ningún efector para su función y la expresión del gene *fis* es independiente de la condición respiratoria de crecimiento *per se* (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999).

A pesar de estos indicios, factores transcripcionales que prevengan la inducción anaeróbica de *adhE* no han sido caracterizados aún.

1.4.3.1 Estudios Utilizando Fusiones Transcripcionales y Traduccionales

Una fusión transcripcional es aquella en la que el promotor de un gene específico está unido a un gene monitor que carece de región promotora, en este caso *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, cuya actividad es muy fácil de medir. Para la construcción de fusiones transcripcionales unimos el promotor del gene en cuestión con el gene *lacZ* incluyendo ambos sitios de unión al ribosoma (RBS). De esta forma, estudiamos la regulación transcripcional, pues el transcrito que se produzca será traducido a partir del RBS de *lacZ*. Así nos aseguramos que la expresión del monitor sea proporcional a la expresión del gene en el ámbito de transcripción. Pudiendo estudiar así el proceso de transcripción de nuestro gene y la regulación a la que se ve sometido (Simons *et al.*, 1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para la construcción y análisis de fusiones genéticas con *lacZ*, utilizamos vectores multicopias, con muy pocos falsos positivos de la expresión de nuestro monitor, *LacZ*. Después de construir el plásmido, transferimos la fusión al DNA cromosomal de la cepa de estudio, usando como vehiculo de entrega al bacteriófago λ RS45 o al bacteriófago λ RZ25. La identificación de las mutantes que hayan adquirido la fusión se verifica en cajas *petri* con un análogo del sustrato del monitor, *LacZ* (X-gal; Simons *et al.*, 1987).

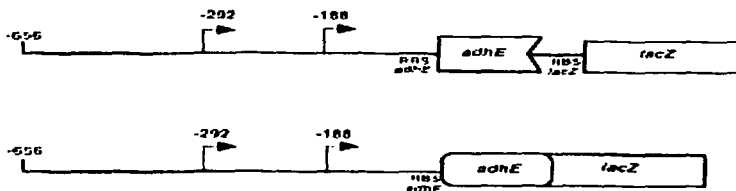


Fig. 10. En este esquema, podemos ver la **Representación esquemática de una fusión transcripcional (arriba) y traduccional (abajo)**. En el primer caso, el transcrito cuenta con dos sitios de unión al ribosoma, mientras que en el segundo caso sólo está el sitio de unión al ribosoma del gen de estudio. Así, mientras que el primer monitor es útil para el estudio de la transcripción, el segundo monitor es útil para el estudio de los mecanismos post-transcripcionales. (Fig. tomada de Membrillo-Hernández y Lin, 1999).

1.4.4 Estructura de la Proteína

La estructura de la alcohol oxidoreductasa consta de dos dominios: Acetaldehído deshidrogenasa y Alcohol deshidrogenasa (Fig. 11). La secuencia de aminoácidos (Fig. 12) muestra un sitio de unión a NAD^+ y un sitio de unión a Hierro.



Fig. 11. Representación esquemática de los dominios de la proteína AdhE

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

1	MAVTHVAELN	ALVERVKKAC	KEYASPTQEG	VDEIIPAAAL	AAADAPIPLA
51	EMAVAESQCF	IVEDKVIKSH	FASEYLYNAY	KREKTCGVLS	EDDTGFTITI
101	AEPGIIICGI	VPEINPTSTA	IFKSLISEKT	PKALIEEPHP	KAYDATHKAA
151	DVLDAAIAR	GAPPFLIGWI	DQPSVELSNA	LNRHDPINLI	LATGGPDMVK
201	AAYSQCKPAI	GVSAUNTQVV	LDHTADIKKA	VASYLSEKTF	DNQVICASQK
251	SVVVDSVVD	AVREPTATHG	GYLQGELEK	AVQDVLKNG	ALNAAIVGCP
301	AYKIANIAGF	SVPEKTKILI	GEVTVDESE	PFARERLSPT	LAMYRAKDFK
351	DAVERAKELV	AMGGIGHTDC	LYTQDNQFA	KVSYFGQKKK	TARILSTFA
		NAD binding site			
401	SQGGIGDLYN	PKLAFSLTIG	GGWQGNRIR	ENVGPKHLIN	KKTVAKKAEN
		Linker			
451	MLWIKLPSKI	<i>IFRFGSLPIA</i>	<i>LDQVITDQIK</i>	RALIVTDFPL	FNNGVADQIT
501	SVLKAAGVET	EVFFEVADP	TLSIVRKAEP	LANSFKPDVI	IALGCGPMD
551	AAKIMVMYKE	KPKTHPEKLA	LRPMDINKKI	YKPKKGVKA	KMAVTTTSG
601	TGSEVTPFAV	VINDATGQKY	PLADYALTPD	MAIVDANLYK	DMPKSLCAFG
651	GLEAVTHAME	AVVSVLASEP	EGQALCALK	LLKEYLPASY	HEGSKNPPVA
		Fe²⁺ Binding Site			
701	ERYVSAATIA	SIAPANAFIR	VCRURANKLG	SETHIHPOLA	NALLICNVIF
751	YNANENPTKO	TAFSQYRPFQ	ARFRYREIAD	HIGLSATGDR	TAAKTEKLLA
801	KEETLKAFLG	IPKSTRKAGW	QKADPLANVD	KLSQDAFDQJ	CTGANPHYPL
851	ISELPGILLD	TYYGROYVNS	ETAARKEAAP	AKAEKKAKKS	A

Fig. 12. Secuencia de Aminoácidos de AdhE y probables sitios de unión. Tanto el dominio de acetaldehído deshidrogenasa como el alcohol deshidrogenasa están conectados por la región indicada por las flechas. El sitio de unión a NAD⁺ se localiza en las bases del motivo GYGXXG. El sitio de unión a Hierro se muestra con los residuos conservados que están en *cursiva*. (Fig. tomada de Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

1.4.5 Regulación Post-Transcripcional de *adhE*

Además de los controles transcripcionales, la traducción del mRNA de *adhE* requiere de la actividad enzimática de la RNasa III. Se ha sugerido que la estructura secundaria de la región no traducida (5') del transcrito de *adhE* aparea bases intramolecularmente ocluyendo el RBS (Sitio de Unión al Ribosoma). La actividad de la RNasa III podría cortar la estructura secundaria, liberando así al RBS para el inicio de la traducción.

La lógica del requerimiento de esta actividad enzimática no es muy clara, ya que la expresión del gene *mc* que codifica para la RNasa III al parecer es constitutiva (Membrillo-Hernández *et al.*, Membrillo-Hernández y Lin, 1999; Aristarkhov *et al.*, 1996).

La cantidad de transcrito de *adhE* también es controlada por la RNasa G, responsable de la degradación del transcrito (Umitsuki *et al.*, 2001).

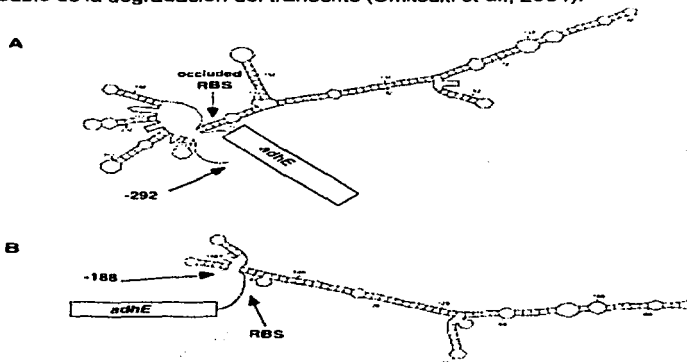


Fig. 13 Modelos para el mRNA del gene *adhE*, que incluyen la región 5' no traducida. Los números indican la posición con respecto al inicio de la traducción +1 (ATG). La estructura A muestra la estructura secundaria más favorecida para el segmento 5' del transcrito *adhE* iniciando en la posición -292 y B) en -188. (Fig. tomada de Membrillo-Hernández y Lin, 1999).

1.4.6 Regulación Post-Traduccional de AdhE

La actividad enzimática de AdhE, bajo condiciones anaeróbicas es 10 veces mayor a la observada en aerobiosis. Esto se debe a la oxidación catalizada por un metal (MCO), donde la Etanol Oxidorreductasa (AdhE) se inactiva al oxidarse su centro Fe, como se ha observado en *K. pneumoniae*.

1.4.6.1 Metal Catalyzed Oxidation: MCO

Cuando no se ha degradado el H_2O_2 por las catalasas, este puede oxidar metales de transición tales como Fe(II) por medio de la reacción de Fenton, produciendo a su vez radicales hidroxilos libres, OH^\cdot (White, 1995). Los radicales hidroxilos generados localmente por el Fe^{2+} unido a la proteína atacan covalentemente a la cadena de aminoácidos cercanos al sitio activo, desnaturalizando a la proteína (Reacción 3). *AdhE* es una enzima susceptible al MCO, pues tiene un centro con Hierro (Tamarit *et al.*, 1998; Echave *et al.*, 2002).



Reacción 3

La respiración aeróbica tiene sus desventajas. La reducción del O_2 se da de un a un electrón, produciendo especies tóxicas y reactivas para las células (Reacción 4).



Reacción 4

El radical superóxido, es una especie muy reactiva que ataca a biomoléculas clave. La célula responde al estrés oxidativo defendiéndose y reparando el daño que estas especies causan. Las superóxido dismutasas disminuyen la cantidad de superóxido en la célula, una fuente de daño oxidativo. Éste es degradado por la superóxido dismutasa (codificada por *sodA*), que convierte dos moléculas de superóxido a peróxido y H_2O (Reacción 5).



Reacción 5

El peróxido a su vez es degradado finalmente a H_2O y O_2 por catalasas e hidroperoxidasas (reacción 6).



Reacción 6

E. coli cuenta tanto con la superóxido dismutasa como con catalasa para defenderse del estrés oxidativo (White, 1995).

1.5 Objetivo de esta Tesis

Como el interés de esta tesis es estudiar como se regula post-transcripcionalmente el gene *adhE*, como una introducción específica describiremos a las dos RNAsas que regulan la expresión y estabilidad del transcrito de *adhE*.

1.5.1 Regulación Post-Transcripcional

Se conocen dos RNAsas importantes para la regulación de la expresión de AdhE.

1.5.1.1 La Transcripción del mRNA de *adhE* Requiere un Corte de la RNasa III en *E. coli*

Aristarkhov *et al.* (1999) notaron que las mutantes en la RNasa III no presentaban actividad de etanol oxidorreductasa al ser crecidas anaeróbicamente en LB + glucosa, a pesar de que los niveles de mRNA de *adhE* eran altos. Notaron que ni las mutantes *adhE*, ni las cepas sin la RNasa III crecieron fermentativamente en glucosa, aunque podían crecer en otra fuente de carbono menos reducida, como el glucoronato. En estas fuentes de carbono, no se requiere la intervención de AdhE, pues no se generan equivalentes reductores por mol de piruvato formada.

Generaron también modelos de la estructura secundaria en la región no traducida 5' del mRNA de *adhE*, los que sugirieron que el sitio de unión al ribosoma está ocluido por un apareamiento de bases intramolecular. Parece ser que se necesita el corte de la estructura secundaria por la RNasa III para un eficiente inicio de traducción.

La existencia de un mecanismo dependiente de RNasa III para controlar la traducción de *adhE* nos lleva a pensar que la RNasa III debe tener un papel regulatorio en la modulación de la expresión de *adhE* y de otros genes en respuesta a señales fisiológicas diferentes al O₂.

1.5.1.2 La Regulación de la Expresión del gene *adhE* en *Escherichia coli*: Transcripción de un promotor río abajo y Regulación por Fnr y RpoS

Membrillo-Hernández y Lin (1999) demostraron que el promotor de *adhE* tiene dos sitios probables de inicio transcripcional que pueden ser funcionales, y que cada sitio es regulado dependiendo del estado redox. Para esto se utilizaron fusiones transcripcionales y traduccionales de *adhE* con el gene *lacZ*. Ambos sitios son reprimidos por NarL en la presencia de NO₃⁻. Fnr activa solamente al sitio de inicio de -188, y se requiere Fis para la transcripción del sitio de inicio -292.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

RpoS activa la transcripción de *adhE* en ambos sitios de inicio de transcripción. Solamente la traducción del mRNA que inicia en el sitio -292, y no el de -188, requiere el corte de la RNasa III para liberar el sitio de unión al ribosoma (RBS) de una estructura de horquilla a un largo transcrito.

1.5.1.3 Implicación de la RNasa G en el Metabolismo de mRNA *in vivo* en *E. coli*

El grupo de Umitsuki (Kaga *et al.*, 2002) encontraron que cepas mutantes de *rng::cat* sobreproducen una proteína de 100 kDa en la cepa MC1061, que tiene una mutación en la caja *cra* dentro del promotor de *adhE*. La secuenciación de aminoácidos del extremo NH₂-terminal mostró que la proteína sobreproducida es *adhE*. Los niveles del mRNA de *adhE* fueron significativamente mayores en las mutantes *rng::cat* que en la cepa parental. Un experimento con rifampicina reveló que la vida media de los mRNA de *adhE* era 2 veces mayor en las mutantes *rng::cat* que en la cepa silvestre.

1.5.1.4 Papel de las RNasas en *E. coli*

Las ribonucleasas son muy importantes en la maduración y decaimiento de los RNAs de doble cadena (ds; Tabla 4). Un conocido ejemplo de lo primero, es el de la endoribonucleasa III (RNasa III) de *E. coli*, de la familia de las nucleasas específicas-dsRNA, que digiere sitios específicos tanto en precursores rRNAs como mRNA, a la vez que inicia la degradación de mRNAs específicos, tanto virales como celulares. Muchos RNAs celulares y virales requieren reacciones de procesamiento para llegar a su forma funcional y madura. En el decaimiento del RNA, eventualmente son degradados a mononucleótidos, utilizados nuevamente en la síntesis de RNA.

El procesamiento y decaimiento de los RNAs involucra el corte específico de sitios, catalizado por la acción de ribonucleasas celulares. De esta forma, las RNasas pueden regular la expresión genética controlando el nivel y la actividad de los RNAs mensajeros.

Tipo	Acción	Nombre	Descripción
Exoribonucleasas (8)	Quitan nucleótidos terminales del extremo 3' al 5'	Pnpasa (<i>pnp</i>)	Polinucleótido fosforilasa: Degrada mRNA de cadena sencilla vía una reacción fosforolítica reversible, generando mononucleótidos 5'-difosfato.
		RNasa II (<i>mb</i>)	Ribonucleasa II: Degrada mRNA de cadena sencilla. Los hidroliza irreversiblemente a 5'-nucleótidos monofosfato.
	Degradan la mayoría del volumen del mRNA	RNasa R (<i>mr</i>)	Homólogo RNasa II, pero no puede digerir oligómeros de DNA.
Endoribonucleasas (11)	Cortan enlaces fosfodiéster internos	RNasa I (<i>ma</i>)	Degrada rRNA y mRNA, especialmente pequeños oligonucleótidos.
		RNasa III (<i>mc</i>)	Corta RNA de doble cadena (reconoce estructuras de tallo-asa), hace cortes post-transcripcionales de mRNA y maduración de rRNA.
		RNasa E (<i>ams</i> o <i>me</i>)	Papel general en el decaimiento químico del mRNA, maduración de rRNA. Corta mRNA cerca de estructuras secundarias y de extremos 5' con apareamiento de bases. La secuencia consenso de sitio de corte RAUUW (R=A o G; W=A o U).
		RNasa G (<i>mg</i>)	Muy similar a la RNasa E.
		RNasa P (<i>mp</i>)	Genera extremos 5' en tRNA de procariontes y eucariontes.

Tabla 4. Ribonucleasas más conocidas en *E. coli*. Estas ribonucleasas tienen diversas funciones, y son sujeto de investigación experimental en muchos laboratorios con herramientas genéticas, bioquímicas y biofísicas (Arraiano, 1993; Kennell, 2002; Cheng y Deutscher, 2002). El número entre paréntesis indica las ribonucleasas de cada tipo conocidas hasta ahora.

1.5.1.4.1 ¿Quién es la RNasa III?

La RNasa III fue la primera endoribonucleasa que se descubrió que corta RNA de doble cadena (dsRNA) de manera específica en *E. coli*. La RNasa III (EC 3.1.26.3) es una fosfodiesterasa 5' (codificada por el gene *mc* en el min 55) que pertenece a una familia de nucleasas Mg^{2+} -dependiente que ha mostrado especificidad hacia los dsRNAs. Se encuentran presentes tanto en bacterias como en eucariontes, y su papel es importante tanto en la maduración de rRNAs como en el decaimiento de mRNAs.

A pesar de no ser necesaria para la viabilidad de las células bacterianas (a excepción de *B. subtilis*), *mc* es un gene muy conservado aún en genomas muy pequeños, tales como el de *Mycoplasma genitalium* (Robertson *et al.*, 1968; Simons, 2002).

Su mRNA produce un homodímero de 226 aminoácidos ó 50 kDa (25.6 kDa por cada subunidad) equivalente al 0.01% del total de la proteína celular; posee un dominio de unión a dsRNA de doble cadena (dsRBD) en el extremo COOH-terminal (de 70 aminoácidos) y cuenta con un dominio catalítico en el extremo NH₂-terminal (Simons, 2002).

El corte de la RNasa III deja fragmentos de RNA con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo con dos nucleótidos 3'-colgantes. El tamaño mínimo del sustrato es de 20 nucleótidos, equivalente a dos vueltas de la forma A del dsRNA (Conrad y Rauhut, 2002). Se ha mostrado *in vitro*, que el dominio dsRBD aislado puede unirse a dsRNA, y que el dominio catalítico corta en sitios específicos al sustrato bajo condiciones específicas. Ambos dominios trabajan en conjunto, llevando a cabo una catálisis eficiente. Se sabe que secuencias específicas de bases apareadas actúan como antideterminantes del procesamiento de la RNasa III, jugando un importante papel en la selección de sitios de digestión del sustrato (Simons, 2002).

La RNasa III se autorregula: río arriba del gene estructural de *mc* está *mcO*, una estructura en tallo-asa que es sustrato de corte para la misma RNasa III (Błaszczuk *et al.*, 2001; Conrad y Rauhut, 2002). La RNasa III degrada tanto RNA natural como sintético, esto puede reflejar una adaptación evolutiva de las bacterias contra las infecciones virales o RNA exógeno. La RNasa III puede ser fosforilada por una serin-treonina protein-quinasa del fago T7. Esta modificación covalente incrementa la actividad de corte de la enzima al dsRNA (Conrad y Rauhut, 2002).

La función principal de la RNasa III es el procesamiento de pre-rRNA. También participa en la maduración de mRNA a la vez que influencia indirectamente la estabilidad de éstos, separando genes en operones. Junto con la RNasa E madura tRNAs cotranscritos, cortando las regiones intercistónicas de mRNAs policistónicas. La RNasa III también procesa el transcrito *pnp*, que codifica para la PNPasa –que junto con la RNasa II, es la exonucleasa bacteriana más importante. Como ya había mencionado, las mutantes en *mc* son viables, aunque impedidas en el crecimiento. Varios de sus procesamientos son llevados a cabo por la RNasa P (Conrad y Rauhut, 2002).

1.5.1.4.2 ¿Quién es la RNasa G?

La RNasa G tiene actividad endoribonucleolítica, confirmada por Tock *et al.*, (2000) que es dependiente de la naturaleza del extremo 5' del sustrato. La RNasa G digiere eficientemente sustratos con el extremo 5' monofosforilado, pero no digiere en absoluto aquellos con el extremo 5' hidroxilados ó extremos 5' con trifosforilados (Umitsuki *et al.*, 2001).

El grupo 5' monofosforilado estimula la digestión en sitios internos de la molécula de RNA. La RNasa G digiere preferentemente RNAs 5' monofosforilados ya en decaimiento, antes que iniciar la digestión de RNAs 5' trifosforilados intactos. Mientras que el extremo 5' tiene una gran importancia para el decaimiento de los RNAs, el extremo 3' no tiene ninguna importancia en la actividad de la RNasa (Umitsuki *et al.*, 2001).

Los resultados de Tock *et al.*, (2000) sugieren fuertemente que la RNasa G contribuye al decaimiento de los RNAs en *E. coli*, datos confirmados al observar el decaimiento de *adhE* por la RNasa G (Umitsuki *et al.*, 2001). Un estudio de Lee *et al.* (2002), en el que se hizo un microarreglo de una cepa *mg-1 vs mg+*, observó que la deleción de la RNasa G incrementó la abundancia de 18 transcritos celulares más de 1.5 veces. Entre los transcritos más afectados por la deleción de *mc* está *adhE* (Tabla 5).

La sobreexpresión de la RNasa G complementa funcionalmente una deleción de la RNasa E (Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, el modo de acción de la RNasa G es diferente del de la RNasa E. A diferencia de la RNasa E, que cuenta con una inherente direccionalidad 3' a 5' en la selección de sitio de corte, la RNasa G no muestra esta direccionalidad (Feng *et al.*, 2002).

1.5.1.5 Objetivo de la Tesis

El objetivo de este proyecto es: El análisis de la acción de la RNasa III y de la RNasa G sobre el transcrito del gene *adhE* y su importancia en su regulación post-transcripcional.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Gene ^a	Descripción	Nivel de mRNA en cepa <i>mg</i> ^b	Nivel de mRNA en cepa complementada ^c
<i>adhE</i>	Alcohol oxidorreductasa	3.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
<i>pgi</i>	Glucosa fosfato isomerasa 1	2.8 ± 0.5	0.7 ± 0.1
<i>glk</i>	Glucocinasa 1	2.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1
<i>clpB</i>	Heat shock proteína, ClpB	2.3 ± 0.5	0.6 ± 0.1
<i>tpiA</i>	Triosa fosfato isomerasa 1	2.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0
<i>eno</i>	Enolasa	1.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1
<i>mopA</i>	Heat shock proteína, GroEL	1.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
<i>ndh</i>	Respiratoria NADH deshidrogenasa	1.8 ± 0.3	0.9 ± 0.2
<i>yhgI</i>	Proteína hipotética	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.0
<i>ythO</i>	Probable aminotransferasa 1	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1
<i>yeiP</i>	Probable factor de elongación	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1
<i>mgsA</i>	Metilgloxal sintasa	1.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0
<i>panB</i>	3-Metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa	1.7 ± 0.2	0.8 ± 0.0
<i>nagB</i>	Glucosamina-6-fosfato deaminasa	1.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1
<i>ahpF</i>	Alquil hidroperóxido reductasa, F52a subunidad	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.0
<i>srlA</i>	Sistema PTS, componente IIIC glucitol/sorbitol-específico	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1
B1963	Proteína hipotética	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1
<i>acs</i>	Acetil-CoA sintetasa	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2
<i>rpoE</i>	RNA polimerasa, factor σ^E	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1
<i>murA</i>	UDP-N-glucosamina 1-carboxiviniltransferasa	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
<i>ybqJ</i>	Probable carboxilasa	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2
B2326	Probable ATPasa transportadora	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0
<i>mg</i>	Filamento axial citoplásmico RNasa G	0.2 ± 0.1	13.5 ± 2.9

Tabla 5. Transcritos afectados por la deficiencia de RNasa G. a) Se eligieron inicialmente 42 genes a los que el nivel de mRNA cambió 1.5-veces en tres de cuatro experimentos preparados con muestras de RNA de N3433*mg*. Fueron seleccionados 23 de los 42 genes en los que el error estándar fue igual o menor al 20% en el nivel promedio. b) Se calculó el nivel de mRNA de al menos 2 conjuntos de experimentos independientes, se muestra el promedio ± error estándar (Tabla tomada de Lee *et al.*, 2002).

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Técnicas Bacteriológicas

2.1.1 Cepas Bacterianas y Plásmidos

Se muestran los genotipos de las cepas bacterianas y de los plásmidos usados en este trabajo en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente/ Referencia
ECL4000	MC4100 Φ (<i>adhE-lacZ</i>)	Dr. Jorge Membrillo-Hernández U.N.A.M.
MC4100	Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 araD169 relA1 flb-5301 deoC1 ptsF25</i>	Dr. Jorge Membrillo-Hernández U.N.A.M.
JE52	<i>AdhE</i> ^{AD87T E568K}	Dr. Jorge Membrillo-Hernández U.N.A.M.
JMH0098	MC4100 <i>mc::tet</i>	Dr. Jorge Membrillo-Hernández U.N.A.M.
JMH0104	MC4100 <i>adhE::kan</i>	Dr. Jorge Membrillo-Hernández U.N.A.M.
MC1061	<i>araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7697 Δ (<i>lac</i>)X74 <i>galU galK hsdR rpsL150 thi</i>	Dr. Masaaki Wachi Universidad de Tokio
JMH0042	MC4100 <i>mc::Tn10</i>	Dr. Robert Simons UCLA
JMH0510	MC1061 pero <i>mc::tet</i> [MC1061 x P1(JMH0042)]	Este trabajo
JMH0511	GM11 pero <i>mc::tet</i> [GM11 x P1(JMH0042)]	Este trabajo
JMH0512	JMH0510 pero <i>mg::cat</i> [JMH0510 x P1(GM11)]	Este trabajo

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Cepas	Genotipo	Fuente/ Referencia
JMH0526	JMH0523 pero <i>adhE::kan</i> [JMH0523 x P1(JMH0104)]	Este trabajo
JMH0527	JMH0512 pero <i>adhE::kan</i> [JMH0512 x P1(JMH0104)]	Este trabajo
JMH0528	JMH0511 pero <i>adhE::kan</i> [JMH0511 x P1(JMH0104)]	Este trabajo
JMH0530	MC1061 pero <i>adhE::kan</i> [MC1061 x P1(JMH0104)]	Este trabajo
JMH0531	GM11 pero <i>adhE::kan</i> [GM11 x P1(JMH0104)]	Este trabajo
JMH0536	JRG780 pero <i>mg::cat</i> [JRG780 x P1(GM11)]	Este trabajo
JMH0537	JRG780 pero <i>mc::tet</i> [JRG780 x P1(JMH0042)]	Este trabajo
JMH0540 a JMH0545	Mutantes supresoras de JMH0510 capaces de crecer en MM anaeróbicamente	Este trabajo
JMH0546 a JMH0551	Mutantes supresoras de JMH0510 capaces de crecer en MM anaeróbicamente pALF1	Este trabajo
JMH0552 a JMH0557 y JMH0577 a JMH0580	Mutantes supresoras de JMH0511 capaces de crecer en MM anaeróbicamente	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente/ Referencia
JMH0563	MC1061 <i>attB::φ(adhE⁻/lacZ)</i> [MC1061 x λRS45[pφ(<i>adhE⁻/lacZ</i>)]]	Este trabajo
JMH0564	JMH0563 <i>pero mgr::cat</i> [JMH0563 x P1(GM11)]	Este trabajo
JMH0565	JMH0563 <i>pero mc::tet</i> [JMH0563 x P1(GR11)]	Este trabajo
JMH0566	JMH0563 <i>pero adhE::kan</i> [JMH0563 x P1(JMH0104)]	Este trabajo
JMH0567	JMH0563 <i>pero mc::tet</i> [JMH0563 x P1(GR11)]	Este trabajo
JMH0568	JMH0565 <i>pero mgr::cat</i> [JMH0565 x P1(GM11)]	Este trabajo
JMH0569	JMH0564 <i>pero mc::tet</i> [JMH0564 x P1(GR11)]	Este trabajo
JMH0570	JMH0566 <i>pero mgr::cat</i> [JMH0566 x P1(GM11)]	Este trabajo
JMH0520	JMH0536 <i>pero mc::tet</i> [JMH0536 x P1(GM11)]	Este trabajo

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Tabla 7. Plásmidos de *Escherichia coli* utilizados en esta tesis

Plásmido	Características Relevantes	Fuente
pRS414	Ap ^r derivado de pBR322 (20 copias)	Dr. Jorge Membrillo Hernández U.N.A.M.
pRS415	Ap ^r derivado de pBR322 (20 copias)	Dr. Jorge Membrillo Hernández U.N.A.M.
pSK	Ap ^r derivado de pUC19 (50 copias) 2.96 kb	Dr. Jorge Membrillo Hernández U.N.A.M.
pT(<i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i>)	pRS414 <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> Ap ^r Fusión traduccional	Este trabajo
pALF1	miniF <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> Ap ^r (Unicopia)	Dr. Masaaki Wachi Universidad de Tokio
pSK1	pSK <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 1419 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pSK2	pSK <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 1555 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pSK3	pSK <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 2444 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pSK4	pSK <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 2915 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pFG1	pRS414 <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 1419 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pFG2	pRS414 <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 1485 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pFG3	pRS414 <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 2444 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo
pFG4	pRS414 <i>adhE</i> ⁻ - <i>lacZ</i> con 2915 bp de <i>adhE</i>	Este trabajo

2.1.2 Medio y Condiciones de Crecimiento

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120° C y 15 psi por 20 min antes de ser vertidos en las cajas Petri. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar bacteriológico al 1.5% (p/v) al medio líquido antes de ser esterilizado. La incubación anaeróbica se llevó a cabo en jarras anaeróbicas a 1 atmósfera de H₂ y CO₂ en Sistemas anaeróbicos de GasPak™ (BBL Microbiology Systems).

Cultivo Luria Bertani (LB). Se disolvió Bacto-Triptona (10 g), Extracto de Levadura (5 g) y NaCl (10 g) en 1 l de agua destilada y desionizada, ajustando el pH a 7.0 con 2-3 gotas de NaOH 2.5 N. Se esterilizó en autoclave.

Cultivo Sólido (con X-gal). Se disolvió Bacto-Triptona (10 g), Extracto de Levadura (5 g) y NaCl (10 g) en 950 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.4 con 2-3 gotas de NaOH 10 M. Se agregó agar (15 g) y agua hasta 1l. Después del proceso de autoclave, en caso de necesitarse se agregaron 2 ml de X-gal (Preparado al 2% (p/v), en dimetilformamida).

Cultivo Sólido para Fago λ (con X-gal) . Se disolvió Bacto-Triptona (8 g), Extracto de Levadura (5 g), NaCl (5 g), Glucosa (2 g), Agar (20 g) y se disolvió en 1 l de agua destilada. Después del proceso de autoclave, se agregó 10 ml de MgSO₄ 1M, 10 ml de CaCl₂ 0.5 M, 1 ml de FeCl₃ 10 mM y 2 ml de X-gal (Preparado al 2% (p/v), en dimetilformamida).

TB Agar Suave. Se disolvió Bacto-Triptona (8 g), NaCl (5 g) en 950 ml de agua destilada y se agregó el Agar (7 g). Se esterilizó en autoclave.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Medio Mínimo (MM). Se disolvió NH_4Cl (1 g), KH_2PO_4 (3 g), Na_2HPO_4 (6 g), NaCl (0.5 g) en 500 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.4 con 2-3 gotas de NaOH 10 M. Se disolvió agar (20 g) en 500 ml de agua destilada. Se esterilizaron por separado. Se mezclaron y se adicionó 1 ml de MgSO_4 (solución al 25%), azúcar (agregada al 0.2% de la concentración final), 16 ml de Tiamina (solución al 0.1%), aminoácidos (20 mg/ml) y Timina (a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$). Se homogeneizó y se vació en cajas Petri. Se flameó cada caja 1 s para eliminar burbujas y se incubaron 24 h. A menos que se indique, la fuente de carbono usada fue glucosa.

Medio Mínimo Glicerol Fumarato (MM GF) . Se disolvió NH_4Cl (1 g), KH_2PO_4 (3 g), Na_2HPO_4 (6 g), NaCl (0.5 g) en 500 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.4 con 2-3 gotas de NaOH 10 M. Disolvimos agar (30 g) en 500 ml de agua destilada. Se esterilizaron por separado. Se mezclaron y se adicionó 1 ml de MgSO_4 (solución al 25%), glicerol 0.04 M, casaminoácidos al 0.2% y Fumarato de Sodio 0.04 M. Se homogeneizó y se vació en cajas Petri. Se flameó cada caja 1 s para eliminar burbujas y se incubaron 24 h.

2.1.2.1 Suplementos a los Medios de Cultivos

Cuando fue necesario, se agregó una solución esterilizada por filtración de casaminoácidos a una concentración final al 0.2%.

2.1.2.2 Selección por Antibióticos

Las concentraciones utilizadas en este trabajo se dan en la Tabla 8, mismas que fueron utilizadas tanto en medios líquidos como sólidos. Para el agar, el volumen apropiado de la solución stock de antibiótico se mezcló con el medio recién esterilizado a una temperatura menor a 50° C. Todas las soluciones de antibiótico se esterilizaron por filtración usando filtros de membrana MF™ (Millipore Acrodix) de 0.45 μm .

Tabla 8. Concentración de Antibióticos usados en los medios de cultivo

Antibióticos	Stock	Concentración Final
Ampicilina	200 mg/ml	200 µg/ml
Cloramfenicol	20 mg/ml (etanol)	25 µg/ml
Kanamicina	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetraciclina	15 mg/ml (50% etanol)	15 µg/ml
Espectinomina	20 mg/ml	25 µg/ml
Estreptomina	50 mg/ml	200 µg/ml

2.1.2.3 Preservación y Mantenimiento de Cepas Bacterianas, Bacteriófagos y Plásmidos.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en cajas de agar a 4° C hasta por 1 mes. Se subcultivaron de forma rutinaria para propagar la cepa en medio selectivo, sellándose con Parafilm para evitar la evaporación. Para almacenamientos a largo plazo, se utilizaron viales con medio LB y glicerol al 15% (v/v) y se almacenaron a -70° C. Los lisados de P1 se mantienen a 4° C. Los plásmidos purificados se mantienen a -20° C.

2.1.2.4 Condiciones de Crecimiento

Los cultivos se crecieron en matraces Erlenmeyer o en tubos de ensayo, a 30° C y con agitación de 200 rpm. El volumen de los cultivos varió entre 1/25 a 1/10 del volumen del matraz. Los cultivos anaeróbicos se crecieron en tubos de vidrio con tapa de rosca, llenos hasta el tope, a 37° C. Se crecieron cultivos aeróbicos en matraces nefeleométricos, para la medición de OD₆₀₀ en el espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb). La inoculación de los cultivos se hizo con 1% (v/v) de un cultivo en fase estacionaria. El crecimiento se siguió midiendo la OD₆₀₀ usando el espectrofotómetro, alternativamente se usó un espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando celdas de 1 ml, diluyendo 10 o 100 veces para mantener la medición de OD₆₀₀ debajo de 0.6.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.1.2.5 Estudios de Expresión de Fusiones *lacZ*

Las células se crecieron aeróbica o anaeróbicamente hasta una OD₆₀₀ de 0.4 antes de recibir el tratamiento del ensayo de β-galactosidasa. En el caso de actividades enzimáticas de β-galactosidasa la OD₆₀₀ fue de 0.6 a 1.0.

2.2 Técnicas Bioquímicas

2.2.1 Preparación de Extractos Libres de Células

Se colectaron las células por centrifugación a 5 000 g por 30 min. Se lavó y resuspendió la pastilla precipitada en solución amortiguadora de K₃PO₄ 0.1 M (pH 7.0). Se trató la suspensión celular por sonicación usando un sonicador MSE Soniprep 150 W. Las células se sonicaron 10 veces, cada ciclo duró 30 s con intervalos de 1 min enfriando en un baño de hielo-sal. Se removieron los restos celulares por centrifugación a 132 000 g por 90 min a 4° C. Los sobrenadantes se guardaron a -70° C.

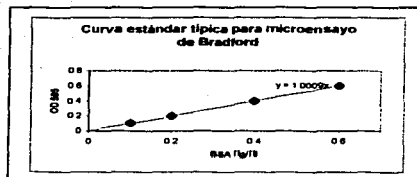
2.2.2 Determinación de Concentración de Proteína

2.2.2.1 Método de Bradford

La concentración de proteína de extractos celulares se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad). Se resuspendieron los sobrenadantes de las células sonicadas a 1/20 en amortiguador A [Tris-HCl 50 mM pH 8.5, KCl 50 mM, DTT 5 mM; para estabilizar las proteínas se agregó 1/200 de inhibidores de proteasas Roche (#cat. 1836-170), NAD⁺ 1 mM]. El reactivo de Bradford se diluyó 1:5. Se tomaron 25 µl de extracto celular más 75 µl de amortiguador A y 5 ml de reactivo de Bradford; 50 µl de extracto celular más 50 µl de amortiguador A y 5 ml de reactivo de Bradford; 100 µl de extracto celular y 5 ml de reactivo de Bradford; usando 100 µl de amortiguador A y 5 ml de reactivo de Bradford como blanco.

Curva estándar

BSA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.1	0.2	0.4	0.6
BSA μl	14.3	28.6	57.2	75.8
H ₂ O μl	85.7	71.4	42.8	24.2



Se usó un stock de 1.4 mg/ml de BSA. Se incubó al menos 5 min a t.a. La lectura se hizo a 595 nm. La reacción es estable por 1 hora. Se usó la pendiente de la curva estándar ajustada a cero. Para obtener la concentración por muestra se dividieron los valores obtenidos en las muestras por la pendiente de la curva estándar. Al dividir por los μl de muestra se obtienen los $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se tomaron los dos valores más cercanos y se obtuvo el promedio.

2.2.3 Medición de Actividad de β -galactosidasa

El producto del gene *lacZ*, la β -galactosidasa ha sido utilizado para estudiar muchos aspectos de la regulación genética. Para esto se construye una fusión genética entre un operón *lac* sin promotor y el promotor del gene de interés. La concentración de la enzima, y por lo tanto la expresión del gene, puede medirse con el sustrato cromogénico *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG) incoloro, que al hidrolizarse por la acción de la β -galactosidasa da un color amarillo proporcional al producto hidrolizado.

El ensayo se llevó a cabo como está descrito por Miller (1972) por triplicado, para cada muestra con ligeras modificaciones. Se crecieron los cultivos hasta fase logarítmica. Al llegar a una OD_{600} entre 0.4 y 0.6, se les agregó cloramfenicol o espectinomicina a una concentración final de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se incubaron 5 min más en las condiciones de crecimiento previas. 1 ml de cada cultivo se centrifugo 5 min a 3000 rpm.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Se resuspendió en 1 ml de amortiguador Z (0.06 M Na₂HPO₄·7H₂O, 0.04 M NaH₂PO₄·H₂O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄·7H₂O, 0.05 M β-mercaptoetanol, pH 7.0). Se midió la OD₆₀₀ y se separaron entre 25 y 100 µl del cultivo líquido ó suspensión celular y se mezclaron con Amortiguador Z hasta un volumen final de 1 ml. Se permeabilizaron las membranas celulares para permitir la salida de las enzimas citoplásmicas, por difusión. Esto se logró al agregar 40 µl de cloroformo y 20 µl de SDS al 0.1% a la mezcla de cada ensayo y agitar por 10 s.

Los tubos de ensayo se incubaron a t.a. por 10 min. Se inició la reacción al agregarse 0.2 ml de ONPG (4 mg/ml) a cada tubo, que se agitaron por 5 s y se incubaron a t.a. hasta que la mezcla del ensayo incoloro cambió a un suave amarillo. Para detener la reacción se agregaron 0.5 ml de Na₂CO₃ 1M y se obtuvo una coloración amarilla, se registró el tiempo de reacción. Se midió para cada ensayo, la OD₄₂₀ y OD₅₅₀.

La OD₄₂₀ mide la absorbancia debida a la hidrólisis de ONPG; la OD₅₅₀ mide la dispersión de la luz debida a los escombros celulares y la turbidez. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la actividad de β-galactosidasa (Miller, 1972):

$$\text{Unidades Miller} = \frac{(1000 \cdot OD_{420}) - (1.75 \cdot OD_{550})}{t \cdot v \cdot OD_{600}}$$

OD₄₂₀ y OD₅₅₀ son las medidas de absorbancia.

t = tiempo de incubación de la mezcla de reacción, en min.

v = Volumen del cultivo celular usado, en ml.

OD₆₀₀ = Densidad óptica a 600 nm de la suspensión celular.

Alternativamente, se llevó a cabo la actividad enzimática de β-galactosidasa por triplicado, para cada muestra. Para esto se resuspendieron las células en cuatro volúmenes de amortiguador A (Tris.HCl 50 mM pH 8.5, KCl 50 mM, DTT 5 mM, para estabilizar las proteínas se agregó 1/200 de inhibidores de proteasas, NAD⁺ 1 mM).

Se agregó en cubetas de medición de 1 ml en el siguiente orden, 150 μ l de ONPG al 0.4% en β -mercaptoetanol, 845 ó 830 μ l de Buffer Z (0.06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 M NaH_2PO_4 , H_2O , 0.01 M KCl, 0.001 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 M β -mercaptoetanol, pH 7.0) y 5 ó 20 μ l del extracto celular. Se midió la cinética cada 3 segundos por 120 segundos. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Unidades}}{\mu\text{g proteína}} = \frac{(m) * (f.d)}{(\text{coef.ext. } \beta\text{gal}) * (\text{conc. Proteína})}$$

m = pendiente de la cinética enzimática de la β -galactosidasa.

f.d = factor de dilución, que fue de 200 ó 50.

conc. Proteína = Determinada por el método de Bradford

coef. extinción de β -galactosidasa a 420 nm es de 0.0045.

2.2.4 Actividades Enzimáticas Específicas de AdhE

Se creció el cultivo de 50 ml en las condiciones deseadas. Se pesó la pastilla celular (colectada por centrifugación a 3000 rpm a 4°C). Se resuspendieron las células en 4 volúmenes del amortiguador A. Se prepararon extractos libres de células. Estos sobrenadantes fueron utilizados después de ser obtenidos.

Se prepararon las siguientes soluciones al momento: 50 mM de NAD^+ ; 10 M de Etanol, 0.6 M de K_2CO_3 pH 10. Se agregó en la calda de cuarzo de 1 ml en el siguiente orden: 500 μ l de K_2CO_3 , 300 ó 285 μ l de H_2O destilada, 150 μ l de etanol, 45 μ l de NAD^+ y 5 ó 20 μ l del extracto libre de células. Se mezclaron tapando la celda con parafilm. Se midió la Absorbancia a 340 nm (que mide la formación de NADH) cada 5 s por 120 s. La pendiente de la recta es el radio de consumo (formación NADH/min). De acuerdo a la siguiente fórmula se calculó la actividad específica (actividad/concentración de proteína).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Unidades}}{\mu\text{g proteína}} = \frac{(m) * (f.dil)}{(\text{Coef.Ext.}) * (\text{Conc. Proteína})}$$

m = relación de consumo NAD^+ /min.

f.dil. = Factor de dilución, que fue de 200 ó 50.

Conc. Proteína = Concentración de Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Coef. Ext. = Coeficiente de extinción de NAD^+ a 340 nm es de 6.22.

2.2.5 Electroforesis en Geles (SDS-PAGE)

Se centrifugó 1.5 ml de cultivo a 14 krpm. Se resuspendió en $\frac{1}{4}$ de volumen del amortiguador Laemmli para proteína [Ácido acético glacial al 10%, Metanol al 30%. Azul de Coomassie R250 al 0.06%; antes de usar se agregó β -mercaptoetanol al 5% y 1X cocktail inhibidor de proteasas Roche (# cat. 1836-170)]. Las muestras se hirvieron por 5 min para desnaturalizar las proteínas antes de ponerlas en el gel. Se usaron de 5 a 30 μl de muestra en cada gel. Se hicieron pregeles para calcular la cantidad de muestra a poner. Las muestras son estables por dos semanas si se guardan a -20°C .

Se preparó el gel de acuerdo al catálogo Mini-Protean 3 Cell de Bio-Rad. Se adicionó el gel separador al 9% [3 ml de acrilamida/bis al 30% (29:1), 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.9, 100 μl de SDS al 10%, 4.3 ml de H_2O se mezcló suavemente; se agregaron 80 μl de Persulfato de amonio al 10%, 5 μl N,N,N,N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) como catalizadores] y después de agregar isopropanol encima, se dejó polimerizar 45 min. Después, se quitó el isopropanol y se agregó el gel concentrador al 5% [1 ml de acrilamida/bis al 30% (29:1), 1.5 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 60 μl de SDS al 10%, 3.4 ml de H_2O se mezcló suavemente; se

agregaron 40 μ l de Persulfato de amonio al 10%, 5 μ l de N,N,N,N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) como catalizadores].

Después de dejar gelificar el gel concentrador durante 30 min , se colocó el gel en la cámara, misma que se relleno con amortiguador Laemmli frío (Tris-base 25 mM, glicina 220 mM, SDS al 10%, 1 l de H₂O desionizada). Durante la electroforesis del gel se usaron 50 V durante el gel concentrador y 70 V durante el gel separador.

Se sumergió el gel en 5 volúmenes de la solución teñidora [0.25 g azul de Coomasie R250, 90 ml de Metanol:H₂O (1:1 v/v) y 10 ml de Ácido acético glacial; filtrado] y se colocó por 4 h el recipiente en una plataforma (Labnet) que agitaba suavemente el gel. Se lavó el gel con la solución desteñidora [90 ml de Metanol:H₂O (1:1 v/v) y 10 ml de Ácido acético glacial; filtrado] y después con agua y se colocó sobre un papel filtro y un acetato. El gel fue secado a 80°C por 45 min con una bomba secadora de vacío Hydrotech Vacuum Pump (Bio-Rad).

2.2.6 Técnicas Espectrofotométricas

El espectro de absorción electrónica se midió usando un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech). Para la medición de la densidad óptica (OD) de matraces nefelométricos se usó el espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.3 Manipulación y Análisis de DNA

2.3.1 Preparación de DNA Celular

2.3.1.1 Purificación de DNA de Plásmidos

Este procedimiento está basado en el protocolo del Kit de Qiagen-Plasmid, diseñado para purificar hasta 20 µg de DNA de plásmidos multicopia provenientes de cultivos de *E. coli* hasta de 5 ml crecidos en medio LB (Luria Bertani). Se concentraron células de un o.n. de 5 ml por centrifugación a 13 000 rpm por 5 min. Se resuspendió la pastilla obtenida en 250 µl de amortiguador P1 (100 µg/ml de RNasa A; 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM de EDTA) hasta obtener una solución homogénea. La RNasa A digiere el RNA liberado durante la lisis alcalina. Los fragmentos de RNA resultantes no se unen a la resina de QIAGEN bajo las condiciones de pH y sal presentes en el lisado.

Se agregaron 250 µl de amortiguador P2 (NaOH 200 mM, SDS al 1% (p/v)) a la suspensión celular, se mezcló suavemente hasta obtener una solución clara. El SDS solubiliza los componentes fosfolipídicos y proteínicos de la membrana celular, permitiendo la lisis y liberación del contenido celular. El NaOH desnatura tanto el DNA cromosomal y de plásmido, como las proteínas.

El tiempo óptimo de lisis permite la máxima liberación del DNA de plásmido de la célula sin permitir la salida del DNA cromosomal, minimizando a su vez la exposición del plásmido a una desnaturalización irreversible. Por esto la reacción de lisis no debe durar más de 5 min. Se obtiene un lisado viscoso, el que se neutralizó con 350 µl de amortiguador N3 (CH₃COOK 3.0 M, pH 5.5). La alta concentración de sales precipita al KDS (Dodecil sulfato de potasio), y tanto las proteínas desnaturalizadas, como el DNA cromosomal y los restos celulares quedan atrapados en el complejo de sales-detergente.

El DNA de plásmido, al ser más pequeño que el DNA cromosomal y cerrado covalentemente, se renaturaliza correctamente, manteniéndose en solución. Como cualquier remanente de SDS inhibiría la unión del DNA a la resina de QIAGEN, la solución debe mezclarse perfectamente de manera suave, asegurando así la completa precipitación del detergente.

El precipitado se removió con una centrifugación a alta velocidad por 10 min. Se pasó el sobrenadante al tubo con la resina de QIAGEN por decantación. Se centrifugó de 30 a 60 s, donde se une el DNA de plásmido a la resina QIAGEN. La resina de intercambio aniónico de QIAGEN, hecha de Dietilaminoetanol (DEAE), en condiciones ácidas está cargada positivamente, interactuando entonces con los grupos fosfatos del DNA. Se lavó el DNA del plásmido con 750 μ l de amortiguador PE (80% etanol) y se centrifugó de 30 a 60 s. En este paso se lavó el DNA adherido a la columna con etanol: volátil y fácil de remover. Se volvió a centrifugar por 2 min para evaporar el etanol. El DNA se lavó con 50 μ l de amortiguador EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5). Los plásmidos obtenidos se guardaron a -20° C.

2.3.2 Modificaciones Enzimáticas del DNA

2.3.2.1 Digestión con Endonucleasas de Restricción

La digestión de DNA con endonucleasas de restricción se llevó a cabo con amortiguadores y enzimas comerciales (GIBCO BRL y Promega). Se agregó al menos 1 unidad de enzima por 1 μ g de DNA por cada sitio de restricción, tal que el volumen de enzima agregado fue de un décimo del volumen de reacción total. La digestión se incubó por 2 h, a las temperaturas recomendadas por el fabricante. Un amortiguador univésal se utilizó cuando se usaron dos o más enzimas con diferentes requerimientos de sal. Los fragmentos cortados se purificaron con el kit de QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. Ver sección 2.5.3.2. Se analizaron las digestiones por electroforesis.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.3.2.2 Ligación de Fragmentos de DNA *in vitro*

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo de acuerdo a Sambrook y Russell (2001) en 3 μ l amortiguador de ligación 10X [Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; KCl 60 mM, EDTA 1 mM, ditioeritritol 5 mM, glicerol al 50% (v/v)] por 12 a 16 h a 14° C. La mezcla contenía 2 μ l de DNA ligasa T4 (Roche), 5 μ l plásmido y 10 μ l del inserto. Se trataron dos reacciones control al mismo tiempo: a) sin ligasa y b) sin inserto.

De forma alternativa se utilizó el kit de ligación rápida de DNA (Roche). Se agregaron 2 μ l vector (aproximadamente 20 ng/ μ l), 6 μ l del fragmento (80 ng/ μ l) y 2 μ l amortiguador de dilución (DNA 5X) y se agitó. Se agregaron 10 μ l de amortiguador de DNA ligasa T4, se mezclaron y se agregó entonces 1 μ l DNA ligasa T4. Se dejó 10 min a t.a.

2.3.3 Electroforesis con Geles de Agarosa

La electroforesis en gel de DNA se llevó a cabo de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). Típicamente, se agregó polvo de agarosa al 1.0 % (Bio-Rad) a un amortiguador 1 X de TBE (Tris base 8.9 mM, Ácido bórico 8.9 mM, EDTA 0.2 mM, pH 8.0). Se disolvió la agarosa en el horno de microondas a la mitad de la potencia (sin llegar a ebullición) por 2 min; se mezcló el gel a homogeneizar, se dejó enfriar unos momentos y se vertió en la caja de electroforesis. Se dejó gelificar antes de llevar a cabo la electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo en cámaras de electroforesis de Bio-Rad a un voltaje constante (90 V por 1 hora), en solución amortiguadora 1 X TBE a 15°C. Se preparó amortiguador de carga (6 X) que contiene 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilen cianol y 40% de sacarosa (p/v) en agua destilada. Éste se agregó a muestras de DNA antes de ser corridas, tal que el volumen del amortiguador de carga fuera 1/5 del volumen total corrido en el gel.

Después de la electroforesis, se sumergió el gel por 10 min en una solución de Bromuro de etidio (5 µg/ml). El bromuro de etidio se intercala con las bases del DNA, fluoresciendo en presencia de luz UV. Después de la tinción, se vió el gel con luz UV en el transiluminador a 260 nm (Hoefer), se fotografiaron usando una cámara digital DC290 ZOOM (Kodak) y se manipularon con el programa 1D versión 3.5.4. Se usaron patrones de peso molecular de DNA de 100 bp o de 1 kb, de Bio-Rad, Invitrogen ó Bethesda Research Laboratories (Gibco BRL).

2.4 Técnicas Genéticas

2.4.1 Introducción DNA de Plásmido por Transformación

2.4.1.1 Preparación de Células de *E. coli* Competentes

Se subcultivó un o.n. de *E. coli*, en LB y se creció a 37° C hasta OD₆₀₀ de 0.5. Se colectaron las células por centrifugación a 5 000 g por 5 min a 4° C. Se lavó la pastilla con CaCl₂ 50mM enfriado a hielo antes de resuspender en 20 ml de esta solución. Se incubó la mezcla en hielo por 30 min. Se centrifugaron nuevamente a 5 000 g por 5 min a 4° C y se resuspendió suavemente la pastilla obtenida en 1 ml de CaCl₂ 50mM enfriado a hielo, antes de transformar. De forma alternativa, se resuspendieron las células en 1 ml de CaCl₂ 50mM enfriado a hielo, con glicerol al 15% (v/v) y guardadas a -70° C para transformaciones subsecuentes. Estas células se conocen como "células competentes".

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.4.1.2 Transformación de Células de *E. coli*.

Se agregaron células competentes (200 μ l), a un tubo de microcentrifuga eppendorf frío y estéril, al que se le agregaron 1-2 μ g de DNA plasmidal. Se dejó la mezcla en hielo por 45 min. También se preparó un tubo control que tenía solamente las células competentes. Después de 30 min, las células recibieron un choque calórico a 42° C por 90 s y se les dejó crecer en 1 ml de LB por 2 h a 37° C. Esto permitió que las células se recuperaran del choque calórico, para que al sembrar posteriormente éstas células transformadas en el medio selectivo (con antibiótico), se expresen los genes de resistencia antibiótica codificados por el DNA introducido (plásmido). Se centrifugaron las células, y la pastilla obtenida se resuspendió en 80 μ l de medio de dilución (MgSO₄ 10 mM). Se plateó en medio selectivo y se incubaron o.n. a 37° C para recuperar las transformantes.

2.4.2 Introducción DNA de Plásmido por Electroporación

De forma alternativa, la introducción del DNA plasmidal puede hacerse por electroporación, con una eficiencia de 10⁹ a 10¹⁰ transformantes por μ g de plásmido, mayor aún que cualquier método químico .

2.4.2.1 Preparación de Células Electrocompetentes.

Se inocularon 20 ml de LB con 1/100 del volumen (200 μ l) de un o.n. fresco de *E. coli*. Se crecieron las células a 37° C y con agitación de 300 rpm hasta OD₆₀₀ de 0.5 a 0.7 (células en fase log temprana a media). Se enfriaron las células en hielo por 20 min. En lo que resta del protocolo, se mantuvieron las células lo más cercano a 0° C (en un baño de agua-hielo). Se colectaron las células por centrifugación a 3 000 g por 10 min a 4° C. Se descartó cuidadosamente y por completo el sobrenadante. Se resuspendió suavemente la pastilla en 20 ml de glicerol al 10% enfriado en hielo.

Se centrifugó a 3 000 g por 10 min a 4° C, y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 1 ml de glicerol al 10% enfriado en hielo. Se centrifugó a 3 000 g por 10 min a 4° C, se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en un volumen final de 2 ml de glicerol al 10% enfriado en hielo. Esta suspensión puede congelarse en alícuotas en hielo seco y guardarse a -70° C hasta por 6 meses.

2.4.2.2 Electroporación

Manteniendo las células en hielo, para cada muestra a ser electroporada, se puso un tubo de microfuga de 1.5 ml (eppendorf) estéril y una cubeta de electroporación estéril de 0.2 cm a enfriar en hielo. En uno de estos tubos fríos, mezclamos 100 µl de la suspensión celular con 1 a 2 µl de DNA (suspendido en amortiguador TE). Se mezclaron bien y se incubaron en hielo por 1 min. Se programó el Micropulsador en Ec2. Se transfirió la mezcla de células con DNA al fondo de la cubeta de electroporación fría y se tapó. Se puso la cubeta en el carril y se le aplicó una sola vez un pulso (2.5 kV por 5 ms). Rápidamente se agregó 1 ml de medio SOC a la cubeta (Bacto triptona al 2%, 0.5% Bacto extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucosa 20 mM) y se resuspendió rápida y suavemente con una pipeta Pasteur.

Se transfirió la suspensión celular a un tubo de microfuga y se incubó a 37°C y con agitación de 225 rpm por 1 h. Se plateó en medio selectivo (de acuerdo al plásmido electroporado) y se incubó a 37° C o.n. Para la aplicación de los pulsos se utilizó un MicroPulser™ de Bio-Rad.

2.4.3 Técnica de Transducción por P₁_{vir}

Las transducciones se llevaron a cabo usando P₁_{vir} como está descrito por Silhavy *et al.* (1984). P₁_{vir} es una variedad de P₁, que no puede formar lisógenos.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.4.3.1 Preparación de Lisados Transducidos.

Se creció un o.n. de la cepa receptora en LB suplementado con CaCl_2 5 mM y los antibióticos correspondientes. Se centrifugó el cultivo y se resuspendió la pastilla en la mitad del volumen de LB + CaCl_2 5 mM. A 100 μl de células resuspendidas se les agregó igual cantidad de bacteriófago. Se incubaron a 37° C sin agitación por 20 min.

Se agregaron entonces 200 ml de LB + CaCl_2 5 mM, y se agitaron fuertemente (vórtex). Se incubaron a 37° C y con agitación de 300 rpm de 2-4 h. Se observó que el control crece, mientras que los otros están lisados. Se removieron los restos celulares por centrifugación a 14 000 rpm por 5 min. Se pasó el sobrenadante a tubos nuevos sin tocar la pastilla. Se agregó 200 μl de CHCl_3 y se agitó 30 s (vórtex). Se guardaron los lisados a 4° C.

2.4.3.2 Transducción por P1_{vir}

Se creció la cepa receptora o.n. en LB suplementado con CaCl_2 5 mM. Se centrifugó el cultivo y resuspendimos la pastilla en la mitad del volumen del MgSO_4 10mM. Se diluyó el lisado en MgSO_4 10mM de 10^0 a 10^{-4} . A tubos con 100 μl de células, se le agregaron 100 μl del fago diluido. Se incubaron como controles otros dos tubos, uno sin células y otro sin fago. Se incubaron todos los tubos a 37° C por 20 min. Se centrifugó y quitó el sobrenadante con pipeta. La pastilla se lavó 3 veces: Se agregó 1 ml LB, resuspendiendo con pipeta. Se centrifugó y se tiró el sobrenadante en frasco que se esterilizó posteriormente. Después de lavar, se agregó a la pastilla 1 ml de LB y se resuspendió. Se incubó a 37° C, con agitación de 450 rpm por 1 h. Finalmente, se centrifugaron las células y resuspendimos en 80 μl de MgSO_4 10 mM. Se platearon en el medio selectivo apropiado.

2.4.4 Transferencia de Fusiones *x-lacZ* de Plásmido a λ RS45

Las transducciones se llevaron a cabo usando λ RS45 como está descrito por Simons *et al.* (1987).

2.4.4.1 Aumentar el Título del Lisado de λ RS45 en una Cepa con el Plásmido con la Fusión.

Se inoculó 5 ml de LB con antibiótico (ampicilina) con una colonia de la cepa con el plásmido que contiene la fusión. Se dejó agitando o.n. a 37°C. Para obtener placas aisladas de λ RS45 al platear diluciones del lisado λ RS45 en agar suave usando como células a lisar a MC4100.

Se obtuvo un jardín de células al agregar 100 μ l de una suspensión de células en $MgSO_4$ (se centrifugó un cultivo o.n. de MC4100 a 14 krpm y se resuspendió en la mitad del volumen de $MgSO_4$) y 10 μ l de diluciones del lisado de λ RS45 (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} en amortiguador de dilución λ : Tris 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 5 mM y NaCl 50 mM a pH 7.5) a 3 ml de TB agar suave calentado en baño maría a 70°C. Se agitó 10 s con vórtex y se vertió en cajas de medio para fago λ Xgal. Se usó como control 1 caja sin lisado y una caja sin células. Donde la caja sin lisado mostró un jardín de células blancas y la caja sin células no mostró ninguna célula. Se incubó 4 h a 37°C en una cámara húmeda hasta ver placas azules.

Para recuperar las placas azules y aumentar el título del fago, se picaron las placas azules con pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo de ensaye estéril con 3 ml de LB + $MgSO_4$ 10 mM. Se agitó con vórtex 5 s y se hicieron diluciones 10^{-2} y 10^{-4} de ésta en LB + $MgSO_4$ 10 mM. Se hicieron nuevamente jardines de células como indiqué arriba, con 10 μ l de cada dilución y se incubaron a 37°C en una cámara húmeda hasta ver placas azules.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Para preparar los lisados, se recuperaron placas azules con una pipeta Pasteur estéril y se agregaron de 1-3 placas a células (de un cultivo o.n. de MC4100 resuspendido en MgSO_4 10 mM). Se agitó con vórtex y se dejó 5 min a t.a.

Se agregó 2 ml de LB + MgSO_4 10 mM y se incubó a 37°C con agitación hasta observar lisis. Se agregó 100 μl CHCl_3 y se agitó con vórtex durante 10 s. Se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó 10 min. Se recuperó sobrenadante y se agregó 100 μl de CHCl_3 , agitando con vórtex 10 s. Se centrifugó 10 min y se cambió el sobrenadante a otro tubo eppendorf. Estos lisados se guardaron a 4°C.

2.4.4.2 Transducción Cepa Receptora con Fago λ con $\Phi(\text{adhE}^+ \text{-} \text{lacZ})$

Se resuspendió un cultivo o.n. nuevo de la cepa receptora en la mitad de volumen de MgSO_4 10 mM. A 4 tubos por cada lisado: se agregó 100 μl de células, y 10 ó 20 μl del lisado. Teniendo como control un tubo solamente con células y un tubo solamente con bacteriófagos. Se agitó 10 s con vórtex y se dejó incubando a t.a. 12 min. Se agregó 1 ml de LB y se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 min. Se recuperó la pastilla y se desechó el sobrenadante. Se lavó 2 veces la pastilla con LB y se resuspendió en 1 ml de LB. Se hicieron diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} en LB y se plateó 100 μl de cada dilución en placas de LBXgal. Se incubó o.n. a 37°C y se sembraron las colonias azules obtenidas.

2.4.5 Obtención de Mutantes Supresoras Espontáneas

El protocolo de la obtención de mutantes supresoras se diseñó para que fuera posible valorar estadísticamente la aparición de éstas por cepa analizada.

2.4.5.1 Obtención de Mutantes Supresoras Espontáneas

Se inocularon 3 ml de LB con 1/200 de preinóculos de cada cepa en LB o MM. Se crecieron a 30°C ó 37°C y con agitación de 200 rpm hasta que los cultivos llegaron a fase log (OD_{600} entre 0.4 y 0.6), se hicieron diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} en $MgSO_4$ 10 mM. Se platearon en cajas de MM casaminoácidos o LB las diluciones de 10^{-4} ó 10^{-6} .

Se incubaron anaeróbicamente a 37°C durante 5 días o aeróbicamente a 37°C por 36 h. Las colonias que crecieron anaeróbicamente se sembraron y se dejaron crecer 60 h en las mismas condiciones para verificar que si fueran mutantes supresoras. Se eligieron 6 colonias de la cepa JMH0510 (cepas JMH0540 a JMH0545); 10 colonias de la cepa JMH0511 (cepas JMH0552 a JMH0557 y JMH0577 a JMH0580).

2.4.5.2 Estadística de Mutaciones

Se hicieron los experimentos tres veces por duplicado. Se calculó el porcentaje de colonias de mutantes supresoras obtenidas anaeróbicamente contra el número de colonias obtenidas aeróbicamente, teniendo como control positivo a la cepa parental (MC1061 ó JRG780).

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.5.1 Síntesis de Primers de Oligo-nucleótidos

Se diseñaron primers de oligo-nucleótidos de aproximadamente 25 a 30 bp de longitud. El fabricante de los primers fue la casa comercial Gibco-BRL. En la Tabla 9 se muestran los primers usados en este estudio.

Tabla 9. Secuencia de oligo-nucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gene de alineamiento / Referencia
Gret1	TGA GTC GAC GAA TTC AGA TTC AGG GGG CC	<i>adhE</i> / Leonardo <i>et al.</i> , 1993
Gret2	TGC CAT GGA TCC GCG ACA TTA GTA ACA GCC AT	<i>adhE</i> / Leonardo <i>et al.</i> , 1993
LacZ-rev	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC G	<i>lacZ</i> / Dr. Jorge Membrillo- Hernández U.N.A.M.
LacZ (seq)	GGG GGA TGT GCT GCA AGG CG	<i>lacZ</i> / Dr. Jorge Membrillo- Hernández U.N.A.M.
Adh5'N	CAA TGG AAT TCC CAC AAA GAA ACC AAA CAG	<i>adhE</i> / Este trabajo
AdhE3' 500	TTG AGG ATC CCA GCC GAT CAG ATC TTT CGG	<i>adhE</i> / Este trabajo
AdhE3' 1000	CAG AGG ATC CGA CAG TTT TTC ATG TGC	<i>adhE</i> / Este trabajo
AdhE3' 1560	GGA GGG ATC CAG TTC TGC ACC TTT ACG AAC	<i>adhE</i> / Este trabajo
AdhE3' 2000	AGA GGG ATC CGA TGC CAG TAC AGA AAC ATA	<i>adhE</i> / Este trabajo

2.5.2 Amplificación del DNA.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer). Se agregaron a un tubo estéril de PCR: aproximadamente 10 ng del templado genómico de DNA (1 μ l), 2 μ M de cada primer (40 pM), 10 μ l amortiguador 10x *Pfu* (PROMEGA), 78 μ l agua estéril bidestilada y 5 μ l de dNTP (BRL). Se centrifugó el tubo por 5 s, para asegurar que todos los componentes estuvieran en contacto. Se agregó 2 μ l de *Pfu* DNA Polimerasa y se mantuvo en hielo hasta entrar al termociclador.

Alternativamente, se agregaron a un tubo estéril de PCR: 2 μ l de templado genómico de DNA (20 ng), 2 μ l de cada primer (40 pM), 19 μ l Platinum PCR Supermix (Gibco BRL), que contiene la enzima Taq Polimerasa, dNTPs y amortiguador. Se centrifugó el tubo por 5 s, para asegurar que todos los componentes estuvieran en contacto. Se mantuvo en hielo hasta entrar al termociclador, utilizando el programa de la tabla 10.

Alternativamente, se agregaron a un tubo estéril de PCR: templado genómico de DNA (2 ng), 4 μ l de cada primer (40 μ M), 5 μ l amortiguador 10x *Pfx* (PROMEGA), 2 μ l $MgSO_4$ 50mM, 31.5 μ l agua PISA (estéril bidestilada), 1.5 μ l de dNTP (BRL) y 1 μ l Platinum *Pfx* DNA Polimerasa (5 unidades/ μ l). Se centrifugó el tubo por 5 s, para asegurar que todos los componentes estuvieran en contacto. Se mantuvo en hielo hasta entrar al termociclador, utilizando el programa de la tabla 10.

Para escoger el programa adecuado, se tomaron en cuenta las T_m de los oligo-nucleótidos de cada reacción de termociclación, se determinó la temperatura de alineamiento (5°C debajo de la T_m del oligo-nucleótido con menor T_m). El tiempo de la extensión se determinó de acuerdo al tamaño del fragmento esperado, asumiendo una extensión de 1 kb por min. La temperatura de extensión para la Taq polimerasa es de 72°C.

Control post-transcripcional del gene *adhE* en *E. coli*

Tabla 10. Programa utilizado en el PCR.

Ciclos (#)	Temperatura (° C)	Tiempo (min.)	Función
1	95	1	Separar las cadenas
40	94	1	Desnaturalizar
	58	1.5	Alinear
	72 (68 para <i>pfu</i>)	2	Extender
1	72 (68 para <i>pfu</i>)	10	Última extensión
1	25	25	Enfriamiento

Cada muestra (5 µl) se verificó por electroforesis de geles de agarosa al 1%.

2.5.3 Purificación de Productos de PCR.

2.5.3.1 Purificación de Enzimas de PCR del Producto del PCR

Después de someter la reacción de PCR a electroforesis de agarosa al 1% (Bio-Rad; ver sección 2.3.4.), se cortó la banda del producto de PCR (fragmento de DNA) y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se le agregaron 3 volúmenes del amortiguador QG por cada volumen de gel (100 mg ~ 100 µl). Se incubó a 50° C por 10 min (hasta que el gel estaba completamente disuelto), con agitación. El color de la disolución debe ser amarillo, indicador de pH<7.5, en caso de ser violeta, agregar 10 µl de CH₃COONa 3M. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló. Se colocó una columna QIAquick spin en un tubo colector. Para unir el DNA, vertemos la mezcla en la columna y centrifugamos 1 min. Se descartó el sobrenadante y se colocó nuevamente la columna en el tubo. Se lavó la columna con 750 µl de amortiguador PE (Etanol al 96%) y se centrifugó 1 min. Se descartó el líquido y se centrifugó la columna 3 min más a 10 000 g, para remover completamente el etanol. Se colocó la columna QIAquick en un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio. Para eluir el DNA, se agregó 50 µl amortiguador EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) al centro de la columna y se centrifugó por 1 min.

Para clonar los productos de PCR fue precedido por la construcción de los vectores pRS414 y pRS415. Para esto, ambos vectores fueron digeridos en BamHI y EcoRI como está descrito en 2.3.2.1. y ligados con los productos de PCR como está descrito en 2.3.2.2.

2.5.3.2 Purificación de Enzimas de Restricción del Producto del PCR

Cuando el producto de PCR obtenido en II.5.2, se sometió a una digestión, la purificación de las enzimas de restricción siguió el siguiente protocolo:

El fragmento de DNA obtenido se purificó utilizando el protocolo descrito por QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). La banda del fragmento de DNA se cortó y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml . Se le agregaron 5 volúmenes del amortiguador PB por cada volumen de la reacción de PCR y se mezcló. Se colocó una columna QIAquick spin en un tubo colector, se virtió la muestra y se centrifugó a 14 000 rpm de 30 a 60 s. La alta concentración de sales deja pasar los contaminantes a través de la columna mientras ésta adsorbe al DNA a la columna de QIAquick (membrana de sílica-gel). Se descartó el líquido y se colocó nuevamente la columna en el tubo. Se lavó con 750 μ l de amortiguador PE (Etanol al 96%) y se centrifugó de 30 a 60 s. Se descartó el líquido y se centrifugó la columna 1 min más a 10 000 g, para remover completamente el etanol. Se colocó la columna QIAquick en un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio. Para eluir el DNA, se agregaron 50 μ l amortiguador EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) al centro de la columna y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min.

3 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS

3.1 Introducción

La actividad de dos RNasas regula la traducción del mRNA de *adhE*, la RNasa III y la RNasa G. Datos obtenidos por Aristarkhov *et al.* (1996) sugieren que la actividad de la RNasa III se requiere para la liberación del sitio de unión al ribosoma (RBS) del mRNA de *adhE*. Por otro lado, reportes del grupo de Masaaki Wachi (Umitsuki *et al.*, 2001) en la Universidad de Tokio han demostrado que la actividad de la RNasa G degrada el transcrito de *adhE* de forma específica.

Para estudiar la regulación post-transcripcional de *adhE*, usamos una mutante afectada en la RNasa G (*mg::cat*), construimos una mutante en la RNasa III (*mc::tet*), y dobles mutantes –en ambas RNasas (*mc::tet mg::cat*), utilizando en todos los casos la cepa parental MC1061 (Tabla 6).

Se eligió la cepa MC1061 como cepa parental, debido a que esta cepa tiene una mayor expresión de AdhE. Un reporte reciente del grupo de Wachi (Kaga *et al.*, 2002) demostró que el gene *adhE* de la cepa MC1061 acarrea una mutación puntual en la secuencia de unión al factor transcripcional negativo Cra, lo que resulta en un incremento del 40% de *adhE* sobre otras cepas parentales (Diagrama 1).

Para estudiar la expresión de AdhE, requeríamos un monitor que nos permitiera observar a simple vista o cuantitativamente la cantidad de transcrito traducido en las diferentes cepas construidas. Para esto, transformamos las cepas anteriores con plásmidos miniF (pALF1) o con plásmidos derivados de pRS414 [pΦ(*adhE*'-'*lacZ*)]. Ambos plásmidos tienen una fusión traduccional *adhE*'-'*lacZ* (que da lugar a una proteína híbrida) y una resistencia a ampicilina que nos permitió monitorear la presencia de los plásmidos en las cepas.

El transcrito de la proteína monitor AdhE'-LacZ usada para estudiar la actividad post-transcripcional de AdhE contiene 942 bp del promotor de *adhE* y 9 bp del gene estructural de *adhE*, en fase con el noveno codón del gene estructural *lacZ*. Con esta construcción, únicamente el RBS de *adhE* es utilizado para traducir la proteína híbrida. El RBS de *adhE* está ocluido por un apareamiento de bases intramolecular que necesita la digestión de la RNasa III para ser traducido (Fig. 13; Aristarkhov *et al.*, 1996). Este bloqueo está dado por la estructura secundaria del transcrito determinada por la secuencia de bases nucleotídicas que conforman el mRNA.

Una mutante en *adhE* es incapaz de crecer en MM anaeróticamente, pues la célula no puede deshacerse del exceso de equivalentes redox (NADH) producidos en la fermentación a partir de glucosa. AdhE ocupa dos moléculas de NADH para producir una molécula de etanol a partir de una molécula de acetil-CoA, permitiendo el crecimiento en MM anaeróticamente. De esta forma se reciclan los NADH producidos en la fermentación.

Por lo tanto, fenotípicamente una mutante *adhE* es similar a una mutante *mc* en su deficiencia de AdhE. Por otro lado, una mutante en la RNasa G produce más AdhE que la cepa parental, pues el transcrito de *adhE* se degrada mucho más lento que en la cepa parental. En una doble mutante *mg mc*, el transcrito de *adhE* se acumula, pues no es degradado por la RNasa G ni traducido por la RNasa III.

Al obtener mutantes supresoras de las cepas JMH0510 (MC1061 *mc::tet*) y JMH0511 (MC1061 *mg::cat mc::tet*) que adquirieran la capacidad de crecer en MM anaeróticamente, puede deberse a:

- a) Que otra RNasa actúe sobre el mRNA de *adhE* y libere el RBS de *adhE*.
- b) Que se sobreexpresa otra vía metabólica ajena a AdhE que recicle el exceso de equivalentes reductores.
- c) Que la transcripción de *adhE* sufra un cambio e inicie en un punto tal que no se requiera la acción de RNasa alguna para su traducción.

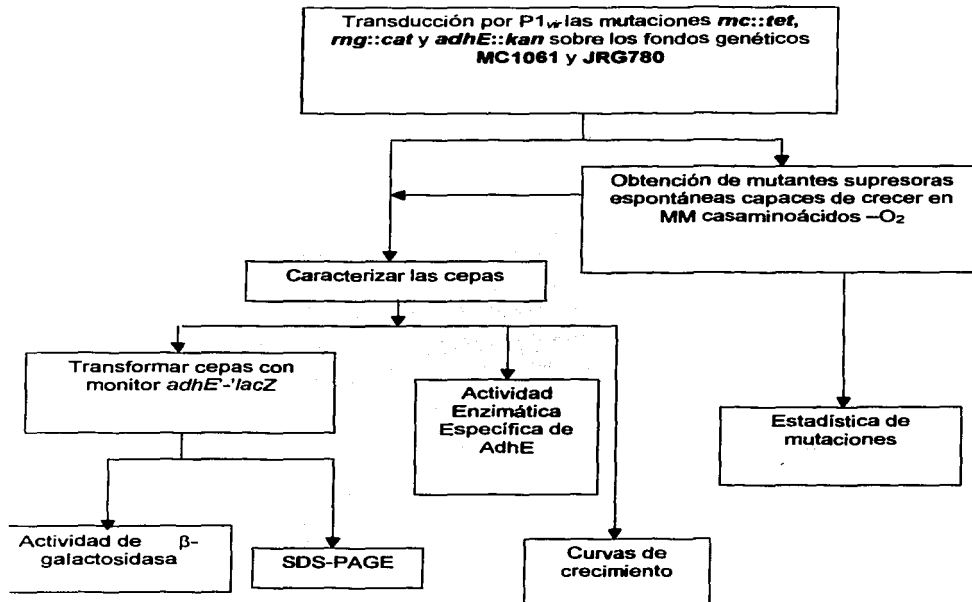
La metodología de este análisis se basa en la comparación del número de células que crecen aeróticamente y el número de mutantes supresoras que crecen anaeróticamente en MM después de 5 días de incubación a 37°C. Se utilizó como control experimental a las mutantes supresoras obtenidas de la cepa parental afectada en *adhE* [JMH0530 (MC1061 *adhE::kan*)]. Estas mutantes supresoras necesariamente tienen que deberse a la explicación del inciso b) de nuestra hipótesis.

Una de las opciones más viables que podrían apoyar a la opción b) de nuestra hipótesis es que probablemente *E. coli* se sobreponga a la necesidad de desechar equivalentes reductores sobreexpresando la vía metabólica de síntesis de succinato, perteneciente también a las vías fermentativas. Existen dos razones que nos llevan a pensar en esta posibilidad:

1) La síntesis de succinato (uno de los productos de fermentación) se da a partir de fumarato por medio de la acción de la enzima fumarato reductasa (ver número 14 Fig. 7), que consume un equivalente reductor por reacción. Y 2) David Clark y colaboradores (Chatterjee *et al.*, 2001) demostraron que una mutante afectada en la fermentación de glucosa (*pfl::cat ldhA::kan*) podía escapar de este defecto sobreexpresando la biosíntesis de succinato. La mutación supresora fue detectada en el gene *ptsG* que codifica para la permeasa EIIICB^{9c}. Sin embargo, no fueron reportados datos enzimáticos que demuestran el mecanismo de sobreproducción de succinato.

Para probar esta hipótesis agregamos al experimento una cepa mutante en el gene *frd* que codifica para la fumarato reductasa. Así, si obtenemos mutantes supresoras en los fondos genéticos *adhE::kan frd* ó *mc::tet frd*, se deberán a un mecanismo diferente a la sobreproducción de succinato. Para obtener el alelo *frd* se utilizó la cepa JRG780, amablemente provista por el Dr. Jeff Green de la Universidad de Sheffield (Reino Unido; Diagrama 1).

Diagrama 1. Obtención de cepas y caracterización de las mismas



Mi objetivo fue obtener mutantes en *mc::cat*, *mg::cat*, *adhE::kan* sobre un banco genético sobreproductor de AdhE o sobre una cepa *frd-*, para estudiar la regulación traduccional de *adhE*. Construir la fusión monitora *adhE'-lacZ* en plásmidos de bajo número de copias, unicopia o en el cromosoma.

3.2 Resultados e Interpretación

Para la construcción de las cepas *mc::tet*, *rg::cat* y/o *adhE::kan*, se produjeron los lisados de las cepas JMH0042 (MC4100 *mc::tet*), GM11 (MC1061 *mg::cat*) y JMH0104 (MC4100 *adhE::kan*) respectivamente con P1_{wr}, como está descrito en material y métodos. Para obtener las dobles mutantes transdujimos los mismos lisados sobre las mutantes sencillas obtenidas anteriormente, obteniendo las mutantes en *mc::tet mg::cat*, *mc::tet adhE::kan* y la doble mutante *mg::cat adhE::kan*. Para revisar que las mutantes obtenidas provinieran de la cepa parental, sembramos e incubamos a 37°C aeróbicamente a las mutantes tanto en MMXgal y MMXgal + casaminoácidos. La cepa MC1061 no puede crecer en MM pues es un auxótrofo de leucina.

Como la mutante en *frd* no tiene un marcador de antibiótico para seleccionar, usamos esta cepa como receptora de las mutaciones en *mc::tet*, *mg::cat* y/o *adhE::kan*. Para verificar que si fueran transductantes en la cepa *frd-*, sembramos las mutantes en MM GF más el antibiótico correspondiente e incubamos a 37°C anaeróbicamente, donde una mutante en *frd* es incapaz de crecer. Para verificar que tuvieran las mutaciones transducidas, sembramos las mutantes en MM casaminoácidos 0.2% y las dejamos 72 h a 37°C anaeróbicamente. Donde las mutantes en *mc::tet* ó en *adhE::kan* no crecieron y las mutantes en *mg::cat* crecieron muy bien. La tabla de cepas está en el cap. 2.

Para la construcción de la cepa merodiploide JMH0563 [MC1061 *attB::Φ(adhE'-lacZ)*] produjimos el lisado del plásmido pΦ(*adhE'-lacZ*) con el fago λRS45, como está descrito en material y métodos. Transducimos entonces a MC1061 con este lisado. Seleccionamos a las colonias que fueran Ap^s y tuvieran coloración azul al ser sembradas en Xgal. Usando a JMH0563 como cepa parental, la transdujimos por P1_{wr} con los lisados de *mc::tet*, *mg::cat*, *adhE::kan*. Sobre estas cepas transdujimos los lisados para construir las dobles mutantes (*mc::tet mg::cat*, *mc::tet adhE::kan*, *mg::cat adhE::kan*). Se verificó nuevamente que las cepas crecieran en MM + casaminoácidos aeróbicamente más no en MM.

Para obtener cepas mutantes supresoras en los fondos genéticos descritos, se sembraron aproximadamente 1000 colonias (por dilución) en placas de MM casaminoácidos tanto aeróbicamente como en jarras de anaerobiosis a 37°C por cinco días.

En todos los casos, se obtuvieron colonias en las cajas anaeróbicas que comenzaron a aparecer después de cuatro días de incubación en anaerobiosis (mutantes supresoras).

Para verificar si las mutantes supresoras readquirieron la capacidad de sintetizar AdhE, se utilizó como monitor a la proteína híbrida AdhE'-LacZ presente en el plásmido unicopia (pALF1). Además utilizamos a la cepa merodiploide JMH0563 [MC1061 *attB::Φ(adhE'-lacZ)*] como cepa parental en algunos casos.

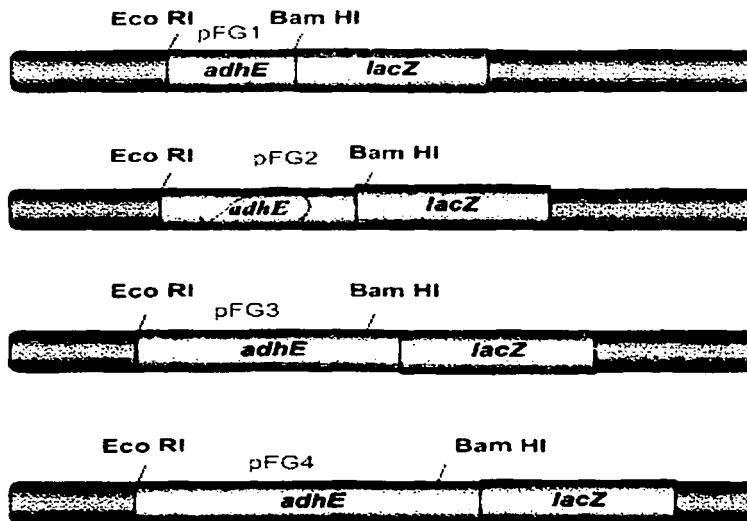


Fig. 14. Clonas construidas que codifican para proteínas híbridas. Esquema de los fragmentos obtenidos por PCR, cortados con BamHI y EcoRI y ligados en pSK y subclonados en pRS414, ambos cortados a su vez con BamHI y EcoRI. Estas reacciones de ligación fueron clonadas en la cepa parental y en las cepas obtenidas en este estudio. Para más información ver cap. 6.

Como se ha mencionado, la explicación más aceptada acerca del requerimiento de la actividad de la RNasa III para la traducción del transcrito de *adhE* es que el extremo 5' no traducible del RNA de *adhE* forma una estructura secundaria que bloquea la accesibilidad del RBS. Sin embargo, estudios de predicción de estructuras secundarias de mRNA de la molécula completa del transcrito no se han realizado. Por ello, decidimos también realizar construcciones de proteínas híbridas AdhE'-LacZ que contengan diferentes longitudes del gene estructural *adhE*. La obtención de estos monitores nos serviría para estudiar la regulación post-transcripcional de AdhE más a fondo. La construcción de los plásmidos pSK1-4 y de pFG1-4 está descrita en la Fig. 14.

La obtención de las cepas a estudiar por medio del uso de bacteriófagos así como la caracterización de las mutaciones introducidas en el cromosoma sembrando en medios selectivos y comparando con la cepa parental, nos permitió contar con las herramientas necesarias para estudiar cómo se regula post-transcripcionalmente el transcrito de *adhE*. Resultados de actividades enzimáticas, gels de proteínas y análisis posteriores son presentados en los siguientes capítulos.

4 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

La caracterización de las cepas es fundamental para verificar que tienen las construcciones debidas y establecer su comportamiento fisiológico en crecimiento en diferentes medios de cultivo. Para ello se determinaron tanto las actividades enzimáticas de AdhE como su actividad de β -galactosidasa, ésta última como monitor de la actividad traduccional de la fusión $\Phi(adhE'-lacZ)$. Adicionalmente, la caracterización en geles de proteínas (SDS-PAGE) fue realizada para verificar la presencia de la proteína híbrida AdhE'-LacZ.

4.1 Resultados

4.1.1 Transformantes

La presencia de los plásmidos $p\Phi(adhE'-lacZ)$ y pALF1 fue corroborada mediante la selección de colonias resistentes a ampicilina después del proceso de transformación (ver Material y Métodos). La funcionalidad de las fusiones genéticas fue demostrada en primera instancia por la coloración azul de las colonias sembradas en medios sólidos suplementados con X-gal (un sustrato incoloro de la β -galactosidasa que al ser hidrolizado adopta una coloración azul). En la Tabla 11 se describen los fenotipos observados en placas suplementadas con X-gal de varias cepas.

Sorprendentemente, las mutantes *mc::tet* transformadas con el plásmido pALF1 o con el $p\Phi(adhE'-lacZ)$ dieron una coloración azul en placas suplementadas con X-gal (ver Tabla 11). Nuestra predicción era que serían blancas debido al requerimiento del transcrito de *adhE* por la actividad de RNasa III. Esto implica que nuestro monitor de traducción está escapando a éste requerimiento. Quizás al estar en un plásmido multicopia, algunas moléculas del mRNA del gene híbrido *adhE'-lacZ* escapan al requerimiento de la RNasa III.

Tabla 11. Fenotipo observado en cepas con $p\Phi(adhE'-lacZ)$ ó pALF1 en placas de LB suplementadas con X-gal.

Cepa transformada con pALF1 ó $p\Phi(adhE'-lacZ)$	Fenotipo en LBXgal
MC1061	Azul
GM11 (<i>mg-</i>)	Azul más intenso
JMH0510 (<i>mc-</i>)	Azul pálido
JMH0511 (<i>mg- mc-</i>)	Azul pálido
JMH0512 (<i>rnc- mg-</i>)	Azul pálido

4.1.2 Transductantes

Para descartar esta posibilidad, construimos la cepa merodiploide JMH0563 [MC1061 ($\Phi(adhE\text{-}'lacZ)$)]. Usando ésta como cepa parental, la transdujimos con las mutaciones *mc::tet*, *mg::cat*, y *adhE::kan*. Sobre estas cepas transdujimos los lisados para construir las dobles mutantes (*mc::tet mg::cat*, *mc::tet adhE::kan*, *mg::cat adhE::kan*). Sin embargo, el fenotipo observado en la cepa merodiploide es el mismo que el de las cepas transformadas con el plásmido que contiene la fusión monitora. Ensayos enzimáticos de AdhE revelarán si la fusión es la que escapa o el gene estructural también. Los resultados de dichos experimentos se encuentran en la sección 4.3.3.

La transducción con lisados de P1_{vr} dio lugar a la obtención de cepas resistentes al antibiótico del lisado y que daban las características fenotípicas descritas antes (ver sección 3.3.). Así, la cepa MC1061 y todas las transductantes derivadas de ésta necesitan MM con leucina (MM + casaminoácidos) para crecer aeróbicamente, característica observada en la cepa receptora.

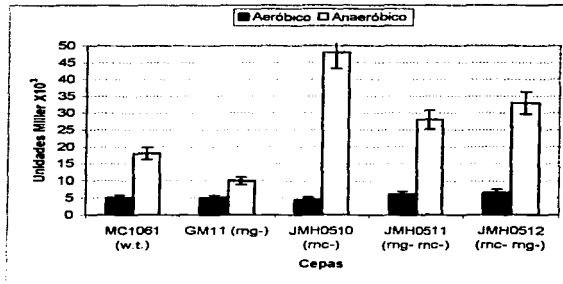
Por otro lado, las mutantes en la RNasa III (tanto las mutantes sencillas como dobles) no son capaces de crecer en MM + casaminoácidos anaeróbicamente después de ser incubadas 72 horas a 37°C. El mismo fenotipo fue observado en la cepa MC1061 *adhE*. Las mutantes transducidas con el lisado de la cepa GM11 (*mg::cat*), son capaces de crecer en estas condiciones.

4.1.3 Ensayos de β -galactosidasa y Actividad Enzimática AdhE.

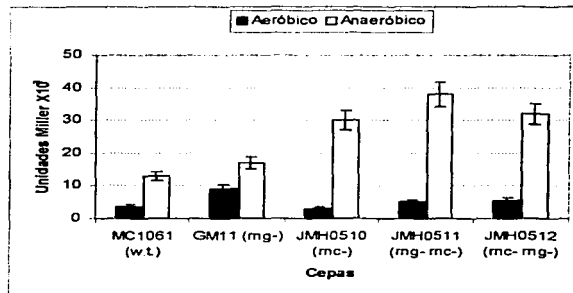
Tanto los ensayos de β -galactosidasa como las actividades enzimáticas de AdhE se llevaron a cabo como está descrito en material y métodos.

Como podemos ver en las gráficas 1-2 y 3-4, la expresión del monitor ($\Phi(adhE\text{-}'lacZ)$) en unidades Miller no concuerda con lo esperado de la expresión del gene. Ya que en las cepas *mc* vemos una alta expresión del monitor, aunque estas cepas son incapaces de crecer en MM + casaminoácidos, estos resultados nos indican que la expresión de β -galactosidasa como monitor del promotor de AdhE en plásmidos unicopia y multicopia no es representativo de la actividad enzimática de AdhE.

Así, parece ser que la proteína híbrida no es regulada transcripcionalmente de la misma manera que el transcrito de *adhE*. Para confirmar que el fenotipo de no crecimiento de las cepas con la mutación en la RNasa III concordara con una actividad baja o no detectable de AdhE, realizamos las Actividades Enzimáticas Específicas de AdhE.

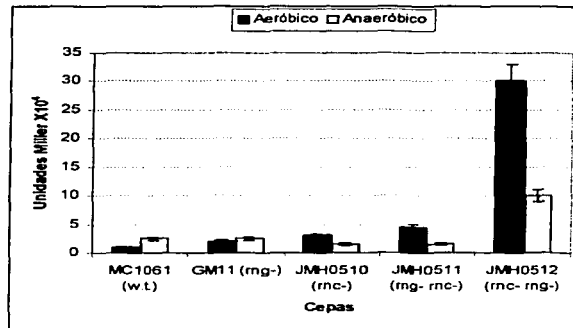
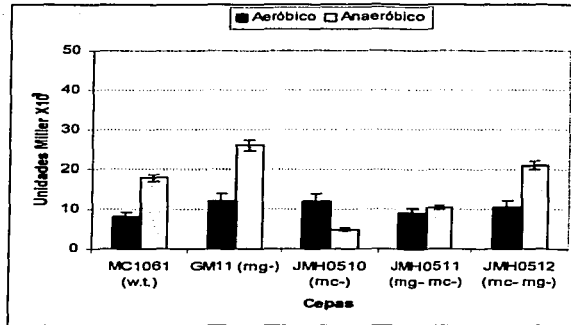


Gráfica 1. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pALF1 - ($\Phi(adhE'$ - $'lacZ)$) crecidas en LB a 37°C. Las barras negras pertenecen a la actividad de β -galactosidasa aeróbicamente y las barras grises anaeróbicamente. Podemos notar que en todos los casos, la actividad anaeróbica es mayor que la aeróbica, sin embargo, la actividad observada no corresponde a la esperada. Se muestra la desviación estándar de tres experimentos realizados independientemente por triplicado.



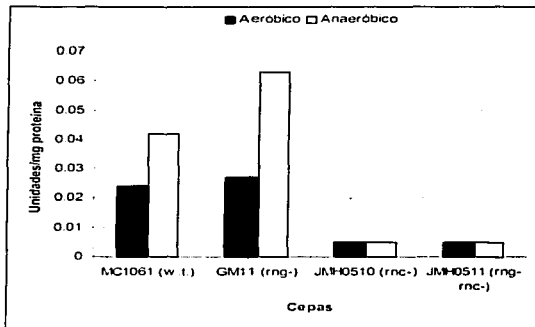
Gráfica 2. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pRS414 - ($\Phi(adhE'$ - $'lacZ)$) crecidas en LB a 37°C. Las barras negras pertenecen a la actividad de β -galactosidasa aeróbicamente y las barras grises anaeróbicamente. Podemos notar que en todos los casos, la actividad anaeróbica es mayor que la aeróbica, sin embargo, la actividad observada no corresponde a la esperada. Se muestra la desviación estándar de tres experimentos realizados independientemente por triplicado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 3 y 4. Actividad de β -galactosidasa de cepas transformadas con pALF1 ó pRS414 - (Φ (*adhE-lacZ*)) crecidas en MM casaminoácidos a 37°C. Las barras negras pertenecen a la actividad de β -galactosidasa aeróbicamente y las barras grises anaeróbicamente. En la gráfica 3, en todos los casos, la actividad anaeróbica es mayor que la aeróbica, sin embargo, esto no es para la Gráfica 4. La actividad observada no corresponde a la esperada. Se muestra la desviación estándar de tres experimentos realizados independientemente por triplicado.

Por otro lado, al observar las gráficas de actividades enzimáticas específicas de AdhE, observamos el patrón esperado. Donde tanto MC1061 como GM11 tienen actividad de AdhE, mientras que las cepas JMHO510 (*rnc-*) y JMHO511 (*rnc- rng-*) no presentan actividad de AdhE. Estos resultados concuerdan con el fenotipo observado, donde las primeras 2 cepas crecen muy bien en esas condiciones mientras que las mutantes en *rnc-* (*rng-*) no crecen. Observamos que al ser actividades específicas, no importa que las cepas estén transformadas con el plásmido unicopia (pALF1) ó bajo número de copias (p(Φ)-*adhE'-lacZ*)).



Gráfica 5. Actividades Específicas AdhE en cepas con pRS414-(Φ)-*adhE'-lacZ*) crecidas en MM casaminoácidos. Las barras negras pertenecen a la actividad enzimática aeróbica y las barras grises a la actividad AdhE anaeróbica. Los resultados obtenidos corresponden a lo esperado. Resultado de un solo experimento realizado por triplicado.

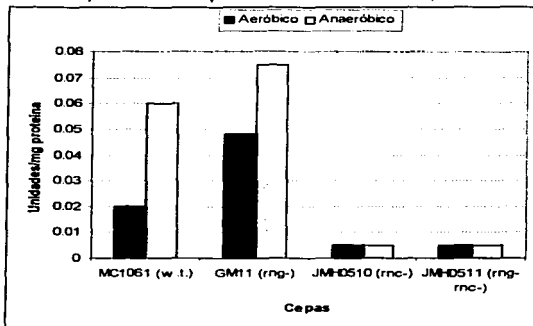
4.1.4 Electroforesis en Geles (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles (SDS-PAGE) se llevaron a cabo como está descrito en material y métodos. En los geles 1-4 podemos observar proteínas de las mutantes construidas con y sin plásmido con la fusión monitora.

En los geles 1-2 observamos los geles s de cultivos crecidos en MM + casaminoácidos anaeróbicamente a 37°C. Los tres primeros carriles son el control de cada gel. Como podemos observar, la cepa GM11 sobre-expresa tanto a AdhE como a AdhE'-LacZ.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como era de esperarse tanto las cepas JMH0510, JMH0511 y JMH0512 no expresan AdhE. Sin embargo, algo que nos llamó mucho la atención es que en los carriles JMH0510b, JMH0511c, JMH0512b y JMH0512c, la proteína híbrida: AdhE'-LacZ escapa al requerimiento de la RNasa III. Estas cepas que vemos en el gel son mutantes supresoras, ya que tardaron 4 días en comenzar a crecer. El resultado que vemos en el gel nos hace pensar que estas mutantes supresoras no son en AdhE, ya que no vemos que ésta se exprese en ninguno de los patrones de proteínas de JMH0510, JMH0511 ó JMH0512.

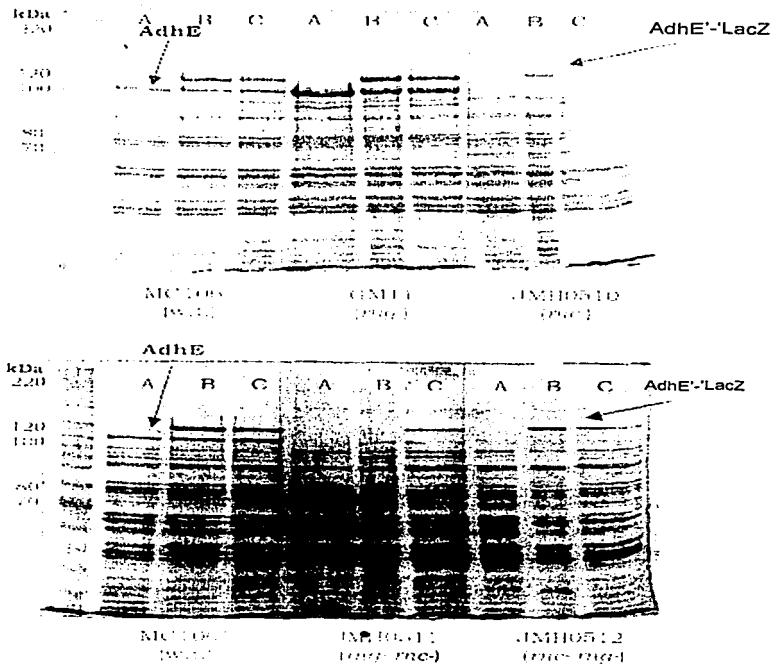


Gráfica 6. Actividades Específicas AdhE en cepas transformadas con pALF1-($\Phi(adhE'-lacZ)$) crecidas en MM casaminoácidos. Las barras negras pertenecen a la actividad enzimática aeróbica y las barras grises a la actividad enzimática AdhE anaeróbica. Los resultados obtenidos corresponden a lo esperado. Resultado de un solo experimento realizado por triplicado. Se observa el mismo patrón que en la gráfica 5.

En los gels 3-4 observamos los gels de proteínas de cultivos crecidos en MM + casaminoácidos aeróbicamente a 37°C. Los tres primeros carriles son el control de cada gel. Como podemos observar, la cepa GM11 sobre-expresa tanto a AdhE como a AdhE'-LacZ. Nuevamente vemos que tanto las cepas JMH0510, JMH0511 como JMH0512 no expresan AdhE.

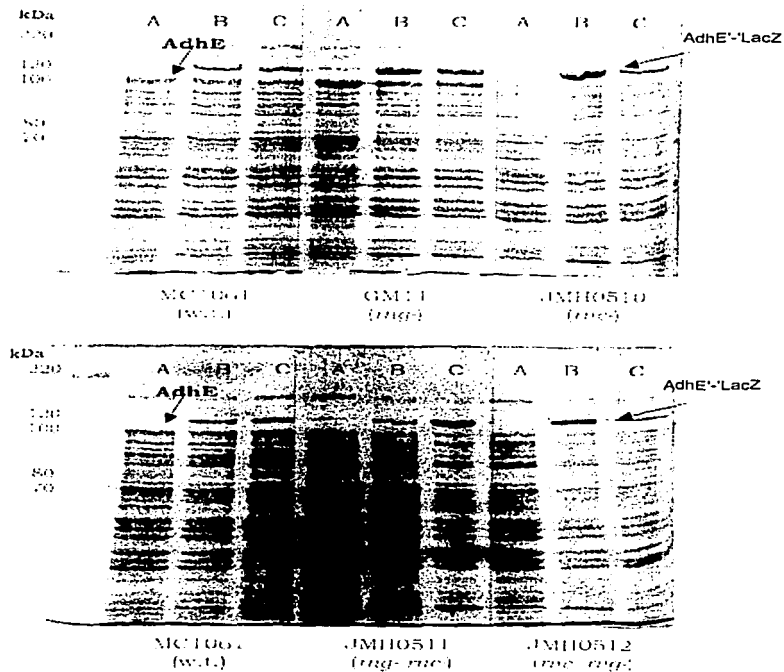
En este caso vemos que todos los carriles de las cepas JMH0510, JMH0511, JMH0512 transformados con alguno de los plásmidos muestran que la proteína híbrida: AdhE'-LacZ escapa del requerimiento de la RNasa III. Esto nos hace pensar que quizás las condiciones que se utilizaron para los crecimientos aeróbicos hacían que no fuera necesario el requerimiento de la RNasa III para traducir AdhE'-LacZ.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gel 1 y 2. Geles (SDS-PAGE) de cepas crecidas en MM líquido glucosa casaminoácidos anaeróbicamente a 37°C. Abajo del patrón de proteínas, se muestra el nombre de la cepa al que corresponde, así como el genotipo relevante. 1er carril, Marcador de peso molecular (kDa); A) cepa sin plásmido; B) cepa con plásmido unicopia pALF1; C) cepa con plásmido p(adhE'-lacZ). Se muestra AdhE y AdhE'-LacZ con flechas.

TESIS CON
 FOLIA DE ORIGEN



Gel 3 y 4. Geles (SDS-PAGE) de cepas crecidas en MM líquido glucosa casaminoácidos aeróbicamente a 30°C. Abajo del patrón de proteínas, se muestra el nombre de la cepa al que corresponde, así como el genotipo relevante. 1er carril, Marcador de peso molecular (kDa); A) cepa sin plásmido; B) cepa con plásmido unicopia pALF1; C) cepa con plásmido p1(adhE'-lacZ). Se muestra AdhE y AdhE'-LacZ con flechas.

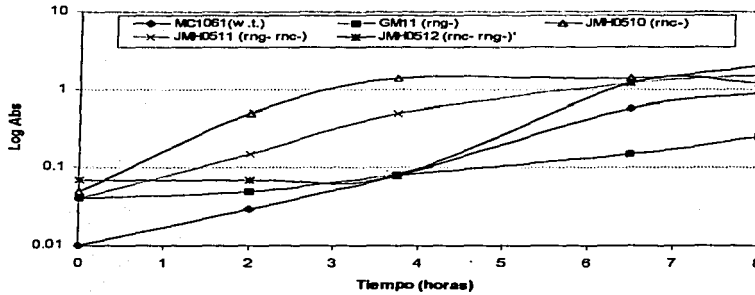
4.1.5 Curvas de Crecimiento

Como era de esperarse, el crecimiento fermentativo es mucho más lento que el aeróbico. Curiosamente la cepa GM11 (*mg-*) crece más lento que la cepa JMH0510 (*mc-*) en todos los casos. Por otro lado, las cepas transformadas con el plásmido $\rho(\Phi(adhE^-lacZ))$ -de bajo número de copias- crecen más lento que las mismas cepas transformadas con pALF1 -plásmido unicopia.

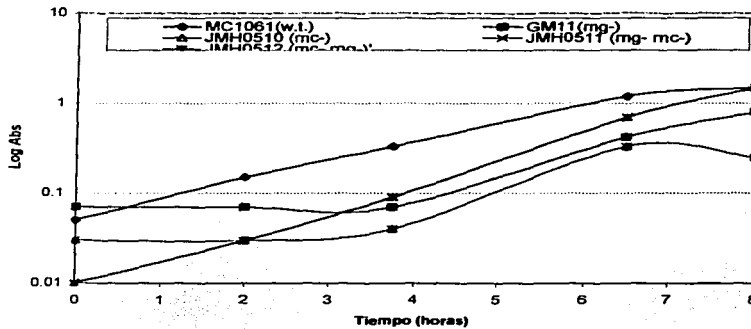
Tabla 12. Ecuaciones determinadas de las curvas de crecimiento aeróbicas obtenidas en MM + casaminoácidos o LB. Mutantes en *mc::tet* ó *mg::cat*, transformadas con plásmido de bajo número de copia ($\rho(adhE^-lacZ)$) ó unicopia (pALF1).

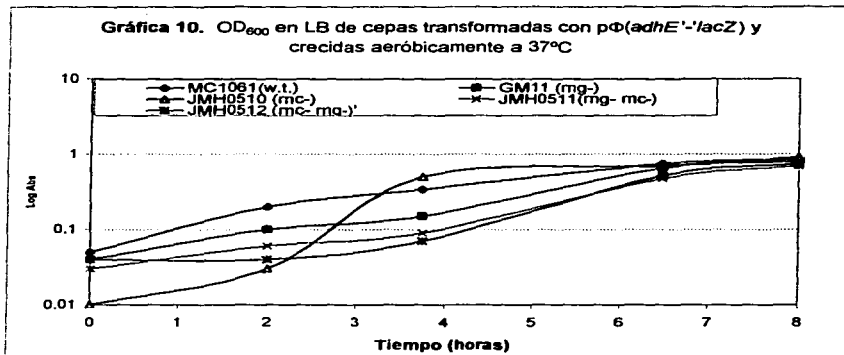
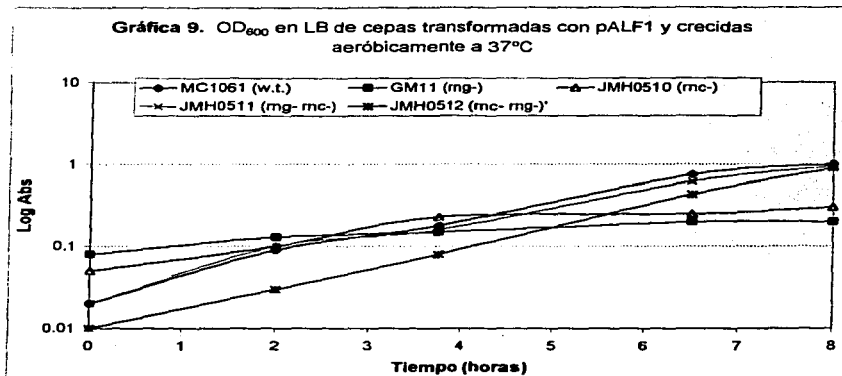
Medio de Cultivo	MM + casaminoácidos + antibióticos correspondientes									
	pALF1					$\rho(adhE^-lacZ)$				
Ecuación tipo $y=ae^{bt}$ /Cepa	MC1061 (w.t.)	GM11 (mg-)	JMH0510 (mc-)	JMH0511 (mg-mc-)	JMH0512 (mc-mg-)	MC1061 (w.t.)	GM11 (mg-)	JMH0510 (mc-)	JMH0511 (mg-mc-)	JMH0512 (mc-mg-)
Tiempo de duplicación (min)	102.0	136.0	43.0	50.1	47.3	219.0	176.1	58.6	176.1	57.5
a	0.13	0.02	0.08	0.04	0.02	0.08	0.04	0.09	0.08	0.06
b	0.41	0.31	0.97	0.83	0.88	0.19	0.24	0.71	0.24	0.72
R ²	0.96	0.94	0.96	0.91	0.98	0.82	0.76	0.95	0.76	0.84
Medio de Cultivo	LB + antibióticos correspondientes									
Plásmido	pALF1					$\rho(adhE^-lacZ)$				
Ecuación tipo $y=ae^{bt}$ /Cepa	MC1061 (w.t.)	GM11 (mg-)	JMH0510 (mc-)	JMH0511 (mg-mc-)	JMH0512 (mc-mg-)	MC1061 (w.t.)	GM11 (mg-)	JMH0510 (mc-)	JMH0511 (mg-mc-)	JMH0512 (mc-mg-)
Tiempo de duplicación (min)	48.8	49.3	43.8	52.9	37.9	51.6	85.9	62.7	87.8	52.6
a	0.02	0.04	0.02	0.04	0.00	0.04	0.02	0.22	0.05	0.04
b	0.85	0.84	0.95	0.79	1.10	0.81	0.48	0.66	0.47	0.79
R ²	0.93	0.93	0.89	0.90	0.96	0.83	0.89	0.91	0.80	0.97

Gráfica 7. OD₆₀₀ en MM + casaminoácidos de cepas transformadas con pALF1 y crecidas aeróbicamente a 37°C



Gráfica 8. OD₆₀₀ en MM + casaminoácidos de cepas transformadas con pΦ(adhE'-lacZ) y crecidas aeróbicamente a 37°C



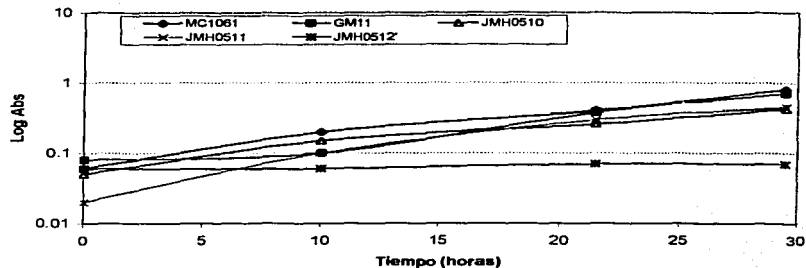


Gráficas 7, 8, 9 y 10. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas aeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pALF1 ó pRS414-(Φ(adhE⁻/lacZ)), crecidas en MM casaminoácidos o en LB a 37°C. Se grafican horas de crecimiento en el eje de las abscisas vs OD₆₀₀ representado logarítmicamente.

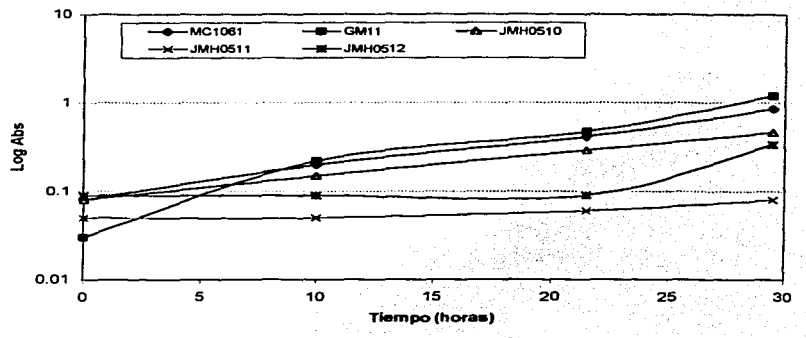
Tabla 13. Ecuaciones determinadas de las curvas de crecimiento anaeróbicas obtenidas en MM + casaminoácidos o LB. Mutantes en *mc::tet^r rng::cat*, transformadas con plásmido de bajo número de copia (*p-(adhE'-lacZ)*) ó unicopia (pALF1).

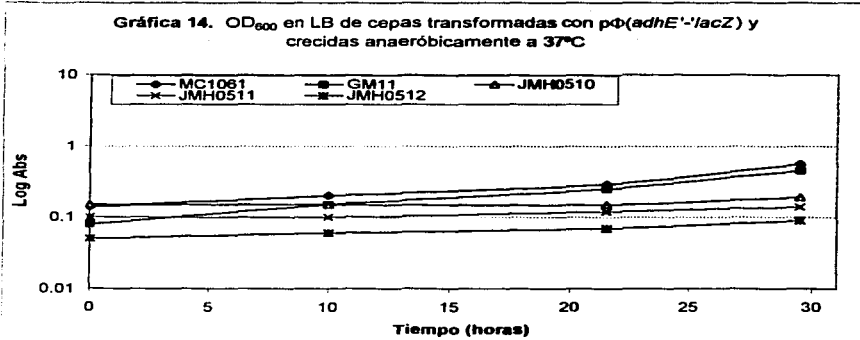
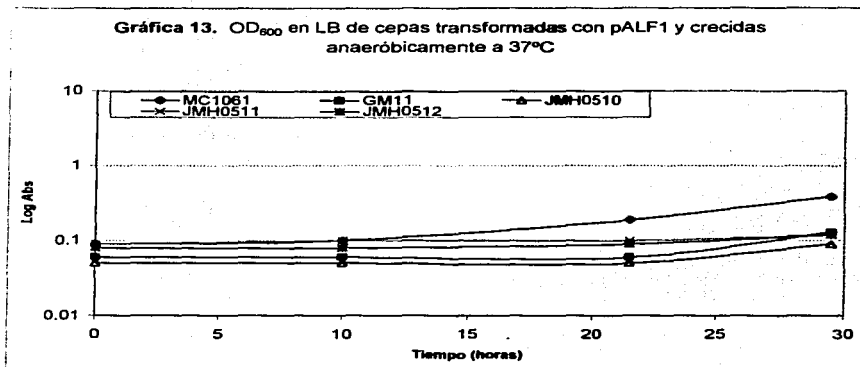
Medio de Cultivo	MM + casaminoácidos + antibióticos correspondientes									
	pALF1					pΦ(<i>adhE'-lacZ</i>)				
Plásmido	MC1061	GM11	JMH0510	JMH0511	JMH0512	MC1061	GM11	JMH0510	JMH0511	JMH0512
Ecuación tipo $y=ae^{bt}/Cepa$	(w.t.)	(<i>rng-</i>)	(<i>rnc-</i>)	(<i>rng- rnc-</i>)	(<i>rnc- rng-</i>)	(w.t.)	(<i>rng-</i>)	(<i>rnc-</i>)	(<i>rng- rnc-</i>)	(<i>rnc- rng-</i>)
Tiempo de duplicación (min)	473.1	567.4	564.3	378.8	5776.2	524.4	330.9	700.1	2888.1	1164.9
a	0.06	0.08	0.05	0.02	0.06	0.08	0.03	0.08	0.05	0.08
b	0.09	0.07	0.07	0.11	0.01	0.08	0.13	0.06	0.01	0.04
R ²	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	0.50
Medio de Cultivo	LB + antibióticos correspondientes									
Plásmido	pALF1					pΦ(<i>adhE'-lacZ</i>)				
Ecuación tipo $y=ae^{bt}/Cepa$	MC1061	GM11	JMH0510	JMH0511	JMH0512	MC1061	GM11	JMH0510	JMH0511	JMH0512
	(w.t.)	(<i>rng-</i>)	(<i>rnc-</i>)	(<i>rng- rnc-</i>)	(<i>rnc- rng-</i>)	(w.t.)	(<i>rng-</i>)	(<i>rnc-</i>)	(<i>rng- rnc-</i>)	(<i>rnc- rng-</i>)
Tiempo de duplicación (min)	892.5	1999.4	2632.2	4780.3	3465.7	938.8	724.5	6601.4	3815.4	2188.9
a	0.09	0.05	0.05	0.09	0.08	0.13	0.08	0.15	0.10	0.05
b	0.05	0.02	0.02	0.01	0.01	0.04	0.06	0.01	0.01	0.02
R ²	0.94	0.50	0.50	0.84	0.77	0.95	0.99	0.50	0.96	0.97

Gráfica 11. OD₆₀₀ en MM + casaminoácidos de cepas transformadas con pALF1 y crecidas anaeróbicamente a 37°C



Gráfica 12. OD₆₀₀ en MM + casaminoácidos de cepas transformadas con pΦ(*adhE*'-lacZ) y crecidas anaeróbicamente a 37°C





Gráficas 11, 12, 13 y 14. Curvas de crecimiento a 600 nm obtenidas anaeróbicamente a 37°C de cepas transformadas con pALF1 ó pRS414-Φ(adhE'-lacZ), crecidas en MM casaminoácidos o en LB a 37°C. Se grafican horas de crecimiento en el eje de las abscisas vs OD₆₀₀ representado logarítmicamente.

4.2 Interpretación

En este capítulo caracterizamos las cepas producidas, así como la expresión de la proteína monitora AdhE'-LacZ en plásmidos unicopia y multicopia. Como pudimos notar desde el fenotipo en LBXgal, las mutantes en *mc*' (*mg*') tenían una coloración azul pálida, lo que nos indicaba que el monitor se estaba expresando. Los resultados de la actividad de β -galactosidasa no fueron congruentes con lo esperado. Nuevamente dudamos que el monitor estuviera representando la actividad de AdhE.

Al analizar la actividad enzimática específica de AdhE, encontramos que ésta era congruente con el fenotipo encontrado, donde las cepas JMH0510, JMH0511 y JMH0512 no crecen en MM + casaminoácidos anaeróticamente. Al observar los geles de SDS-PAGE, corroboramos que la proteína híbrida AdhE'-LacZ escapa al requerimiento de la RNasa III. Esto nos hizo pensar que las razones para que esto pasara son:

1. La estructura secundaria del transcrito de la proteína híbrida AdhE'-LacZ no ocluye completamente el sitio de unión al ribosoma (RBS), permitiendo la traducción de ésta.
2. Que el gene *adhE*'-lacZ se exprese en mayor número que en el cromosoma hace que una parte escape del requerimiento de la RNasa III y sea traducido.

Para contestar la primera razón, pensamos en construir proteínas híbridas que contengan una mayor parte del gene estructural de AdhE.

Para saber si *adhE*'-lacZ escapa por ser mayor número de copias que una sola copia en el cromosoma, transdujimos con el fago λ RS45 la fusión al cromosoma de la cepa MC1061. Sobre este fondo genético, transdujimos por P1_w las mutaciones en *mc::tet*, *mg::cat*, *adhE::kan*. En todos los casos observamos el mismo fenotipo al platear el LBXgal estas cepas: coloración azul. De este resultado concluimos que la razón 1 es por la que el monitor se esté expresando en las cepas *mc* (*mg*).

Buscando la construcción de un monitor de la fusión traduccional de *adhE*, construimos diferentes plásmidos con construcciones *adhE*'-lacZ con mayor proporción de *adhE*, como se mostró ya en la figura 14. Los resultados de estos experimentos se muestran en el capítulo 6.

5 MUTANTES SUPRESORAS

5.1 Introducción

Una cepa de *Escherichia coli* mutante en *adhE* es incapaz de crecer fermentativamente usando glucosa como fuente de carbono y energía. Esto es porque *adhE* es la enzima encargada de reciclar el NADH producido en estas vías (Clark, 1989). Sin embargo, puede crecer utilizando otras fuentes de carbono menos reducidas, tales como gluconato ó glucoronato.

La cepa de *Escherichia coli* NZN111 (derivada de la cepa W1485 (F⁺ λ⁻ *rpoS*396 (Am) *rph-1*) pero Δ*pfIB*::Cam *ldhA*::Kan) no es capaz de crecer fermentativamente pues tiene interrumpidos los genes que codifican para Lactato deshidrogenasa (*ldh*) y Piruvato formiato liasa (*pfI*; Donnelly *et al.*, 1998; ver Fig. 7). David Clark y colaboradores (Chatterjee *et al.*, 2001) describieron una mutante espontánea de esta cepa, AFP111, que fermenta glucosa a una mezcla de succinato, acetato y etanol. Ellos mapearon la mutación y atribuyeron el restablecimiento de crecimiento en estas condiciones al gene *ptsG*. Observaron que en el fondo genético AFP111, mutantes en *adhE* ó *pta* perdían la habilidad de fermentar glucosa. Esto nos indica que la vía para la producción de succinato es la misma que en la cepa parental.

El gene *ptsG* codifica para EIICB^{Glc}, la permeasa específica de glucosa del sistema Fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-dependiente (PTS). El estado de fosforilación de EIICB^{Glc} regula la expresión genética de genes inducidos por glucosa al unirse al represor, Mic. Mic es una proteína de 44 kDa que reprime varios operones catabólicos ligados al metabolismo de azúcar, tales como *ptsG*, *ptsHlcr*, *manXYZ*. Cuando la glucosa se fosforila en el curso del transporte, las proteínas PTS se defosforilan. EIICB^{Glc} defosforilado se une a Mic y desreprime la expresión de los genes blancos, tales como *mic* y *pts*. La célula sintetiza más proteínas PTS que toman el azúcar. Cuando la glucosa se acaba, Mic es liberado y reprime los genes blanco; cuando no se transporta suficiente glucosa se fosforila (Nam *et al.*, 2001). Para más información ver capítulo 3 (Construcción de cepas).

Nuestro objetivo fue aislar y caracterizar mutantes supresoras de las cepas JMH0510 (*mc-*) y JMH0511 (*mc- mg-*) capaces de crecer en MM + casaminoácidos anaeróbicamente. Así como aislar y caracterizar mutantes supresoras de las cepas JMH0537 (*frd- mc-*) y JMH0620 (*frd- mc- mg-*) capaces de crecer en MM + casaminoácidos anaeróbicamente.

Para que una mutante en *adhE* pueda crecer fermentativamente con glucosa, los equivalente reductores que se producen deben ser iguales a los que se gastan dentro de la fermentación. Esto puede ser por el re-establecimiento de la actividad de AdhE ó por la mayor actividad de otras enzimas que gasten equivalentes reductores al llevar a cabo su reacción.

Para que el succinato sea excretado de la célula, ocupa 2 equivalentes reductores para salir como ácido succínico. La enzima Fumarato reductasa (codificada por *frd*) produce succinato a partir de fumarato. Esperaríamos que una mutante supresora de una cepa parental incapaz de crecer fermentativamente con glucosa como única fuente de carbono y energía, expresaría más AdhE ó Fumarato reductasa.

Como la RNasa G degrada específicamente al mRNA de *adhE*. Al tener una doble mutante en *mc* y *mg*, la cantidad de transcrito presente en la célula es mayor. Creemos que quizás esta mayor cantidad de transcrito sea sustrato para aumentar la probabilidad de que otra RNasa lo digiera permitiendo su traducción.

5.2 Resultados

5.2.1 Estadística de Mutaciones

Se quería conocer que porcentaje de mutantes supresoras aparecían después de 6 días de haber plateado células de las cepas *mc* (*mg*) en MM casaminoácidos. Estos experimentos de estadística de mutaciones se llevaron a cabo como está descrito en material y métodos. Usando como control positivo a la cepa parental MC1061 ó JRG780, así como a las mutantes respectivas en *mg*, y como control negativo a la cepa *adhE*.

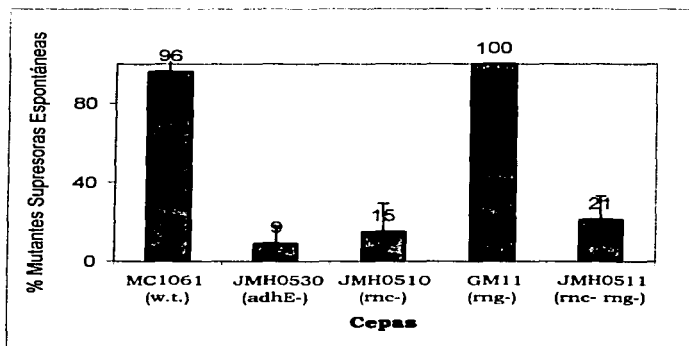
La diferencia de mutantes supresoras aparecidas entre la cepa *adhE* y *mc* (*mg*), nos indicaría el número de mutantes supresoras debidas a una mayor actividad de *adhE*.

En las gráficas 15 y 16 vemos la estadística de mutantes supresoras aparecidas en medio sólido LB y MM casaminoácidos. Como podemos observar en la gráfica 15, tanto la cepa parental como la cepa *mg* crecen de igual manera aeróbicamente como anaeróbicamente. Vemos también que hay un mayor porcentaje de mutantes supresoras en las cepas *mc* (*mg*). Esto nos indicaría que la diferencia de mutantes supresoras entre las cepas *mc* y *adhE* podría deberse a una mayor actividad de AdhE en las mutantes en *mc*. Por otro lado, la cepa *mc mg* tiene un mayor porcentaje de aparición de mutantes supresoras que la cepa *mc*. Esto podría indicarnos que al haber mayor cantidad de transcrito de *adhE* aparecen más mutantes supresoras que ya no requieren el corte del mRNA por la RNasa III.

Sin embargo, al observar la gráfica 16, donde se platearon las mismas células en las mismas condiciones pero crecidas en MM casaminoácidos, observamos un patrón diferente. Aquí nuevamente la cepa parental MC1061 y la cepa *mg* crecen igual aeróbica y anaeróbicamente. Nuevamente la cepa *mc* tiene más mutantes supresoras que la cepa *adhE*. Sin embargo, la doble mutante tiene la misma aparición de mutantes supresoras que la cepa *adhE*.

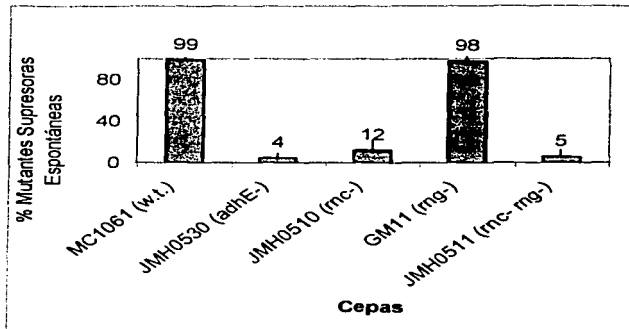
Para saber si lo que nos indican los experimentos de estadística de mutantes supresoras discutido arriba es verdad, se hicieron geles de proteína de las mutantes supresoras así como medición de la actividad enzimática AdhE.

Por otro lado, al obtener la estadística de las cepas derivadas de la cepa JRG780, observamos que la frecuencia de aparición de mutantes fue mucho menor que en las cepas sin la mutación en *frd*. Esto puede deberse a que la enzima Fumarato reductasa es importante para mantener el equilibrio del potencial redox cuando la célula crece en condiciones anaeróbicas con glucosa como única fuente de carbono y energía. Los resultados de la gráfica 17 nos indican que una cepa *frd* crece mal en estas condiciones. Por otro lado, una mutación en *mg* aumenta el porcentaje de crecimiento en estas condiciones. La frecuencia de aparición de mutantes espontáneas es baja, y el estudio de éstas nos permitiría conocer por cual vía se recupera la célula. Sin embargo, la comparación de las mutantes supresoras de la cepa *adhE*- vs. *mc*- nos indicaría que probablemente las mutantes supresoras no son en *adhE*.

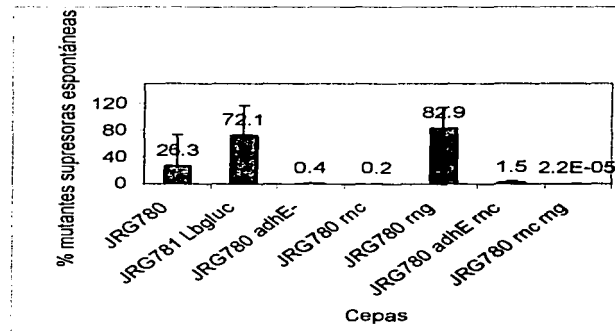


Gráfica 15. Promedio de Células que crecieron en LB sólido anaeróbicamente con respecto a las que crecieron aeróbicamente. Se muestra la desviación estándar resultado de tres experimentos realizados por duplicado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 16. Promedio de Células que crecieron en MM casaminoácidos sólido anaeróbicamente con respecto a las que crecieron aeróbicamente. Se muestra la desviación estándar resultado de tres experimentos realizados por duplicado.



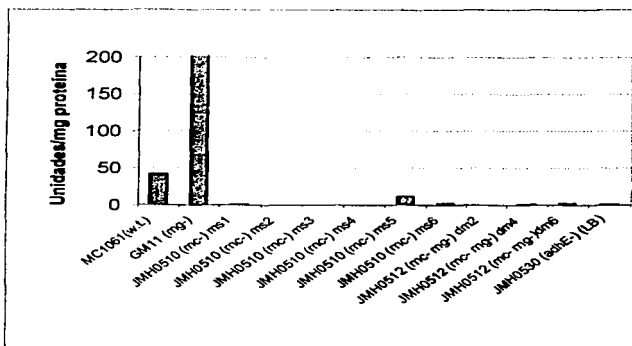
Gráfica 17. Porcentaje de Células que crecieron en MM casaminoácidos sólido anaeróbicamente con respecto a las que crecieron aeróbicamente. Se muestra la desviación estándar resultado de tres experimentos realizados por duplicado.

5.2.2 Caracterización de Mutantes Supresoras

Para caracterizar e identificar si alguna de las mutantes supresoras aisladas de las cepas isogénicas de MC1061 ó JRG780, tenía una mayor actividad enzimática de AdhE se seleccionaron 6 mutantes supresoras de la cepa *mc* y 3 mutantes supresoras de la cepa *mc mg*. A estas cepas se les realizó el ensayo de actividad enzimática de AdhE como está descrito en Material y Métodos (Gráfica 18 y 19).

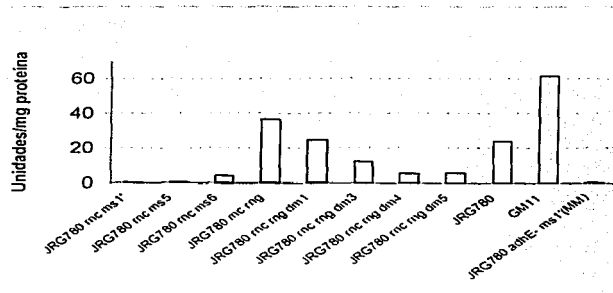
5.2.2.1 Actividades Específicas de AdhE

Como podemos ver en la gráfica 18, la cepa GM11 tiene mayor actividad AdhE que la cepa parental MC1061 y ninguna de las mutantes tiene actividad enzimática de AdhE apreciable. Para corroborar este resultado se decidió hacer el gel de proteínas de estas cepas.



Gráfica 18. Actividades Específicas de AdhE de Mutantes Supresoras en Cepas isogénicas de MC1061 con pRS414- Φ (*adhE'*-*lacZ*) crecidas en MM casaminoácidos. Resultado de un solo experimento realizado por triplicado.

En la gráfica 19 observamos la actividad enzimática de AdhE, donde los controles positivos fueron la cepa parental JRG780 y GM11. Como control negativo se usó la cepa JRG780 *adhE*. Observamos que la cepa JRG780 *mc mg dm1* presenta actividad enzimática de AdhE.



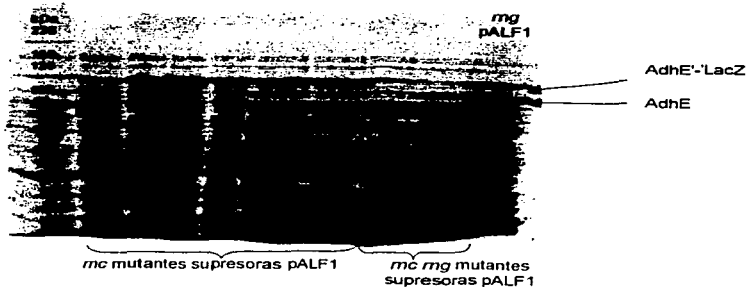
Gráfica 19. Actividades Específicas de AdhE de Mutantes Supresoras en cepas isogénicas de JRG780 y crecidas en MM casaminoácidos. Resultado de seis experimentos realizados por duplicado.

5.2.2.2 Electroforesis en Geles (SDS-PAGE)

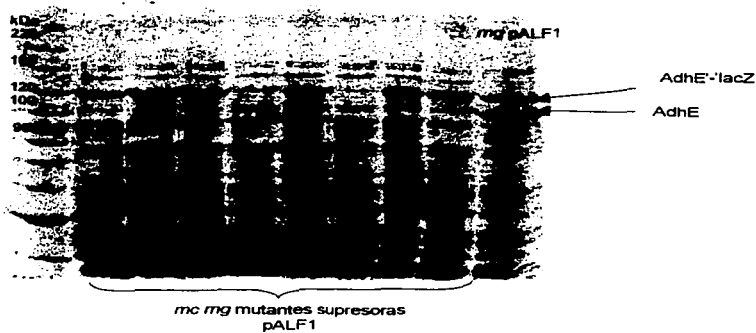
Se transformaron con el plásmido pALF1 [$\Phi(adhE^{-}-lacZ)$] a las mutantes supresoras previamente obtenidas. De estas cepas se hizo el gel de proteínas como está descrito en Material y Métodos.

Como podemos ver en los geles 5 y 6, la cepa GM11 que está en el último carril de la derecha presenta dos bandas que corresponden en peso (de acuerdo al marcador en kDa que está en el primer carril del gel) a las proteínas AdhE⁻-LacZ y AdhE. Ninguna de las mutantes supresoras de la cepa *mnc* presenta la banda que corresponde a AdhE, sin embargo a excepción de la mutante supresora 1, todas presentan la banda que corresponde a la proteína AdhE⁻-LacZ. De las 10 mutantes supresoras de la cepa *mnc rng*, nuevamente ninguna de ellas presentó la banda de AdhE, aunque algunas de ellas presentaron de forma dispareja la banda que corresponde a AdhE⁻-LacZ.

De aquí concluimos que ninguna de las mutantes supresoras isogénicas a MC1061 seleccionadas presentó la banda que corresponde a la proteína AdhE en los Geles s, lo que corrobora las actividades enzimáticas AdhE presentada anteriormente. Así que ninguna de las mutantes supresoras isogénicas a MC1061 está afectada en AdhE.



Gel 5. Geles de Proteinas (SDS-PAGE) de mutantes supresoras isogénicas a MC1061, transformadas con pALF1.



Gel 6. Geles de Proteinas (SDS-PAGE) de mutantes supresoras isogénicas a MC1061, transformadas con pALF1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3 Interpretación

Los experimentos de estadística de las cepas derivadas de la cepa parental MC1061 (Gráfica 15 y 16) parecían indicar que encontraríamos una mutante supresora que hubiera recuperado la capacidad de crecer en MM casaminoácidos anaeróbicamente al sobre-expresar AdhE. Sin embargo, al analizar el patrón de proteínas de ciertas mutantes supresoras seleccionadas (Gel 5 y 6), no se pudo observar que ninguna mutante supresora expresara AdhE. Esto se corroboró al obtener la actividad enzimática de AdhE de estas mutantes supresoras, que nuevamente no mostró mayor actividad de AdhE en ninguna de las mutantes supresoras ensayadas.

De aquí concluimos que las cepas JMH0510 y JMH0511 gastan los equivalentes reductores por un vía diferente al escape del requerimiento de la RNasa III para digerir el transcrito de *adhE*. Pensamos que tal vez la vía por la cual están gastando los equivalentes reductores es a través de la Fumarato reductasa, codificada por *frd*. Es por esto que solicitamos a Jeff Green la cepa JRG780 (*frd*-), que amablemente nos proporcionó. A esta cepa la transdujimos por P1_{vir} con los lisados de *mc*- y *mg*-. Al hacer experimentos de estadística de la cepa JRG780 y las cepas isogénicas, observamos que la cepa JRG780 crece menos anaeróbica que aeróbicamente. Mientras que la cepa JRG780 *mg* crece prácticamente igual aeróbica y anaeróbicamente. Se seleccionaron nuevamente mutantes supresoras que crecieran anaeróbicamente en MM casaminoácidos, como está descrito en Material y Métodos.

La obtención de mutantes supresoras fue mucho menor en la cepa *frd* que cuando se usó la cepa MC1061 como cepa parental. A las mutantes supresoras seleccionadas se les determinó la actividad enzimática AdhE. Se observó que una de las mutantes tenía actividad de AdhE. Esta mutante se guardó en glicerol para su estudio posterior.

6 CLONAS

6.1 Amplificación por PCR de los fragmentos del gene que contengan la región reguladora de *adhE* y fragmentos de diferentes tamaños del gene estructural y su posterior clonación.

Se ha sugerido que en la estructura secundaria de la región no traducida (5') del transcrito de *adhE*, las bases se aparean intramolecularmente ocluyendo el RBS. Es necesaria la actividad endoribonucleolítica de la RNasa III para cortar la estructura secundaria del transcrito, liberando así el RBS y permitiendo la traducción (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999; Membrillo-Hernández y Lin, 1999; Aristarkhov *et al.*, 1996). Por otro lado, la RNasa G degrada específicamente al transcrito de *adhE* (Umitsuki *et al.*, 2001).

Monitores de expresión como el gene *lacZ* son comúnmente usados en biología molecular. Un monitor con una fusión traduccional hace posible estudiar los mecanismos de control post-transcripcional. Para conocer la expresión del gene *adhE* se utilizó como monitor al plásmido pRS414, que contiene la fusión traduccional $\Phi(adhE'-lacZ)$ -descrita en la sección 1.4.3.1.. En esta fusión, el único RBS que se utiliza es el del gene *adhE*, lo que produce un solo mRNA híbrido a ser traducido. El gene *lacZ* codifica para la β -galactosidasa, que puede hidrolizar al sustrato Xgal dando como resultado un compuesto de coloración azul. Así, a mayor concentración de la proteína híbrida monitor, mayor coloración azul tendrá la colonia en medios de cultivo suplementados con Xgal.

En una cepa mutada en el gene *mc* que codifica para la RNasa III, el transcrito de *adhE* no es traducido. De la misma manera, la proteína híbrida monitor AdhE'-LacZ debería expresarse muy poco o nulamente en una cepa *mc*. Por otro lado, en una cepa *mg*, esperamos una mayor producción de la proteína monitor AdhE'-LacZ dado que el producto del gene *mg*, está involucrado en la degradación del mRNA de *adhE*.

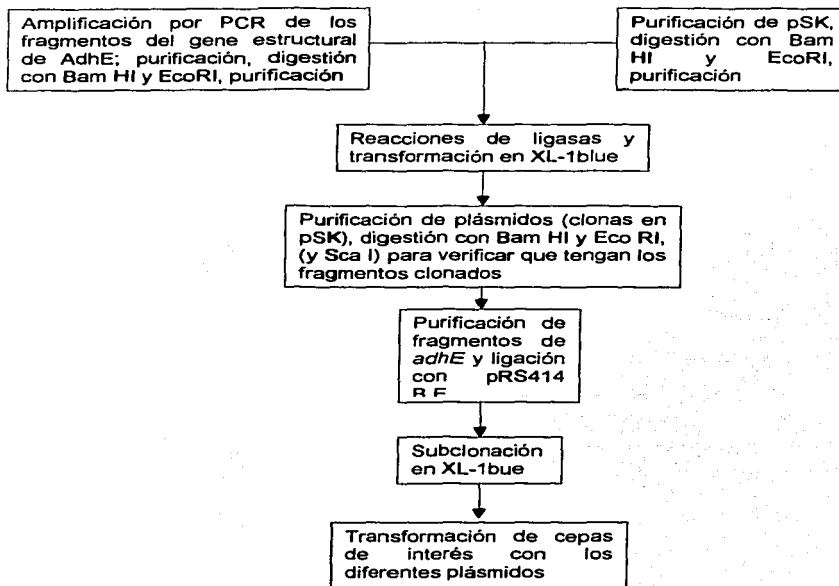
Para estudiar el efecto de una mutación en la RNasa III (*mc*) y/o en la RNasa G (*mc*), transdujimos estas mutaciones a cepas isogénicas y transformamos las cepas obtenidas con dos monitores diferentes, que tienen la construcción arriba mencionada: pALF, unicopia y pRS414- $\Phi(adhE'-lacZ)$, bajo número de copias. Al sembrar las cepas transformadas en LBXgal con los antibióticos correspondientes observamos que el monitor se expresaba (Tabla 11, cap. 4) aún en las cepas con el gene *mc* interrumpido. Al realizarles ensayos de β -galactosidasa a éstas (Gráfica 1-4), observamos que el monitor no parecía reflejar fielmente la actividad de AdhE.

Esto lo dedujimos dado que la cepa *mg⁻* produce una mayor cantidad de AdhE que la cepa parental y crece mejor que ésta en MM anaeróbicamente, sin embargo el monitor no indicaba esto. Al realizar las actividades específicas de AdhE en las mismas cepas (Gráfica 5-6) observamos que éstas concordaban con los resultados experimentales observados (para más información ver cap. 4).

La expresión de la fusión $\Phi(adhE'-lacZ)$ escapa al requerimiento de la RNasa III. Al ser diferente la estructura primaria del transcrito de la fusión monitora al mRNA de *adhE*, la estructura secundaria también es diferente. Nosotros hipotetizamos que probablemente la diferencia de estructura hace accesible el RBS sin necesidad del procesamiento de la RNasa III. La fusión monitora $\Phi(adhE'-lacZ)$ tiene solamente 3 codones del gene estructural de *adhE*. Nosotros pensamos que si la fusión contiene una mayor parte del gene estructural de *adhE*, podría conservarse la estructura secundaria del extremo 5' no traducible. Esto se traduciría en que la fusión monitora se comportase igual que el gene *adhE*. Si encontráramos tal fusión, tendríamos un monitor que no escaparía del requerimiento de la RNasa III para liberar su RBS y ser traducido.

Decidimos entonces construir 4 fusiones que contuvieran, además de la región reguladora del gene *adhE*, desde 500 bp hasta 2kb del gene estructural de *adhE* unido al gene *lacZ*. De esta manera, si alguna de estas construcciones no se expresaba al estar contenida dentro de una cepa *mc⁻* nos indicaría que nuestro razonamiento fue correcto: La estructura secundaria cambia de acuerdo al transcrito y una mayor parte del transcrito del gene unido al monitor puede dar una estructura secundaria del extremo 5' similar a la estructura secundaria del gene nativo.

Diagrama 2. Obtención de los fragmentos del gene estructural de *adhE* y clonación.



6.2 Resultados

En la Fig. 14 en el cap. 3 observamos el esquema de los genes híbridos contruidos.

6.2.1 Amplificación de los Fragmentos del Gene *adhE* por PCR

La amplificación de fragmentos se realizó como está descrito en Material y Métodos. Se diseñaron los primers Adh5'N, AdhE3'500, AdhE3'1000, AdhE3'1560, AdhE3'2000 y se mandaron fabricar. Se amplificaron los fragmentos por PCR utilizando pares de primers del primer Adh5'N con cada uno de los otros 4, se verificó que la banda de cada fragmento tuviera el peso esperado.

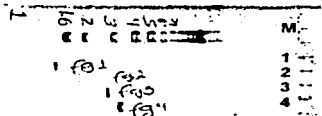
Tabla 14. Tamaño de los diferentes fragmentos amplificados de *adhE*.

pFG	bp <i>adhE</i> total	bp <i>adhE</i> estructural	Aminoácidos	Peso en kDa (1 aa =100 Da)
1	1500	558	186	18.6
2	2000	1058	352	35.2
3	2560	1617	539	53.9
4	3000	2058	686	68.6

6.2.2 Clonación de los Fragmentos en Plásmido pSK

La clonación se realizó como está descrito en Material y Métodos. Después de purificar los fragmentos, se digirieron con BamHI y EcoRI. Se purificaron nuevamente y se tomó una muestra de 5 µl de cada fragmento y se realizó una electroforesis para conocer la concentración relativa de las muestras (Gel 7). Se llevó a cabo una reacción de ligasa de los fragmentos con el plásmido pSK digerido con BamHI y EcoRI y purificado, con una relación 10:1 ó 5:1; la reacción de ligasa se incubó a 14°C por 16 horas. Se electroporaron células electrocompetentes frescas de XL-1blue con la reacción de ligasa y se platearon en L2Xgal. Se seleccionaron aquellas colonias que tenían una coloración blanca (por α -complementación del fragmento dentro del plásmido pSK, que interrumpe el gene *lacZ*).

Los plásmidos clonados pSK1, pSK2, pSK3 y pSK4 se purificaron y se verificó por digestión de enzimas de restricción que dieran el patrón de restricción esperado (Gel 8).



Gel 7. Fragmentos de *adhE* amplificados por PCR, cortados con enzimas de restricción y purificados. De este gel se determinó cualitativamente la concentración relativa de los fragmentos para llevar a cabo la reacción de ligasa con una relación 1:5 ó 1:10 (plásmido:fragmento). Carril 1 fragmento 1 B,E; Carril 2 fragmento 2 B,E; Carril 3 fragmento 3 B,E; Carril 4 fragmento 4 B,E; M Marcador de Peso Molecular de 1 kb Invitrogen. B,E significa digerido con BamHI y EcoRI.



Gel 8. Electroforesis que muestra los plásmidos obtenidos y su patrón de digestión. M Marcador de Peso Molecular de 1 kb Invitrogen; Carril 1 pSK; Carril 2 pSK B,E Q; Carril 3 pSK B,E,S Q; Carril 4 fragmento 1 B,E Q (banda de 1.4 kb amplificada por PCR); Carril 5 pSK1; Carril 6 pSK1 B,E; Carril 7 fragmento 2 B,E Q (banda de 1.9 kb amplificada por PCR); Carril 8 pSK2; Carril 9 pSK2 B,E; Carril 10 fragmento 3 B,E Q (banda de 2.5 kb amplificada por PCR); Carril 11 pSK3; Carril 12 pSK3 B,E,S; Carril 13 fragmento 4 B,E Q (banda de 2.9 kb amplificada por PCR); Carril 14 pSK4; Carril 15 pSK4 B,E,S; M Marcador de Peso Molecular de 1 kb Invitrogen. Donde B es BamHI; E es EcoRI; S es Scal y Q es purificado con kit de qiagen.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.3 Subclonación en Plásmido pRS414

La subclonación se realizó como está descrito en Material y Métodos. Después de purificar los plásmidos pSK1-4 que contenían los fragmentos de diferentes tamaños de *adhE*, se digirieron con BamHI y EcoRI. Al realizar la electroforesis de las digestiones, se seleccionó y cortó la banda que correspondía al fragmento clonado. Por otro lado se purificó pRS414, se cortó con BamHI y EcoRI.

Tanto el fragmento como el plásmido digeridos se purificaron de la banda del gel de agar y se realizó otra electroforesis con 5 μ l de muestra de cada uno para conocer la concentración. Se llevo a cabo una reacción de ligasa del fragmento con el plásmido pRS414, ambos digeridos con BamHI y EcoRI y purificados, la reacción de ligasa se incubó a 14°C por 16 horas. Se electroporaron células electrocompetentes frescas de XL-1blue con la reacción de ligasa y se platearon en L2Xgal. Se seleccionaron aquellas colonias que tenían una coloración azul. Los plásmidos clonados pFG1, pFG2, pFG3 y pFG4 se purificaron y se verificó por digestión con enzimas de restricción que dieran el patrón de restricción esperado..

6.2.4 Fenotipo de pFG's en Cepas Transformadas

La electroporación se realizó como está descrito en Material y Métodos. Donde se utilizaron células electrocompetentes frescas para electroporar con los plásmidos purificados. Se usaron células de las cepas isogénicas MC1061 (cepa parental), GM11(*mg*), JMH0510 (*mc*) y JMH0511(*mg*/*mc*). Se seleccionó en L2Xgal con los antibióticos correspondientes y la coloración de las colonias obtenidas se ve en la Tabla 15.

Tabla 15. Coloración de cepas transformadas con cada plásmido al sembrar en LBXgal más antibióticos. N.D. indica no determinado.

Cepa/plásmido	pFG1	pFG2	pFG3	pFG4
XL-1blue	azul	azul	azul	azul
MC1061	azul	azul	N.D.	azul
GM11 (<i>mg</i>)	azul	azul	N.D.	azul
JMH0510 (<i>mc</i>)	azul	azul	N.D.	N.D.
JMH0511 (<i>mg mc</i>)	azul	azul	N.D.	blanca

6.3 Estructuras Secundarias de los Transcritos Híbridos Construidos

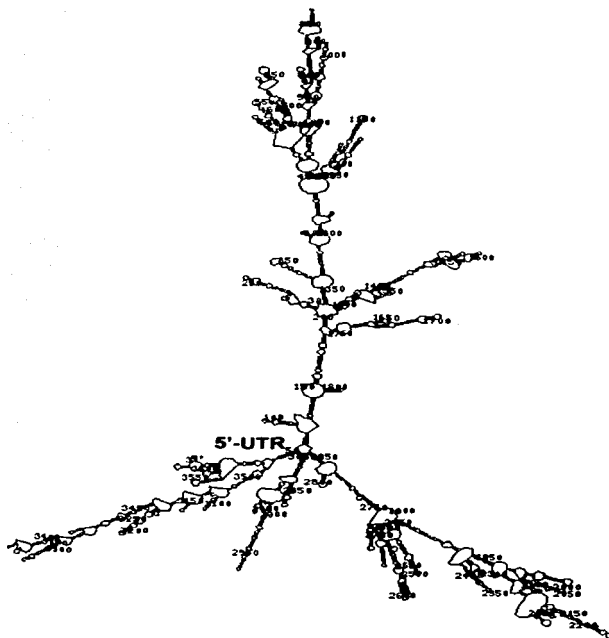
De la Fig. 16 a la Fig. 19 se muestran las estructuras secundarias probables de los transcritos híbridos contruidos, tomándose como control la estructura secundaria probable del transcrito de *adhE* (Fig. 15). Podemos notar que los extremos 5'-no traducidos de las distintas fusiones *adhE*'-'*lacZ* cambian al tener otra estructura primaria en el extremo 3'. Estas estructuras nos indican que las fusiones con mayor cantidad del gene estructural de *adhE* tienen un extremo 5'-UTR más parecido al del transcrito de *adhE*. De los resultados de la tabla 15 y de éstas figuras concluimos que un monitor traduccional necesita contener una parte del gene estructural tal que la estructura secundaria del extremo 5'-UTR se mantenga lo más parecida al gene de estudio. Sólo de esta forma podremos utilizar fusiones de proteína para estudiar la regulación post-transcripcional.

Se transformaron los plásmidos que contenían las fusiones monitoras en la mayoría de las cepas de estudio. Al platear las cepas transformadas en LBxgal, se expresaron todas las fusiones contenidas (pFG1, pFG2, pFG4) tanto en la cepa parental (MC1061) como en la cepa *mg'* (GM11). Esto nos indicó que las fusiones son funcionales y se expresan en los controles positivos.

Por otro lado, observamos que incluso en las cepas deficientes en *mc* (JMH0510 y JMH0511), las fusiones monitoras pFG1 y pFG2 se expresaron. Esto nos indica que incluso con 1 kb del gene estructural, la fusión monitora tiene una estructura secundaria que no requiere de la acción de la RNasa III.

Por último, la fusión monitora pFG4, que contiene 2 kb del gene estructural no se expresó en la cepa JMH0511 (*mg' mc*). Esto nos indica que probablemente esta fusión requiere de la RNasa III para digerir la estructura secundaria del extremo 5' no traducible y liberar el RBS para la posterior traducción del transcrito híbrido. Para confirmar estos resultados, es necesario completar la Tabla 13 (N.D.).

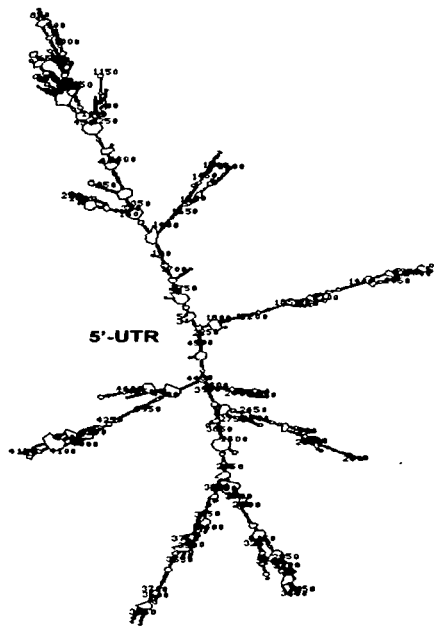
También se podría complementar a la cepa JMH0511 pFG4 con un plásmido -con diferente *ori* que pRS414- que contuviera al gene *mc* y resistencia a algún antibiótico. Si esta cepa recobrarla la expresión de la fusión monitora, nos estaría indicando que efectivamente la falta de expresión del monitor se debe al requerimiento de la RNasa III. Después de confirmar esto, podríamos afirmar haber obtenido una fusión monitora fidedigna de los controles post-transcripcionales de *adhE*.



$dG = -1090.08$ [initially -1187.7] *adhEic*

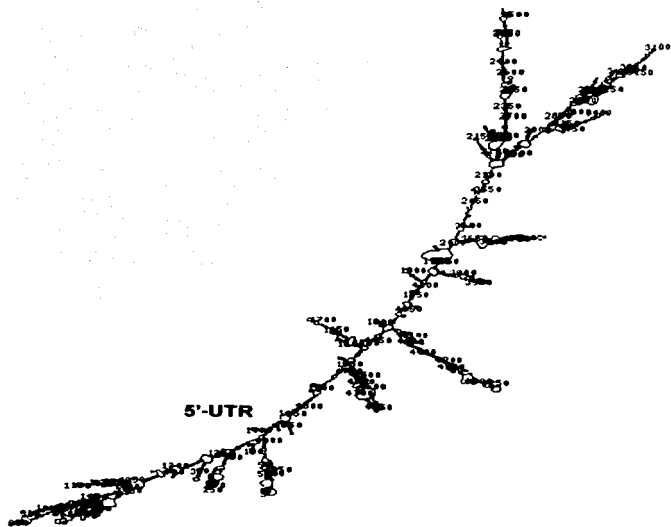
Fig. 15. Estructura Secundaria Probable del Transcrito de *adhE*. Se utilizó el programa Mfold 3.1 (Zucker, 1989) para modelar la termodinámica más favorable de la estructura secundaria. Esta estructura está más detallada que la mostrada en la Fig. 20.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



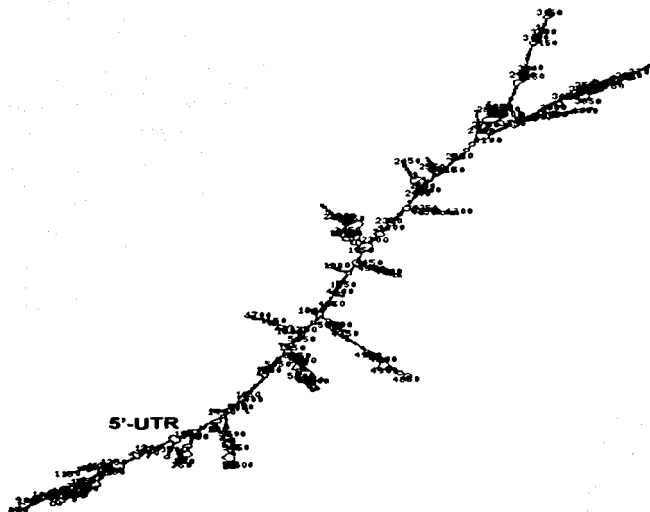
dG = -1477.24 [initially -1540.5] clonatic

Fig. 16. Estructura Secundaria Probable del Transcrito de la Fusión Híbrida *adHE'-lacZ* proveniente de la clona pFG1. Se utilizó el programa Mfold 3.1 (Zucker, 1989) para modelar la termodinámica más favorable de la estructura secundaria.



$\Delta G = -1661.42$ [initially -1829.3] clona2ic

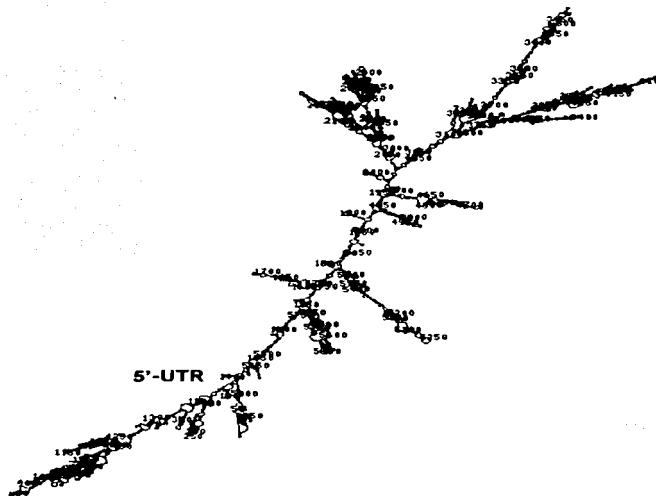
Fig. 17. Estructura Secundaria Probable del Transcrito de la Fusión Híbrida *adhE'-lacZ* proveniente de la clona pFG2. Se utilizó el programa Mfold 3.1 (Zucker, 1989) para modelar la termodinámica más favorable de la estructura secundaria.



dG = -1834.18 [initially -2019.6] clona3ic

Fig. 18. Estructura Secundaria Probable del Transcrito de la Fusión Híbrida *adhE-lacZ* proveniente de la clona pFG3. Se utilizó el programa Mfold 3.1 (Zucker, 1989) para modelar la termodinámica más favorable de la estructura secundaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



dG = -1982.7 [initially -2166.4] clona4ic

Fig. 19. Estructura Secundaria Probable del Transcrito de la Fusión Híbrida *adhE'*-*lacZ* proveniente de la clona pFG4. Se utilizó el programa Mfold 3.1 (Zucker, 1989) para modelar la termodinámica más favorable de la estructura secundaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7 DISCUSIÓN GENERAL

Para estudiar los mecanismos de control post-transcripcional del gene *adhE* en *Escherichia coli*, nos planteamos diferentes vías.

Sabíamos que el transcrito de *adhE* es regulado por dos RNasas a nivel post-transcripcional: La RNasa III y la RNasa G (Aristarkhov *et al.*, 1999; Kaga *et al.*, 2002). La RNasa III es necesaria para liberar el RBS del transcrito de *adhE*, que se encuentra ocluido en la estructura secundaria del mRNA, por un apareamiento de bases intramolecular (Membrillo-Hernández y Lin, 1999). La cantidad de transcrito de *adhE* también es controlada por la RNasa G, responsable de la degradación de éste (Umitsuki *et al.*, 2001).

El gene *adhE* codifica a la enzima encargada de reciclar el NADH producido en la fermentación usando glucosa como fuente de carbono y energía (Clark, 1989). Por otro lado, la enzima Fumarato reductasa, codificada por el gene *frd*, también es responsable de gastar los equivalentes reductores manteniendo el equilibrio del potencial rédox en la fermentación. La relevancia de ambas enzimas en el balance rédox durante la fermentación se puede observar en la Fig. 7.

Nos interesaba conocer por cual de las vías las mutantes supresoras espontáneas recuperaban la capacidad de crecer en MM casaminoácidos anaeróbicamente. Para esto, transdujimos por P1_{vir} la cepa JRG780 (*frd*-) con los lisados de *mc*- y *mg*- e hicimos experimentos de estadística de mutantes supresoras.

Generalmente, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* crecen en el mismo tipo de sustratos fermentativamente, lo que nos sugiere que probablemente sus vías fermentativas son muy similares. Se han comparado las alcohol oxidorreductasas de *S. typhimurium* y *E. coli*. AdhE de *S. typhimurium* tiene 70% de los residuos aminoácídicos idénticos que AdhE de *E. coli*. La enzima de *S. typhimurium* tiene una menor K_m para los alcoholes que AdhE de *E. coli*, aunque ambas enzimas tienen una K_m similar para NAD⁺ (Dailly *et al.*, 2000).

Nos preguntamos si el extremo 5' no traducido del transcrito de *adhE* de *Salmonella* requiere la actividad endonucleolítica de la RNasa III para ser traducido. Como un primer acercamiento, se obtuvieron las estructuras secundarias de ambos transcritos (Fig. 15), para poder compararlos. Así mismo, en las Fig. 16 y 17, se muestran los extremos 5' no traducidos (5'-UTR) del transcrito de *adhE* para *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Para estudiar la regulación por ambas RNasas sobre el transcrito de *adhE*, usamos una mutante afectada en la RNasa G (*mg::cat*), construimos una mutante en la RNasa III (*mc::tet*), y construimos dobles mutantes —en ambas RNasas (*mc::tet mg::cat*), utilizando en todos los casos la cepa parental MC1061 (cap. 3). Con ayuda de una proteína monitor *adhE*::*lacZ*, pensamos estudiar los mecanismos post-transcripcionales

de regulación del *adhE*. Sin embargo, al caracterizar las cepas construidas y transformadas con plásmidos unicopia y multicopia que contenían la fusión monitora, observamos que la fusión monitora no monitoreaba cualitativa ni cuantitativamente la expresión de *adhE* en las diferentes cepas (cap. 4).

En la búsqueda de un monitor que cuantitativamente nos represente la actividad de *adhE* y para hacer los primeros estudios de predicción de estructuras secundarias de mRNA de la molécula completa del transcrito, decidimos realizar construcciones de proteínas híbridas AdhE'-LacZ que contuvieran diferentes longitudes del gene estructural *adhE* (cap. 6). La obtención de este monitor nos servirá para estudiar la regulación post-transcripcional de AdhE más a fondo.

Al observar el fenotipo al sembrar en LBXgal a las clonas transformadas con los plásmidos construidos (Tabla 15), notamos que la fusión monitora proveniente del plásmido pFG4 se expresa tanto en la cepa parental como en la cepa que sobreproduce a *adhE* (controles positivos). Por otro lado, la fusión monitora no se expresa en la cepa JMH0511 (*mg' mc*). Así, esta fusión monitora se expresó tal y como esperamos que se exprese AdhE.

Por otro lado, al hacer experimentos de estadística de la cepa JRG780 y las cepas isogénicas, observamos que la cepa JRG780 crece menos anaeróbica que aeróbicamente. Esto nos explica que *E. coli* se sobreponga a la necesidad de desechar equivalentes reductores sobreexpresando la vía metabólica de síntesis de succinato (cap. 3 y 5). Se seleccionaron y conservaron en glicerol mutantes supresoras que crecieran anaeróbicamente en MM casaminoácidos para su posterior estudio.

Al observar los transcritos del gene *adhE* de ambas especies, observamos que a pesar de la similitud aminoacídica, ambas estructuras secundarias son muy diferentes (Fig. 13). Al comparar los extremos 5' no traducidos (5'-UTR) del transcrito de *adhE* para *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, podemos notar que aparentemente el RBS del transcrito de *Salmonella* no está oculto. De acuerdo a esta observación podemos inferir que el mRNA de *adhE* de *Salmonella* no requiere la actividad endonucleolítica de la RNasa III para ser traducido. Sin embargo, son necesarios resultados experimentales para comprobar esto.

Como ya se mencionó en el cap. 6, es necesario llevar a cabo experimentos que confirmen si la probable construcción monitora realmente se comporta como monitor de la actividad post-transcripcional de *adhE*. Para esto, se puede complementar a la cepa JMH0511 pFG4 con un plásmido que contuviera al gene *mc*. Si esta cepa recobrara la expresión de la fusión monitora, nos estaría indicando que efectivamente la falta de expresión del monitor se debe al requerimiento de la RNasa III.

Para estudiar si alguna de las mutantes supresoras espontáneas que obtuvimos de los experimentos de estadística de las cepas isogénicas de JRG780 está afectada en *adhE*, tendremos que analizar geles de proteínas e identificar a las proteínas Alcohol oxidorreductasa y Fumarato reductasa, así como la actividad enzimática de AdhE.

7.1 Perspectivas

La cepa JE52 sintetiza una proteína AdhE^{A267T/E568K} con dos sustituciones aminoacídicas que le confieren una proteína con mayor estabilidad al unirse a la chaperona DnaK, que la protege del estrés oxidativo (Echave *et al.*, 2002). La cepa JE52 crece en MM etanol al 2% aeróbicamente. Si se transdujeran por P1_w las mutaciones en *mc::tet* y *mg::cat* a la cepa JE52, se obtendrían cepas incapaces de crecer en estas condiciones. Si obtenemos mutantes supresoras capaces de crecer en MM etanol al 2%, se deberá únicamente a la expresión de *adhE*. Para esto, se sembrarían las cepas JE52 *mc::tet* y JE52 *mc::tet mg::cat* en Medio Mc Conkey etanol al 2% y en MM etanol al 2% y se incubarían hasta la aparición de mutantes supresoras espontáneas.

Se utilizaría la técnica de aislamiento de mutantes descrita por Membrillo-Hernández y colaboradores (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000) para obtener mutantes espontáneas capaces de crecer en MM etanol al 2% como alternativa a la aparición de éstas en MM etanol al 2% directamente. Al sembrar las cepas JE52 *mc::tet* y JE52 *mc::tet mg::cat* en Medio Mc Conkey etanol al 2%, se observaría primero la aparición de colonias blancas. Estas colonias habrían utilizado los nutrientes del Medio Mc Conkey para crecer. Después de cierto número de días observaríamos la aparición de papilas rojas dentro de algunas de las colonias blancas. Estas colonias rojas estarían utilizando el etanol como fuente de carbono y energía. Se resembrarían en Medio Mc Conkey etanol al 2% hasta obtener únicamente colonias rojas. Se probaría entonces que estas colonias crecieran en MM etanol al 2% aeróbicamente.

Como una alternativa para identificar colonias que hubieran obtenido una mutación espontánea en *adhE*, se realizaría el experimento descrito arriba en cepas que contuvieran la fusión monitora del pFG4 clonada o transducida. Se sembrarían las cepas en Medio Mc Conkey Xgal etanol al 2%, y se seleccionarían las colonias con una coloración morada. Es decir, que estén utilizando etanol y que se exprese la fusión monitora de *adhE*.

Para estudiar si alguna de las mutantes supresoras espontáneas que obtuvimos de los experimentos de estadística de las cepas isogénicas de JRG780 está afectada en *adhE*, sería transformar a éstas con el plásmido pFG4 y observar la expresión del monitor al sembrar en MMXgal glucosa casaminoácidos o en MMXgal sorbitol casaminoácidos (fuente de carbono aún más reducida que la glucosa). Aquellas colonias que tuvieran una coloración azul estarían expresando AdhE, por lo que serían mutantes supresoras espontáneas interesantes para estudiar.

El experimento para conocer si el transcrito de *adhE* de *Salmonella typhimurium* requiere a la RNasa III para ser traducido sería crecer una cepa *mc* en MM casaminoácidos anaeróticamente. Si el transcrito del gene de *Salmonella* no crece en estas condiciones, es muy posible que también requiera la actividad de la RNasa III para liberar el RBS. Para confirmar estos resultados sería importante complementar a esta cepa y crecerla en las mismas condiciones, esperando que crezca. Las cepas deficientes en la RNasa III de *Salmonella* fueron obtenidas ya (Mattatall y Sanderson., 1998), sin embargo, no se han llevado a cabo aún estos experimentos.

7.2 Conclusiones

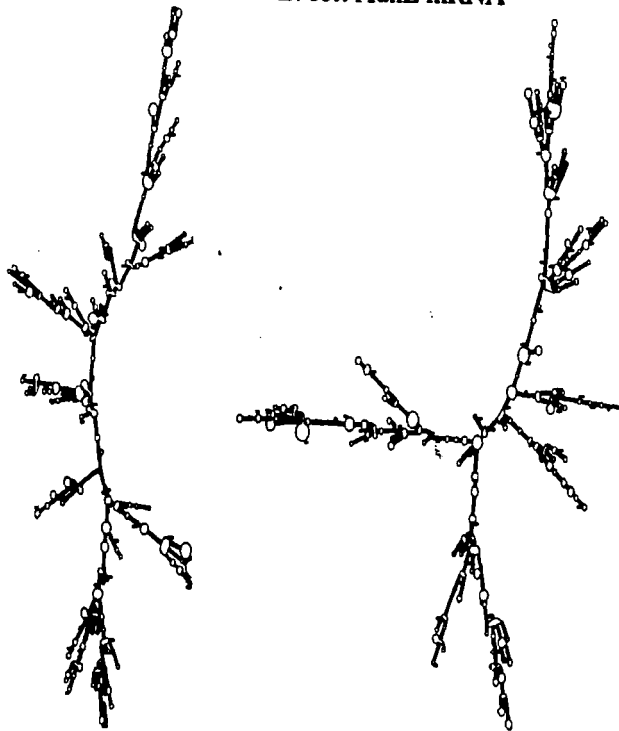
La obtención de una fusión monitora de la regulación post-transcripcional de *adhE* nos permitirá estudiar los mecanismos de control a este nivel. El estudio que se hizo para obtener la fusión monitora nos muestra la importancia que tiene que la estructura secundaria del extremo 5' no traducido de la fusión monitora sea similar al del gene de estudio. Una forma de asegurarnos que los extremos 5' no traducidos de ambos transcritos se parezcan es aumentando la proporción del gene que está presente en la fusión monitora.

El estudio de las mutantes supresoras espontáneas obtenidas al crecer anaeróticamente las cepas isogénicas de JRG780 en MM casaminoácidos pueden proveernos de información de cómo la célula reestablece el equilibrio redox en condiciones fermentativas.

El estudio de las estructuras secundarias predichas por computadora puede ayudarnos a inferir el comportamiento del extremos 5' no traducido, sin embargo, es necesaria evidencia experimental que compruebe las predicciones hechas.

Salmonella AdhE mRNA

E. coli AdhE mRNA



116

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 20. Estructuras secundarias de los transcritos de *adhE* de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

117

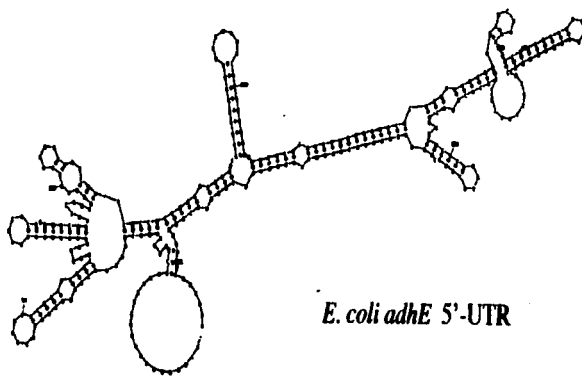


Fig. 21. Estructura secundaria del extremo 5' no traducido del mRNA de *adhE* de *Escherichia coli*.

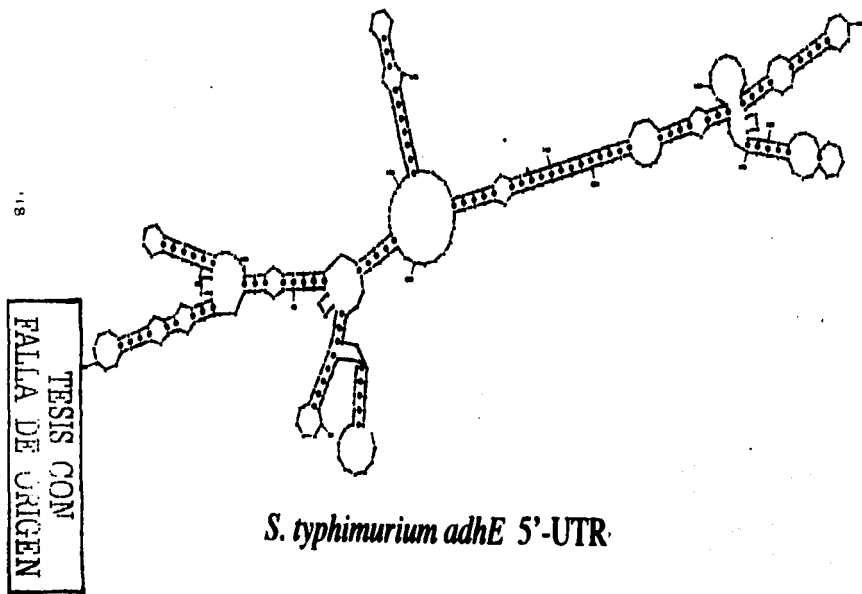


Fig. 22. Estructura secundaria del extremo 5' no traducido del mRNA de *adhE* de *Salmonella typhimurium*.

8 REFERENCIAS

Arraiano CM. (1993) Post-Transcriptional Control of Gene Expression: Bacterial mRNA Degradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 421-32.

Aristarkhov A, Mikulskis A, Belasco JG, Lin ECC. (1996) Translation of the *adhE* Transcript to Produce Ethanol Dehydrogenase Requires RNase III Cleavage in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 4327-32.

Atlung T, Nielsen A, Hansen FG. (1989) Isolation, Characterization and Nucleotide Sequence of *appY*, a Regulatory Gene for Growth-Phase-Dependent Gene Expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:1683-91.

Bauer CE, Elsen S, Bird TH. (1999) Mechanisms for Redox Control of Gene Expression. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 495-523.

BIO-RAD. Micropulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide. Número de catálogo: 165-2100 11-12.

Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X. (2001) Crystallographic and Modeling Studies of RNase III Suggest a Mechanism for Double-Stranded RNA Cleavage. *Structure.* **9**: 1225-36.

Böck A, Sowers G. (1996) Chapter 18: Fermentation *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. Editor in chief Frederick C. Neidhardt Vol **2**: 262-82.

Chatterjee R, Sanville-Millard C, Champion K, Clark DP, Donnelly MI. (2001) Mutation of the *ptsG* Gene Results in Increased Production of Succinate in Fermentation of Glucose by *Escherichia coli*. *Applied Environ. Microbiol.* **67**: 148-54.

Clark DP. (1989) The Fermentation Pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **5**: 223-34.

Chen YM, Lin ECC. (1991) Regulation of the *adhE* Gene, which Encodes Ethanol Dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 8009-13.

Cheng ZF, Duetscher MP. (2002) Purification and Characterization of the *Escherichia coli* Exoribonuclease RNase R (Comparison with RNase II). *J. Biol. Chem.* **277**: 21624-9.

Conrad C, Rauhut R. (2002) Ribonuclease III: New Sense from Nuisance. *Internat. J. Biochem. Cell. Biol.* **34**: 116-24.

Contreras ML. (2000) Propiedades Moleculares y Catalíticas de la Citocromo Oxidasa *bo'* en *Bacillus cereus*: Introducción. U.N.A.M. **1**:1-2.

Dailly YP, Bunch P, Clark DP. (2000) Comparison of the Fermentative Alcohol Dehydrogenases of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbios* **103**:179-96.

Delgado-Nixon VM, González G, Gilles-González MA. (2000) DOS, a Heme Binding PAS Protein from *Escherichia coli* is a Direct Oxygen Sensor. *Biochem.* **39**:2685-91.

Dismukes GC. (2001) Photosynthesis: Splitting Water. *Science.* **292**: 447-48.

D'Mello R, Hill S, Poole RK. (1995) The oxygen Affinity of Cytochrome *bo'* in *Escherichia coli* Determined by the Deoxygenation of Oxyhemoglobin and Oxymyoglobin: Km Values for Oxygen are in the Submicromolar Range. *J. Bacteriol.* **177**: 867-70.

Donnelly MI, Millard CS, Clark DP, Chen MJ, Rathke JW. (1998) A Novel Fermentation Pathway in an *Escherichia coli* Mutant Producing Succinic Acid, Acetic Acid and Ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**: 187-98.

Echave P, Esparza-Cerón MA, Cabisco E, Tamarit J, Ros J, Membrillo-Hernández J, Lin ECC. (2002) DnaK Dependence of Mutant Ethanol Oxidoreductases Evolved for Aerobic Function and Protective Role of the Chaperone Against Protein Damage in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **299**: 4626-31.

Feng Y, Vickers TA, Cohen SN. (2002) The Catalytic Domain of RNase E shows inherent 3' to 5' directionality in cleavage site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 14746-51.

Georgellis D, Lynch SA, Lin ECC. (1997) *In Vitro* Phosphorylation Study of the Arc Two-Component Signal Transduction System of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 5429-35.

Georgellis D, Kwon O, Lin EC. (2001) Quinones as the Redox Signal for the arc Two-Component System of Bacteria. *Science* **292**: 2314-6.

Goodlove PE, Cunningham PR, Parker J, Clark DP. (1989) Cloning and Sequence Analysis of the Fermentative Alcohol-Dehydrogenase-Encoding Gene of *Escherichia coli*. *Gene* **85**: 209-14.

Guest JR, Green J, Irvine AS, Spiro S. (1996) Chapter 16. The FNR Modulon and FNR- Regulated Gene Expression. Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. Ed. Chapman & Hall 317-42.

Ingmer H, Miller CA, Cohen SN. (1998) Destabilized Inheritance of pSC101 and other *Escherichia coli* Plasmids by DpiA, a Novel Two-Component System Regulator. *Mol. Microbiol.* **29**: 49-59.

Jiang GR, Nikolova S, Clark DP. (2001) Regulation of the *ldhA* Gene, Encoding the Fermentative Lactate Dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**:2437-46.

Jordan PA, Thomson AJ, Ralph ET, Guest JR, Green J. (1997) FNR is a Direct Oxygen Sensor Having a Biphasic Response Curve. *FEBS Lett.* **416**: 349–52.

Kaga N, Umitsuki G, Clark DP, Nagai K, Wachi M. (2002) Extensive Overproduction of the AdhE Protein by *mg* Mutations Depends on Mutations in the *cra* Gene or in the Cra-Box of the *adhE* Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**: 92-97.

Kaspar S, Bott M. (2002) The Sensor Kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* Functions as a High-Affinity Citrate Receptor. *Arch. Microbiol.* **177**: 313-21.

Kennell D. (2002) Dialog: Processing Endoribonucleases and mRNA Degradation in Bacteria. *J. Bacteriol.* **184**: 4645-57.

Kessler D, Herth W, Knappe J. (1992) Ultrastructure and Pyruvate-Formate-Lyase Radical Quenching Property of the Multienzymic AdhE Protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 18073-9.

Kessler D, Leibrecht I, Knappe J. (1991) Pyruvate-Formate-Lyase Deactivase and Acetyl-CoA Reductase Activities of *Escherichia coli* Reside on a Polymeric Protein Particle Encoded by *adhE*. *FEBS Lett.* **1-2**: 59-63.

Khoroshilova N, Popescu C, Münck E, Beinert H, Kiley P. (1997) Iron-Sulphur Cluster Disassembly in the FNR Protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] Conversion with Loss of Biological Activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6087–92.

Kumari S, Beatty CM, Browning DF, Busby SJW, Simel EJ, Hovel-Miner G, Wolfe AJ. (2000) Regulation of Acetyl Coenzyme A Synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 4173-79.

Kumari S, Simel EJ, Wolfe AJ. (2000) σ^{70} is the Principal Sigma Factor Responsible for the Transcription of *acs*, which Encodes Acetyl Coenzyme A Synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 551-4.

Lee K, Bernstein JA, Cohen SN. (2002) RNase G Complementation of *rne* Null Mutation Identifies Functional Interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **43**: 1445-56.

Leonardo MR, Dailly Y, Clark DP. (1996) Role of NAD⁺ in Regulating the *adhE* Gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6013-8.

Lin ECC, Iuchi S. (1991) Regulation of Gene Expression in Fermentative and Respiratory Systems in *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 361- 87.

Lin ECC, Lynch SA. (1996) Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. Chapman & Hall. New York.

Lowry OH, Rosenborough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-75.

Markwell MAK, Hass SM, Tolbert NE, Bieber LL. (1981) Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples: Manual and Automated Procedures. *In methods in Enzymology* **72**:296-303 ed. Lowestein SM. New York Academic Press.

Matsushika A, Mizuno T. (1998) A Dual-Signalling Mechanism Mediated by the ArcB Hybrid Sensor Kinase Containing the Histidine-Containing Phosphotransfer Domain in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **180**: 3973-77.

Mattatall NR, Sanderson KE. (1998) RNase III Deficient *Salmonella typhimurium* LT2 Contains Intervening Sequences (IVSs) in its 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett* **159**: 179–85.

Membrillo-Hernández J. (1996) Regulation of Expression of the *Escherichia coli* Flavohaemoglobin and Relationships with Other Globins. *Doctor of Philosophy Thesis*. Kings College London.

Membrillo-Hernández J, Echave P, Cabisco E, Tamarit J, Ros J, Lin ECC. (2000) Evolution of the *adhE* Gene Product of *Escherichia coli* from a Functional Reductase to a Dehydrogenase: Genetic and Biochemical Studies of the Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* **275**: 33869-75.

Membrillo-Hernández J, Kwon O, De Wulf P, Finkel S, Lin ECC. (1999) Regulation of *adhE* (Encoding Ethanol Oxidoreductase) by Fis Protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 7390-93.

Membrillo- Hernández J, Lin ECC. (1999) Regulation of Expression of the *adhE* Gene, Encoding Ethanol Oxidoreductase in *Escherichia coli*: Transcription from a Downstream Promoter and Regulation by Fnr and RpoS. *J. Bacteriol.* **181**: 7571-79.

Mikulskis A, Aristarkhov A, Lin ECC. (1997) Regulation of Expression of the Ethanol Dehydrogenase Gene (*adhE*) in *Escherichia coli* by Catabolite Repressor Activator Protein Cra. *J. Bacteriol.* **179**: 7129-34.

Miller JH. (1972) *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.J.

Nam TW, Cho SH, Shin D, Kim JH, Jeong JY, Lee JH, Roe JH, Peterkofsky A, Kang SO, Ryu S, Seok YJ. (2001) The *Escherichia coli* Glucose Transporter Enzyme IICB^{Glc} Recruits the Global Repressor Mic. *EMBO J.* **20**: 491-8.

NC (Nomenclature Committee) IUBMB. (1992) *Enzyme Nomenclature*. Ed. Academic Press

Poole RK, Cook GM. (2000) Redundancy of Aerobic Respiratory Chains in Bacteria? Router, Reasons and Regulation. *Adv. In Microbial Physiol.* **43**: 165-224.

Poole RK, D'mello R, Hill S, Ioannidis N, Leung D, Wu G. (1994) The Oxygen Reactivity of Bacterial Respiratory Haemoproteins: Oxidases and Globins. *Biochem. Biophys. Acta.* **1187**: 226-31.

QIAGEN. (2000) QIAGEN Plasmid Purification Handbook: 66-73.

QIAGEN. (2001) QIAquick^R Spin Handbook: 17-25.

Rebbapragada A, Johnson MS, Harding GP, Zuccarelli AJ, Fletcher HM, Zhulin IB, Taylor BL. (1997) The Aer Protein and the Serine Chemoreceptor Tsr Independently Sense Intracellular Energy Levels and Transduce Oxygen, Redox, and Energy Signals for *Escherichia coli* Behaviour. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10541-46.

Robertson HD, Webster RE, Zinder ND. (1968) Purification and Properties of Ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **243**: 82-91.

Sambrook J, Russell DW. (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd Edition.

Sawers G. (1999) The Aerobic/Anaerobic Interface. *Curr. Opin. In Microbiology.* **2**: 181-87.

Silhavy TJ, Berman ML, Enquist L. (1984) *Experiments with gene fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Simons RW, Houman F, Kleckner N. (1987) Improved Single and Multicopy *lac*- Based Cloning Vectors for Protein and Operon Fusions. *Gene*. **53**: 85-96.

Simons RW. (2002) Web Page:

http://www.mimq.ucla.edu/faculty/simons/fac_simons.html

Stewart V. (1988) Nitrate Respiration in Relation to Facultative Metabolism in Enterobacteria. *Microbiol. Rev.* **52**: 190-232.

Tamarit J, Cabiscol E, Ros J. (1998) Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells Exposed to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **273**: 3027-32.

Tock MR, Walsh AP, Carrol G, McDowall KJ. (2000) The CafA Protein Required for the 5'-Maturation of 16S rRNA is a 5'-End-Dependent Ribonuclease that has Context-Dependent Broad Sequence Specificity. *J. Biol. Chem.* **275**: 8726-32.

Umitsuki G, Wachi M, Takada A, Hikichi T, Nagai K. (2001) Involvement of Rnase G in *in vivo* mRNA Metabolism in *Escherichia coli*. *Genes to Cells*. **6**: 403-10.

Vasudevan SG, Armarego WLF, Shaw DC, Lilley PE, Dixon NE, Poole RK. (1991) Isolation and Nucleotide Sequence of the *hmp* Gene that Encodes a Haemoglobine-Like Protein from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 49-58.

Wachi M, Kaga N, Umitsuki G, Clark DP, Nagai K. (2001) A Novel RNase G Mutant that is Defective in Degradation of *adhE* mRNA but Proficient in the Processing of 16S rRNA Precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 1301-6.

Wagner AFV, Schultz S, Bomke J, Pils T, Lehmann WD, Knappe J. (2001) YfiD of *Escherichia coli* and YO61 of Bacteriophage T4 as Autonomous Glycyl Radical Cofactors

Reconstituting the Catalytic Center of Oxygen-Fragmented Pyruvate Formate Lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 456-62.

White D. (1995) The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. Chapter 14: Fermentations. *Oxford Press*.

Zuker J. (1989) On Finding All Suboptimal Foldings of an RNA Molecule. *Science* **244**: 48-52; para manipular el RNA se usó el programa que está en la red: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/manip/index.html>