



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL REGULÓN DE SACAROSA EN  
CEPAS PATÓGENAS DE *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO:

RICARDO GONZÁLEZ CHÁVEZ

TUTOR

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

2007



Facultad de Ciencias  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## DEDICATORIA

*A mi madre: Eloisa Chávez.*

*Quise escribirte estas líneas antes de mi examen y que las leyeras cuando yo me encuentre en él, para recibir tus bendiciones justo en ese momento. Quiero que sepas que te agradezco mucho el apoyo que me has brindado, como siempre me has dado una lección de vida!!*

*Se que hemos empezado un camino difícil, que la meta aún está lejos de conseguir, ANIMO ¡! Estamos al inicio de una etapa muy dura mamá, pero juntos vamos a salir adelante, tengo un compromiso de amor y lealtad contigo, aunque las cosas pintan de diferentes maneras, te aseguro y te afirmo que estoy contigo de igual forma a la que tu estás conmigo, pronto verás que esa semillita de LUCHA que sembraste en mí dará frutos.*

*Quiero que sepas que ya inicie esto y si Dios tiene para mí destinado un camino con muchos obstáculos, no me voy a detener, por que si algo he aprendido de ti en todos estos años es a ser un luchador incansable de mis metas y sueños, así que esto ya es una meta de vida, por lo que la batalla es más fácil de ganar si nos unimos, con amor y con paciencia, pues somos seres diferentes pero con un mismo fin ¡¡¡*

*Gracias mamá, por esta oportunidad que me brindas; sin tu apoyo y sin tu ejemplo no estaría ahora aquí cumpliendo mis sueños ¡!!*

*TU ERES MI EJEMPLO MAS GRANDE ¡! Tu eres el ejemplo que quiero seguir y es a ti a quien quiero premiar con mi esfuerzo, gracias mamá por sacrificararte y por todo el amor y cariño que siempre me has regalado ¡!!!*

*ESTA VA POR NOSOTROS!!!!*

*Tu hijo: Ricardo González Chávez.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a cada uno de los integrantes del jurado: Dr. Guillermo Gosset, Dr. Luis Gerardo Treviño, Dr. José Adelfo Escalante, Dr. José Luis Puente y al Dr. Víctor Valdés por la revisión de este trabajo. Cada uno de sus comentarios y observaciones han sido de gran ayuda para la realización y culminación de este proyecto.

A todos los miembros del laboratorio Gosset-Bolívar del Instituto de Biotecnología, por haberme ayudado en las cuestiones técnicas, pero sobre todo por brindarme su apoyo y amistad.

A cada uno de mis maestros de la Facultad de Ciencias por haberme mostrado el maravilloso mundo de la biología.

A cada uno de mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias por haberme brindado su amistad.

A mis hermanos, Araceli, Susana, Edmar y Miguel quienes siempre de alguna manera me apoyaron para seguir adelante con mis estudios.

A todos los miembros del laboratorio 226 Norte del Instituto de Fisiología Celular por brindarme su apoyo y amistad, especialmente al Dr. Dimitris Georgellis por darme la oportunidad de continuar con mis estudios.

Hoy termina un ciclo en mi vida, pero inicia otro.

GRACIAS A TODOS.

## **APOYO ACADÉMICO**

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Guillermo Gosset Lagarda, perteneciente al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus: Cuernavaca, Morelos. (2003-2004).

Agradezco al instituto de Biotecnología. UNAM-PAPIIT, por el apoyo económico para la realización de esta tesis bajo el proyecto: Howard Huges Departamental. P-133.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
González Chávez Ricardo  
54 46 15 52  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
095221500
2. Datos del tutor  
Dr.  
Guillermo  
Gosset  
Lagarda
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
José Luis  
Puente  
García
4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Luis Gerardo  
Treviño  
Quintanilla
6. Datos del sinodal 4  
Dr.  
José Adelfo  
Escalante  
Lozada
7. Datos del trabajo escrito  
Análisis funcional del regulón de sacarosa en cepas patógenas de *Escherichia coli*  
57 p  
2007

# ÍNDICE

	Página
<b>RESÚMEN.</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> . .....	9
1.1 Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> . .....	10
2. SISTEMA DE FOSFOTRANSFERENCIA (PTS) DE SACAROSA: DEPENDIENTE DE FOSFOENOLPIRUVATO (PEP). .....	13
3. SISTEMA NO DEPENDIENTE DE FOSFOTRANSFERENCIA (NO-PTS): SIMPORTE DE SACAROSA. ....	19
<b>ANTECEDENTES</b>	
1. Aislamiento y caracterización de seis cepas enteropatógenas de <i>Escherichia coli</i> (EPEC). .....	23
2. Identificación y caracterización de los genes involucrados en el fenotipo Scr + .....	25
3. Secuenciación del inserto en pSac13. ....	26
4. Identificación de la región genómica en donde se localiza el regulón <i>scr</i> en las cepas EPEC.	
4.1 Análisis bioinformático. ....	27
4.2 Análisis experimental. ....	28
<b>OBJETIVOS.</b>	
Objetivo general. ....	31
Objetivos particulares. ....	31

<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
-----------------------	-----------

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

Cepas enteropatógenas de <i>Escherichia coli</i> (EPEC). .....	33
Cinéticas de crecimiento y condiciones de cultivo. ....	33
Determinación de la actividad específica de la enzima: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa.....	34

## **RESULTADOS.**

Cinéticas de crecimiento de las cepas EPEC. ....	36
Determinación de la actividad específica: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa.....	39

<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
--------------------------------------	-----------

<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
--------------------------	-----------

<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>44</b>
-------------------------	-----------

### **ANEXO I. Artículo de investigación:**

Treviño-Quintanilla, L.G., Escalante, A., Caro, D. A., Martínez, A., González, R., Puente, L. J., Bolívar, F. and Gosset, G.2007. The phosphotransferase system dependent sucrose utilization regulon in enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains is located in a variable chromosomal region containing <i>iap</i> sequences.J Mol Microbiol Biotechnol. Vol. 13. No. 1-3.....	49
---	----

## RESUMEN

Aproximadamente el 50% de las cepas de *Escherichia coli* tienen la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Scr<sup>+</sup>). En este estudio, siete cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC) fueron estudiadas para conocer su capacidad de crecimiento en sacarosa. Los cultivos en medios líquidos suplementados con sacarosa, demostraron que las siete cepas analizadas (E2348/69, T2, T12, T18, T19, T23 y T45) presentan el fenotipo Scr<sup>+</sup>, distinguiendo dos grupos de crecimiento específico. Este conjunto de cepas presentaron tiempos de duplicación de 67 (E2348/69, T2, T19, T23 y T45) y 125 minutos (T12 y T18), respectivamente. La determinación de la actividad de hidrólisis de la enzima: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa fue utilizada como indicador de la actividad metabólica. El resultado de este análisis demuestra que la diferencia en la capacidad de crecimiento por parte de las cepas T12 y T18 no se encuentra asociada a la actividad específica de la enzima sacarosa-6-fosfato-hidrolasa, ya que no se observó una diferencia significativa en dichas actividades. El análisis de la secuencia del regulón *scr* de la cepa T19 reveló una alta frecuencia del fenotipo Scr<sup>+</sup> en organismos patógenos. Estos resultados indican la posibilidad de que la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente del carbono en los microorganismos patógenos, se encuentre relacionada con los procesos de colonización y patogénesis.

# INTRODUCCIÓN

## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *ESCHERICHIA COLI*.

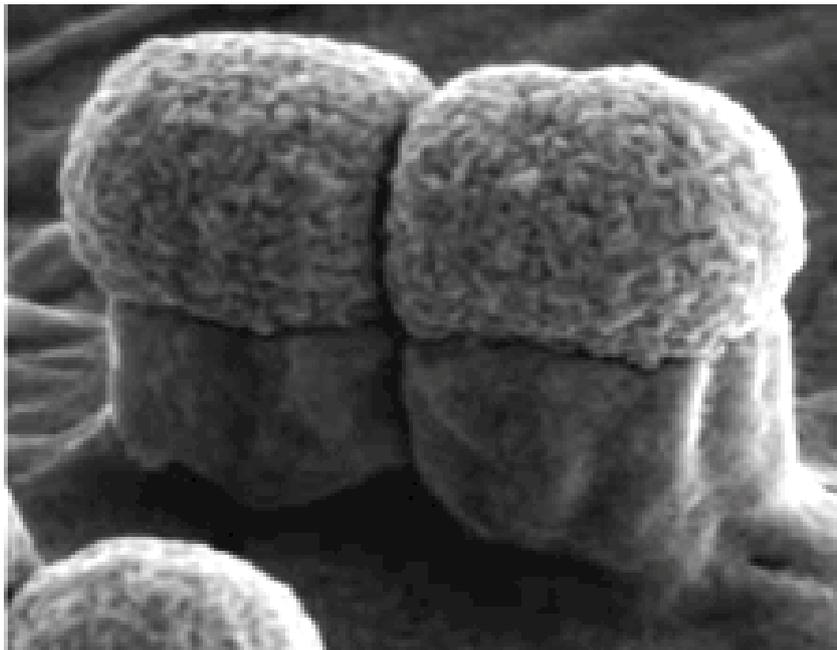
*Escherichia coli* es un bacilo anaerobio facultativo, gram negativo, perteneciente al Phylum: Proteobacteria; Clase: Gammaproteobacteria; Orden: Enterobacteriales; Familia Enterobacteriaceae y Género: Escherichia. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal del humano pocas horas después del nacimiento, favoreciendo un beneficio mutuo para ambos organismos, por lo que es considerado un microorganismo de flora normal (Holt et al., 1994; Nataro y Kaper., 1998; Rodríguez-Ángeles., 2002). *E. coli*-K12 presenta un genoma de DNA circular dúplex de 4 639 221 pb, donde el 87.8% de total del genoma corresponde a secuencias codificantes para proteínas, el 0.8% corresponde a secuencias codificantes para diferentes RNAs, el 0.7% corresponde a secuencias repetidas no codificantes y aproximadamente el 11.0% corresponden a secuencias regulatorias (Blattner et al., 1997). Dentro de las secuencias repetidas no codificantes se encuentra una secuencia altamente conservada de 29 pb registrada entre las 2 875 665 y 2 902 430 pb. Esta secuencia repetida consecutivamente, nombrada *iap* (por localizarse a 32 ó 33 pb corriente abajo del gen *iap* que codifica para una aminopeptidasa de conversión de la isoenzima fosfatasa alcalina) se encuentra en tres regiones ó clusters de 14, 7 y 2 copias, registrando un total de 23 copias. Las secuencias *iap* presentan una secuencia conservada consenso de 29 pb: CGGTTTATCCCGCTGGCGCGGGGAACAC (las bases subrayadas se conservan en todas las repeticiones). Es importante destacar que dentro de la región intergénica que comprenden los genes *ygcF-ygcE* de *E. coli*, se encuentra una región de 9 secuencias repetidas *iap*, asociadas a otra región de 14 secuencias *iap*, las cuales se localizan 24 Kb corriente arriba de dicha región (Nakata et al., 1989; Blattner et al., 1997).

Es de un notable interés que en el resto del genoma *E. coli*, no se encuentren copias adicionales de dicha secuencia. Sin embargo, a pesar de que estas se han detectado en los genomas de *E. coli* K10, *E. coli* MG1655, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*, aún no se conoce su función celular específica (Bachellier et al., 1996).

### **1.1 Cepas patógenas de *Escherichia coli*.**

*E. coli* es considerada parte de la flora bacteriana normal del ser humano, sin embargo existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño en el hombre, produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Con base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* se han clasificado en seis grupos principales: Enterotoxigénica (ETEC), Enterohemorrágica o también conocida como productora de toxinas Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EAEC), de adherencia difusa (DAEC) y Enteropatógena (EPEC) (Levine et al., 1978; Nataro y Kaper., 1998; Rodríguez-Ángeles., 2002; Dulguer et al., 2003). Estas cepas se pueden aislar de pacientes que presentan los síntomas característicos o incluso pueden identificarse tradicionalmente con base en sus características bioquímicas y serológicas. Sin embargo, también se pueden estudiar los diferentes mecanismos de patogenicidad, a través de ensayos en cultivos celulares o modelos animales y más recientemente empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos (Rodríguez-Ángeles., 2002). En este sentido, Kauffman ha desarrollado un esquema de serotipificación para determinar el grupo patógeno al que pertenece cada cepa aislada. Este esquema contiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo, mientras que la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Nataro y Kaper., 1998).

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes menores de seis meses, principalmente en países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper., 1998; Scaletsky et al., 1985). EPEC se adhiere a las células epiteliales intestinales (enterocitos) a través de la formación de la fimbria BFP (Bundle-Forming Pilus) (Scaletsky et al., 1984). Al proceso de adherencia localizada (LA) entre la bacteria y la membrana de las células epiteliales intestinales, que es dirigido por la producción de la fimbria tipo IV(codificada en el plásmido EAF [EPEC Adherente Factor]), seguido de la destrucción de las microvellosidades con polimerización de actina y alteración del citoesqueleto para la formación de una estructura llamada “pedestal”, debido al aumento en los niveles de calcio intracelular y de la proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E) (figura. 1).



**Figura 1.** Imagen por microscopía electrónica que muestra la formación del pedestal que induce EPEC en la superficie de los enterocitos (Nature Reviews Microbiology 4, 91-101 February 2006).

Cabe destacar, que las proteínas responsables de la lesión A/E, (intimina y diferentes proteínas pertenecientes al sistema de secreción tipo III) codificadas en la región cromosomal de 35.6 Kb llamada: isla de patogenicidad LEE (Locus for Enterocyte Effacement) desempeñan un papel importante durante los diferentes procesos de señalización intracelular cuando las condiciones medioambientales y de crecimiento son específicas (Nataro y Kaper., 1998; Rodríguez-Ángeles., 2002). En este sentido, Vanmaele y coautores (1997) reportan que al infectar células epiteliales Hep-2 con dos cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC E2348/69 y EPEC JPN15) que crecen en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado con 0.45% de glucosa y galactosa respectivamente, es posible observar diferencias fenotípicas de adherencia. Cuando EPEC E2348/69 es cultivada en DMEM suplementado con glucosa es posible observar un incremento en la expresión de las proteínas intimina y BfpA, generando en el 96.0% de las células Hep-2 un fenotipo LA<sup>+</sup>. Por el contrario, cuando EPEC E2348/69 es cultivada en presencia de galactosa no se observa ningún tipo de adherencia (Fenotipo LA<sup>-</sup>). Estos últimos resultados son similares a los observados con la cepa EPEC JPN15. El estudio demuestra que la glucosa se encuentra regulando los factores de virulencia asociados al proceso de adherencia localizada (Vanmaele et al., 1997).

Diversos estudios indican que las cepas patógenas de *Klebsiella pneumoniae* (causante de neumonía y septicemia en humanos) y *Erwinia amylovora* (patógeno de plantas, principalmente de rosáceas) son capaces de utilizar la sacarosa como única fuente de carbono, a través del sistema de fosfotransferencia (PTS): sacarosa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) (Sprenger y Lengeler., 1988; Titgemeyer et al., 1996 Bogs et al., 2000). En contraste, la cepa patógena EHEC EDL933 (O157:H7) de tipo silvestre (que causa el síndrome urémico hemolítico en el hombre), es capaz de utilizar la sacarosa mediante el sistema no dependiente de fosfotransferencia (no-PTS): simporte de sacarosa (Perna et al., 2001; Jahreis et al., 2002).

## **2. SISTEMA DE FOSFOTRANSFERENCIA (PTS) DE SACAROSA: DEPENDIENTE DE FOSFOENOLPIRUVATO (PEP)**

Generalmente los microorganismos bacterianos tienen la capacidad de responder y adaptarse a los diferentes cambios del medio ambiente e incluso de competir por los nutrientes limitantes. Esto es posible, gracias a la expresión y utilización de diferentes sistemas sensores que monitorean constantemente el medio extracelular. En este sentido, *E. coli* posee la capacidad de elegir, a partir de una mezcla de fuentes de carbono, aquella que le permite crecer más rápidamente, reprimiendo la transcripción de los genes responsables del transporte y catabolismo de diferentes carbohidratos, a través de la disminución en la concentración de AMPc. A este proceso se le denomina represión catabólica (Postma et al., 1993; Wang et al., 2001; Flores et al., 2005). El sistema sensor responsable de esta respuesta es el sistema de fosfotransferencia (PTS): carbohidrato dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). El mecanismo sensor-transductor de señales, que involucra el transporte y catabolismo de la sacarosa acoplado a la transferencia de grupos fosfato dependientes de PEP se denomina: Sistema de fosfotransferencia (PTS) de sacarosa: dependiente de PEP (Sauter et al., 2004).

Este sistema ha sido estudiado en diferentes bacterias gram positivas (Thompson et al., 1981; Reid y Abratt., 2005) y gram negativas (Nelson et al., 1982; Sprenger y Lengeler., 1988; Thompson et al., 1992; Bogs et al., 2000). En este sentido, Schmid y coautores (1998) reportan que *Salmonella typhimurium* es capaz de utilizar la sacarosa como única fuente de carbono mediante el sistema PTS de sacarosa: dependiente de PEP. Los genes responsables del transporte y catabolismo de la sacarosa (genes *scr*), que se han detectado en los transposones CTnscr94, Tn2555 y en el plásmido pUR400, se encuentran organizados como unidades transcripcionales continuas expresadas a partir de diferentes secuencias promotoras, las cuales se encuentran reguladas por la proteína

represora ScrR. A este conjunto de unidades transcripcionales se les denomina "regulón *scr*" (Hochhut et al., 1997; Schmid et al., 1988; Pembroke et al., 2002; Doroshenko et al., 2004). Por el contrario, Bockmann y coautores (1992) indican que *E. coli* K-12 no tiene la capacidad de utilizar la sacarosa como única fuente de carbono (fenotipo Scr<sup>-</sup>). Sin embargo, aproximadamente el 50 % de las cepas de *E. coli* tipo silvestre presentan el fenotipo Scr<sup>+</sup> (Bockmann et al., 1992).

Con el objeto de caracterizar al sistema PTS de sacarosa: dependiente de PEP en *E. coli*, se han propuesto diferentes modelos teóricos y experimentales que involucran la transferencia del regulón *scr* (78 kb derivados del plásmido pUR400 de *Salmonella typhimurium*) dentro del cromosoma de *E. coli* K-12 (Schmid et al., 1998) y *E. coli* W3110 (Wang et al., 2001; Sauter et al., 2004) respectivamente. De acuerdo con estos modelos, el sistema PTS: sacarosa dependiente de PEP se encuentra constituido por ocho proteínas diferentes, tres de las cuales pertenecen al sistema general de PTS. Estas proteínas: Enzima I (EI; gene *ptsI*), Histidine containing phosphocarrier protein; (Hpr; gene *ptsH*) y la enzima IIA (EIIA<sup>Crr</sup>; gene *crr* por catabolite repression resistance) que se encuentran codificadas en el cromosoma de *E. coli* y cuyos genes se encuentran organizados en el operón *ptsHlcrr*, son las responsables de la transferencia de grupos fosfato durante el transporte y catabolismo de diferentes carbohidratos: D-glucosa, D-manosa y D-fructosa entre otros (Alaeddinoglu et al., 1979; Wang et al., 2001). Adicional al transporte de carbohidratos, estas enzimas citoplasmáticas, solubles de energía acoplada, desempeñan un papel regulatorio durante los procesos de represión catabólica y quimiotaxis (Postma et al., 1993).

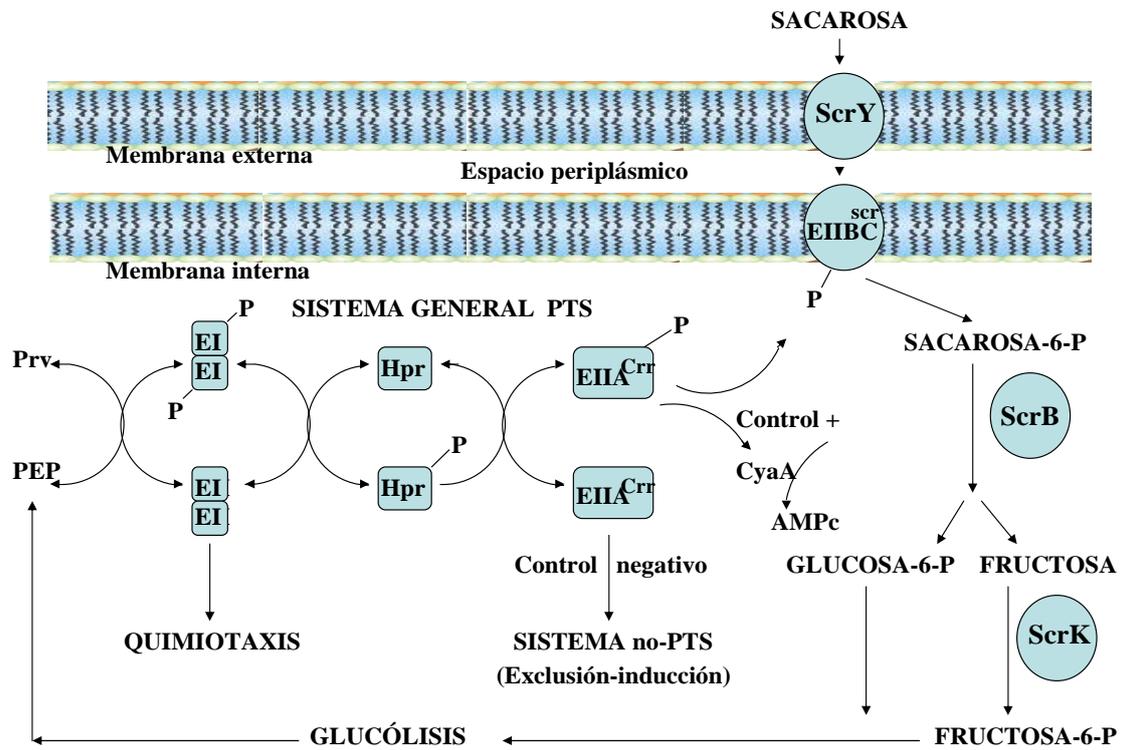
Cabe destacar, que durante los procesos de regulación transcripcional el complejo AMPc (Adenosina-3'-5'-monofosfato cíclica)-CRP (Proteína receptora de AMPc; gene *crp*, anteriormente nombrada CAP) ejerce un control positivo sobre la expresión de los genes *ptsH* y *ptsI*. Alternativamente, el represor global Mlc (Making large colonies, anteriormente nombrado DgsA) y el represor de fructosa FruR interaccionan físicamente con las secuencias promotoras P<sub>0</sub> y P<sub>1</sub> respectivamente, ejerciendo un control negativo sobre la expresión del operón *ptsH/crr*. A pesar del que el gene *crr* es resistente a represión catabólica, la proteína H-NS (Histone-like nucleoid-structuring protein) interacciona físicamente con las secuencias promotoras P<sub>2</sub>, ejerciendo un control positivo sobre la expresión de este gene (Krin et al., 2002). Las cinco proteínas restantes involucradas en el transporte y catabolismo de la sacarosa se encuentran codificadas en el regulón *scr*, el cual esta constituido por dos operones (*PscrK* y *PscrYAB*) bajo la misma dirección en la transcripción y cuyas secuencias promotoras (P) independientes, se encuentran asociadas a una secuencia palindrómica de 6pb (TAAACC/GGTTTA) que es considerada sitio de interacción con la proteína represora ScrR. Corriente arriba de esta secuencia regulatoria (solamente en el operón *PscrYAB*) se localiza otra región de 22 pb considerada sitio de unión al complejo AMPc-CRP (Cowan et al., 1991).

Físicamente, el regulón *scr* se encuentra constituido por cinco genes estructurales: *scrK* (codifica para la enzima intracelular ScrK: fructocinasa dependiente de ATP [EC 2.7.1.4], *scrY* (codifica para la porina de membrana externa, sacarosa-especifica llamada ScrY, la cual presenta 85 % de homología con la permeasa de maltosa LamB), *scrA* (codifica para la permeasa de membrana interna, PTS: sacarosa específica: EIIBC<sup>Scr</sup>) y *scrB* (codifica para la invertasa: β-D-fructofuranosido fructohidrolasa [EC 3.2.1.26], también nombrada sacarosa-6-fosfato-hidrolasa), todos ellos bajo el control negativo de la proteína represora ScrR (gene *scrR*) que pertenece a la familia de represores LacI-GalR (Wang et al., 2001; Bogs et al., 2000).

Es importante destacar que, únicamente el operón *PscrYAB* se encuentra regulado positivamente por el complejo AMPc-CRP (Hardesty et al., 1991; Cowan et al., 1991; Bogs et al., 2000). Alternativamente el regulón *scr* puede ser inducido por la presencia de sacarosa (en el medio extracelular), fructosa (como inductor intracelular) ó arabinosa. Por el contrario, puede ser reprimido por la presencia de D-glucosa, D-galactosa, lactosa ó melobiosa (Schmid et al., 1988; Sprenger y Lengeler., 1988; Titgemeyer et al., 1996).

Funcionalmente, el modelo del sistema PTS: sacarosa dependiente de PEP en *E. coli* involucra una cascada inicial de fosforilación como vía común, en la cual la enzima EI es autofosforilada (His189) a partir del PEP. Subsecuentemente EI en su conformación dimérica transfiere el grupo fosfato a la enzima Hpr (His15) y esta a su vez transfiere el grupo fosfato a la enzima EIIA<sup>Crr</sup> (His90) (Postma et al., 1993; Sauter., et al 2004). La enzima EIIA<sup>Crr</sup> en su estado fosforilado (EIIA<sup>Crr</sup> ~P) sigue dos rutas principales, dependiendo de la presencia o ausencia de sacarosa. Bajo estas últimas condiciones, existe una alta concentración de EIIA<sup>Crr</sup> ~P (baja concentración de EIIA<sup>Crr</sup> no fosforilada), lo que induce la activación de la enzima adenilato ciclasa (gen *cyaA*) produciendo un aumento en la síntesis de AMPc. Cuando el complejo AMPc-CRP interacciona físicamente con la subunidad  $\alpha$  de la enzima RNA polimerasa, este actúa como un activador transcripcional de los genes responsables del transporte y catabolismo de diferentes carbohidratos, como lactosa o glicerol. En presencia de sacarosa, este carbohidrato es transportado por difusión facilitada, hacia el espacio periplásmico por acción de la porina trimérica ScrY. Subsecuentemente la sacarosa es transportada hacia el citoplasma por acción de la enzima EIIBC<sup>Scr</sup> (Krin et al., 2002).

Bajo estas mismas condiciones, existe una baja concentración  $EIIA^{Crr} \sim P$  intracelular (alta concentración de  $EIIA^{Crr}$  no fosforilada) ya que el grupo fosfato es transferido rápidamente a la permeasa  $EIIBC^{Scr}$ , la cual transporta y simultáneamente fosforila a la sacarosa en el carbono 6 (sacarosa-6-fosfato). Una vez que la sacarosa se encuentra fosforilada es hidrolizada por la enzima sacarosa-6-fosfato hidrolasa generando dos productos principales. El primer producto (glucosa-6-fosfato) es directamente incorporado a la vía de la glucólisis, mientras que el segundo producto (fructosa), es fosforilado por la enzima fructocinasa dependiente de ATP y cuyo producto resultante (fructosa-6-fosfato) también es incorporado a la ruta de la glucólisis (Sauter et al., 2004). Cuando existe una alta concentración de  $EIIA^{Crr}$  en su estado no fosforilado, esta enzima tiende a interactuar con otras proteínas transportadoras de carbohidratos pertenecientes a los sistemas no-PTS (glicerol y lactosa), ejerciendo un control negativo sobre estos sistemas (figura 2). A este proceso se le llama exclusión-inducción (Postma et al., 1996). Bajo este mismo modelo, cuando *E. coli* K-12 (que contiene el plásmido pUR400 derivado *Salmonella typhimurium*) crece en medio rico LB suplementado con 0.2 % de sacarosa, se observa una alta eficiencia en la asimilación de este azúcar, ya que la permeasa  $EIIBC^{Scr}$  presenta una actividad de transporte de 280 pmoles/min·mg de proteína, asociada a una actividad específica por parte de la invertasa de 190 nmoles/min·mg de proteína. (Schmid et al., 1988)



**Figura 2.** Modelo del sistema de fosfotransferencia (PTS) de sacarosa: dependiente de PEP en *E. coli* de acuerdo con Sauter et al. 2004. La figura muestra las dos etapas principales en la utilización de la sacarosa por *E. coli*. Durante la primera etapa, se lleva a cabo la transferencia de grupos fosfato (a partir de PEP) por acción de las enzimas generales del sistema PTS. Durante la segunda etapa, la sacarosa es transportada y fosforilada por acción de la enzima EIIBC<sup>scr</sup>. Subsecuentemente la sacarosa-6-P es hidrolizada por la enzima: sacarosa-6-fosfato.hidrolasa, generando dos productos principales: glucosa-6-fosfato y fructosa. Este último producto es fosforilado por la enzima ScrK dependiente de ATP. Ambos productos son incorporados a la glucólisis generando PEP, el cual es utilizado por la enzima EI para iniciar nuevamente el ciclo de transferencia de grupos fosfato.

### **3. SISTEMA NO DEPENDIENTE DE FOSFOTRANSFERENCIA (NO-PTS): SIMPORTE DE SACAROSA.**

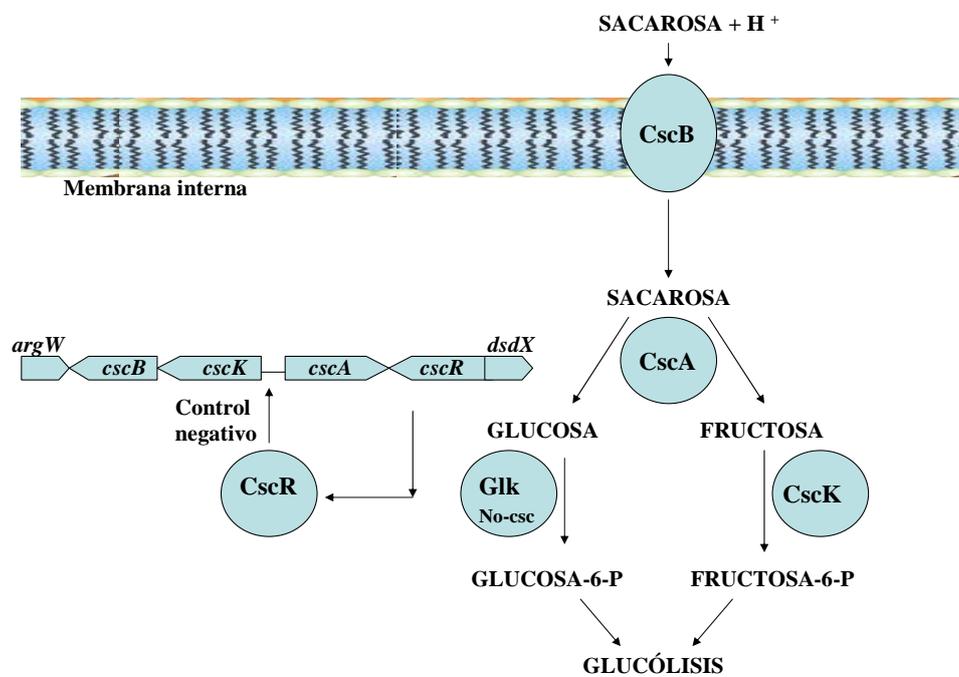
El sistema no dependiente de fosfotransferencia (no-PTS): simporte de sacarosa es un sistema sensor-transductor de señales que involucra el transporte y catabolismo de la sacarosa a través de la expresión del regulón de sacarosa *csc* (chromosomally encoded sucrose catabolism). Diversos estudios indican que *E. coli* B-62, *E. coli* EC3132 y EHEC EDL933 (O157:H7) de tipo silvestre, tienen la capacidad de utilizar la sacarosa como única fuente de carbono, mediante el sistema no-PTS: simporte de sacarosa (Sahin-Tóth et al., 1999; Bockmann et al., 1992; Hayashi et al., 2001).

En *E. coli* EC3132 y EHEC EDL933 (O157:H7), los regulones *csc* codificados a nivel cromosomal, se encuentran constituidos por cuatro genes estructurales: *cscK* (codifica para una fructocinasa intracelular: CscK), *cscB* (codifica para la permeasa de membrana interna responsable del transporte de sacarosa, llamada CscB), *cscA* (codifica para la invertasa intracelular CscA) y *cscR* (codifica para la proteína represora perteneciente a la familia de represores LacI-GalR llamada CscR), el cual se transcribe en dirección opuesta al gene *cscA*. Sin embargo estos genes se encuentran organizados en dos operones (*PcscKB* y *PcscA*) con transcripción divergente y cuyas secuencias promotoras (P) se encuentran asociadas a dos operadores independientes (GTTAAC/GTTAAC) que al interactuar con el represor CscR se induce un control negativo transcripcional sobre el regulón *csc*. Alternativamente, el complejo AMPc-CRP ejerce un control positivo sobre el regulón *csc* al interactuar con dos secuencias independientes de 22 pb que se localizan corriente arriba de las secuencias promotoras -35 de los genes *cscK* y *cscA* respectivamente (Jahires et al., 2002).

De acuerdo con el mapa genético comparativo reportado por Jahreis y coautores (2002), los regulones *csc* de *E. coli* EC3132 y EHEC EDL933 O157:H7 se encuentran localizados en la región hot spot equivalente a la región cromosomal de *E. coli* K-12, localizada entre los 53.0 y 53.4 min. Estas secuencias codificantes se encuentran remplazando de forma parcial los genes involucrados en la utilización de D-serina (regulón *dsd*), sin embargo, en ambos casos aún es posible detectar en dirección 5', adyacente al gene *cscR* parte del gene *dsdx* que codifica para un posible transportador de D-serina. Corriente abajo de este gene, se localiza de forma inactiva el gene *dsdA* que codifica para la enzima D-serina desaminasa. En sentido opuesto al gene *dsdx* (dirección 3') se localiza una secuencia repetida de 21 pb, perteneciente al gene *argW* que codifica para un RNAt específico para arginina. Esta secuencia localizada entre los genes *Z3622* y *cscB* es considerada un sitio específico de integración, ya que frecuentemente es utilizada por ciertos bacteriófagos (fago lambda y otros elementos genéticos transponibles) para integrar al cromosoma bacteriano diferentes islas genómicas, que incluyen islas de patogenicidad, factores de virulencia o incluso vías metabólicas completas, como es el caso del regulón *csc* (Jahires et al., 2002).

Funcionalmente, el sistema no-PTS: simporte de sacarosa se encuentra asociado al nivel de expresión del regulón *csc*, el cual depende cualitativamente y cuantitativamente del azúcar inductor. En este sentido, cuando existe sacarosa en el espacio periplásmico, la permeasa CscB de *E. coli* EC3132 (que presenta 30 % de homología con la permeasa de lactosa LacY de *E. coli* y que pertenece a la familia de transportadores MFS [Major Facilitator Superfamily]) induce el transporte activo de la sacarosa que simultáneamente se asocia con la translocación de protones (H<sup>+</sup>) hacia el espacio citoplasmático (Shain-Tóth et al., 1995).

Una vez que la sacarosa se encuentra en el interior celular, la invertasa CscA (que presenta 98% de homología con la sacarosa-hidrolasa de *E. coli* B-62) induce la hidrólisis de la sacarosa, generando dos productos principales: D-glucosa y D-fructosa (figura 3). El primer producto es fosforilado por una fructocinasa que no es codificada por el regulón *csc*, mientras que el segundo producto es fosforilado por acción de la fructocinasa CscK (que presenta 74% de homología con la fructocinasa ScrK del plásmido pUR400 derivado de *Salmonella typhimurium*) generando un tercer producto: fructosa-6-fosfato. Finalmente ambos productos son incorporados a la vía de la glucólisis (Jahires et al., 2002).



**Figura 3.** Modelo del sistema no-dependiente de fosfotransferencia (no-PTS): simporte de sacarosa en *E. coli* EC3132. La figura muestra el transporte y catabolismo de la sacarosa a través de la expresión del regulón de sacarosa *csc*. La sacarosa al ser transportada por acción de la permeasa CscB con la translocación simultánea de protones (H<sup>+</sup>) hacia el interior celular, es subsecuentemente hidrolizada por la acción de la invertasa CscA. Esta reacción genera dos productos: glucosa y fructosa. El primer producto es fosforilado por una glucocinasa independiente de *csc*, mientras que el segundo producto es fosforilado por la acción de la enzima: CscK. Finalmente ambos productos son incorporados a la vía de la glucólisis.

Sin embargo cuando *E. coli* EC3132 crece en medio mínimo suplementado con 0.2 % de sacarosa, se observa una baja eficiencia en la asimilación de este azúcar, ya que presenta un tiempo de duplicación de 1200 minutos asociado con una baja actividad de hidrólisis por parte de la invertasa CscA de 30 nmoles/min-mg de proteína. Por el contrario cuando *E. coli* B-62 crece bajo las mismas condiciones se observa una alta eficiencia en la asimilación de sacarosa, al presentar un tiempo de duplicación de 48 minutos, asociado con una actividad de hidrólisis por parte de la invertasa CscA de 11.7  $\mu$ moles/ 20min-mg de proteína. Las diferencias en el grado de asimilación de la sacarosa y la correspondiente actividad de hidrólisis entre ambas cepas, indica una baja frecuencia de adaptación del sistema no-PTS: simporte de sacarosa en *E. coli* EC3132 (a diferencia de *E. coli* B-62), como resultado de una reciente adquisición del regulón *csc* a su genoma. Evento que es posible, gracias a los diferentes mecanismos de transferencia genética horizontal que llevan al cabo los microorganismos bacterianos como parte del proceso evolutivo (Jahires et al., 2002).

## ANTECEDENTES

### 1. Aislamiento y caracterización de seis cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* (EPEC).

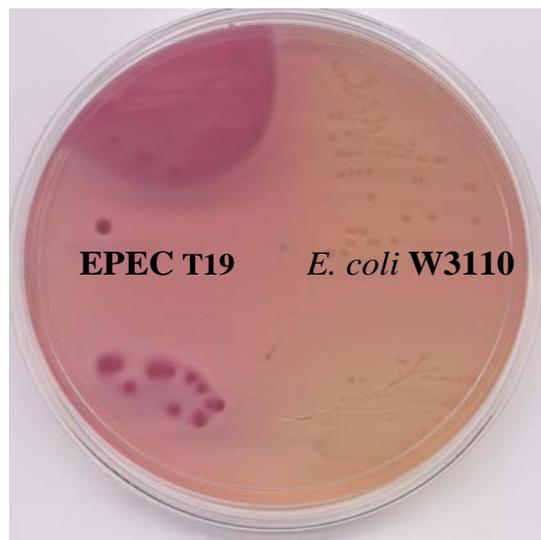
Durante un estudio epidemiológico realizado en Brasil entre 1997 y 1999, se aislaron seis cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC) a partir de una población infantil menor de dos años de edad que presentaba severos cuadros de diarrea. Estas cepas fueron tipificadas y donadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por la Dra. Isabel C. A. Scaletsky, investigadora del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Universidad Federal de Sao Paulo, Brasil (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cepas de *E. coli*

Cepa	Características relevantes	Serotipo	Fuente de referencia
W3110	Scr <sup>-</sup>		Jensen, 1993.
E2348/69	EPEC prototipo	O127:H6	Levine et al. 1978.
T2	EPEC de tipo silvestre	ONT:H45	Dulguer et al. 2003.
T19	EPEC de tipo silvestre	O2:H45	Dulguer et al. 2003.
T23	EPEC de tipo silvestre	O145:HNT	Dulguer et al. 2003.
T45	EPEC de tipo silvestre	O55:NM	Dulguer et al. 2003.
T12	EPEC de tipo silvestre	O162:NM	Dulguer et al. 2003.
T18	EPEC de tipo silvestre	O2:H2	Dulguer et al. 2003.

Las seis cepas de EPEC (T2-T18), fueron aisladas de diferentes pacientes infantiles que presentaban cuadros de diarrea severos, durante el estudio epidemiológico llevado a cabo en Brasil. (Dulguer et al. 2003).

Para caracterizar a cada una de estas cepas enteropatógenas (incluyendo a la cepa prototipo EPEC E2348/69), se realizaron cultivos sólidos en placas de agar MacConkey suplementado con 1% de sacarosa. El resultado de este análisis reflejó una diferencia fenotípica relacionada con la utilización de la sacarosa (fenotipo Scr<sup>+</sup>) por parte de la cepa prototipo y de las seis cepas silvestres de EPEC (T2-T18), en comparación con la cepa de *E. coli* no patógena W3110, que presentó un fenotipo Scr<sup>-</sup> (figura 6).



**Figura 6.** Caracterización del fenotipo Scr<sup>+</sup> en la cepa EPEC T19. La figura muestra la diferencia en la utilización de la sacarosa por parte de dos cepas de *E. coli* que crecen en agar MacConkey suplementado con 1% de sacarosa. A la izquierda se muestra la cepa silvestre EPEC T19, que presenta un fenotipo Scr<sup>+</sup>, mientras que del lado derecho se muestra la cepa de *E. coli* W3110 con un fenotipo Scr<sup>-</sup>.

## 2. Identificación y caracterización de los genes involucrados en el fenotipo Scr +

Para identificar y caracterizar de los genes involucrados en el fenotipo Scr<sup>+</sup> de las siete cepas EPEC, se construyó una biblioteca genómica a partir del DNA cromosomal de la cepa T19. La región cromosómica que contiene los genes involucrados en la expresión del fenotipo Scr<sup>+</sup> se fragmento con la enzima de restricción *Sau3A* I, la cual se clonó en el cósmido pCP13 (Darzins y Chakrabarty, 1984). Posteriormente el DNA ligado fue empaquetado *in vitro* en el fago lambda (Kit Gigapack III plus, Stratagene), el cual a su vez fue utilizado para transfectar a *E. coli* W3110 (Scr<sup>-</sup>). Las cepas recombinantes que son resistentes a tetraciclina tienen la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono, por lo que fueron seleccionadas en cajas con agar MacConkey suplementado con 1 % de sacarosa (figura 7).

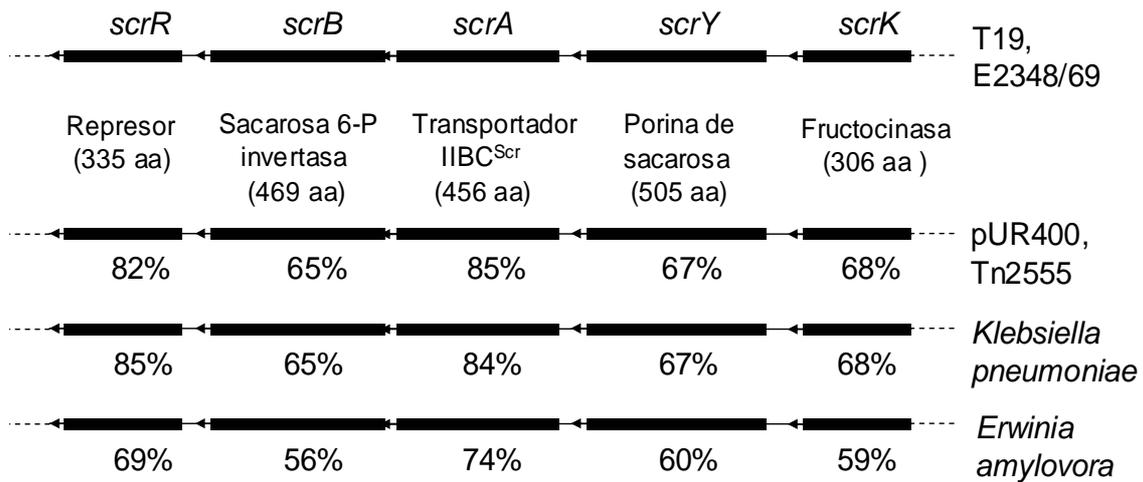


**Figura 7.** Cultivo sólido en placa de agar MacConkey suplementado con 1 % de sacarosa. A la izquierda se muestra el crecimiento de *E. coli* W3110 que contiene el plásmido pSac13, en el cual se encuentran clonados los genes determinantes para el fenotipo Scr<sup>+</sup> derivados de la cepa EPEC T19. A la derecha se muestra a *E. coli* W3110 que contiene únicamente el vector cósmido pCP13, por lo que presenta un fenotipo Scr<sup>-</sup>.

Estas cepas, ahora contienen un cósmido derivado (pSac13), que presenta un inserto de DNA clonado de aproximadamente 10 Kb. El resultado de este análisis reveló que la cepa W3110/pSac13 presenta el fenotipo Scr <sup>+</sup>, por lo que fue aislada y caracterizada.

### **3. Secuenciación del inserto en pSac13.**

La secuencia de nucleótidos del inserto en pSac13 fue determinada por PCR, utilizando el DNA del cósmido pCP13 como templado. Utilizando el programa BLAST se realizó un alineamiento de secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El análisis de 7812 pb del inserto en pSac13, reveló la presencia de cinco ORFs que presentaron similitud en secuencia y la misma organización que los genes localizados en el regulón *scr* del plásmido pUR400 de *Salmonella typhimurium* y en los cromosomas de *Klebsiella pneumoniae* y *Erwinia amylovora*, respectivamente (Schmid et al., 1988; Sprenger y Lengeler, 1988). La similitud en la secuencia incluye el solapamiento del codón de inicio y de término de la traducción de los genes *scrA* y *scrB* que se han reportado para los regulones *scr* de pUR400 y de *Klebsiella pneumoniae* (Titgemeyer et al., 1996). De acuerdo con estos datos, a los ORFs clonados a partir de la cepa de EPEC T19 se les asignaron los mismos nombres de los genes del regulón *scr*: *scrK*, *scrY*, *scrA*, *scrB* y *scrR*, respectivamente. Además, el alineamiento de la secuencia del regulón *scr* de EPEC T19 reveló una identidad del 100 % en la secuencia de aminoácidos con respecto al regulón *scr* de la cepa prototipo E2348/69. Sin embargo, el porcentaje de identidad de los genes *scr* en otras especies bacterianas patógenas como *Salmonella typhimurium* (pUR400), *Klebsiella pneumoniae* y *Erwinia amylovora* disminuyó con respecto a la cepa T19, encontrando los valores de identidad más altos en las proteínas codificadas por los genes *scr* de pUR400 y de *Klebsiella pneumoniae* (figura 10).



**Figura 10.** Esquema que muestra el porcentaje de identidad de las proteínas codificadas por los genes *scr* de EPEC E2348/69, EPEC T19, pUR400, *Klebsiella pneumoniae* y de *Erwinia amylovora*, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y regiones flanqueantes de los genes *scr* derivados de la cepa T19 pueden ser consultados en la base de datos EMBL (European Molecular Biology Laboratory) bajo el número de acceso AJ639630.

#### 4. Identificación de la región genómica en donde se localiza el regulón *scr* en las cepas enteropatógenas de *E. coli*

##### 4.1 Análisis bioinformático

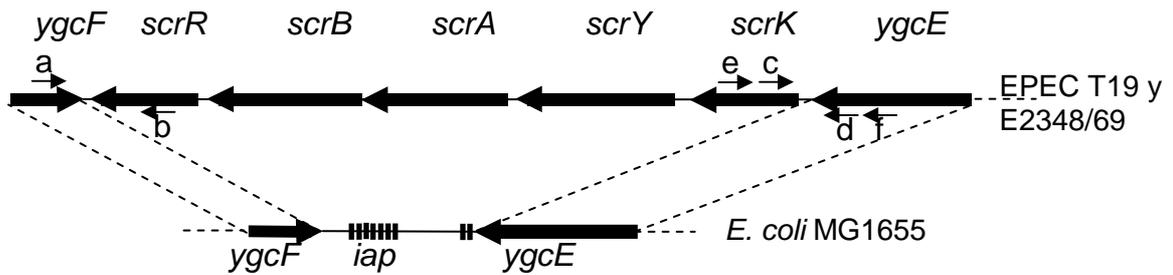
Para determinar la región genómica en donde se localiza el regulón de sacarosa en cada una de las cepas EPEC, se realizó un análisis de secuencias tomando como referencia los genes *scr* de las cepas T19 y E248/69 ([http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/escherichia\\_shigella](http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/escherichia_shigella)). El alineamiento de las secuencias permitió la identificación de la región cromosómica en la cepa prototipo E2348/69, la cual presentó un alto grado de similitud con las secuencias *scr* de EPEC T19.

La comparación de 6479 pb que corresponden a los cinco genes *scr* y a las regiones intergénicas de ambas cepas, reflejo diferencias en solo 23 nucleótidos, con respecto a 22 substituciones detectadas en las regiones codificantes. Considerando el alto grado de similitud, se concluyó que la cepa E2348/69 contiene el mismo regulón *scr* de EPEC T19. Es importante mencionar que la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado en pSac13 a partir del DNA cromosomal de la cepa T19 también presentó regiones flanqueantes en los genes *scr*, lo cual es consistente con la secuencia total del gene *scrR* que se encuentra flanqueado en la dirección 5' por el gene hipotético *ygcF* y por 138 pb en el extremo 3', mientras que el gene *scrK* se encuentra flanqueado por el gene hipotético *ygcE*. Los genes *scr* localizados en el cromosoma de la cepa E2348/69 también se encontraron flanqueados por los genes *ygcF* y *ygcE*, por lo que se dedujo que los genes *scr* de EPEC T19 también se encuentran insertados en el cromosoma.

#### **4.2 Análisis experimental.**

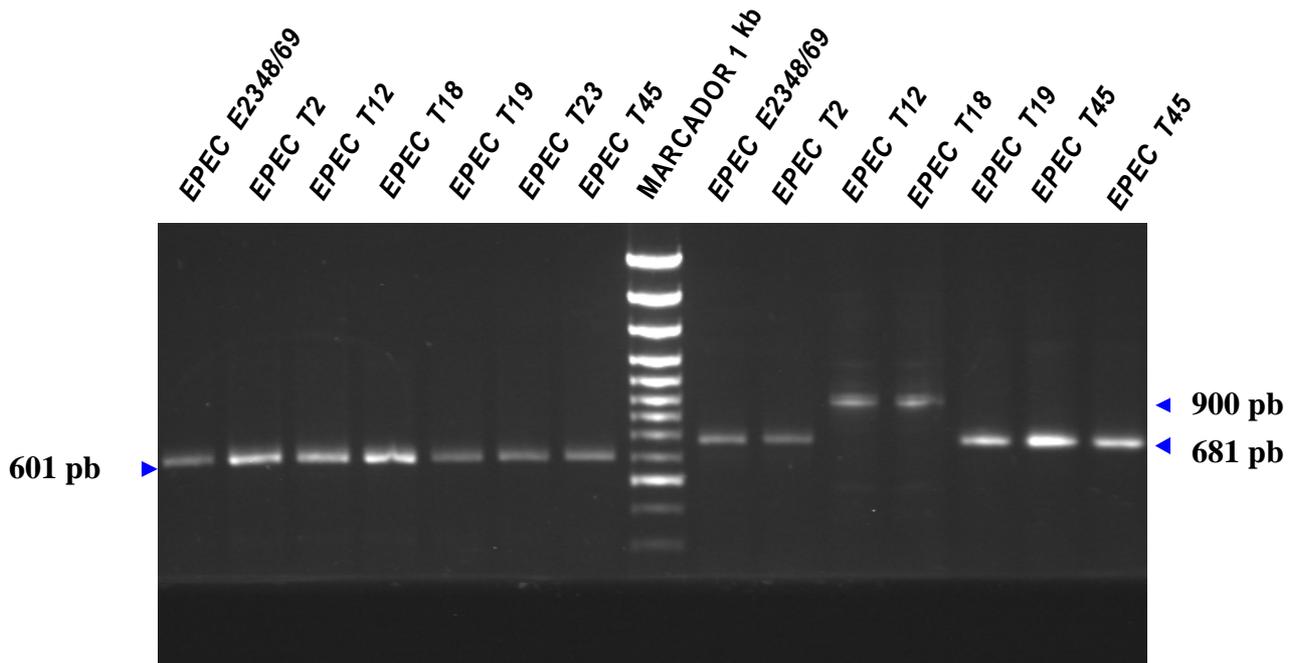
Para comprobar experimentalmente si los genes *scr* de las cepas EPEC se encuentran insertados en el cromosoma, se diseñó la siguiente estrategia, basada en la metodología de PCR: Polymerase Chain Reaction. Teniendo como referencia la secuencia del regulón *scr* de la cepa T19, se diseñó un conjunto de primers (primers *ygcF* y *scrR*) para amplificar 601 pb, pertenecientes a los genes *ygcF* y *scrR* en el extremo 3'.

Alternativamente, se diseñaron otros dos grupos de primers (*scrK-ygcE7540* y *scrKFW2-ygcERv2*), en donde el primer grupo fue utilizado para amplificar 681 pb que incluye el gen *scrK* en el extremo 5' y el gen *ygcE* en el extremo 3', mientras que el segundo grupo fue utilizado para amplificar 1312 pb que incluyen el extremo 5' del gen *scrK* y el extremo 3' del gen *ygcE*, respectivamente (figura 11).



**Figura 11.** Esquema que muestra la estrategia experimental para la amplificación del regulón de sacarosa y sus regiones flanqueantes en cada una de las cepas EPEC basado en la arquitectura genética de *E. coli* MG1655 y la secuencia del regulón *scr* de la cepa T19. Para las reacciones de PCR se diseñaron tres grupos de primers: *ygcF-scrR*, *scrK-ygcE7540* y *scrKFW2-ygcERV2* que corresponden a las letras a-b, c-d y e-f respectivamente, utilizando como templado el DNA cromosómico de cada una de las cepas EPEC.

De acuerdo con esta estrategia experimental, se obtuvieron los productos de amplificación por PCR, de EPEC E2348/69, T2, T19, T23 y T45, encontrando los tamaños esperados en la región *ygcF-scrR* de 601pb y en la región *scrK-ygcF* de 681 pb. Los productos de amplificación por PCR de las cepas T12 y T18 fueron detectados mediante la utilización de los primers *ygcF-scrR* y *scrKFW2-ygcERV2*, encontrando los tamaños esperados para la región *ygcF-scrR* de 601pb y para la región *scrK-ygcF* de 900 pb. De acuerdo con este análisis de amplificación por PCR se demostró que los genes *scr* en las siete cepas EPEC, se encuentran situados en la región intergénica cromosómica *ygcF-ygcE* (figura 12).



**Figura 12.** Gel de agarosa al 1.2 % que muestra las reacciones de amplificación por PCR del regulón de sacarosa y sus regiones flanqueantes en cada una de las cepas EPEC. En la parte izquierda de la figura, tomando como referencia el marcador de 1Kb, se muestra la amplificación de la región genómica que comprenden los genes *ygcF-scrR*. En la parte derecha se muestra la amplificación de la región genómica que comprenden los genes *scrK* y *ygcE*.

# OBJETIVOS

## Objetivo general.

1. Conocer la capacidad de utilización de la sacarosa en diferentes cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*.

## Objetivos particulares.

1.-Determinar la velocidad específica de crecimiento en siete cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* en presencia de sacarosa como única fuente de carbono.

2.- Determinar la capacidad metabólica de las diferentes cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* para utilizar la sacarosa como única fuente de carbono, a través de la determinación de la actividad específica de la enzima: sacarosa-6-fosfato hidrolasa.

## HIPÓTESIS

Aproximadamente el 50 % de las cepas de *E. coli* tipo silvestre, incluyendo *E. coli* B-62, *E. coli* EC3132 y EHEC EDL933 (O157:H7) tienen la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Scr<sup>+</sup>). Dada la presencia del regulón *scr* en las siete cepas EPEC (E2348/69, T2-T18), es posible que estas presenten características de crecimiento y actividades metabólicas similares en presencia de sacarosa como única fuente de carbono.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. (EPEC).**

Las siete cepas EPEC utilizadas en este estudio, fueron donadas por la Dra. Isabel C. A. Scaletsky, investigadora del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Universidad Federal de Sao Paulo, Brasil (Tabla 1).

### **Cinéticas de crecimiento y condiciones de cultivo.**

Para conocer la capacidad de utilización de la sacarosa en las siete cepas EPEC, se realizaron diferentes cinéticas de crecimiento en ensayos independientes utilizando medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % de glucosa y sacarosa respectivamente. De cada una de las EPEC, incluyendo la cepa E2348/69 se realizó un cultivo en 5 ml de medio líquido LB a 37°C por 12 horas a 300 rpm (condiciones overnight). De cada uno de estos cultivos se tomó el volumen correspondiente ( $D.O_{600}$  inicial de 0.1) para ser inoculado en 7 matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio mínimo M9 (Maniatis et al., 1982) suplementado con 0.2 % de glucosa como única fuente de carbono. Estos matraces fueron incubados inmediatamente bajo condiciones overnight, por un tiempo de 8 horas. Durante este periodo de tiempo, se tomó una muestra cada hora para determinar el crecimiento celular ( $D.O_{600}$ ), utilizando un espectrofotómetro: BioMate 5, Termospectronic.

Posteriormente, a partir de cada overnight, se tomó el volumen correspondiente ( $D.O_{600}$  inicial de 0.1) para ser inoculado en 7 matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % de sacarosa como única fuente de carbono, los cuales fueron incubados bajo las mismas condiciones de crecimiento. Durante el periodo de incubación de 15 horas, se tomo una muestra cada 2 horas, para determinar el crecimiento ( $D.O_{600}$ ) correspondiente. Para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  expresada en  $h^{-1}$ ) y los tiempos de duplicación de cada

una de las cepas EPEC, las D.O<sub>600</sub> correspondientes se procesaron a través del programa computacional PRISMA 3.0.

### **Determinación de la actividad específica de la enzima: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa.**

Para establecer la capacidad metabólica de las diferentes cepas EPEC en presencia de sacarosa como única fuente de carbono, se determinó la actividad específica de la enzima: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa. Durante una primera etapa, cada cepa se cultivó en 7 matraces de 500 ml que contenían 250 ml de medio rico LB suplementado con 0.2 % de sacarosa como fuente de carbono, para ser incubados bajo condiciones overnight. En el momento en que el cultivo bacteriano alcanzó la fase exponencial media (D.O<sub>600</sub> de 1.2), el cultivo celular fue centrifugado por 10 minutos a 4° C, a una velocidad de 4000 rpm. Retirando el sobrenadante, se añadió al pellet resultante, 4 ml de buffer de fosfatos (100 mM, pH 6.6). Las células se lisaron en una prensa de French, ThermoSpectronic a una presión de 15,000 psi, obteniendo aproximadamente 5 ml de extracto celular crudo por cada cultivo.

Inmediatamente las reacciones enzimáticas se prepararon, agregando 1 ml de cada extracto celular crudo a una solución que contenía 10 ml de buffer de fosfatos (100 mM, pH 6.6) y 1 ml de solución de sacarosa 100 mM. Estos ensayos independientes realizados por duplicado se incubaron a 37° C por 30 minutos. Durante este periodo de incubación se tomó una muestra de 1.5 ml cada 5 minutos, para inactivarse en un baño de agua en ebullición.

Para determinar la actividad de la enzima: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa se utilizó el método de azúcares reductores DNS (3,5-dinitrosalicílico) asociado a una curva estándar de glucosa (1g/L)+fructosa (1g/L). Para estos ensayos realizados por duplicado, se agregó 0.5 ml de reactivo DNS a 0.5 ml de cada una de las reacciones. Inmediatamente estas muestras se incubaron en baño maría (en ebullición) por un periodo de 5 minutos. Para detener la reacción colorimétrica las muestras fueron

incorporadas a un recipiente que contenía una mezcla de agua-hielo, donde inmediatamente se agregó a cada muestra, 5 ml de agua. Finalmente se determinó la D.O<sub>540</sub> correspondiente.

Durante la segunda etapa se cuantificó la concentración de proteína total de cada una de las cepas EPEC, a través del método de Bradford asociado a un curva estándar de albúmina de 1mg/ml (Bradford., 1976). La mezcla de reacción se preparó añadiendo 20 µl de extracto celular crudo a 1 ml de reactivo de Bradford diluido 1:5, en siete ensayos independientes realizados por duplicado. Las mezclas se agitaron suavemente e inmediatamente se determinó las D.O<sub>595</sub> correspondientes.

Una vez obtenida la actividad enzimática (µmoles/ml\*min) y la concentración de proteína total (mg/ml) se obtuvo la actividad específica (nmoles/min\*mg de proteína) a través del programa PRISMA 3.0. Las actividades específicas fueron tratadas a través de la prueba de chi-cuadrada de homogeneidad ( $\chi^2_{h, p=0.05}$ ) tomando como referencia la actividad de la cepa T19.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversos estudios revelan la existencia de una gran diversidad de microorganismos bacterianos gram positivos y gram negativos que tienen la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono (Reid y Abratt., 2005). Sin embargo, aproximadamente el 50% de las cepas de *E. coli* presentan el fenotipo Scr<sup>+</sup> (Bockmann et al., 1992). En este trabajo, se realizó la caracterización de siete cepas EPEC que tienen la capacidad de utilizar la sacarosa como única fuente de carbono. De acuerdo con este análisis, se observaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de las siete cepas enteropatógenas cuando crecen en medio mínimo M9 suplementado con 0.2% de sacarosa, permitiendo la diferenciación de dos grupos de crecimiento específico. Este conjunto de cepas presentaron tiempos de duplicación de 67 (E2348/69, T2, T19, T23 y T45) y 125 minutos (T12 y T18), respectivamente.

La determinación de la actividad de hidrólisis de la enzima: sacarosa-6-fosfato-hidrolasa, fue utilizada como indicador de la actividad metabólica en cada una de las cepas de EPEC. El resultado de este análisis demostró que la diferencia en la capacidad de crecimiento por parte de las cepas T12 y T18 no se encuentra asociada a la actividad específica de la enzima sacarosa-6-fosfato-hidrolasa, ya que no se observó una diferencia significativa entre dichas actividades, por lo que es posible especular sobre otra u otras limitantes metabólicas que se encuentren asociadas a dicho comportamiento.

En este sentido, recientes estudios indican que el nivel de transcripción de los genes *scrR* y *scrK*, muestran un patrón de regulación transcripcional previsto por la presencia de glucosa y/o sacarosa en el grupo de crecimiento que presenta un rápido crecimiento con sacarosa (E2348/69, T2, T19, T23 y T45). Sin embargo, en las cepas que presentan una menor velocidad específica de crecimiento, (cepas T12 y T18), no se detectó ninguna señal para la transcripción de los genes *scrK* y *scrR*.

El análisis de la secuencia de la región 5', corriente arriba del gene *scrK*, revela una sola diferencia en la secuencia de nucleótidos, localizada en la región espaciadora del posible promotor (Treviño-Quintanilla et al., 2007)

Se ha reportado que un cambio de un sólo nucleótido, en la región espaciadora del promotor del fago  $\lambda$  ( $P_{RM}$ ) y en el promotor  $P_{lac}$  resulta en una alteración significativa en la actividad del promotor (Auble et al., 1986; Liu et al., 2004). En este sentido, la disminución en la tasa de crecimiento de las cepas T12 y T18 en presencia de sacarosa, podría ser el resultado de una deleción en las secuencias promotoras del regulón *scr*, sin embargo no hay que descartar la posibilidad de que existan diferentes mutaciones en los genes *scr*, que podrían tener efectos deletéreos en las actividades del transporte y catabolismo de la sacarosa.

Por otra parte, de acuerdo con el análisis de secuencia del regulón *scr* de la cepa T19, fue posible detectar una alta frecuencia del fenotipo  $Scr^+$  en organismos patógenos, lo que sugiere que esta capacidad podría tener un papel importante en el ciclo vital de EPEC. En este sentido, la bacteria gram negativa *Erwinia amylovora*, que se caracteriza por ser un patógeno de plantas, causante de la destrucción de cultivos de manzanas, peras y otras rosáceas, presenta en su región cromosómica los genes que constituyen al regulón *scr*, los cuales son homólogos a los genes que se localizan en las cepas EPEC analizadas en este estudio. El análisis de las cepas mutantes de *Erwinia amylovora* en los genes *scr* (mutantes *scr*<sup>-</sup>), revelan una disminución en los procesos de colonización y virulencia. Estos resultados indican la posibilidad de que la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente del carbono en los microorganismos patógenos, se encuentre relacionada con los procesos de colonización y patogénesis (Bogs y Geider, 2000).

## PERSPECTIVAS

La aplicación de la ingeniería metabólica enfocada al mejoramiento de cepas microbianas, ha permitido incrementar de forma importante la productividad de metabolitos que normalmente son producidos por diferentes microorganismos y que son de gran interés a nivel biomédico e industrial. En este sentido, en el laboratorio del Dr. Gosset se están generando cepas de *E. coli* que tengan la capacidad de producir etanol a partir de sacarosa (Cepas W3110/Psac13). En este sentido, Tsunekawa y coautores (1992) han reportado la construcción de dos cepas *E. coli* capaces de utilizar la sacarosa como fuente de carbono para la producción de triptófano. Mediante el proceso de clonación y recombinación homóloga, las cepas de *E. coli* SGIII1032S y SGIII1032 tienen la capacidad de producir a partir de una concentración de 6% de sacarosa (cultivo en matraz a 33° C por 96 h), 2.3 y 5.7 g de triptófano por litro respectivamente (Tsunekawa et al., 1992).

Alternativamente, una cepa mutante *scr<sup>-</sup>* derivada de la cepa EPEC E2348/69 se está generando en el laboratorio del Dr. Gosset. Este mutante permitirá realizar diferentes estudios sobre el efecto en la capacidad del consumo de sacarosa durante los procesos de colonización y la virulencia.

## REFERENCIAS

1. Alaeddinoglu, N.G. and Charles, H.P. 1979. Transfer of a gene for sucrose utilization into *Escherichia coli* K12, and consequent failure of expression of genes for D-serine utilization. *J Gen Microbiol* 110:47-59.
2. Auble, D.T., Allen, T.L. and deHaseth P.L. 1986. Promoter Recognition by *Escherichia coli* RNA Polymerase. *J Biol Chem* 261:11202-11206.
3. Bachellier, S., Gilson, E., Hofnung, M. and Hill, C. W. 1996.Repeated sequences. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology in: Neidhardt F.C., Curtis III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Brooks K., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., and Umbarger H.E., Eds, Vol. 2.,ASM Press, Washington, D.C. pp. 2012-2040.
4. Blattner, F.R., Plunkett II, I G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y. 1997.The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
5. Bockmann, J., Heuel, H., Lengeler, J.W. 1992.Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132. *Mol Gen Genet* 235:22-32.
6. Bogs, J. and Geider, K. 2000.Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. *J Bacteriol* 182:5351-5358.
7. Bradford, M. 1976.A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
8. Cowan, P.J., H.Nagesha, L.Leonard, J, L. Howard, and A.J. Pittard. 1991. Characterization of the major promoter for the plasmid-encoded sucrose genes *scrY*, *scrA*, and *scrB*. *J. Bacteriol.* 177:7464-7470.
9. Darzins, A. and Chakrabarty, A.M. 1984.Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 159:9-18.

10. Doroshenko, V.G. and Livshits, V.A. 2004. Structure and mode of transposition of Tn2555 carrying sucrose utilization genes. *FEMS Microb Lett* 233:353-359.
11. Dulguer, M.V., Fabbicotti, S.H., Bando, S.Y., Moreira-Filho, C.A., Fagundes-Neto, U. and Scaletsky, I.C.A. 2003. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J Infect Dis* 188:1685-1694.
12. Flores, N., Flores, S., Escalante, A., Leal, L., deAnda, R., Malpica, R., Georgelis, D., Gosset, G. and Bolívar, F. 2005. Adaptation for fast growth in glucose in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Met.Eng* 7:70-85.
13. Hardesty, C.B., Ferran, C. and DiRienzo, J.M. 1991. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli*: characterization of *scrY*, the structural gene for a phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase systems outer membrane porin. *J Bacteriol* 173:449-456.
14. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and Shinagawa, H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8:11-22.
15. Hochhut, B., Jahreis, K., Lengeler, J.W. and Schmid, K. 1997. CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria. *J Bacteriol* 179:2097-2102.
16. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.
17. Jahreis, K., Bentler, L., Bockmann, J., Hans, S., Meyer, A., Siepelmeyer, J. and Lengeler, J.W. 2002. Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132. *J Bacteriol* 184:5307-5316.

18. Krin, E., O.Sismeiro, A.Danchin, and P.N.Bertin. 2002. The regulation of enzyme IIA<sup>Glu</sup> expression controls adenylate cyclase activity in *Escherichia coli*. *Microbiology*.148:1553-1559.
19. Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., and Sotman, S. 1978.*Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1:1119-1122.
20. Liu, M., Tolstorukov, M., Zhurkin, V., Garges, S. and Adhya S. 2004. A mutant spacer sequence between -35 and -10 elements makes the *P<sub>lac</sub>* promoter hyperactive and cAMP receptor protein-independent. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6911-6916.
21. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
22. Nakata, A., Amemura, M. and Makino, K. 1989.Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol* 171:3553-3556.
23. Nataro, J.P., and J.B. Kaper.1998.Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:142-201.
24. Nelson, S.O., B.J. Scholte, and P.W. Postma. 1982. Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system-mediated regulation of carbohydrate metabolism in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 150:604-615.
25. Pembroke, J.T., MacMahon, C. and McGrath, B. 2002.The role of conjugative transposons in the *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol Life Sci* 59:2055-2064.
26. Perna, N.T., Plunkett III, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. and Blattner, F.R. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-533.
27. Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57:543-594.

28. Reid, S.J. and Abratt, V.R. 2005. Sucrose utilization in bacteria: genetic organization and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:312-321.
29. Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud. Publica. Mex.* 44:464-475.
30. Sahin-Tóth, M., S. Frillingos, J. W. Lengeler, and H. R. Kaback. 1995. Active transport by the *CscB* permease in *Escherichia coli* K-12. *Biochem and Biophys. Res. Comm.* 208:1116-1123.
31. Sahin-Tóth, M., Z. Lengyel, and H. Tsunekawa. 1999. Cloning, sequencing, and expression of *cscA* invertase from *Escherichia coli* B-62. *Can.J.Microbiol.* 45:418-422.
32. Sauter, T., and E.D.Gilles. 2004. Modeling and experimental validation of the signal transduction via the *Escherichia coli* sucrose phosphotransferase system. *J. Biotechnol.* 110:181-199.
33. Scaletsky, I.C.A., M.L.M.Silva, and L.R.Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cell. *Infect. Immun.* 45:534-536.
34. Scaletsky, I.C.A., M.L.M.Silva, M.R.F.Toledo, B.R.Davis, P.A.Blake, and L.R.Trabulsi. 1985. Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotypes, and bioserotypes of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 49:528-532.
35. Schmid, K., Ebner, R., Altenbuchner, J., Schmitt, R. and Lengeler, J.W. 1988. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli* K12: mapping of the *scr* genes of pUR400. *Mol Microbiol* 2:1-8.
36. Sprenger, G.A. and Lengeler, J.W. 1988. Analysis of sucrose catabolism in *Klebsiella pneumoniae* and *Scr+* derivatives of *Escherichia coli* K-12. *J Gen Microbiol* 134:1635-1644.
37. Titgemeyer, F., Jahreis, K., Ebner, R. and Lengeler, J.W. 1996. Molecular analysis of the *scrA* and *scrB* genes from *Klebsiella pneumoniae* and plasmid pUR400, which encode the sucrose transport protein enzyme II<sup>Scr</sup> of the phosphotransferase system and a sucrose-6-phosphate invertase. *Mol Gen Genet.* 250:197-206.
38. Thompson, J., and B.M. Chassy. 1981. Uptake and metabolism of sucrose by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 147:543-551.

39. Thompson, J., N.Y.Nguyen, and S.A.Robrish. 1992. Sucrose fermentation by *Fusobacterium mortiferum* ATCC 25557: Transport, catabolism, and products. J. Bacteriol. 174:3227-3235.
40. Treviño-Quintanilla, L.G., Escalante, A., Caro, D. A., Martínez, A., González, R., Puente, J. L., Bolívar, F., and Gosset, G.2007. The phosphotransferase system dependent sucrose utilization regulon in enteropathogenic *Escherichia coli* strains is located in a variable chromosomal region containing *iap* sequences.J Mol Microbiol Biotechnol. Vol.13. No. 1-3.
41. Tsunekawa, H., S. Azuma, M. Okabe, R. Okamoto, and S. Aiba. 1992. Acquisition of a sucrose utilization system in *Escherichia coli* K-12 derivatives and its application to industry. Appl.Environ.Microbiol. 58:2081-2088.
42. Vanmaele, R.P., and G.D.Armstrong. 1997. Effect of carbon source on Localized Adherence Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 65:1408-1413.
43. Wang, J., E.D.Giles, J.W.Lengeler, and K.Jahreis. 2001. Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and no-PTS dependent glycerol transport systems in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification. J. Biotechnol. 92:133-158.