



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la represión catabólica en una cepa
enteropatógena de *Escherichia coli* que tiene la capacidad
de utilizar sacarosa como única fuente de carbono**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANA JOYCE MUÑOZ ARELLANO

TUTOR

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA



2007



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Muñoz
Arellano
Ana Joyce
56227601
Universidad nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099201908

2. Datos del tutor

Dr.
Guillermo
Gosset
Lagarda

3. Datos del sinodal 1

Dr.
José Adelfo
Escalante
Lozada

4. Datos del sinodal 2

M en C
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Alfonso Manuel
Torre
Blanco

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Luis Gerardo
Treviño
Quintanilla

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la represión catabólica en una cepa enteropatógena de *Escherichia coli* que tiene la capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono.

68 p
2007

AGRADECIMIENTOS

Porque a lo largo el camino nunca estamos solos:

G R A C I A S:

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí, rodeada de amor y llena de bendiciones.

A mi familia, por todo su amor y paciencia. Por ser mí fuerza y mí apoyo en todo momento. Los amo.

A mis amigos, por su cariño, su apoyo y sus consejos. Porque siempre estuvieron ahí cuando los necesité. Los quiero

A mis profesores, que me han dado las bases para seguir adelante.

A mi tutor, por confiar en mí y darme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo. Fue un placer trabajar con tan excelente persona.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por su apoyo y buena disposición. Mucho de lo aprendido fue gracias a ustedes.

	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
I RESUMEN.	1
II INTRODUCCIÓN.	2
II.I Sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS).	3
II.II Represión catabólica de carbono (CCR) en bacterias entéricas.	6
II.II.I Papel regulatorio central de la enzima IIA ^{Glc} en la CCR y el control del inductor en bacterias entéricas.	
II.III Sacarosa como fuente de carbono.	11
II.III.I Organización genética de sistemas para el catabolismo de sacarosa en bacterias entéricas	
II.III.II Regulación global del metabolismos de sacarosa en <i>E. coli</i>	
II.IV Estudio de cepas EPEC por su capacidad de utilizar sacarosa y glucosa como única fuente de carbono	18
III JUSTIFICACIÓN.	20
IV HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
IV.I Hipótesis	
IV.II Objetivo general.	
IV.III Objetivos particulares.	
V MATERIAL Y MÉTODOS.	
V.I Cepas bacterianas	22
V.II Plásmidos.	22
V.III Oligonucleótidos	24
V.IV Medios de cultivo	26
V.V Condiciones de cultivo.	27
V.VI Extracción de DNA cromosomal.	27
V.VII Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Mini preparaciones)	27
V.VIII Separación de DNA en gel de agarosa por electroforesis.	28
V.IX Amplificación del casete de resistencia por PCR	29
V.X Extracción del producto de PCR	29
V.XI Preparación de células electrocompetentes de la cepa E2348/69 empleando un medio libre de sales	30

V.XII	Transformación de la cepa E2348/69 con el plásmido pKD46 .	31
V.XIII	Preparación de células electrocompetentes de E2348/69 con pKD46 para la inducción del sistema de recombinasa λ Red	31
V.XIV	Transformación de la cepa E2348/69 expresando el sistema λ Red recombinasa con el producto de PCR	32
V.XV	Selección y caracterización de las cepas mutantes	32
	V.XV.I Selección por resistencia	
	V.XV.II Caracterización por fenotipo	
	V.XV.III Localización de la interrupción cromosomal por PCR	
V.XVI	Cinéticas de crecimiento	33
V.XVII	Métodos analíticos	34
	V.XVII.I Determinación de la biomasa	
	V.XVII.II Análisis de azúcares	
VI	RESULTADOS.	35
VI.I	Interrupción cromosomal del regulón <i>scr</i> y del gen represor <i>scrR</i> de la cepa enteropatógena E2348/69	35
VI.II	Amplificación del casete de resistencia con extremos homólogos al regulon <i>scr</i> y al gen <i>scrR</i>	37
VI.III	Selección y caracterización de las cepas mutantes E2348/69 Δ <i>scr</i> y E2348/69 Δ <i>scrR</i>	37
	VI.III.I Selección por resistencia	
	VI.III.II Caracterización por fenotipo	
	VI.III.III Verificación de las interrupciones cromosomales por productos de PCR.	
VI.IV	Caracterización de las cepas	39
	VI.IV.I Caracterización de la cepa silvestre E2348/69 cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.	39
	VI.IV.II Caracterización de la cepa silvestre E2348/69 cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa	41
	VI.IV.III Caracterización de la cepa E2348/69 Δ <i>scr</i> cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.	44
	VI.IV.IV Caracterización de la cepa E2348/69 Δ <i>scrR</i> cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.	46
	VI.IV.V Caracterización de la cepa E2348/69 Δ <i>scrR</i> cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa .	48
	VI.IV.VI Caracterización de la cepa E2348/69 Δ <i>scrR</i> cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.	51
VII	DISCUSIÓN.	54

VIII CONCLUSIONES.	61
IX PERSPECTIVAS.	62
X ABREVIATURAS.	63
XI BIBLIOGRAFÍA.	65

INDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Componentes del PTS.	4
Figura 2. Transporte específico de diversos sustratos a través del PTS. . . .	5
Figura 3. Diauxia glucosa-lactosa.	7
Figura 4. Exclusión del inductor.	8
Figura 5. Represión catabólica de carbono.	10
Figura 6. Principales mecanismos del transporte y catabolismo de sacarosa en bacterias.	12
Figura 7. Comparación del arreglo de genes del loci sacarosa de diferentes grupos bacterianos.	14
Figura 8. Mapa genético del regulón <i>scr</i>.	15
Figura 9. Control global del regulón <i>scr</i>.	17
Figura 10. Esquema de un regulador de la familia LacI-GalR.	18
Figura. 11. Cinética de crecimiento de cepas EPEC en medio mínimo suplementado con sacarosa.	19
Figura 12. Esquema de los plásmidos utilizados	
A) pKD46	
B) Representación lineal del plásmido templado pKD3	23
Figura 13. Representación de la homología de los oligonucleótidos al cromosoma.	
A) Homología a la región <i>scr</i>	
B) Homología a la región <i>scrR</i>	25
Figura 14. Representación del casete de resistencia a Cloramfenicol presente en el cromosoma (Datsenko y Wanner, 2000).	32
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR del casete de resistencia a Cm.	36
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR del casete de resistencia a Cm en cromosoma.	38

Figura 17. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa silvestre E2348/69 en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.	40
Figura 18. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa silvestre E2348/69 en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.	43
Figura 19. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69Δ<i>scr</i> en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.	45
Figura 20. Curva de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69Δ<i>scr</i> en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.	47
Figura 21. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69Δ<i>scrR</i> en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.	49
Figura 22. Curva de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69Δ<i>scrR</i> en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.	52
Figura 23. Preferencia de la EIIA^{Glc} por la permeasa IIBC^{Glc} específica para el transporte de glucosa.	55
Figura 24. Consumo simultáneo de glucosa y sacarosa	58
Figura 25. Modelo de represión catabólica de carbono en el consumo de glucosa y sacarosa.	60

ÍNDICE DE TABLAS	Página
TABLA I. Cepas bacterianas usadas en este trabajo.	22
TABLA II. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	24
TABLA III. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.	26
TABLA IV. Parámetros cinéticos de las cepas E2348/69, E2348/69 Δ <i>scr</i> y E2348/69 Δ <i>scrR</i> creciendo en un medio mínimo suplementado con una simple y doble mezcla de azúcares como fuentes de carbono. .	53

I RESÚMEN

La cepa enteropatógena E2348/69 tiene la capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono ya que cuenta con el regulón *scr*, y esta capacidad es típica de bacterias patógenas. La sacarosa es uno de los sustratos más abundantes en la naturaleza por su alto origen en tejidos de plantas como la caña de azúcar. Sin embargo, de todos los carbohidratos disponibles, la glucosa suele ser la fuente de carbono preferencial como sustrato para las bacterias y por lo tanto ejerce un efecto represivo sobre el resto de fuentes de carbono disponibles en el medio; por ello, resulta interesante el estudio de la regulación genética sobre la capacidad de consumo de otros azúcares como la sacarosa. Con el fin de entender el papel de genes específicos del regulón *scr* sobre la capacidad de consumir sacarosa y su importancia en el fenómeno de represión catabólica, se llevo a cabo la eliminación cromosomal del regulón *scr* y del gen represor *scrR* en la cepa E2348/69, obteniendo las cepas designadas como E2348/69 Δscr y E2348/69 $\Delta scrR$ respectivamente.

Se realizaron los cultivos creciendo en medio mínimo suplementado con uno y dos azúcares tales como glucosa y sacarosa. En cultivos creciendo en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono, la mutante E2348/69 Δscr y la mutante E2348/69 $\Delta scrR$ no presentaron una diferencia importante en la velocidad de crecimiento y en la velocidad de consumo de éste azúcar con respecto a la cepa silvestre. Por otra parte, en los cultivos realizados en un medio suplementado sólo con sacarosa, la mutante E2348/69 Δscr fue incapaz de crecer bajo estas condiciones, demostrando que el regulón *scr* es la única vía catabólica para sacarosa en la cepa E2348/69. En cultivos creciendo en medio mínimo suplementado con una mezcla de glucosa y sacarosa, la glucosa reprime la utilización de sacarosa en la cepa silvestre. Sin embargo, bajo las mismas condiciones de cultivo con la mutante E2348/69 $\Delta scrR$, la glucosa y la sacarosa fueron co-metabolizadas, eliminándose por completo el efecto de represión catabólica, demostrando que este fenómeno se debe principalmente a la regulación que el gen represor *scrR* ejerce sobre el regulón *scr*. En comparación con la cepa silvestre, el crecimiento de la mutante E2348/69 Δscr en un medio con ambos azúcares se debió exclusivamente a la glucosa presente en el medio presentando una disminución en su velocidad de crecimiento.

II INTRODUCCIÓN

La adquisición de nutrientes del ambiente es un proceso esencial para todos los organismos vivos, e involucra el transporte de nutrientes del medio externo a través de la membrana citoplasmática al interior de la célula y el catabolismo de estos nutrientes a través de vías de degradación subsecuentes.

Bacterias como *Escherichia coli* han sido ampliamente usadas como sistemas modelo para estudiar mecanismos moleculares del transporte y degradación de nutrientes y esto entre otras cosas, se debe a que pueden crecer fácilmente en grandes poblaciones homogéneas, son accesibles a manipulación genética y son organismos flexibles que responden y se adaptan de manera específica a cambios en las condiciones ambientales.

Cualquier cambio, el cual lleve a la bacteria fuera de un equilibrio metabólico previo, resulta en una alteración en la fisiología celular. *E. coli* es capaz de utilizar un gran número de sustratos como fuentes de carbono y energía; azúcares, aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes son tomados por las bacterias vía sistemas de transporte específicos localizados en la membrana citoplásmica.

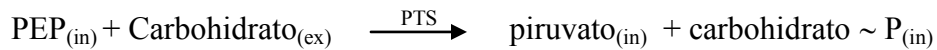
Cuando existen cambios en la disponibilidad de nutrientes, como la presencia o ausencia de un azúcar específico, los niveles de expresión de genes para el transporte y las reacciones iniciales en el metabolismo de carbohidratos son estrictamente regulados en respuesta a estos cambios nutricionales. Así por ejemplo, cuando se expone a una mezcla de fuentes de carbono, *E. coli*, como otros microorganismos, usa uno preferencialmente. Este fenómeno el cual asegura que una célula utilizará la mejor fuente de carbono y energía disponible, se conoce como represión catabólica de carbono (Postma 1993).

II.I Sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS)

El sistema fosfotransferasa de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) es el sistema sensor mejor conocido y caracterizado del transporte y fosforilación de carbohidratos. Usando fosfoenolpiruvato (PEP) como el donador fosfato, el PTS cataliza el transporte y concomitante fosforilación de algunos azúcares por cinasas a expensas de ATP.

El PTS está involucrado tanto en el transporte como en la fosforilación de un gran número de carbohidratos y en la regulación de un diverso número de vías metabólicas.

El PTS cataliza el siguiente proceso general:



Este sistema de proteínas, en el cual los procesos de transporte actúan en conjunto con la modificación química de la molécula sustrato, pertenece a la familia de translocadores de grupo ya que la fosforilación de carbohidratos está acoplada a su translocación (Figura 1).

El PTS consta de tres tipos de enzima:

- Una enzima soluble llamada EI (codificada por el gen *ptsI*)
- Una proteína soluble que contiene histidina llamada HPr (codificada por el gen *ptsH*)
- Y una enzima unida a membrana llamada EII azúcar específico.

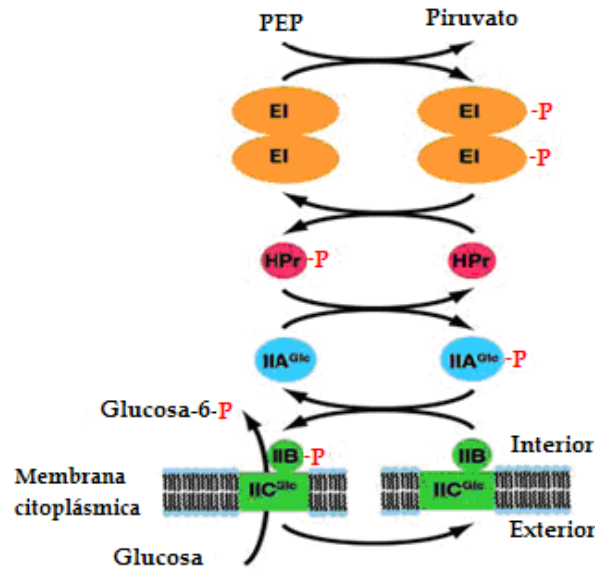


Figura 1. Componentes del PTS. La energía de hidrólisis del grupo fosfato del PEP es utilizada para la translocación y la fosforilación de su sustrato. El grupo fosfato es transferido del PEP al carbohidrato a través de los intermediarios EI, HPr y EII. EII^{Glc} es específico para glucosa, y en este caso es el dominio IIA^{Glc} el que recibe el grupo fosfato y lo transfiere al dominio IIBC que conforma una proteína acoplada a la membrana y transloca al carbohidrato al interior de la célula. Una vez dentro, el carbohidrato es fosforilado por el dominio IIB. -P indica la forma fosforilada de las proteínas.

La enzima I (EI) y la proteína acarreadora fosfohistidina (HPr) son proteínas solubles, no son específicas del azúcar y participan en el transporte de todos los carbohidratos PTS, por lo que se les conoce como componentes generales del PTS. El grupo fosfato requerido es transferido del metabolito intracelular fosfoenolpiruvato (PEP) exclusivamente al componente EI, el cual a su vez transfiere el grupo fosfato a la proteína con histidina (HPr).

La proteína HPr transfiere el grupo fosfato a la enzima II (EII) que se compone de diferentes subunidades funcionales dependiendo del tipo de azúcar al cual son específicos (figura 1).

El complejo EII puede consistir en una simple proteína acoplada a la membrana comprendiendo tres dominios (A, B y C) tal como para manitol (EII^{Mtl}), o puede consistir en dos o más proteínas de las cuales una está acoplada a la membrana (B y C) y una es soluble (IIA) tal como $IICB^{Glc}$ - IIA^{Glc} para glucosa. En cualquier caso el grupo fosfato es transferido del PEP al carbohidrato vía los fosfo intermediarios EI, HPr y EII (A y B).

El dominio IIC, la porción integral de membrana de EII, forma el canal de translocación y presumiblemente el sitio de unión específico del sustrato. Un tercer tipo de EII se encuentra en el PTS de manosa, en el cual los dominios A y B se encuentran fusionados en un simple polipéptido soluble, y dos proteínas integrales de membrana (IIC^{Man} y IID^{Man}) están involucradas en la translocación de manosa (figura 2).

El dominio IIA es fosforilado por HPr ($HPr\sim P$) y el $IIA\sim P$ resultante fosforila al dominio IIB, formando un complejo al unirse a la subunidad IIC y en algunos casos IID, las cuales conforman la permeasa integral de membrana que reconoce y transporta las moléculas de azúcar. La fosforilación del carbohidrato translocado al citoplasma por IIC está mediada por $IIB\sim P$ y esto resulta en la rápida disociación del carbohidrato $\sim P$ del complejo formado con EII (figura 2).

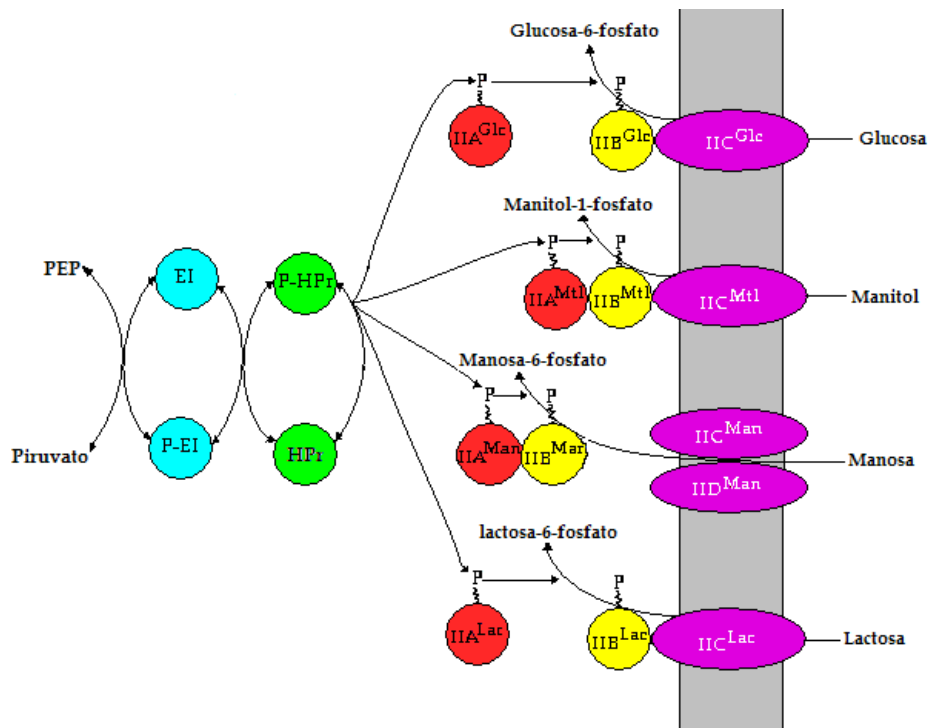


Figura 2. Transporte específico de diversos sustratos a través del PTS. EI y HPr son las proteínas generales para todos los PTSs. Del complejo EII, se muestran aquellos específicos para glucosa (Glc), manitol (Mtl), manosa (Man) y lactosa (Lac). Cada uno contiene dos dominios hidrofílicos: IIA contiene el primer sitio de fosforilación (His-P), y IIB contiene el segundo sitio de fosforilación (residuo Cys o His). El dominio hidrofóbico acoplado a la membrana es IIC, y en algunos casos consiste de dos proteínas separadas (IIC y IID).

Aunque la translocación azúcar específico a través de la membrana es facilitada por el dominio integral de membrana IIBC^{azúcar} es el complejo de los tres dominios de proteína (EIIABC) funcionando juntos, el responsable del transporte y fosforilación del azúcar sustrato, resultando en una reserva intracelular de carbohidratos fosforilados.

El PTS transporta un amplio rango de monosacáridos y disacáridos como glucosa, fructosa, manosa, sacarosa, trealosa y algunos otros sustratos como glucosamina, manitol y glucitol.

Además de IIBC^{Glc} específico para glucosa, otras permeasas PTS de *E. coli* como IIBC^{Mal} específica para maltosa, IIBC^{Scr} específica para sacarosa, y IICB^{Tre} específica para trealosa, cuentan para su actividad en el transporte de azúcares con IIA^{Glc} de glucosa, ya que carecen de su dominio IIA propio.

II. II Represión catabólica de carbono (CCR) en bacterias entéricas

La represión catabólica y la exclusión del inductor son los mecanismos por los cuales la célula selecciona el orden en el cual los azúcares son metabolizados.

El término represión catabólica de carbono describe el fenómeno general en microorganismos por el cual la presencia de una fuente de carbono en el medio puede reprimir la expresión de ciertos genes y operones, cuyos productos están a menudo involucrados con la utilización de una fuente de carbono alternativa. Así se puede definir a la represión catabólica de carbono como el efecto inhibitorio de una fuente de carbono rápidamente metabolizable en el medio sobre la expresión de genes y/o la actividad de proteínas involucradas en el catabolismo de otras fuentes de carbono.

En una mezcla de azúcares, las bacterias despliegan un efecto catabólico represivo que no permite el consumo simultáneo de todos los azúcares; los azúcares son secuencialmente consumidos resultando en fases de crecimiento exponencial que están separadas por fases lag intermedias, desarrollando crecimiento diauxico. A este crecimiento se le conoce también como “efecto glucosa” ya que es este carbohidrato la fuente preferencial de carbono sobre el resto de las fuentes de carbono disponibles (figura 3).

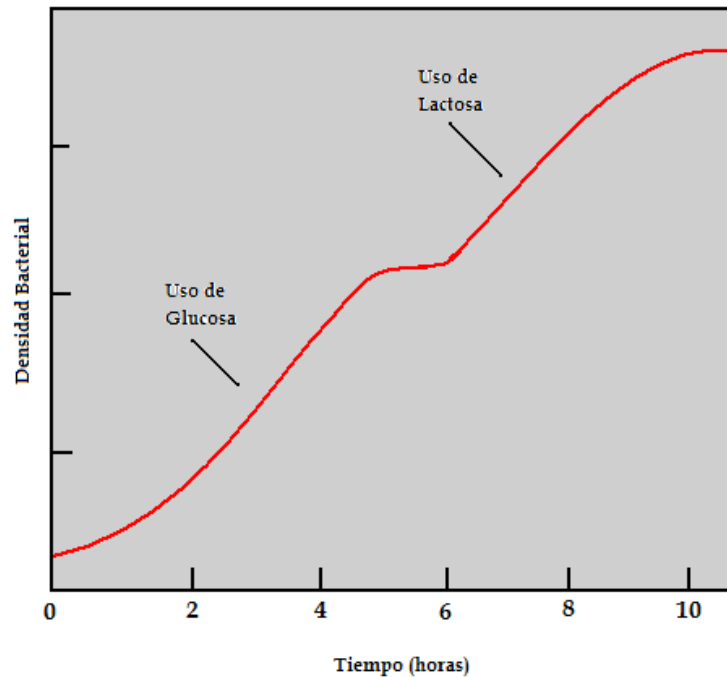


Figura 3. Diauxia glucosa-lactosa. En un crecimiento diauxico, el organismo crece primero utilizando una sola fuente de carbono, habiendo un periodo lag para a continuación volver a crecer utilizando una segunda fuente disponible.

En el PTS de glucosa, el operón *ptsHicrr* codifica los genes para las dos proteínas comunes del PTS, EI (*ptsI*) y HPr (*ptsH*), y el gen para la enzima IIA^{Glc} (*crr*); el gen para IICB^{Glc} (*ptsG*) se expresa como un simple transcrito. Tanto el operón *ptsHicrr* como *ptsG* son inducidos por el crecimiento en glucosa.

En particular, IIA^{Glc}, además de fosforilar a IIB^{Glc}, es responsable de la represión catabólica y la exclusión del inductor, por lo tanto la proteína IIA^{Glc} tiene un papel regulatorio central en el consumo de azúcares. La proximidad del gen *crr* a aquellos genes codificando para las proteínas centrales PTS refleja la importancia de esta función reguladora alostérica de IIA^{Glc} en la utilización de la fuente de carbono.

II.II.I Papel regulatorio central de la enzima IIA^{Glc} en la CCR y el control del inductor en bacterias entéricas

Exclusión del inductor

Cuando un sustrato PTS, por ejemplo la glucosa, está presente en el medio de cultivo, el grupo fosfato de la proteína PTS se transfiere al azúcar que entra. Consecuentemente, IIA^{Glc} se encuentra predominantemente en su forma no fosforilada.

Algunas proteínas IIBC (EII de glucosa, trealosa, sacarosa y maltosa en *E. coli*) pueden interactuar con $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$, y consecuentemente estas enzimas IIBC pueden desfosforilar directamente a IIA^{Glc} (his $\sim\text{P}$). Una vez desfosforilada, la proteína IIA^{Glc} libre interactúa con permeasas no-PTS que son específicas para lactosa, melibiosa, maltosa y rafinosa, inhibiendo alostéricamente el transporte y la utilización de carbohidratos no-PTS. Adicionalmente, IIA^{Glc} es capaz de unirse a enzimas catabólicas como las glicerol cinasas (GK), inhibiendo su actividad y previniendo la producción de glicerol-3-P, el inductor de los genes catabólicos del glicerol (Postma 1996).

Este mecanismo que previene a la célula del inductor (carbohidrato interno, glicerol-3-P), prerequisite para la expresión de operones catabólicos, es nombrado exclusión del inductor (Figura 4).

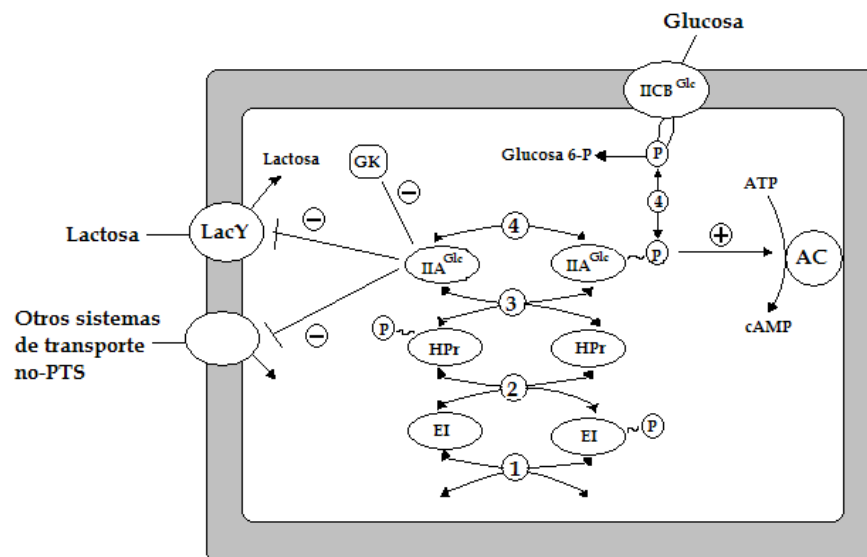


Figura 4. Exclusión del inductor. En presencia de glucosa, el dominio IIA^{Glc} no fosforilado puede interactuar con otros sistemas de transporte no-PTS inhibiendo el transporte de carbohidratos que utilizan estas vías.

Control transcripcional por proteínas de control global (complejo cAMP-CRP)

En bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli*, la represión catabólica esta mediada vía AMP cíclico (cAMP) y la proteína receptora de cAMP (CRP). El complejo cAMP-CRP actúa como un regulador positivo por la unión a un sitio específico en la región promotora de los genes, de este modo activa la transcripción (Busby y Ebright 1999).

En *E. coli*, la proteína CRP (también CAP, codificada por el gen *crp*) activa la transcripción de más de 100 promotores y en algunos casos también está involucrado en la represión. CRP necesita el efector alostérico cAMP para unirse eficientemente al DNA. La regulación global por CRP responde a la cantidad intracelular de cAMP. El nivel intracelular de cAMP, a su vez es ajustado por la adenilato ciclasa, cuya actividad depende de la forma fosforilada de IIA^{Glc} (IIA^{Glc}~P).

En presencia de glucosa, la enzima IIB^{Glc} se encuentra en su forma no fosforilada y se une a la proteína represora Mlc, liberando la represión para genes bajo su control tales como *ptsHI*, *ptsG*, *mlc*, *manXYZ* y *malT*. Los operones están sujetos a la regulación cAMP-CRP, así que el crecimiento en glucosa lleva a dos efectos opuestos, la represión catabólica y la inducción de glucosa.

En ausencia de glucosa, IIA^{Glc} y IIB^{Glc} se encuentran en su estado fosforilado. En esta condición, la proteína IIB~P pierde su capacidad de unirse a Mlc, así ésta proteína se une a su secuencia blanco en el operador causando la represión de genes involucrados en la toma de glucosa (Plumbridge, 2002). Por otro lado, la enzima IIA^{Glc}~P se une a la enzima adenilato ciclasa (AC) activando su capacidad biosintética de adenosina 3,5-monofosfato cíclico (cAMP) (Postma et. al 1996). Por lo tanto, la concentración de cAMP se incrementa en la célula, permitiendo la formación de un complejo con su proteína receptora (CRP) y causando la inducción de genes sujetos a represión catabólica (Figura 5). Así, niveles altos de cAMP son el resultado de condiciones limitantes de carbohidratos. El complejo cAMP-CRP interactúa con la subunidad α de la RNA polimerasa y actúa como un activador de la transcripción de los genes responsables para el consumo y metabolismo de carbohidratos, como lactosa o glicerol.

Tanto la exclusión del inductor como el control transcripcional por el complejo cAMP-CRP son mecanismos reguladores que coordinan cooperativamente los niveles de expresión de genes para asegurar un metabolismo secuencial de diferentes carbohidratos dependiendo de su calidad y cantidad (Wang et al 2001).

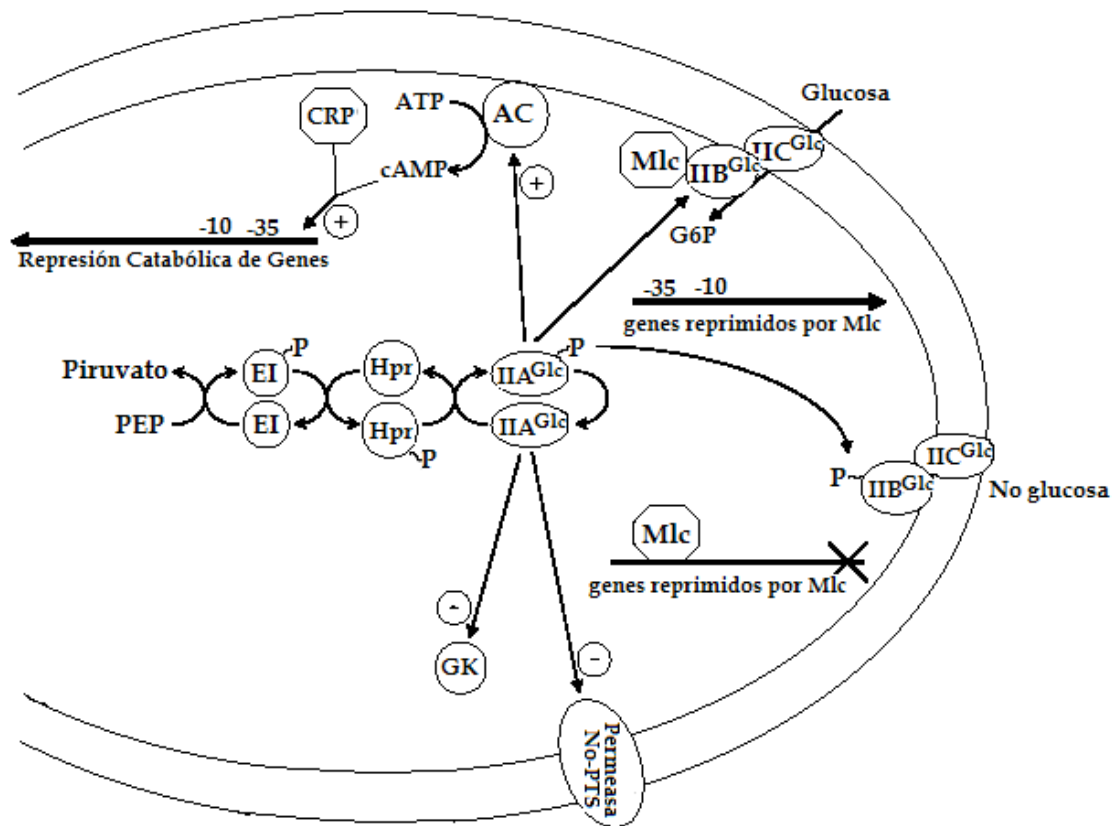


Figura 5. Represión catabólica de carbono. En ausencia de glucosa IIA y IIB se encuentran fosforiladas. Los genes bajo el control de Mlc se encuentran reprimidos (ya que Mlc no puede unirse a IIB) y la IIA~P se une a la AC, provocando un aumento de cAMP y la formación de un complejo con CRP que activa la transcripción de genes para el transporte de otros carbohidratos disponibles. Cuando hay glucosa, EIIB no fosforilada interactúa con Mlc liberando la represión de genes bajo su control y permite el transporte de glucosa, mientras que IIA no fosforilada interactúa con sistemas de transporte como GK y permeasas no-PTS inhibiendo el transporte.

II. III Sacarosa como fuente de carbono

El suelo es un ambiente que contiene una amplia variedad de carbohidratos derivados de plantas y animales que están disponibles para las bacterias como fuentes de carbono. Para usar estos carbohidratos las especies bacterianas producen enzimas que les faciliten su metabolismo. Uno de los carbohidratos más abundantes en la naturaleza por su presencia en tejidos de plantas es la sacarosa, la cual se compone por una unidad de glucosa ligada a una unidad de fructosa a través de un enlace glicosídico. La sacarosa como una accesible fuente de carbono y energía juega un importante papel en el cultivo de microorganismos.

El mejor sistema de transporte de sacarosa conocido es a través del PTS-Scr. El PTS de sacarosa consta de las proteínas: enzima I (EI), proteína con histidina (HPr), enzima IIA de glucosa (IIA^{Glc}) y la proteína de membrana específica para el transporte de sacarosa IIBC (IIBC^{Scr}).

Sin embargo también existen otros mecanismos para el transporte de sacarosa además del sistema PTS, a través de permeasas de sacarosa no-PTS que facilitan la acumulación de sacarosa sin modificación química (Saier 1998). Estas permeasas no-PTS conforman sistemas de simporte soluto-cación, tales como el simporte ScrT en el operón sacarosa de *Bifidobacterium lactis* (Trindade et. al., 2003) y el transportador CscB de *E. coli* (Jahreis et. al., 2002). Los sistemas de transporte específicos de sacarosa tanto PTS como no-PTS están generalmente agrupados con genes regulatorios y catabólicos en diferentes bacterias.

Una vez dentro de la célula, las enzimas implicadas en el catabolismo de sacarosa intracelular son las glicosil hidrolasas (Kitaoka y Hayashi 2002).

Las β -fructofuranosidasas de la familia 32 de las glicosil hidrolasas constituyen posiblemente el grupo mejor caracterizado de enzimas capaces de hidrolizar sacarosa. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de la fructosa terminal de disacáridos, trisacáridos y polímeros conteniendo fructosa. Algunos ejemplos lo constituyen las levanasas e inulinasas específicas para polímeros de fructosa de alto peso molecular.

Otras hidrolasas son específicas para azúcares conteniendo fructosa de bajo peso molecular tales como sacarosa y rafinosa. Las enzimas mejor caracterizadas dentro de este grupo son las sacarosa-6-fosfato hidrolasas, las cuales rompen la sacarosa-6-fosfato para dar glucosa-6-fosfato y fructosa, y además están asociadas usualmente con el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS).

Las sacarosa fosforilasas son miembros de la familia 13 de las glicosil hidrolasas y catalizan la fosforilación reversible de sacarosa en la presencia de fosfato inorgánico para llevarlo a glucosa-1-fosfato y fructosa (Kitaoka y Hayashi 2002). Este proceso no requiere ATP, así la fosforilación puede ser considerada como un proceso celular que permite conservar energía.

La glucosa-1-P generada por las fosforilasas puede ser convertida a glucosa-6-P por la célula bacteriana (con ayuda de una mutasa) e incorporada directamente dentro de la vía glicolítica, al igual que la producida por la sacarosa-6-P hidrolasa. La fructosa resultante del catabolismo de sacarosa o sacarosa-6-P es generalmente fosforilada por fructocinasas dependientes de ATP para obtener fructosa-6-P, un intermediario de la vía glicolítica (Figura 6).

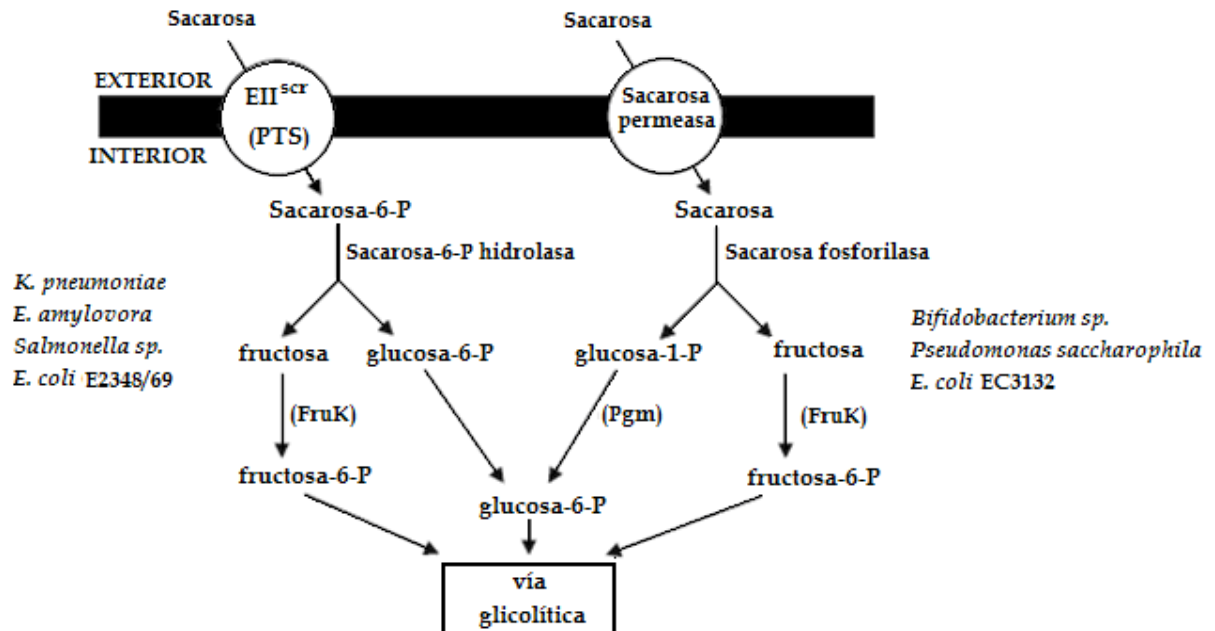


Figura 6. Principales mecanismos del transporte y catabolismo de sacarosa en bacterias

II.III.I Organización genética de sistemas para el catabolismo de sacarosa en bacterias entéricas.

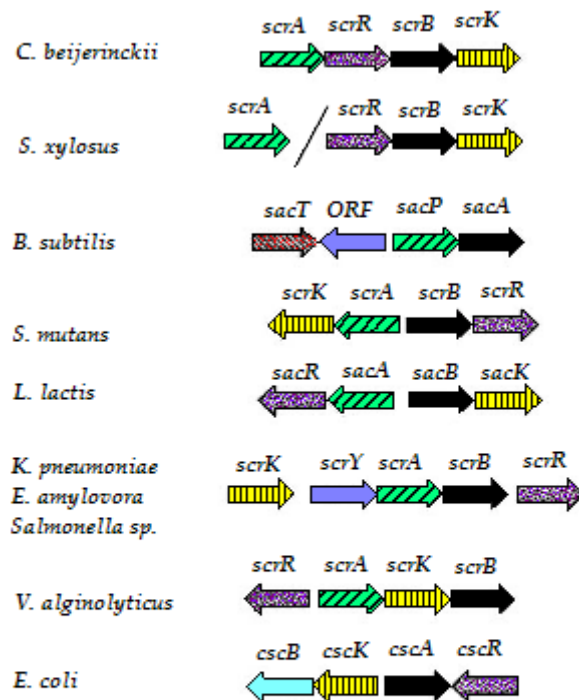
La información de las secuencias genómicas de un amplio rango de bacterias indica que una parte sustancial de muchos genomas está dedicado a genes involucrados en la degradación de carbohidratos. Se han hecho diversos estudios sobre la organización genética y regulación de varios operones bacterianos codificando proteínas para el consumo de sacarosa.

Particularmente, las bacterias enteropatógenas tienen la capacidad de consumir sacarosa. Más del 90% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* pueden usar sacarosa como única fuente de carbono comparado con el 50% de cepas de *Escherichia coli* y 10% de cepas de *Salmonella*. Las variaciones también se han visto en la localización de los genes involucrados en el catabolismo de sacarosa, y la asociación de estos genes al transporte por vías dependientes de PTS o no-PTS (Hochut et al 1997).

Para que los carbohidratos distintos a la glucosa y fructosa puedan entrar a las vías del metabolismo central, deben ser convertidos en una o más reacciones enzimáticas a glucosa o fructosa-6-P, o algún otro intermediario de la vía. En el transporte mediado por PTS, los genes que codifican para enzimas específicas para la utilización de sacarosa están frecuentemente localizados dentro del mismo operón junto con la permeasa PTS específica del carbohidrato. Los genes que codifican para las actividades de transporte y metabolismo de sacarosa se encuentran agrupados en operones complejos transcripcionalmente agrupados como regulones.

En *Salmonella sp.*, elementos genéticos móviles tales como el plásmido conjugativo pUR400 (Shmid et al. 1988) y el transposón conjugativo CTnscr94 proveen a las células la capacidad de utilizar sacarosa. Estudios previos han mostrado que el regulón *scr* del plásmido conjugativo pUR400 aislado de *Salmonella sp.* y el regulón *scr* de *K. pneumoniae* KAY2026, localizado en el cromosoma, están íntimamente relacionados (figura 7).

a Sacarosa hidrolasas



b Fosforilasas

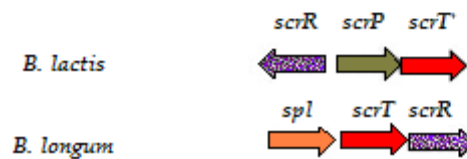


Figura 7. Comparación del arreglo de genes del loci sacarosa de diferentes grupos bacterianos.

Los regulones de sacarosa de pUR400, CTnscr94 y *K. pneumoniae* codifican genes típicos de la vía de fermentación de sacarosa dependiente de PTS. Ambos regulones (*scrKYABR*) consisten en cuatro genes estructurales: el gen *scrA* codifica para el complejo de enzima II del PTS específico para sacarosa (IIBC^{scr}); el gen *scrB* que codifica para una β-D-fructofuranosida fructohidrolasa o invertasa; el gen *scrY* que codifica para una porina de la membrana externa específica de sacarosa; y el gen *scrK* codificando para una fructocinasa dependiente de ATP. Además este regulón cuenta con un gen regulador de sacarosa *scrR* (figura 8).

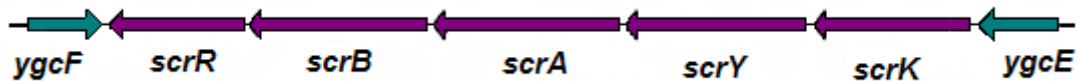


Figura 8. Mapa genético del regulón *scr*. Genes del regulón *scr* presentes en pUR400 y CTnscr94 de *Salmonella sp.*, en el cromosoma de *K. pneumoniae* y en el cromosoma de *E. coli* E2348/69.

A través de este sistema, la sacarosa es internalizada y fosforilada por el transportador II ScrA de PTS, el cual genera sacarosa-6-fosfato intracelular. Ésta sacarosa-6-fosfato es hidrolizada por la invertasa ScrB (sacarosa-6-fosfato hidrolasa) en D-glucosa-6-fosfato y D-fructosa. La fructocinasa ScrK dependiente de ATP fosforila la D-fructosa produciendo fructosa-6-fosfato la cual puede entrar a la vía glucolítica. La porina específica de azúcar ScrY facilita la difusión de sacarosa extracelular a través de la membrana externa (figura 6).

En *E. coli*, la cepa aislada tipo *EC3132* tiene la capacidad de utilizar sacarosa por otro mecanismo; por lo tanto, los genes de sacarosa de *E. coli EC3132* son distintos a los mencionados anteriormente. Los genes involucrados (*cscB*, *cscK*, *cscA* y *cscR*) se encuentran situados en el cromosoma y codifican para un sistema de utilización de sacarosa no-PTS compuesto de un simporte sacarosa-H⁺, una fructocinasa, una invertasa, y un represor específico Csc, respectivamente (Jahreis et al. 2002). Estos genes son negativamente regulados por el represor CscR, y son controlados positivamente por represión catabólica vía cAMP-CRP.

II.III.II Regulación global del metabolismo de sacarosa en *E. coli*

Los genes que componen los operones catabólicos de sacarosa están regulados cuidadosamente por la célula. Éstos se expresan únicamente cuando la sacarosa está presente y cuando otras fuentes de carbono preferentes están agotadas. Los mecanismos que facilitan ésta inducción/represión están usualmente mediados por reguladores transcripcionales específicos del operón, en conjunto con las proteínas globales de represión catabólica de carbono (CRP) (Saier et al. 1995).

A nivel de operón y regulón, es el represor específico (*scrR*, en el caso del regulón *scr*) el que controla negativamente la expresión de genes, y estos genes son al mismo tiempo activados por el complejo regulador global cAMP-CRP. Por lo tanto, los dos mecanismos reguladores comunes son: la interacción operador-represor-inductor y la activación cAMP-CRP.

Las proteínas reguladoras para inducir o reprimir genes estructurales de una manera sustrato específico, están frecuentemente asociadas con los genes para la utilización de ese sustrato.

El sistema de utilización de sacarosa de células conteniendo el plásmido pUR400 son inducidas después del crecimiento en sacarosa, fructosa u oligosacaridos conteniendo fructosa tales como rafinosa y lactulosa. En un estudio se observó que la cepa *E. coli K-12* presentando el pUR400 exhibe una actividad de transporte de sacarosa únicamente después del crecimiento en sacarosa y fructosa. Estas observaciones sugirieron que la fructosa intracelular o un derivado actúan como un inductor molecular. Para identificar el inductor, se hizo una prueba con diferentes azúcares y azúcar fosfato, de los cuales, únicamente la fructosa y la fructosa-1-P funcionaron como inductores al disociar el complejo represor-operador. Estos resultados se obtuvieron tanto para el regulón *scr* de pUR400 como para el regulón *scr* de *K. pneumoniae* (Jahreis y Lengeler 1993). Después del transporte y fosforilación de sacarosa a sacarosa-6-P, la hidrólisis lleva a D-glucosa-6-P y D-fructosa intracelular. Esto coincide con el dato que indica que no es la sacarosa-6-P, sino el derivado D-fructosa el que actúa como inductor (Franekel, 1968; Fermenci y Kornberg, 1973).

Por otro lado, en pUR400 se han identificado dos promotores independientes, uno frente al operón *scrK* y un segundo frente al operón *scrYAB* (Schmid et al. 1991). Aunque ambos sistemas están controlados negativamente por el represor *scrR*, el operón *scrYAB* es dependiente de la inducción transcripcional por el complejo cAMP-CRP, contrario al operón *scrK* que no lo es (figura 9).

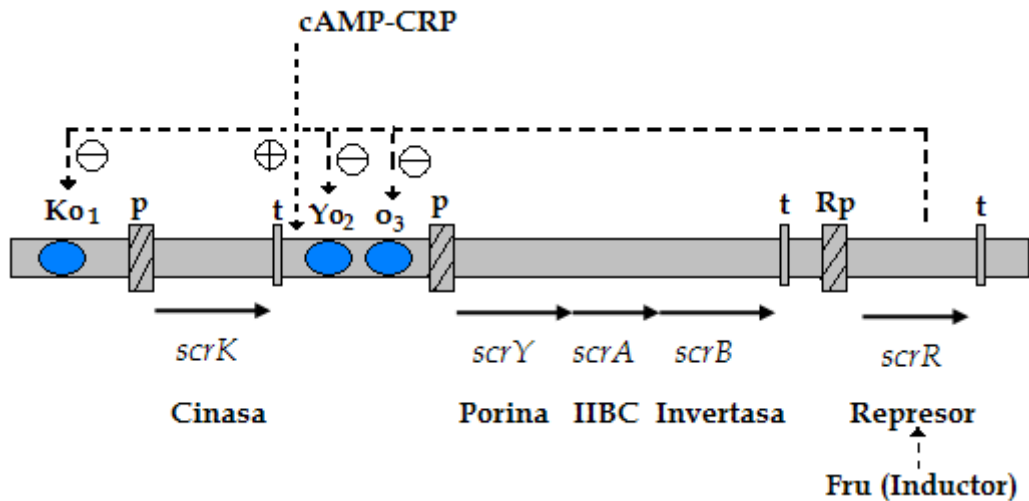


Figura 9. Control global del regulón *scr*. Promotores (p), operadores (Ko_1 , Yo_2o_3), terminadores (t). \ominus Indica interacciones regulatorias negativas, \oplus indica interacciones regulatorias positivas.

El gen *scrR* se presenta río abajo de *scrB*. El análisis de la secuencia de *scrR* revela que ScrR pertenece a la clase de represores típicos de la familia de reguladores transcripcionales LacI-GalR (Weickert y Adhya, 1992). Todos los represores de esta familia contienen un motivo hélice-vuelta-hélice en la parte N-terminal (Freemont et al. 1991) (Figura 10). La conformación del represor ScrR específico del regulón *scr* permite que se pueda unir cooperativamente como un tetrámero a *scrY*_{O2O3} (Jahreis y Lengeler 1993).

La interacción operador-represor-inductor en la regulación de la expresión de genes del operón *scrYAB* se presenta por la señal transformada previamente introducida.

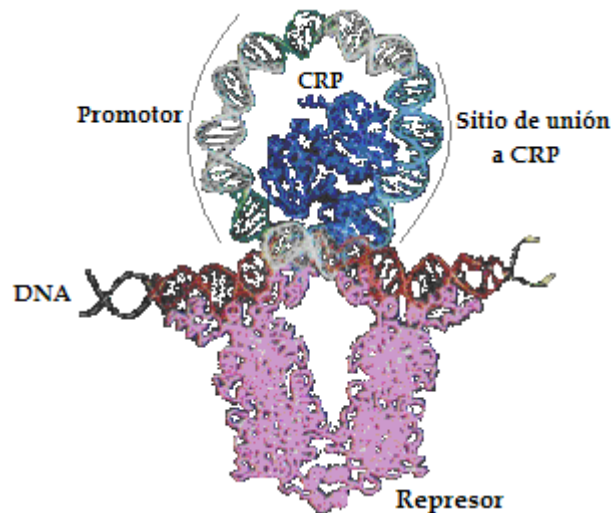


Figura 10. Esquema de un regulador de la familia LacI-GalR. El represor y la proteína CRP tienen su sitio específico de unión al DNA.

Inmediatamente después de la adición de sacarosa, ésta es tomada y fosforilada a sacarosa-6-P por IIBC^{Scr} la cual causa una desfosforilación de IIA^{Glc}. Lo anterior provoca que IIA^{Glc} ~P desaparezca, no se active la adenilato ciclasa y por lo tanto disminuya la concentración de cAMP intracelular. La hidrólisis de sacarosa-6-P por ScrB resulta en un rápido incremento de la concentración de fructosa intracelular, la cual causa la inducción del represor ScrR y la liberación del regulón *scr* para permitir su transcripción.

II. IV Estudio de cepas EPEC por su capacidad de utilizar sacarosa y glucosa como única fuente de carbono

En un estudio sobre algunas cepas enteropatógenicas de *E. coli* (EPEC) se evaluó la capacidad de utilizar sacarosa o glucosa como única fuente de carbono, además se identificaron los genes involucrados en el fenotipo *scr*⁺ y se realizó un análisis comparativo de su localización genómica.

De las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas al azar se observó que las cepas entéropatógenas en su mayoría tienen la capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono.

Cuando estas cepas crecieron en un medio de cultivo suplementado con glucosa, no se observaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento de las diferentes cepas. En un medio de cultivo suplementado con sacarosa se identificaron dos grupos, el primero incluyendo las cepas EPEC E2348/69, T2, T19, T23 y T45, el cual no presentó una fase lag inicial exhibiendo su crecimiento exponencial; y un segundo grupo incluyendo las cepas EPEC T12, T18 y B171-10, presentando una fase de crecimiento lag de 7 h y un subsiguiente periodo de crecimiento exponencial (Figura 10).

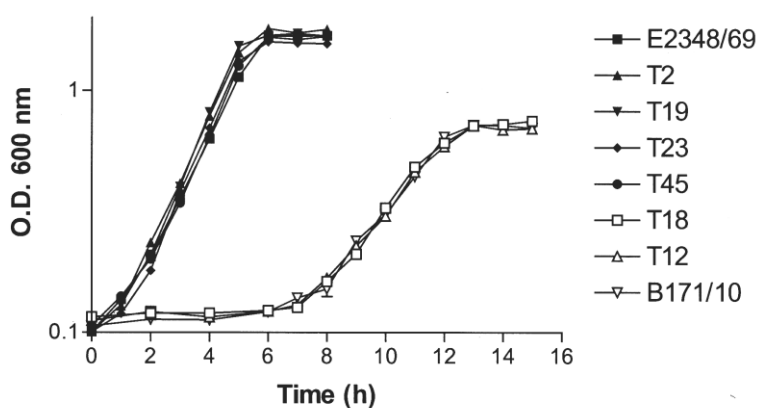


Figura 11. Cinética de crecimiento de cepas EPEC en medio mínimo suplementado con sacarosa

De las cepas analizadas que presentan el fenotipo scr^+ , hubo diferencias significativas en la capacidad de crecimiento cuando se usó la sacarosa como única fuente de carbono.

De las cepas utilizadas en este estudio se caracterizaron los genes involucrados en el fenotipo scr^+ . Este análisis permitió la localización en el cromosoma de la cepa E2348/69 con un alto grado de similitud de la secuencia *scr*, que presenta los genes que codifican para el transporte y metabolismo de sacarosa.

La cepa E2348/69 de *Escherichia coli* es una cepa enteropatógena (EPEC) que ha sido usada para estudios comparativos relacionados a especies de *Escherichia coli* y *Shigella*. Es una causa importante de diarrea infantil y se encuentran por lo general en el tracto intestinal de niños lactantes. Además, como se ha mencionado, cuenta con el regulón *scr* que permite el transporte de sacarosa a través del PTS (Scr-PTS) y la vía metabólica (Luis Treviño, et. al., En prensa).

III JUSTIFICACIÓN

Las bacterias tienen la capacidad de utilizar un amplio rango de fuentes de carbono, las cuales son transportadas hacia el interior de la célula por varios sistemas de transporte específicos. Esta capacidad está asociada a la supervivencia en su medio natural por lo que se ha incrementado el interés por tratar de entender cómo se lleva a cabo la selección de los diferentes tipos de fuentes de carbono disponibles en el medio y por tanto la regulación de los componentes que participan en este proceso.

La mayoría de las bacterias utilizan la glucosa como principal fuente de carbono, ejerciendo ésta un efecto de represión catabólica sobre una gran variedad de otras fuentes disponibles, resultando en un consumo preferencial de carbohidratos. Sin embargo, también existen un gran número de sustratos capaces de ser metabolizados por la célula bacteriana y cuya regulación se conoce poco, un ejemplo de ello es la sacarosa. Éste carbohidrato se encuentra en mayor cantidad de manera natural, en el tejido de plantas tales como la caña de azúcar y su disponibilidad económica y comercial es mucho más factible en países como México. La capacidad de consumir sacarosa como única fuente de carbono es típica de bacterias patógenas, es por ello que resultan un grupo interesante a estudiar para tratar de entender la capacidad de consumir éste azúcar y así mismo entender el fenómeno de represión catabólica en una mezcla de azúcares.

La cepa enteropatógena E2348/69 tiene la capacidad de consumir sacarosa como única fuente de carbono a través del PTS ya que cuenta con el regulón *scr* localizado en el cromosoma. El estudio del papel de genes específicos del regulón *scr* sobre la capacidad de consumo de sacarosa y la determinación de las características de cultivo en un medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa o ambos, contribuye a generar conocimiento sobre la regulación de estos genes y su importancia en el fenómeno de represión catabólica, permitiendo valorar el uso de otras fuentes de carbono que resulten más económicas, eficientes y mejor disponibles como sustrato en el cultivo de bacterias como lo puede ser la sacarosa.

IV HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV.I Hipótesis

Si la cepa enteropatógena E2348/69, que tiene la capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono debido a la presencia del regulón *scr*, crece en un medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa, existirá un efecto de represión catabólica de glucosa sobre el consumo de sacarosa.

IV.II Objetivo general

Estudiar el papel de genes específicos del regulón *scr* sobre la capacidad de consumo de sacarosa y el fenómeno de represión catabólica en la cepa enteropatógena E2348/69.

IV.III Objetivos particulares

- Inactivar el regulón *scr* y el gen represor *scrR* de la cepa EPEC E2348/69.

Se llevará a cabo la inactivación cromosomal del regulón *scr* y del gen represor *scrR* en la cepa EPEC E2348/69, para entender su papel en el metabolismo de sacarosa y en el fenómeno de represión catabólica respectivamente.

- Evaluar el crecimiento y determinar los parámetros cinéticos de la cepa E2348/69, E2348/69 Δ *scr* y E2348/69 Δ *scrR* en cultivos con glucosa o sacarosa.

Con el fin de conocer los parámetros cinéticos de las cepas E2348/69, E2348/69 Δ *scr* y E2348/69 Δ *scrR*, en las condiciones utilizadas para la evaluación del consumo de carbohidratos, en este trabajo se llevará a cabo la caracterización de cultivos en medio mínimo utilizando glucosa o sacarosa como fuentes de carbono.

- Evaluar el efecto de represión catabólica en las cepas E2348/69, E2348/69 Δ *scr* y E2348/69 Δ *scrR* en presencia de una mezcla de glucosa y sacarosa.

Se realizarán cultivos en medio mínimo con la mezcla de carbohidratos glucosa y sacarosa, que permitiría observar el posible efecto de represión catabólica.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.I Cepas bacterianas.

Tabla I Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo o fenotipo relevante	Fuente
E2348/69	Prototipo EPEC	Levine et al., 1978
E2348/69/pKD46	Sistema de recombinasa λ Red	Este trabajo
E348/69 Δscr	EPEC $\Delta scr::Cm$	Este trabajo
E2348/69 $\Delta scrR$	EPEC $\Delta scrR::Cm$	Este trabajo

V. II Plásmidos

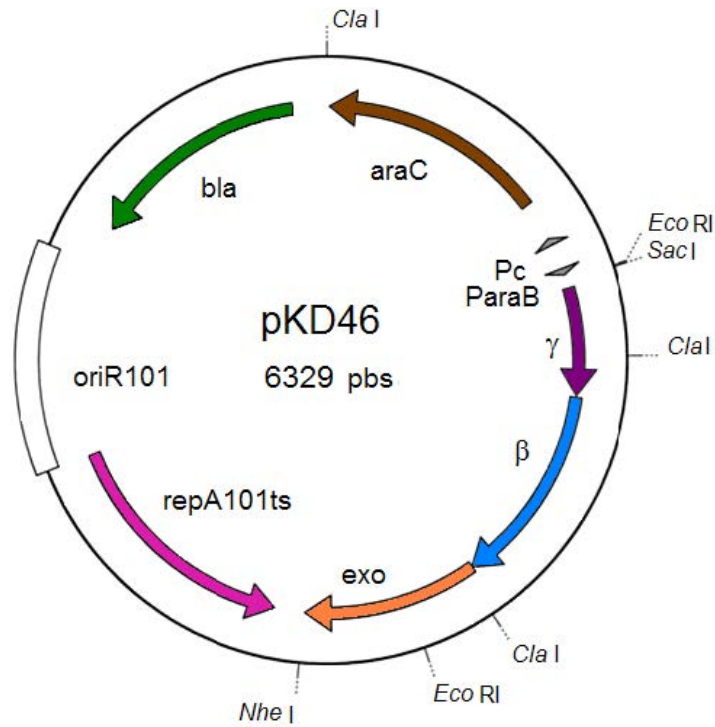
pKD46 (6329 pb)

Plásmido descrito por Datsenko y Wanner, 2000. Éste es un plásmido con bajo número de copias codificando la recombinasa Red. El sistema λ -Red incluye tres genes: γ , β y *exo*, cuyos productos son llamados Gam, Bet y Exo. Gam inhibe a RecBCD, la exonucleasa V del hospedero, así que Bet y Exo tienen libre acceso al DNA y promueven la recombinación. Éste plásmido presenta un sitio de unión al ribosoma optimizado para la traducción eficiente de γ y expresar γ , β y *exo* del promotor P_{araB} inducible por arabinosa. Es además un replicón sensible a la temperatura que permite su fácil eliminación. Contiene un casete de resistencia a Carbamicilina (Cb) (figura 12 A).

pKD3 (2804 pb)

Plásmido descrito por Datsenko y Wanner, 2000. Éste plásmido fue construido como templado y es un replicón condicional (*oriR γ*) que requiere la proteína *trans-acting* II (producto del gen *pir*) para la replicación.

También cuenta con un casete de resistencia a cloramfenicol (Cm) de 1.1 kpb flanqueado por sitios repetidos FRT (figura 12 B).



A

pKD3 (2804 pbs)



B

Figura 12. Esquema de los plásmidos utilizados. A. pKD46, B. Representación lineal del plásmido pKD3.

V.III Oligonucleótidos

Oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR del casete de resistencia a Cm (FinscrR, IniscrK, IniscrR). Estos oligonucleótidos presentan una porción de 20 pb con homología al plásmido templado y una porción de 40 pb con homología de extensión a la región cromosómica a interrumpir (figura 13).

Oligonucleótidos diseñados para la localización de la mutación por PCR del regulón *scr* y del gen *scrR* en el cromosoma (*ygcF*, *ygcE*, *scr-NdeI5*). Estos oligonucleótidos presentan homología algunos pares de bases fuera de la región cromosómica a interrumpir (figura 13).

Tabla II Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligonucleótido	Extremos homólogos	Secuencia	Tamaño (pb)
FinscrR (Sentido)	Al fin del gen <i>scrR</i> (H1)	5' GCT GTA ATG GGG ATG GCG TTT CAC CTT CAA TCA GTT GCG AGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G 3'	61
IniscrK (Antisentido)	Al inicio del regulón <i>scr</i> (H3)	5' GAT CCT TTC GGT CGC TTT ATG TAT CAG ACA CTG AGT ACA GCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG 3'	60
IniscrR (Antisentido)	Al inicio del gen <i>scrR</i> (H2)	5' CCA GTC TGG TTC TCA ATG GTC GTG GCA AAG AGT TAC GTG TCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG 3'	60
<i>ygcF</i> (Sentido)	327pb fuera del regulón <i>scr</i> y del gen <i>scrR</i> a interrumpir	5' CAA GCC CTG GAG CGA GCT AAC 3'	21
<i>ygcE</i> (Antisentido)	463 pb fuera del regulón <i>scr</i> a interrumpir	5' GCG TTG CTC TCA ACA GGC ATA A 3'	22
<i>scr-NdeI 5</i> (Antisentido)	2605 pb fuera del gen <i>scrR</i> a interrumpir	5' CGA CTC GCC GCT CAA AAA CTC 3'	21

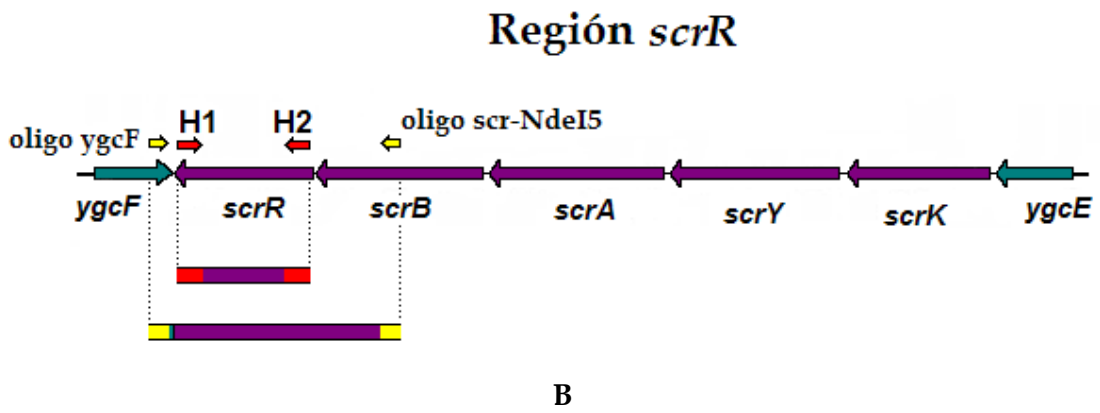
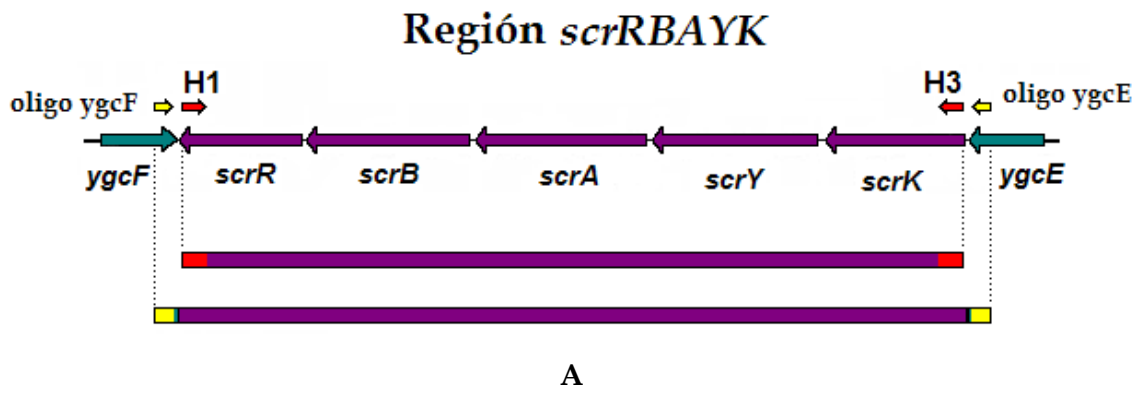


Figura 13. Representación de la homología de los oligonucleotidos al cromosoma. A. Homología a la región *scr*, B. Homología a la región *scrR*.

V.IV Medios de Cultivo

Tabla III. Medios de cultivo utilizados en este trabajo

Medio	Composición (por litro de medio)
Medio mínimo (M9)	<ul style="list-style-type: none">• 100 ml de concentrado de sales M9 (10X)• CaCl₂ 0.1 M, 100 ml• MgSO₄·7H₂O 1M, 100 ml• Tiamina·HCl (vitamina B1 0.5%) 50 µl• Glucosa o Sacarosa*• Aforar a 1000 ml de H₂O
LB + Cloramfenicol	<ul style="list-style-type: none">• Bactotripton, 10 g• Extracto de levadura, 5 g• NaCl, 10 g• Cloramfenicol (30 µg/ml)
LB + Ampicilina	<ul style="list-style-type: none">• Bactotripton, 10 g• Extracto de levadura, 5 g• NaCl, 10 g• Ampicilina (100 µg/ml)
Medio YENB	<ul style="list-style-type: none">• Bacto extracto de levadura al 0.75 %• Caldo nutritivo (Bacto Nutrient Broth) al 0.8%.

Para preparar medio sólido se agregaron 20 g/L de agar.

Se utilizó L-arabinosa 1M para la inducción del sistema de recombinasa λ Red

Los medios SOB y SOC fueron preparados por protocolo.

* Para las cinéticas de crecimiento se utilizó: Medio LB (para preinóculo), Medio M9 suplementado con glucosa al 0.2% (2 g/l), Medio M9 suplementado con sacarosa al 0.2% (2g/l), Medio M9 suplementado con glucosa y sacarosa al 0.2% (1 g/L de cada azúcar).

V. V Condiciones de cultivo

Cultivo en medio sólido.

En una placa de medio sólido, se inoculó una muestra o colonia de la cepa a crecer con un asa estéril, estriando por toda la placa. Al tratarse de una muestra en suspensión, se añadió un volumen de 200 μ l de la suspensión a cada placa y se distribuyó por toda la superficie del medio con la ayuda de perlas estériles. Se incubó a 37°C por toda la noche. En el caso de las cepas sensibles a la temperatura se incubó a 30°C.

Cultivo en medio líquido

Se tomó una muestra de la cepa a crecer con un asa y se inoculó el volumen deseado de medio líquido. En caso de que la muestra se tratara de una suspensión, se inocularon 50 μ l de volumen de la muestra por 25 ml de volumen de medio a inocular. Se incubó a 37°C y 300 rpm por toda la noche.

V. VI Extracción de DNA cromosomal

La extracción y purificación del DNA cromosomal se llevó a cabo utilizando el kit Ultraclean Microbial Genomic DNA isolation de MO BIO laboratorios (www.mobio.com).

V.VII Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Mini preparaciones)

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo por el método de lisis alcalina. Se preparó medio LB con el marcador de selección apropiado. Se inocularon 3 ml del medio con la cepa y se incubó a 37°C durante 12 horas y a 300 rpm en una incubadora New-Brunswick. Se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 4 minutos a 4000 rpm en una centrífuga marca Eppendorf 5415C. Una vez centrifugado, se aspiró el sobrenadante.

Se llevó a cabo un lavado, usando vortex, con 1 ml de solución I fría¹. Se centrifugó por 4 min a 4000 rpm y se aspiró el sobrenadante.

El pellet se resuspendió, usando el vortex, en 150µl de solución I fría y 5 µl de RNA'sa. Se adicionaron 350 µl de solución II² y se mezcló por inversión. Esta solución contiene SDS. El SDS es un detergente que degrada la estructura de la membrana celular, al emulsionar a los lípidos y proteínas formando complejos con estas macromoléculas precipitándolas. Se dejó en hielo durante 10 min.

Pasado ese tiempo, se adicionaron 250 µl de solución III fría³. Se incubó en hielo durante 30 minutos. Después se centrifugó por 15 min a 14000 rpm.

El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se desechó el pellet. El tubo con el sobrenadante se llenó con isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante.

Finalmente se lavó dos veces con 1 ml de Etanol al 70% con la finalidad de disolver las sales que quedaran unidas al DNA. Se mezcló por inversión. Se centrifugó por 10 min a 14000 rpm y se secó a 37°C por 20 minutos. Se resuspendió en 50 µl de buffer TE pH 8.0.

¹ La solución I se compone de Sacarosa 0.6 M, EDTA 0.05 M pH 8.0, TRIS-HCL 0.05 M pH 8.0.

² La solución II se compone de NaOH 0.2 N, SDS 1%.

³ La solución III esta compuesta de Acetato de sodio 3 M pH 4.8.

V.VIII Separación de DNA en gel de agarosa por electroforesis

Para analizar el DNA se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE 1X.

Para visualizar el DNA en el gel de agarosa, se adicionaron 150 µl de una solución de bromuro de etidio a 250 ml del buffer TBE 1X y se visualizó en una lámpara de luz UV utilizando un equipo Eagle Eye (Stretugne).

V.IX Amplificación del casete de resistencia por PCR

La amplificación del casete de resistencia a Cm del plásmido pKD3 se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación del casete de resistencia con extremos homólogos al principio y fin del regulón *scr* se utilizó la siguiente mezcla de reacción: se prepararon dos mezclas separadas en hielo, una conteniendo 1 μ l de DNA templado (pKD3), 0.5 μ l de oligo FinscrR (50 pmol/ μ l), 0.5 μ l de oligo IniscrK (50 pmol/ μ l), 1 μ l de dNTP's (10 mM) y H₂O estéril hasta completar 20 μ l (Mezcla 1), y otra conteniendo 10 μ l de Buffer B (2.0 mM de Mg²⁺), 1 μ l de Elongase enzyma mix y H₂O estéril hasta completar un volumen de 30 μ l (Mezcla 2). Las dos mezclas se combinaron para obtener una mezcla final de 50 μ l y se mantuvo en hielo hasta antes de iniciar la reacción en un termociclador. Para la amplificación del casete de resistencia con extremos homólogos al principio y fin del gen *scrR* los oligos fueron: FinscrR (50 pmol/ μ l) e IniscrR (50 pmol/ μ l).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: se inició con un ciclo de desnaturalización pre-amplificación de 2 min a 94°C, la siguiente reacción consistió en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 1 min, y extensión a 68°C por 2 min. El tiempo de elongación fue extendido un ciclo más por 8 min para compensar la pérdida de actividad de la DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron establecidas usando un termociclador Robocycler de Invitrogen. Se prepararon 20 reacciones de 50 μ l en cada caso para obtener un producto de PCR altamente concentrado.

V.X Extracción del producto de PCR

El proceso de purificación de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del casete de resistencia se llevó a cabo según el protocolo de extracción por cloroformo-alcohol isoamílico. Se mezcló el contenido de los 20 tubos en 2 y se extrajo con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Se mezcló con ayuda de un vortex y se centrifugó 1 min. Se recuperó la fase acuosa y se extrajo con un volumen adicional únicamente con cloroformo-álcohol isoamílico.

Se precipitó el fragmento extraído con dos volúmenes de etanol al 100% y acetato de amonio 7.5 M y se centrifugó por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de DNA se lavó 2 veces con 1 ml de etanol al 70%. Se secó a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió con 12 μ l de agua estéril.

V.XI Preparación de células electrocompetentes de la cepa E2348/69 empleando un medio libre de sales

Tanto el material como los reactivos fueron previamente esterilizados así como el lugar de trabajo. Se creció un preinóculo de la cepa E2348/69 en 10 ml de medio YENB a 37°C durante toda la noche. Crecer a la cepa en este medio es muy importante ya que no contiene sales y la presencia de estas tiene una influencia negativa en la eficiencia de células electrocompetentes.

Se incubaron 250 ml de medio YENB con 3 ml del preinóculo, se crecieron las células a 37°C con agitación a 300 rpm. Las células fueron recolectadas una vez que alcanzaron una DO_{600} entre 0.5 y 0.9. Para recolectar las células, se enfrió el frasco en hielo durante 5 min y después se centrifugó a 4000 x g por 10 min a 4°C. Fue muy importante no centrifugar a un valor mayor ya que esto reduce la viabilidad de las células y con esto su eficiencia para ser electroporadas.

Se desechó el sobrenadante (YENB), y puesto que este medio carece de sales, no fue necesario remover las trazas de medio. Se lavó la pastilla de células dos veces con 10 ml de agua fría. Se resuspendió en 4 ml de glicerol al 10%, se centrifugó y desechó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 600 μ l de glicerol al 10% frío. Las células se transfirieron a tubos de 0.5 ml (50 μ l por tubo). Estas células electrocompetentes se podían usar frescas o se congelaban a -70°C para ser usadas después.

V.XII Transformación de la cepa E2348/69 con el plásmido pKD46

En condiciones estériles, se transformó la cepa E2348/69 con el plásmido pKD46. Las células electrocompetentes de E2348/69 se descongelaron en hielo. A un tubo Eppendorf conteniendo 50 μ l de las células se le adicionaron 2 μ l de DNA plasmídico pKD46 y se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta.

Se mantuvo en hielo. Se tomó la mezcla de células con el DNA y se depositó entre los dos electrodos de la celda de electroporación previamente enfriada en hielo. En un electroporador se aplicó un voltaje de 2,500 V con constante ms. Se recuperó la muestra electroporada adicionándole 500 μ l de medio SOC sin glucosa.

Se transfirió a un tubo de vidrio estéril y se incubó a 30°C durante 1 hora. Se sembró en placas de LB con Amp (100 μ g/ml) y se incubó a 30°C por toda la noche. Se recuperaron las colonias que crecieron y se hicieron viales con 800 μ l de un cultivo en LB de toda la noche y 200 μ l de glicerol al 50 %. Se guardó a -70°C.

V.XIII Preparación de células electrocompetentes de E2348/69 con pKD46 para la inducción del sistema de recombinasa λ Red.

Un día antes de la preparación de las células electrocompetentes, se estirió la cepa E2348/69 transformada con pKD46 en placas de agar con LB/Amp 100. Se estirió de manera que se pudieran obtener colonias aisladas. El cultivo se guardó a 30°C durante toda la noche.

Se inocularon por triplicado 25 ml de medio SOB + 25 μ l de Amp (100 μ g/ml) + 2.5 ml de L-arabinosa 1 M, con algunas colonias frescas de la placa. Se incubó a 30°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6 (4 h). Se centrifugaron las células durante 10 min a 8000 rpm y a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1 ml de agua fría estéril, se centrifugó por 5 min a 8000 rpm y a 4°C. Se lavó dos veces más con 1 ml de agua fría. Después del último lavado, se resuspendió en 100 μ l de agua fría y se transfirió a tubos Eppendorff (50 μ l en cada tubo). Cada cultivo rindió para dos electroporaciones.

Estas células fueron utilizadas inmediatamente después de ser preparadas ya que se activó el sistema de recombinasa λ .

V.XIV Transformación de la cepa E2348/69 expresando el sistema λ Red recombinasa con el producto de PCR

Se electroporaron 50 μ l de células electrocompetentes con 4 μ l del fragmento de PCR extraído. Se adicionó 1 ml de medio SOC sin glucosa y se recuperó por 3 h a 30°C. Se sembraron 200 μ l en una caja de LB/Cm (30 μ g/ml) y se incubó a 37°C y a 300 rpm durante toda la noche. El resto de las células se dejó a temperatura ambiente para el siguiente día. Se sembraron en caja el resto de las células del siguiente día en 3 placas y se incubó a 37°C y a 300 rpm por 12 horas.

V.XV Selección y caracterización de las cepas mutantes

V.XV.I Selección por resistencia

De las colonias crecidas después de la electroporación, se seleccionaron las más grandes y se estriaron en cajas de LB/Cm (30 μ g/ml) y LB/Amp (100 μ g/ml). Cada colonia se estrió en una caja diferente tanto en las cajas con ampicilina como en las cajas con cloramfenicol. Se incubó a 37°C. De algunas colonias aisladas presentes en la placa de LB/Cm (resistentes a Cm por la presencia del casete de resistencia, figura 14) se hizo un glicerol.

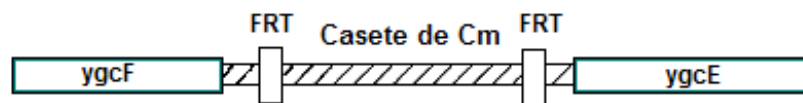


Figura 14. Representación del casete de resistencia a Cloramfenicol presente en el cromosoma (Datsenko y Wanner, 2000).

V.XV.II Caracterización por fenotipo

Como una primera prueba, se inoculó la cepa con la mutación en el regulón *scr* en 3 ml de medio mínimo M9 suplementado con sacarosa al 0.2 % y en LB como control positivo. Esta prueba se realizó para observar si esta cepa, al no contar con el regulón *scr*, se veía afectada en su capacidad de crecimiento utilizando sacarosa como única fuente de carbono.

V.XV.III Localización de la interrupción cromosomal por PCR

Para verificar por PCR la localización de la interrupción del regulón *scr* y del gen *scrR*, se utilizaron los oligos diseñados fuera de la región interrumpida. Como templado se utilizó el DNA genómico de las mutantes obtenidas, E2348/69 Δ *scr* y E2348/69 Δ *scrR*, previamente purificado.

Los oligos *ygcF* y *ygcE* se utilizaron para localizar la interrupción del regulón *scr*, y los oligos *ygcF* y *Scr-NdeI5* para localizar la interrupción del gen *scrR*. Se utilizó el sistema de PCR de *Elongase enzyme mix* de Life Technologies antes descrito.

Las condiciones de amplificación fueron de un ciclo de desnaturalización pre-amplificación a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 1 min, y extensión a 68°C por 3.5 min, se dio un ciclo extra de elongación a 68°C por 8 min.

V.XVI Cinéticas de Crecimiento

Preparación de los inóculos

De un vial guardado a -70°C y descongelado en hielo, se tomó una muestra de la cepa con un asa y se inocularon 3 ml de medio LB. Se incubó a 37°C y 300 rpm por toda la noche en una incubadora New Brunswick, inc., NJ. De este preinóculo se tomaron 50 μ l y se inoculó en matraces de 125 ml conteniendo 25 ml de medio mínimo M9 suplementado con glucosa al 0.2%, otro con sacarosa al 0.2% y otro con glucosa y sacarosa al 0.2% (1 g/l de cada azúcar).

Los matraces fueron incubados a 37°C y a 300 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.05. A este valor se le consideró como el tiempo cero (T0) para iniciar el seguimiento de la cinética de crecimiento y llevar a cabo las mediciones en Klett y la toma de 500 µl de muestra. Se siguió el crecimiento cada media hora hasta una vez entrada la fase estacionaria.

De las mutantes obtenidas y de la cepa silvestre se llevaron a cabo las cinéticas de crecimiento con cada una de las variantes de azúcares (simples y combinados). Cada cinética se llevó a cabo en dos ocasiones distintas y por duplicado (cuatro cinéticas por cepa).

V. XVII Métodos Analíticos

V.XVII.I Determinación de la biomasa

La densidad óptica fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro (Lambda 11 Perkin Elmer, Pomona, Calif.). La DO₆₀₀ fue convertida a gramos de peso seco usando una curva estándar (1 DO₆₀₀= 0.37g/L de gramos de peso seco celular).

Directamente de los matraces, se hicieron las mediciones de biomasa celular en un equipo Klett. Las unidades Klett fueron convertidas a unidades de D.O. mediante la siguiente fórmula: D.O.= (U. Klett) – b/m. La velocidad específica de crecimiento (μh^{-1}), la velocidad específica de consumo de azúcar (qs) y el rendimiento biomasa/sustrato (Yx/s) fueron determinados para todos los cultivos.

V.XVII.II Análisis de azúcares

Los azúcares fueron determinados por HPLC usando una columna de carbohidratos AMINEX para cada una de las muestras tomadas durante la cinética de las cepas examinadas en este estudio (E2348/69, E2348/69 Δscr , E2348/69 ΔscR). Cada muestra fue filtrada con agua para HPLC. Se preparó una curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa que fueron de los 0 a los 2 g/l (se consideraron nueve puntos).

VI. RESULTADOS

VI.I Interrupción cromosomal del regulón *scr* y del gen represor *scrR* de la cepa enteropatógena E2348/69

Con el objetivo de estudiar el papel de genes específicos del regulón *scr* sobre la capacidad de consumo de sacarosa y su importancia en el fenómeno de represión catabólica, se hicieron dos cepas mutantes. Una cepa mutante fue obtenida al inactivar el regulón *scr* de la cepa silvestre E2348/69, que contiene los genes que codifican para el consumo de sacarosa a través del PTS, y a la cual se le llamó E2348/69 Δ *scr*. Una segunda cepa mutante se obtuvo al inactivar el gen *scrR*, represor específico del regulón *scr*, a la cual se le llamó E2348/69 Δ *scrR*. La inactivación de genes se llevó a cabo por el método de interrupción cromosomal de genes descrito por Datsenko y Wanner, 2000 (ver Materiales y Métodos).

VI.II Amplificación del casete de resistencia con extremos homólogos al regulón *scr* y al gen *scrR*.

Con el objetivo de hacer una interrupción del regulón *scr* y del gen *scrR*, se amplificó el casete de resistencia a cloramfenicol con extremos homólogos a la región a interrumpir. Para ello, se diseñaron los oligos FinscrR e IniscrK para el regulón *scr*, y los oligos FinscrR e IniscrR para el gen *scrR* (ver Tabla II). La amplificación se realizó como se indica en Materiales y Métodos. Los productos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis a 90 V durante 1h, se observó la amplificación de un solo fragmento de DNA para cada caso con un tamaño de 1.1 kpb aproximadamente, que corresponde al tamaño del casete de Cm (figura 15).

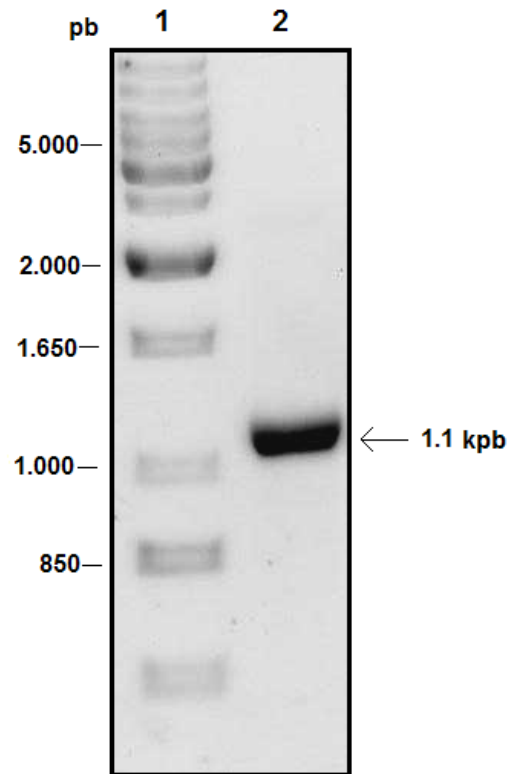


Figura 15. Electroforésis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR del casete de resistencia a Cm. Carril 1, 1 Kb Plus DNA Ladder como marcador de tamaño; Carril 2, producto de amplificación del casete de resistencia a Cm. La flecha indica el tamaño aproximado de 1.1 kpb.

VI.III Selección y caracterización de las cepas mutantes E2348/69 Δ *scr* y E2348/69 Δ *scrR*

VI.III.I Selección por resistencia

Después de la transformación de la cepa E2348/69 /pKD46 con el producto de PCR para la interrupción del regulón *scr* y del gen *scrR*, se observó el crecimiento de pocas colonias (2 colonias por 200 μ l de cultivo) sembradas el mismo día. Del resto de las células que se mantuvieron a temperatura ambiente por toda la noche, y sembradas al día siguiente, se obtuvieron la mayoría de las mutantes potenciales. Se seleccionaron algunas colonias y se estriaron en cajas de LB/Cm y LB/Amp (ver Materiales y Métodos). Se observó que las células crecieron únicamente en las cajas conteniendo Cm, ya que las células transformadas adquirieron el casete de resistencia a este antibiótico (Cm^R). No se presentó crecimiento en las cajas conteniendo LB/Amp.

VI.III.II Caracterización por fenotipo

Una de las mutaciones realizadas fue la eliminación del regulón *scr*. Para observar la capacidad de consumir sacarosa en la cepa E2348/69 Δ *scr*, se inocularon 3 ml de medio mínimo M9 + Cm (30 μ g/ml) suplementado con sacarosa al 0.2 % y 3 ml de LB + Cm como control positivo. Se observó que esta cepa no creció en un medio mínimo teniendo a la sacarosa como única fuente de carbono, a diferencia del crecimiento observado en medio LB.

VI.III.III Verificación de las interrupciones cromosomales por productos de PCR

Después de la selección de las mutantes potenciales, se verificó la localización de la interrupción por PCR. Para la interrupción del regulón *scr* se diseñaron los oligos *ygcF* y *ygcE*, y para la interrupción del gen *scrR* los oligos fueron *ygcF* y *scr-NdeI5* (ver Tabla III). Los productos de la reacción de PCR se separaron por electroforesis a 90 V durante 1h. Se obtuvieron los tamaños esperados de 2011 pb para la interrupción del regulón *scr* y 4120 pb para el caso del gen *scrR* (figura 16).

Estos oligonucleótidos, diseñados unas bases antes y después de la región interrumpida, permitieron amplificar el casete de resistencia localizado en cromosoma (ver figura 13 de Materiales y Métodos).

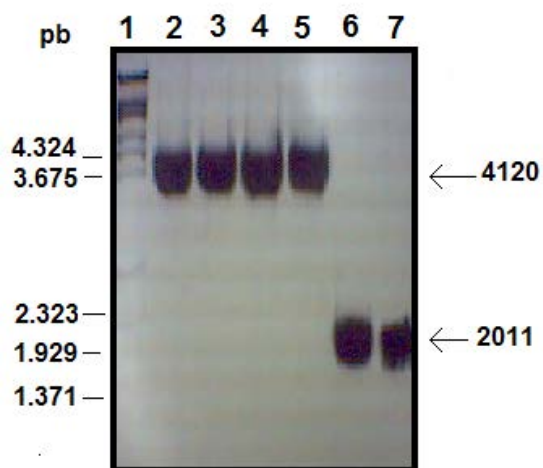


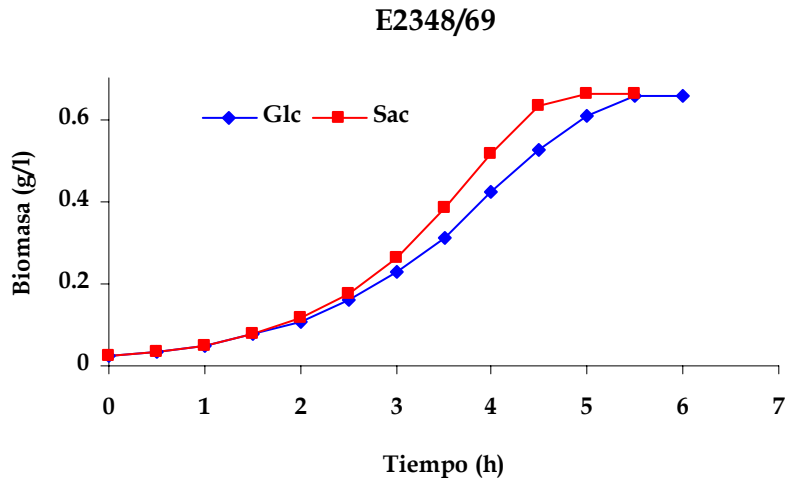
Figura 16. Electroforésis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR del casete de resistencia a Cm en cromosoma. Carril 1, 1 Kb λ DNA Ladder como marcador de tamaño; Carril 2-5, productos de amplificación del casete de resistencia a Cm en la interrupción del gen *scrR*; Carril 6-7, productos de amplificación del casete de resistencia a Cm en la interrupción del regulón *scr*. La flecha indica el tamaño aproximado de cada producto: 4120 para el gen *scrR* y 2011 para el regulón *scr*.

VI.IV Caracterización de las cepas.

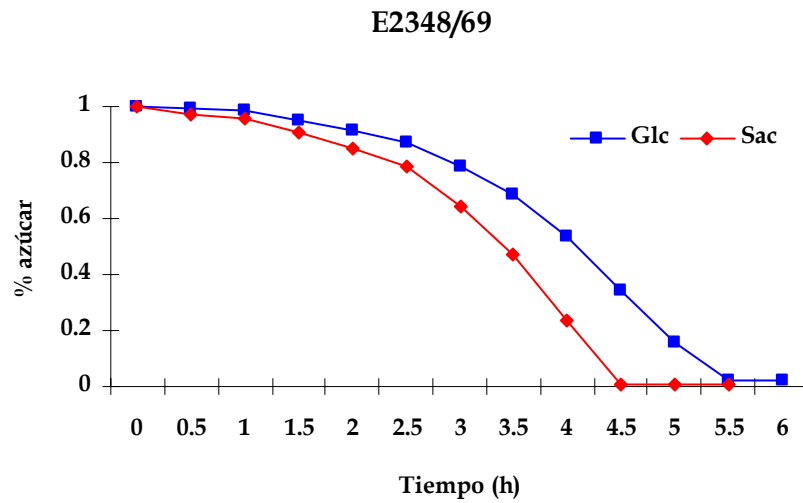
Se llevó a cabo la caracterización de las cepas E2348/69, E2348/69 Δ *scr* y E2348/69 Δ *scrR* para evaluar los parámetros cinéticos en cultivos conteniendo un solo azúcar: glucosa o sacarosa. La biomasa producida, la velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica del consumo de azúcar fueron determinadas para los cultivos. Los cultivos conteniendo ambos azúcares se llevaron a cabo para evaluar el fenómeno de represión catabólica en estas cepas.

VI.IV.I Caracterización de la cepa silvestre E2348/69 cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.

La cepa silvestre E2348/69 fue cultivada en medio mínimo M9 suplementado con cada uno de los dos azúcares: glucosa o sacarosa (ver Material y Métodos). En el cultivo suplementado con glucosa, la cepa E2348/69 creció más lentamente que en el cultivo suplementado con sacarosa. Como se puede ver en la figura 17A, la cepa silvestre dejó de crecer a las 5.5 hrs en el cultivo con glucosa iniciando la fase estacionaria, mientras que en el cultivo con sacarosa la fase estacionaria se alcanzó a las 5 hrs. La velocidad específica de crecimiento en glucosa fue de 0.6 h^{-1} , un 16% menor en comparación a la velocidad específica de crecimiento de 0.72 h^{-1} observada en un medio suplementado con sacarosa (Tabla IV).



A



B

Figura 17. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa silvestre E2348/69 en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa. La concentración inicial de cada azúcar fue de 2 g/l. A. Curvas de crecimiento en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa, B. Consumo de azúcares: glucosa (■) y sacarosa (◆).

Los resultados del consumo de azúcares obtenidos mediante HPLC mostraron que la velocidad específica de consumo de glucosa fue menor que la velocidad específica de consumo de sacarosa (Tabla IV). La sacarosa fue consumida por completo una hora antes que la glucosa en los cultivos realizados con cada uno de los azúcares (figura 17B). En cuanto a la producción de biomasa, se produjeron 0.23g de biomasa por g de glucosa consumida, y esto fue un 9% mayor a la obtenida con sacarosa que fue de 0.21g de biomasa por g de sacarosa consumida (Tabla IV).

VI.IV.II Caracterización de la cepa silvestre E2348/69 cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.

Los cultivos conteniendo ambos azúcares se llevaron a cabo para evaluar si existe un efecto de represión catabólica en la cepa silvestre E2348/69.

Como se puede observar en la figura 18B los azúcares fueron consumidos secuencialmente. El punto en el cual la primera fuente de carbono se termina, coincide con el decremento temporal en la velocidad de crecimiento. Estos datos son indicativos de un crecimiento diauxico en este cultivo (figura 18A).

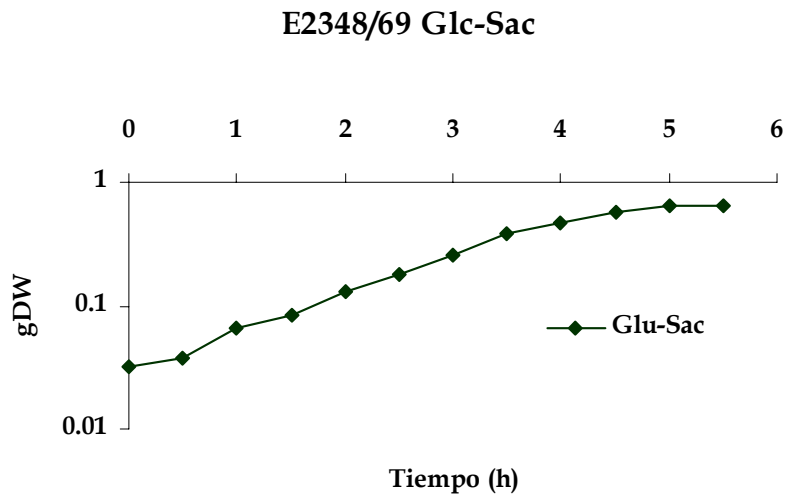
Al medir el consumo de azúcares bajo estas condiciones, los resultados obtenidos muestran que es la glucosa la que presenta un efecto de represión catabólica sobre el consumo de sacarosa. Ésta cepa comienza a consumir la glucosa como principal fuente de carbono y poco antes de que ésta sea consumida por completo (a las 3.5 hrs de cultivo), inicia entonces con el consumo de la segunda fuente de carbono disponible que en este caso es la sacarosa (figura 18B).

Los parámetros cinéticos, determinados durante el periodo de consumo de glucosa en un medio con ambos azúcares, variaron con respecto a los valores obtenidos para el cultivo que sólo contaba con este azúcar.

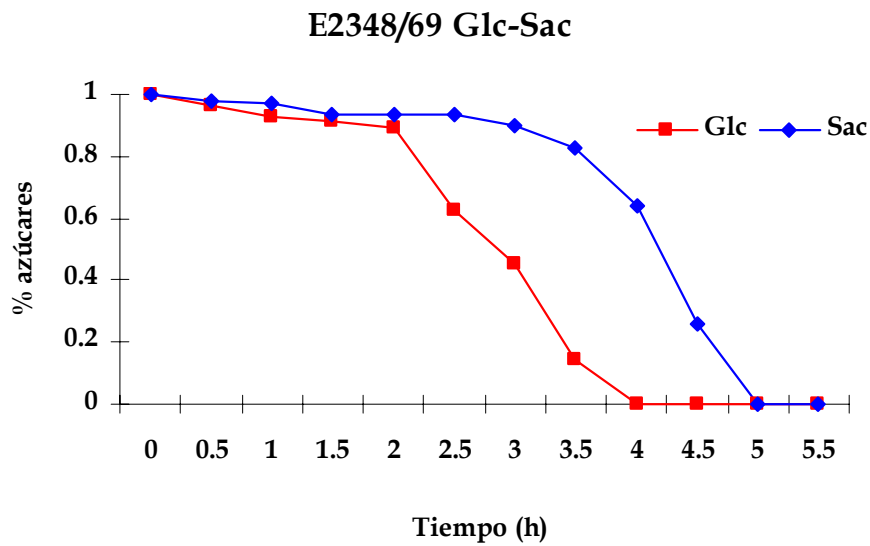
La glucosa en este caso fue consumida por completo a las 4 hrs de iniciado el cultivo, 1.5 hrs antes que cuando sólo había glucosa en el medio, mientras que la sacarosa fue consumida hasta las 5 hrs, 0.5 h después del observado en un medio sólo con este azúcar (figura 18B).

En este cultivo, la velocidad específica de crecimiento en glucosa fue de 0.74 h^{-1} , un 40 % mayor a la velocidad específica de crecimiento observada en sacarosa que fue de 0.44 h^{-1} ; así también, la velocidad específica del consumo de glucosa fue un 44% mayor que la velocidad específica del consumo de sacarosa (Tabla IV). Esto corresponde con la teoría que afirma que la fuente de carbono que ejerce un efecto de represión catabólica sobre otra causa una velocidad mayor tanto en el crecimiento como en el consumo de sustrato que una segunda fuente de carbono disponible.

En cuanto a la producción de biomasa, se produjeron 0.3g de biomasa por g de glucosa consumida y 0.29g de biomasa por g de sacarosa consumida.



A



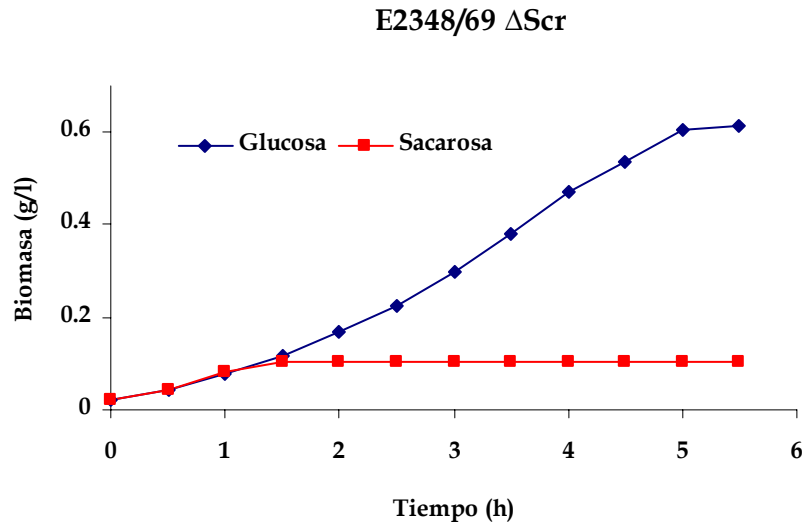
B

Figura 18. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa silvestre E2348/69 en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa. La concentración total de azúcar fue de 2 g/l **A.** Curva de crecimiento en base log, **B.** Consumo de azúcares: glucosa (■) y sacarosa (◆).

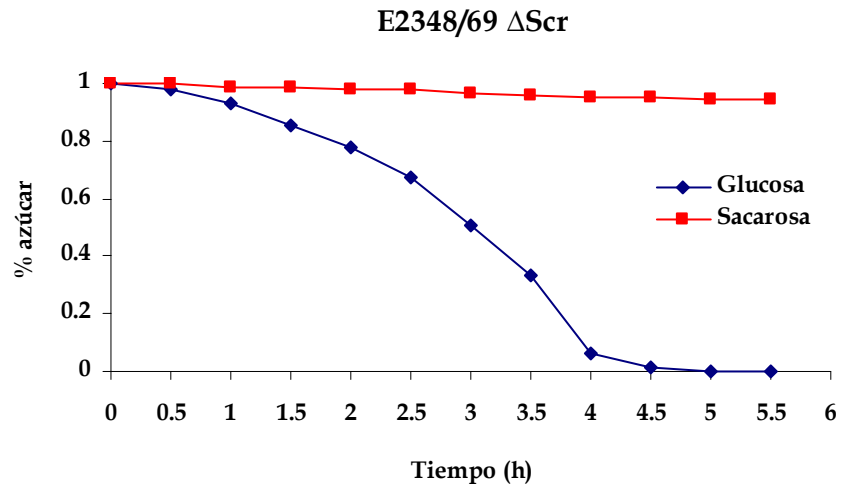
VI.IV.III Caracterización de la cepa E2348/69 Δ *scr* cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.

De los parámetros cinéticos obtenidos en cultivos con un solo azúcar, se pudo observar que la velocidad específica de crecimiento de la cepa mutante E2348/69 Δ *scr* en medio mínimo suplementado con glucosa fue de 0.56 h^{-1} , lo que resultó menor en un 7% al de la cepa silvestre. En la figura 19A se observa que esta cepa ha dejado de crecer a las 5 hrs de cultivo teniendo a la glucosa como sustrato. Al cultivar esta cepa en un medio mínimo suplementado con sacarosa no se observó crecimiento.

Esto nos muestra que la cepa silvestre E2348/69 utiliza únicamente las proteínas codificadas por el regulón *scr* para crecer en sacarosa y no depende de otros sistemas de transporte y metabolismo de este azúcar.



A



B

Figura 19. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69 Δ Scr en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa. La concentración inicial de cada azúcar fue de 2 g/l **A.** Curvas de crecimiento en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa, **B.** Consumo de azúcares en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa: glucosa (■) y sacarosa (◆).

En cuanto al consumo de sustrato, la glucosa fue consumida por completo a las 5 hrs de cultivo (figura 19B), la velocidad específica de consumo de este azúcar fue similar al observado en la cepa silvestre (Tabla IV). Por lo tanto, en la cepa E2348/69 Δ scr no se vio afectada la velocidad específica de consumo de glucosa con respecto a la cepa silvestre; sin embargo, la biomasa producida por g de glucosa consumida fue de 0.18g, poco menos que la biomasa producida por la cepa silvestre (0.23g) teniendo a este azúcar como sustrato.

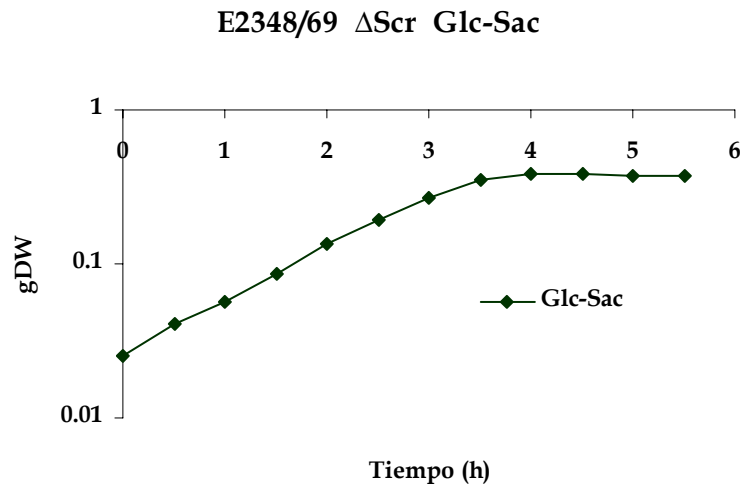
VI.IV.IV Caracterización de la cepa E2348/69 Δ scr cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.

Cuando la cepa E2348/69 Δ scr se cultivó en un medio suplementado con ambos azúcares, se observó una velocidad específica de crecimiento de 0.6 h⁻¹, la cual se debió exclusivamente al consumo de glucosa (figura 20A), y esto fue 11% más rápido que cuando se tuvo a la glucosa como única fuente de carbono.

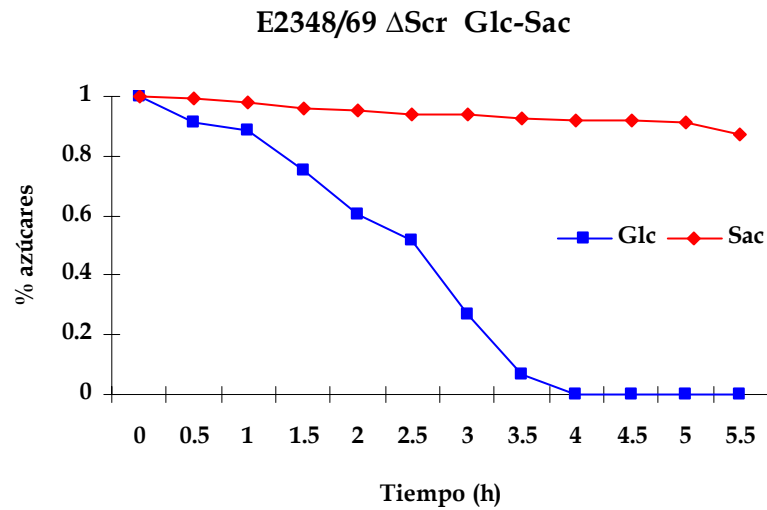
En comparación con la cepa silvestre, la velocidad específica de crecimiento de la cepa mutante E2348/69 Δ scr fue un 19% menor al ser cultivada en un medio con ambos azúcares, pero la misma que se observó cuando la cepa silvestre creció en un medio suplementado sólo con glucosa.

En la mutante E2348/69 Δ scr, la velocidad específica de consumo de sustrato cuando crece en un medio con ambos azúcares fue la misma a la observada cuando se cultivó en un medio suplementado sólo con glucosa (Tabla IV). La glucosa fue consumida por completo a las 4 hrs (figura 20B) y no hubo consumo de sacarosa, por lo que la glucosa fue el único sustrato capaz de ser utilizado por la cepa E2348/69 Δ scr.

En cuanto al rendimiento biomasa/glucosa, se produjo 0.22g de biomasa por g de glucosa consumida, y esto fue 18% más al observado cuando la glucosa es el único sustrato (0.18g) y 26% menos al observado en la cepa silvestre cuando crece en un medio con ambos azúcares (0.3g) (Tabla IV).



A



B

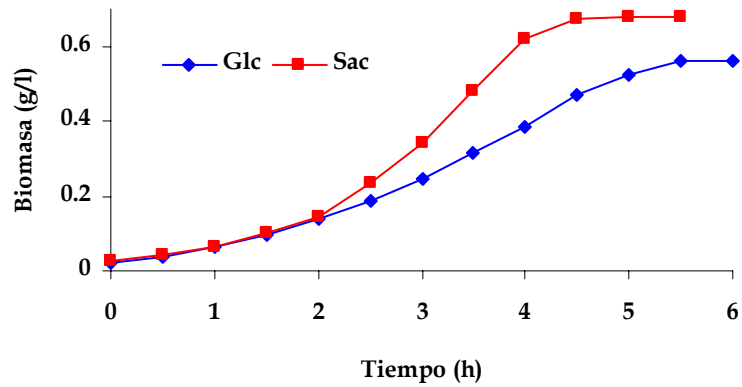
Figura 20. Curva de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69 Δ scr en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa. La concentración total de azúcar fue de 2 g/l A. Curva de crecimiento, B. Consumo de azúcares: glucosa (■) y sacarosa (◆).

VI.IV.V Caracterización de la cepa E2348/69 Δ scrR cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa.

En cultivos con un solo azúcar, la velocidad específica de crecimiento de la cepa mutante E2348/69 Δ scrR en medio mínimo suplementado con glucosa fue de 0.58 h⁻¹, 20% menor a la velocidad específica de crecimiento observada con sacarosa que fue de 0.69 h⁻¹. En la figura 21A se observa que ésta cepa ha dejado de crecer a las 4.5 hrs de cultivo al tener a la sacarosa como sustrato, mientras que en glucosa deja de crecer hasta las 5.5 hrs, una hora después que con sacarosa.

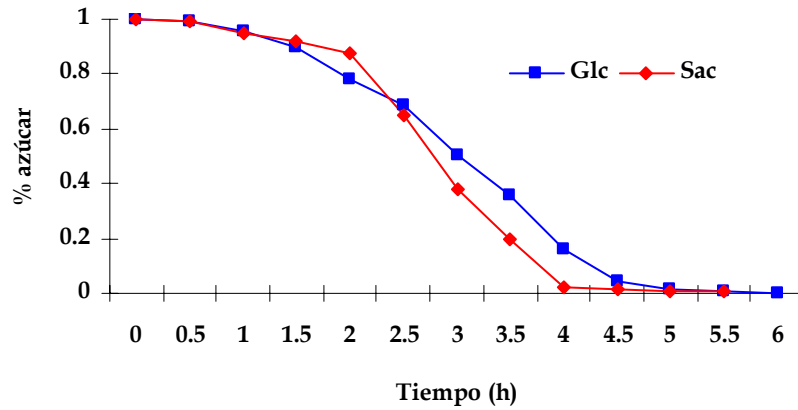
En la cepa mutante E2348/69 Δ scrR, la velocidad específica de crecimiento en glucosa como única fuente de carbono fue similar a la observada en la cepa silvestre (0.6h⁻¹) y la cepa mutante E2348/69 Δ scr (Tabla IV); mientras que la velocidad específica de crecimiento en un medio con sacarosa como única fuente de carbono fue similar a la observada en la cepa silvestre. Tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante E2348/69 Δ scrR, la velocidad específica de crecimiento fue menor en glucosa con respecto a la sacarosa (Tabla IV).

E2348/69 $\Delta scrR$



A

E2348/69 $\Delta scrR$



B

Figura 21. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa E2348/69 $\Delta scrR$ en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa. La concentración inicial de cada azúcar fue de 2 g/l. **A.** Curva de crecimiento en medio mínimo suplementado con glucosa o sacarosa, **B.** Consumo de azúcares: glucosa (■) y sacarosa (◆).

En cuanto al consumo de sustrato, la velocidad específica de consumo de glucosa fue 27% menor a la velocidad específica de consumo de sacarosa, por lo tanto, la cepa mutante E2348/69 Δ *scrR* consume más rápido a la sacarosa que a la glucosa.

En la figura 21B se observa que el consumo total de glucosa fue a las 5.5 hrs de cultivo, mientras que la sacarosa fue consumida por completo a las 4.5 hrs.

En comparación con la cepa silvestre, la velocidad específica del consumo de glucosa y la velocidad específica del consumo de sacarosa, en cultivos realizados con cada uno de los azúcares, no se vieron afectadas en la cepa mutante E2348/69 Δ *scrR* (Tabla IV). En la producción de biomasa teniendo como sustrato a la glucosa con respecto a la sacarosa, se obtuvo 0.18g de biomasa producida por gramos de glucosa consumida y 0.20g de biomasa producida por gramos de sacarosa consumida.

Al comparar con la cepa silvestre, la producción de biomasa en la mutante E2348/69 Δ *scrR* fue 21% menor al tener a la glucosa como sustrato y fue la misma creciendo en un medio con sacarosa (Tabla IV). Por lo tanto, la eliminación del gen represor *scrR*, así como la eliminación del regulón *scr*, afectó sólo la producción de biomasa por g de glucosa consumida.

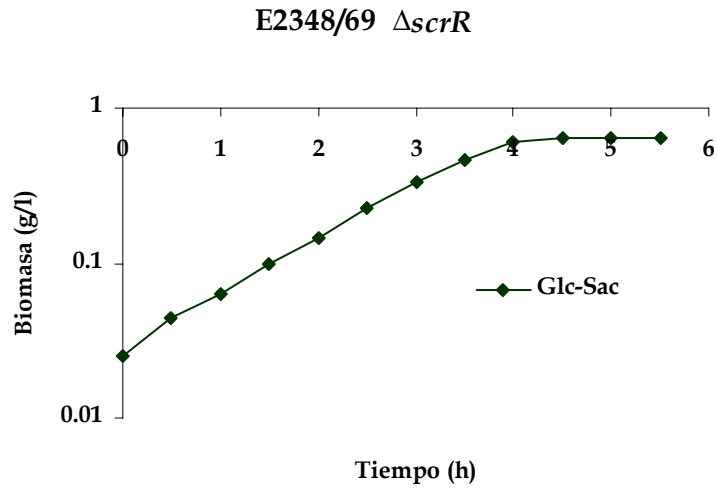
VI.IV.VI Caracterización de la cepa E2348/69 Δ scrR cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa.

Cuando la cepa mutante E2348/69 Δ scrR se hizo crecer en un medio mínimo suplementado con ambos azúcares, se observó que el efecto de represión catabólica que la glucosa ejercía sobre la sacarosa en la cepa silvestre fue eliminado por completo, y ahora ambos azúcares fueron consumidos de manera simultánea (figura 22B). Esto nos muestra que el represor ScrR participa de manera importante en el fenómeno de represión catabólica.

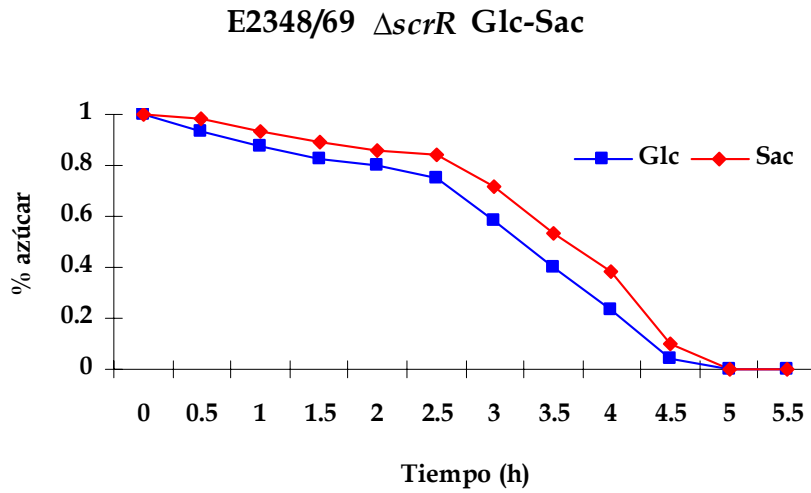
En este cultivo, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.6 h⁻¹, lo que resultó 19% menor con respecto a la cepa silvestre al metabolizar glucosa en un medio con ambos azúcares. Tanto la mutante E2348/69 Δ scrR como la mutante E2348/69 Δ scr presentaron la misma disminución en la velocidad específica de crecimiento en comparación con la cepa silvestre al crecer en un medio suplementado con ambos azúcares.

Se observó una diferencia del 19% en la velocidad específica de consumo de glucosa con respecto a la velocidad específica de consumo de sacarosa en la cepa E2348/69 Δ scrR, sin embargo, ambos azúcares fueron totalmente consumidos a las 5 hrs de cultivo (figura 22B). En comparación con la cepa silvestre, la cepa E2348/69 Δ scrR consumió la glucosa a una velocidad menor en un 36% y la sacarosa a una velocidad menor en un 8% en el cultivo conteniendo ambos azúcares. Aquí se presenta una diferencia interesante, ya que la mutante E2348/69 Δ scr consumió la glucosa a la misma velocidad que la cepa silvestre, y al igual que ésta, resultó ser mayor que la cepa E2348/69 Δ scrR teniendo ambos azúcares como sustrato.

En cuanto a la producción de biomasa, se produjo 0.3g de biomasa por g de glucosa consumida y 0.37g de biomasa por g de sacarosa consumida; la producción de biomasa fue un 19% superior con sacarosa como sustrato. En comparación con las otras dos cepas, la mutante E2348/69 Δ scrR produjo la misma biomasa por g de glucosa consumida en comparación con la cepa silvestre y la cepa E2348/69 Δ scr, y 21% más de biomasa por g de sacarosa consumida con respecto a la cepa silvestre creciendo en un medio con ambos azúcares (Tabla IV).



A



B

Fig. 22 Curva de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa $\Delta scrR$ en medio mínimo suplementado con glucosa y sacarosa. La concentración total de azúcar fue de 2 g/l **A.** Curva de crecimiento, **B.** Consumo de azúcares: glucosa (■) y sacarosa (◆).

Tabla IV. Parámetros cinéticos de las cepas E2348/69, E2348/69 Δ scr y E2348/69 Δ scrR creciendo en un medio mínimo suplementado con una simple y doble mezcla de azúcares como fuentes de carbono.

Azúcar	E2348/69			E2348/69 Δ scr			E2348/69 Δ scrR		
	μ (h ⁻¹)	qs (g/g _{biomasa} * h)	Yx/s (g _{biomasa} /g _s)	μ (h ⁻¹)	qs (g/g _{biomasa} *h)	Yx/s (g _{biomasa} /g _s)	μ (h ⁻¹)	qs (g/g _{biomasa} * h)	Yx/s (g _{biomasa} /g _s)
Glu	0.6	2.7	0.23	0.56	2.9	0.18	0.58	2.7	0.18
Sac	0.72	3.5	0.21	0.0	0.0	0.0	0.69	3.72	0.20
Glu-Sac	0.74 _{glu} 0.44 _{sac}	3.2 _{glu} 1.8 _{sac}	0.3 _{glu} 0.29 _{sac}	0.6 _{glu} 0.0 _{sac}	3.0 _{glu} 0.0 _{sac}	0.22 _{glu} 0.0 _{sac}	0.6 _{glu}	2.04 _{glu} 1.65 _{sac}	0.3 _{glu} 0.37 _{sac}

Velocidad específica de crecimiento (μ), Velocidad específica del consumo de azúcares (qs), Rendimiento biomasa /sustrato (Yx/s).

VII DISCUSIÓN

Aunque el sistema PTS transporta numerosos azúcares en *E. coli*, la glucosa es la fuente de carbono preferida, y la inducción por glucosa de los componentes generales de PTS con *ptsG* se puede considerar como un indicador de que, en *E. coli*, el PTS está involucrado principalmente como un regulón de glucosa. Sin embargo, en los cultivos realizados con cada uno de los azúcares, se observó que la cepa silvestre E2348/69 creció más rápidamente en un medio mínimo al tener como sustrato a la sacarosa, y presentó una velocidad específica de crecimiento y una velocidad en el consumo de sustrato mayor que cuando se tuvo a la glucosa como sustrato. La diferencia en la producción de biomasa por g de glucosa (mayor en un 8%) que la obtenida con sacarosa se pudo deber a que una pequeña porción de la sacarosa se hidrolizara por efecto del calor durante el cultivo antes de ser consumida por la célula. De lo anterior resultan interesantes las características de cultivo teniendo a la sacarosa como sustrato ya que, generalmente el carbohidrato que provocará el efecto de represión catabólica en una mezcla de azúcares, es el que causa una velocidad específica de crecimiento y una velocidad de consumo mayor al resto de las fuentes de carbono.

En el cultivo realizado con la mezcla de azúcares se observó que la glucosa fue la fuente preferencial de carbono causando una represión parcial sobre el consumo de sacarosa. Como consecuencia, la velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica en el consumo de sustrato fueron mayores al consumir la glucosa que al consumir la sacarosa. En cuanto a la producción de biomasa por g de sustrato se obtuvo la misma tanto para la glucosa como para la sacarosa, pero mayor que la producida en los cultivos realizados con cada uno de los azúcares (23% más con glucosa y 27% más con sacarosa).

Lo anterior demuestra que en la cepa E2348/69, los valores obtenidos al crecer con un solo azúcar sugieren que la sacarosa sería la fuente de carbono preferida, pero sigue siendo la glucosa la fuente de carbono preferente al estar en una mezcla de azúcares.

En el cultivo con ambos azúcares se pudo observar que poco antes de que la glucosa fuera consumida completamente, la bacteria inicia el consumo de sacarosa.

Una razón por la cual se pudo dar un rápido cambio en el consumo de glucosa a sacarosa es que, el transporte de ambos azúcares está mediado por el sistema PTS y además ambos sistemas de transporte (PTS-Glc y PTS-Scr) comparten el dominio EIIA^{Glc}, por lo que una vez consumida la glucosa, parte de la maquinaria de transporte se encuentra ya expresada y lista para el transporte de la sacarosa como segunda fuente de carbono. La enzima IIA^{Glc} aunque participa en el sistema de transporte de ambos azúcares, debe tener cierta preferencia por la permeasa unida a membrana específica para glucosa, mostrando también una ventaja preferencial para éste carbohidrato (figura 23).

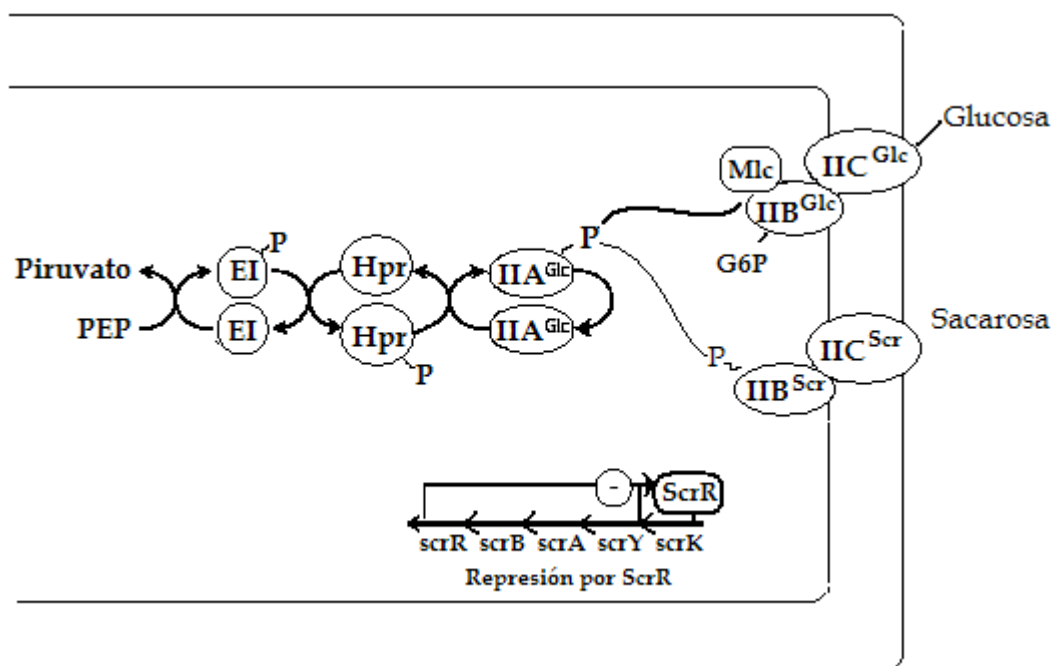


Figura 23. Preferencia de la EIIA^{Glc} por la permeasa IIBC^{Glc} específica para el transporte de glucosa (la línea gruesa indica preferencia).

Es de interés que, sobre los microorganismos capaces de metabolizar y transportar sacarosa, es aparente una variedad de organización y mecanismos de regulación de los genes *scr* (Steinmetz, M. 1993). Para establecer la importancia del regulón *scr* en el metabolismo de sacarosa y para investigar el rol del producto del gen *scrR* como proteína reguladora, la eliminación del regulón *scr* y del gen *scrR* se llevó a cabo en la cepa E2348/69 por interrupción cromosomal de genes.

En el cultivo realizado con glucosa, la cepa E2348/69 Δ *scr* no presentó un cambio relevante en la velocidad de crecimiento (6%) y en la velocidad de consumo del azúcar al comparar con la cepa silvestre. Sin embargo, la biomasa producida por g de glucosa fue 21% menos que la biomasa producida por la cepa silvestre. Esto nos muestra que una mutación en los genes del regulón *scr* no causa efecto en el crecimiento y en el consumo de glucosa, pero sí una disminución en la producción de biomasa.

Al ser cultivada en un medio con sacarosa, no se presentó crecimiento de la mutante E2348/69 Δ *scr*. Con esto se demuestra que el consumo de sacarosa se debe únicamente a los genes localizados en el regulón *scr*, ya que la inactivación de este regulón trajo como consecuencia una cepa incapaz de utilizar este azúcar como sustrato. Éste resultado indica además que ésta cepa no posee los genes del regulón alternativo para el consumo de sacarosa no dependiente de PTS, (por una permeasa simporte-cación) identificado en otras cepas de *E. coli*.

Al cultivar la cepa E2348/69 Δ *scr* con ambos azúcares, se observó crecimiento debido exclusivamente a la presencia de glucosa en el medio y esto causó una disminución en la velocidad específica de crecimiento (19%) con respecto a la observada en la cepa silvestre. La mutante E2348/69 Δ *scr* consumió la glucosa a la misma velocidad de consumo observada en la cepa silvestre pero la biomasa producida por g de glucosa fue menor (26%) en la mutante E2348/69 Δ *scr*. Lo anterior nos muestra que una mutación en los genes para el consumo de sacarosa, afectó la velocidad de crecimiento y la biomasa producida con glucosa pero no la velocidad de consumo de este azúcar.

En este trabajo se hizo una segunda cepa mutante al inactivar el gen *scrR* y a la cual se le llamó E2348/69 Δ *scrR*.

En cultivos realizados con glucosa, la cepa mutante E2348/69 Δ *scrR* al igual que la mutante E2348/69 Δ *scr*, no presentó diferencias significativas en la velocidad de crecimiento y en la velocidad de consumo de éste azúcar con respecto a la cepa silvestre, pero al igual que la mutante E2348/69 Δ *scr*, se presentó una disminución en la biomasa producida (21% menos) por g de glucosa consumida.

En cultivos realizados con sacarosa, la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de consumo del azúcar fueron similares a las observadas en la cepa silvestre y por lo tanto mayores a las observadas en los cultivos realizados con glucosa; es decir, al igual que la cepa silvestre, la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de consumo de sacarosa fueron mayores al tener a la sacarosa como sustrato. La biomasa producida por g de sacarosa consumida fue similar a la obtenida cuando se creció en glucosa y la misma que la obtenida por la cepa silvestre al crecer en sacarosa. Con lo anterior se puede decir que la inactivación del gen *scrR* no afectó significativamente los cultivos realizados con cada uno de los azúcares.

Cuando la cepa mutante E2348/69 Δ *scrR* se cultivo en un medio suplementado con ambos azúcares, se observó que el efecto de represión que ejercía la glucosa sobre la sacarosa fue eliminado, y ambos azúcares fueron consumidos simultáneamente, causando una disminución en la velocidad de crecimiento con glucosa y un aumento en la velocidad de crecimiento con sacarosa (fue la misma para ambos azúcares), en comparación con la cepa silvestre. Así también se observó una disminución importante en la velocidad de consumo de glucosa (36%), pero al igual que la cepa silvestre, sigue siendo mayor para la glucosa con respecto a la sacarosa.

Esta disminución en la velocidad de crecimiento y en la velocidad de consumo de glucosa puede deberse a que, al no presentarse el fenómeno de represión catabólica en la mutante E2348/69 Δ *scrR*, el tiempo en el que consumía un azúcar ahora lo utiliza para consumir ambos, y esto trae como consecuencia una disminución en la velocidad de crecimiento y en la velocidad de consumo de la fuente de carbono que en la cepa silvestre resultaba preferencial y que ahora no existe. Estos resultados indican que el gen *scrR* juega un papel importante mediando la represión de glucosa, lo cual nos permite proponer que este fenómeno depende principalmente de la regulación específica sobre el regulón *scr*.

Sin el gen *scrR*, el regulón *scr* no se encuentra reprimido y por lo tanto puede codificar libremente para las proteínas que permitirán el consumo de sacarosa sin necesidad de un inductor. Esto va a provocar que aumente el nivel basal de la permeasa de sacarosa, compitiendo de manera importante por la $EIIA^{Glc}$ con la permeasa específica de glucosa permitiendo que ambos azúcares sean consumidos de manera simultánea. Además debemos considerar que existen otros factores como la variación de cAMP, que junto con CRP actúa como activador de la transcripción sobre el regulón *scr* (Figura 24).

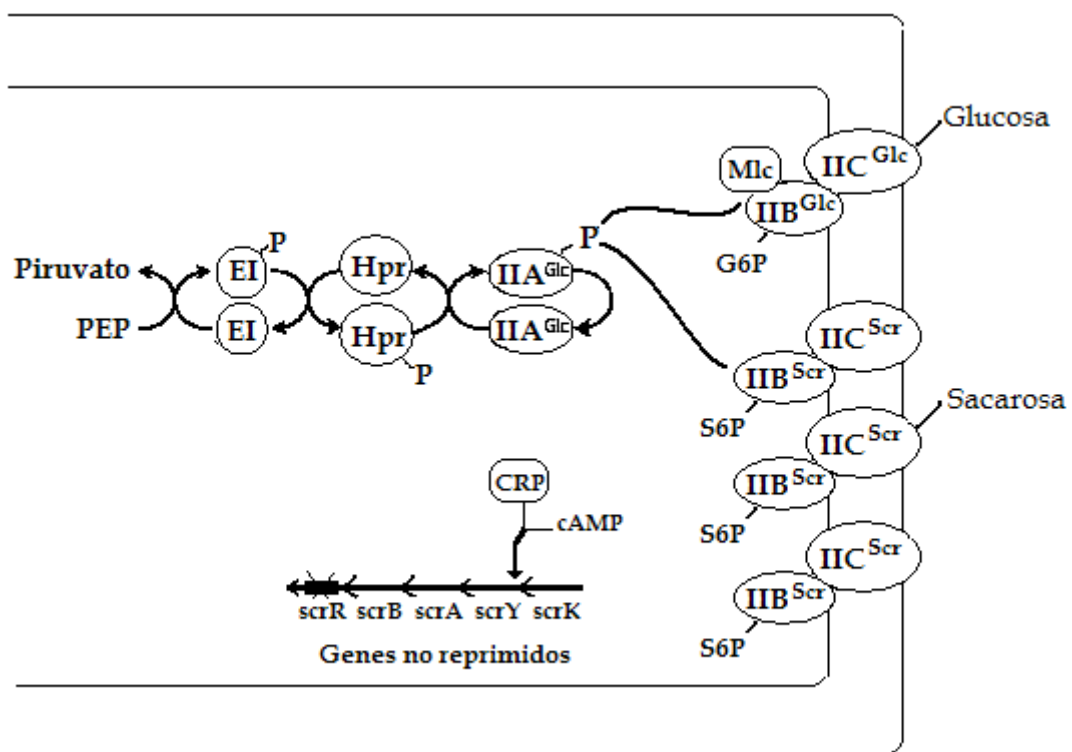


Figura 24. Consumo simultáneo de glucosa y sacarosa.

Modelo de represión catabólica

La proteína IIA^{Glc} tiene un papel central en la represión catabólica de carbono. Cuando la glucosa está presente en el medio ésta proteína se encuentra no fosforilada y en ese estado se une a varias permeasas no PTS, inhibiendo la toma de azúcares no PTS. Esta forma de IIA^{Glc} también se une a la enzima glicerol cinasa (GK) inhibiendo su actividad. En adición IIB^{Glc} no fosforilada se une a la proteína represora Mlc, liberando su represión de genes como *ptsHI* y *ptsG*. Cuando la glucosa está ausente del medio de cultivo IIA^{Glc} y IIB^{Glc} se mantienen en su estado fosforilado. En esta condición, $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$ se une a la enzima adenilato ciclasa (AC) activando su capacidad biosintética de cAMP. Por lo tanto las concentraciones de cAMP aumentan en la célula, uniéndose a la proteína receptora de cAMP (CRP) y causando la inducción de genes catabólicos reprimidos. La proteína $\text{IIB}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$ pierde su capacidad de unirse a Mlc así que la proteína se une a su secuencia operador blanco causando la represión de genes involucrados en la toma de glucosa.

Por su parte, los genes que codifican para el consumo de sacarosa se encuentran reprimidos por la proteína ScrR cuando la sacarosa está ausente en el medio. Esta proteína es un represor específico que actúa sobre el regulón *scr*. Cuando existe sacarosa en el medio, se produce el inductor molecular D-fructosa que actúa sobre la proteína ScrR, eliminando la regulación negativa que ésta ejerce sobre el regulón *scr* permitiendo su transcripción. Adicionalmente los genes *scrYAB*, de los cuales se obtiene como producto final la glucosa-6-P y la D-fructosa, están sujetos a la inducción transcripcional por el complejo cAMP-CRP, por ello es necesario que para que se de la inducción por este complejo, los genes sean liberados primero de la represión ejercida por la proteína ScrR (Figura 25).

La sacarosa utiliza para su transporte el dominio IIA^{Glc} por lo que, al igual que con glucosa, altos niveles de sacarosa disminuyen la cantidad de $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$ y como consecuencia los niveles de cAMP. Para que el complejo cAMP-CRP se pueda formar, debe haber cAMP en el interior de la célula, pero una alta concentración intracelular de cAMP es causada por un alto nivel de fosforilación de IIA^{Glc} ($\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$), por lo que es posible que no sea necesario tener altos niveles de cAMP para formar el complejo con CRP e inducir la transcripción.

Cuando ambos azúcares se encuentran presentes en el medio de cultivo, la enzima IIA^{Glc} difícilmente se encontrará en su forma fosforilada, ya que transfiere el grupo fosfato a la permeasa tanto para el transporte de glucosa como para el transporte de sacarosa. La célula inicia el consumo de glucosa y aunque la sacarosa también se encuentre en el medio, los genes para su consumo se encuentran reprimidos. Por lo tanto la represión que ejerce la glucosa sobre el consumo de sacarosa depende en parte por la afinidad de la enzima IIA^{Glc} por la permeasa IIBC^{Glc} de glucosa y en consecuencia de la represión que la proteína ScrR ejerce sobre los genes del regulón *scr* al no ser inducida.

La relevancia del complejo cAMP-CRP durante el crecimiento diauxico en glucosa y sacarosa puede ser importante en una aceleración de la expresión del regulón *scr* después del consumo de glucosa y una minimización de la fase lag entre la utilización de glucosa y sacarosa.

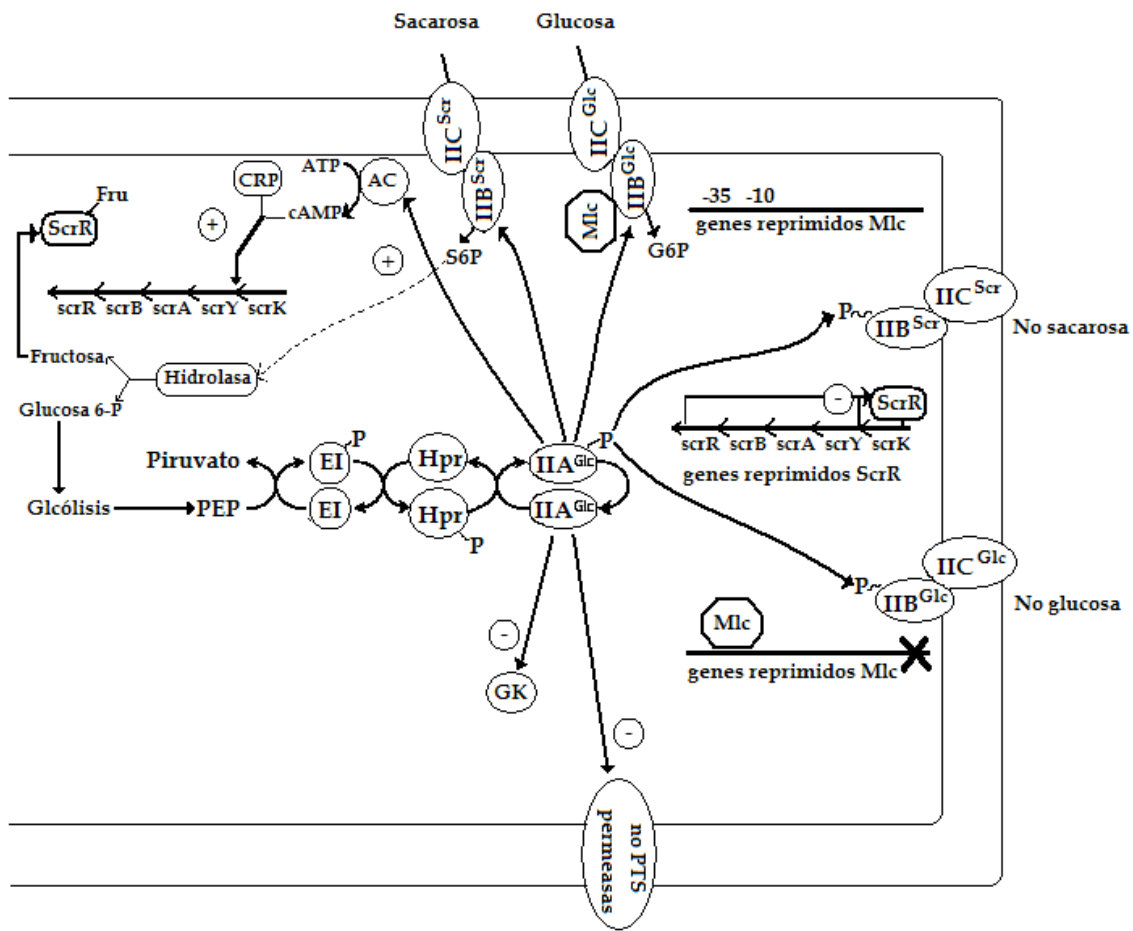


Figura 25. Modelo de represión catabólica de carbono en el consumo de glucosa y sacarosa.

VIII CONCLUSIONES

- En el cultivo suplementado con glucosa, la cepa E2348/69 creció menos rápido que en el cultivo suplementado con sacarosa. La velocidad específica de crecimiento en glucosa fue de 0.6 h^{-1} mientras que con sacarosa fue de 0.72 h^{-1} . Así también la velocidad específica de consumo de glucosa fue 23% menor a la velocidad específica de consumo de sacarosa.
- Cuando la cepa E2348/69 crece en un medio suplementado con ambos azúcares, existe un efecto de represión catabólica de glucosa sobre el consumo de sacarosa. Al terminar de consumir la glucosa, inicia el consumo de sacarosa de manera casi inmediata por la expresión de una parte de la maquinaria para su transporte (EIIA^{Glc}).
- Si la cepa E2348/69 pierde el regulón *scr* (Δscr), entonces pierde su capacidad de crecer en un medio mínimo suplementado con sacarosa, pero sí es capaz de crecer en un medio suplementado con glucosa, por lo que el consumo de sacarosa en la cepa E2348/69 se debe exclusivamente a la presencia del regulón *scr*.
- La mutante E2348/69 Δscr en cultivo suplementado únicamente con glucosa no mostró cambios significativos teniendo a este azúcar como sustrato al compararla con la cepa silvestre.
- Cuando la cepa E2348/69 Δscr crece en un medio suplementado con ambos azúcares, el crecimiento se debió exclusivamente al consumo de glucosa, reflejando una disminución (19%) en la velocidad específica de crecimiento.
- Cuando la cepa E2348/69 pierde el gene represor *scrR* ($\Delta scrR$), no presentó cambios significativos en los cultivos realizados con glucosa y en los cultivos realizados con sacarosa al compararla con la cepa silvestre.
- En la cepa mutante E2348/69 $\Delta scrR$ se pierde la represión específica de la glucosa sobre el regulón *scr* al crecer en un medio suplementado con ambos azúcares, demostrando que no existen otras proteínas o represores que intervengan en su regulación.

IX PERSPECTIVAS

- Al entender la regulación del regulón *scr* sobre el consumo de sacarosa se pueden diseñar estrategias para la clonación de estos genes en una cepa de *E. coli* incapaz de metabolizar este azúcar.
- Se puede valorar la capacidad de consumir sacarosa con las propiedades patógenas de la bacteria.
- Estudiar la transcripción de los genes del regulón *scr* al no presentar el represor ScrR.
- Estudiar la transcripción de los genes del regulón *scr* bajo diferentes concentraciones de cAMP para evaluar el papel de este metabolito en la inducción de la transcripción al formar su complejo con CRP.
- Determinar la afinidad de la enzima IIA^{Glc} por la permeasa específica de glucosa y por la permeasa específica de sacarosa.

XI ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
<i>amp</i>	Gen de resistencia a ampicilina
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosintrifosfato
cAMP	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
Cb	Carbamicilina
CCR	Represión catabólica de carbono
Cm	Cloramfenicol
CRP	Proteína receptora de cAMP
D.O.	Densidad Óptica
EPEC	<i>Esherichia coli</i> enteropatógena
g	Gramos
GK	Glucocinasa
Glc	Glucosa
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
L	Litro
LB	Luria Benturi
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometros
P	Fosfato
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenol piruvato

pmol	Picomol
PTS	Sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
scr	Regulón específico de sacarosa
Sac	Sacarosa
TE	Tris-EDTA
V	Voltios
x g	Gravedades
μg	Microgramo
μl	Microlitros

X BIBLIOGRAFÍA

- **Betenbrock Katja, Fisher Sophia, Kremling Andreas, Jahreis Knut, Sauter Thomas, and Gilles Dieter Ernst (2005).** A Quantitative Approach to Catabolite Repression in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry. 281: 2578-2584.
- **Bogs Jochen and Geider Klaus (2000).** Molecular Analysis of Sucrose Metabolism of *Erwinia amylovora* and Influence on Bacterial Virulence. Journal of Bacteriology. 182:5351-5358.
- **Brückner Reinhold, Titgemeyer Fritz (2002).** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. FEMS Microbiology letters. 209:141-148.
- **Datsenko A. Kirill and Wanner L. Barry (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS. 97: 6640-6645.
- **De Reuse H. and Danchin A. (1991).** Positive Regulation of the *pts* Operon of *Escherichia coli*: Genetic Evidence for a Signal Transduction Mechanism. Journal of Bacteriology. 173: 727-733.
- **Fox K. Donna, Presper A. Kathleen, Adhya Sankar, Roseman Saul, and Garges Susan (1992).** Evidence for two promoters upstream of the *pts* operon: Regulation by the cAMP receptor protein regulatory complex. Biochemistry. 89:7056-7059.
- **Hiratsuka Koichi, Wang Bing, Sato Yutaka, and Kuramitsu Howard (1998).** Regulation of Sucrose-6-Phosphate Hydrolase Activity in *Streptococcus mutans*: Characterization of the *scrR* Gene. Infection and Immunity. 66:3736-3743.
- **Jahreis Knut, Bentler Lars, Bockmann Jürgen, Hans Stephan, Meyer Astrid, Siepelmeyer Jörg, and Lengeler W. Joseph (2002).** Adaptation of Sucrose Metabolism in the *Escherichia coli* Wild-Type Strain EC3132. Journal of Bacteriology. 184:5307-5316.

- **Jahreis K. and Lengeler W. J. (1993).** Molecular analysis of two ScrR repressors and of a ScrR-FruR hybrid repressor for sucrose and D-fructose specific regulons from enteric bacteria. *Molecular Microbiology*. 9: 195-209.
- **Kotrba Pavel, Inui Masayuki and Yukawa Hideaki (2001).** Bacterial Phosphotransferase System (PTS) in Carbohydrate Uptake and Control of Carbon Metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92:502-517.
- **Lengeler W. Joseph, Mayer J. Robert, and Schmid Kurt (1982).** Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Enzyme III and Plasmid-Encoded Sucrose Transport in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 151:468-471.
- **Luesink J. Evert, Marugg D. Joey, Kuipers P. Oscar and de Vos M. Willem (1999).** Characterization of the Divergent *sacBK* y *sacAR* Operons, Involved in Sucrose Utilization by *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 181:1924-1926.
- **Michael T. Madigan, Martinko M. Jhon, Parker Jack (1999).** Brock, Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall Iberia. Madrid.
- **Montalvo Hernández V., Valle F., Bolivar F., Gosset G. (2001).** Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Applied Microbiology Bacteriology*. 57: 186-191.
- **Park Young-Ha, Lee R. Byeong, Seok Yeong-Jae, and Peterkofsky Alan (2006).** *In Vitro* Reconstitution of Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 6448-6454.
- **Plumbridge, Jacqueline (2002).** Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Microbiology*. 5:187-193.
- **Postma W. P., Lengeler W. J. and Jacobson R. G. (1989).** Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System. *Microbiological Reviews*. 206: 1149-1167.
- **Reid J. Sharon, Abratt R. Valerie (2005).** Sucrose utilization in bacteria: genetic organisation and regulation. *Applied Microbiol Biotechnol*. 67: 312-321.

- **Reid J. Sharon, Rafudeen Suhail M. and Leat G. Neil (1999).** The genes controlling sucrose utilization in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 constitute an operon. *Microbiology*. 145:1461-1472.
- **Saier H. Milton, Jr. (1989).** Protein Phosphorylation and Allosteric Control of Inducer Exclusion and Catabolite Repression by the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. *Microbiological Reviews*. 53: 109-120.
- **Saier H. Milton, Jr. (1997).** Multiple Mechanisms Controlling Carbon Metabolism in Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 58:170-174.
- **Saier H. Milton Jr. and Ramseier M. Tom (1996).** The Catabolite Repressor/Activator (Cra) Protein Enteric Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 178:3411-3417.
- **Sauter T., Gilles D. E. (2004).** Modeling and experimental validation of the signal transduction via de *Escherichia coli* sucrose phospho transferase system. *Journal of Biotechnology*. 110: 181-199.
- **Schmid Kurt, Schupfner Margit, and Schmitt Rüdiger (1982).** Plasmid-Mediated Uptake and Metabolism of Sucrose by *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*. 151:68-76.
- **Souza Valeria, Rocha Martha, Sander Luisa y Eguiarte E. Luis.** Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM.
- **Trindade I. Marla, Abratt R. Valerie and Reid J. Sharon (2003).** Induction of Sucrose Utilization Genes from *Bifidobacterium lactis* by Sucrose and Raffinose. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:24-32.
- **Tsunekawa Hiroshi, Azuma Syoji, Okabe Mitsuyasu, Okamoto Rokuro and Aiba Shuichi (1992).** Acquisition of a Sucrose Utilization System in *Escherichia coli* K-12 Derivatives and Its Application to Industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2081-2088.

- **Wang Bing, Kuramitsu K. Howard (2003).** Control of Enzyme II^{scr} and Sucrose-6-Phosphate Hydrolase Activities in *Streptococcus mutans* by Transcriptional Repressor ScrR Binding to the *cis*-Active Determinants of the *scr* Regulon. Journal of Bacteriology. 185:5791-5799.
- **Wang J., Gilles D. E., Lengeler W. J., Jahreis K (2001).** Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and non-PTS-dependent glycerol transport system in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification. Journal of Biotechnology. 92: 133-158.