



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Microbiología Molecular

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE GluP EN LA UTILIZACIÓN DE GLUCOSA Y SU
REGULACIÓN POR EL SISTEMA CbrA/CbrB-Crc en *Azotobacter vinelandii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. ARMANDO HERNANDEZ ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. CINTHIA E. NÚÑEZ LÓPEZ IBt

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR VÍCTOR H. BUSTAMANTE S. IBt
DRA. VICTORIA PANDO ROBLES INSP

CUERNAVACA, MORELOS. FEBRERO, 2014.



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín, bajo la dirección de la Dra. Cinthia E. Núñez López.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Víctor H. Bustamante Santillán

Dra. Victoria Pando Robles

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Secretario Dra. Clarita Olvera Carranza

Vocal Dr. Otto Geiger

Vocal Dra. Isabel Gómez Gómez

Vocal Dr. Carlos Peña Malacara.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí financiamiento de una beca de Maestría otorgada por el CONACyT (No. de registro: 253693); este trabajo contó con el apoyo de los proyectos PAPIIT-UNAM (IN207911) y CONACyT (CB-101643).

***La batalla de la vida no siempre la gana
el hombre más fuerte, o el más ligero,
porque, tarde o temprano, el hombre que gana
es el que cree poder hacerlo.***

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cinthia Núñez: Le agradezco infinitamente la guía, recomendaciones y llamadas de atención, sé que no ha sido fácil para usted pero también sé que me ha tenido mucha fe y paciencia. Gracias por ese incansable esfuerzo por ayudarme a crecer en lo profesional y en lo personal.

A la Dra. Lupita Espin: Por aceptarme en su laboratorio y compartir su experiencia.

Al Dr. Daniel Segura: Por sus sugerencias y preguntas que me ayudaron a observar mi trabajo y mi rumbo desde otro punto de vista.

A los miembros del jurado: Gracias por tomarse el tiempo leer este trabajo y por sus muy valiosas observaciones.

A la M. en C. Josefina Guzmán y la Biól. Soledad Moreno: Gracias por el apoyo técnico, experiencia y sobre todo, por su amistad.

A la Dra. Tania Castillo Marengo: Gracias por el apoyo técnico en este trabajo.

Rosalva: Gracias por estar siempre al pendiente de nuestras necesidades.

A nuestros laboratoristas: Don Eduardo, José Luis y Doña Francis: Ustedes realizan un gran esfuerzo día con día que nos facilita el desempeño a todos.

DEDICATORIA

Mamá, Papá: Han pasado momentos muy difíciles tratando de sacarnos adelante, a veces de chico uno no lo entiende, pero cuando salí de casa comencé a entender muchas cosas. Gracias por todo lo que sacrificaron para que mis hermanas y yo tuviéramos lo que hemos tenido. Ustedes fueron los primeros en enseñarme a creer en mí y que sí se puede.

América y Alondra: Hermanas, gracias por todo. Sé que no lo demuestro mucho pero de verdad, no saben cuánto las quiero.

Viridiana: Mi amor, te debo muchísimo, has respetado y apoyado mis decisiones, , has hecho hasta lo imposible para estar conmigo en las buenas y en las malas.

Elva y Claudia: Hemos crecido juntos en este laboratorio, mucho de lo que aprendí se lo debo a ustedes, me han tratado como a un hermano y las quiero muchísimo.

Ramsés e Israel: Compartimos momentos muy padres dentro y fuera del Instituto, Sin ustedes el curso de bioquímica hubiera sido increíblemente difícil, con ustedes la muy dura vida del científico fué increíblemente divertida.

July, Leidy, Fanny, Sangita, Liber, Mike, Adán, Pipe, José Luis, Zuemy, Adri y los que me faltan: Me han enseñado mucho y hemos compartido cantidad de momentos dentro y fuera del laboratorio. Se los dije antes y se los digo de nuevo, todos ustedes son como una segunda familia para mí. Los quiero.

Pancho, Meño y Deby: Sé que donde estén siempre se acuerdan de mí y siempre me echan porras, gracias por ser mis amigos de toda la vida.

Flor y Laura: Amigas, desde que fuimos vecinos se preocupan por mí y me han tratado súper, las quiero mucho.

Este esfuerzo está dedicado con mucho cariño a todos ustedes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
1 INTRODUCCIÓN	13
1.1 GENERALIDADES DE <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i> .	13
1.2 FAMILIAS DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA	15
1.3 REPRESIÓN CATABÓLICA POR CARBONO.	16
1.3.1 <i>E. COLI</i> Y EL SISTEMA PTS	17
1.3.2 REPRESION CATABOLICA POR CARBONO EN <i>PSEUDOMONAS SPP.</i>	19
1.3.3 LA PROTEÍNA Crc	20
1.3.4 LOS SRNA CrcZ Y CrcY COMO REGULADORES GLOBALES DE LA REPRESIÓN CATABÓLICA EN <i>PSEUDOMONAS SPP.</i>	22
1.3.5 EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES CbrA/B ACTIVA LA EXPRESIÓN DE CrcZ.	24
2 ANTECEDENTES	25
2.1 CRECIMIENTO DIÁUXICO EN <i>A. VINELANDII</i> .	25
2.2 EN <i>A. VINELANDII</i> LA CINASA HISTIDÍNICA CbrA ES NECESARIA PARA LA ASIMILACIÓN DE GLUCOSA EN EL CRECIMIENTO DIÁUXICO.	26
2.3 EL SISTEMA DE REGULACION CbrA/CbrB-Crc EN <i>A. VINELANDII</i> .	27
2.4 ALGUNOS GENES PARA EL TRANSPORTE Y CATABOLISMO DE GLUCOSA EN <i>A. VINELANDII</i> CONTIENEN SITIOS PROBABLES DE UNIÓN A LA PROTEÍNA Crc.	28
3 MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	32
3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	36
3.3 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PAH-03 (PKS <i>GLUP::SP</i>)	37
3.4 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PKS-SP	38
3.5 CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES <i>GLUP</i> EN LOS FONDOS GENÉTICOS E Y EALGD DE <i>A. VINELANDII</i> .	38

3.6 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pSRK-GLUP	38
3.7 COMPLEMENTACIÓN DE LA CEPA MUTANTE E GLUP.	38
3.8 ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA.	39
3.9 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DE E. COLI.	39
3.10 CONJUGACIÓN TRIPARENTAL DE A. VINELANDII Y E. COLI.	40
3.11 TRANSFORMACIÓN DE E. COLI.	40
3.12 PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE A. VINELANDII.	40
3.13 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE A. VINELANDII.	41
3.14 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE A. VINELANDII CON DNA CROMOSOMAL.	41
3.15 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO PARA A. VINELANDII	42
3.16 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.	42
4 HIPÓTESIS	44
<hr/>	
5 OBJETIVOS	44
<hr/>	
GENERAL	44
PARTICULARES	44
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
<hr/>	
6.1 LA FALTA DE ASIMILACIÓN DE GLUCOSA EN PRESENCIA DE ACETATO EN LA MUTANTE AH1 SE DEBE SOLO A LA MUTACIÓN CBRA::TN5.	45
6.2 EL GEN GLUP DE A. VINELANDII CODIFICA UN POSIBLE TRANSPORTADOR DE GLUCOSA	47
6.3 CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES AH120 (EALGD GLUP:: Sp^R) Y AHL 30 (E GLUP:: Sp^R)	49
6.4 LA PROTEÍNA GLUP ES ESENCIAL PARA LA ASIMILACIÓN DE GLUCOSA EN A. VINELANDII	53
6.5 COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTANTE AHL 30 (E GLUP:: Sp^R)	54
6.6 EFECTO DE LA MUTACIÓN GLUP::Sp^R SOBRE EL CRECIMIENTO EN OTRAS FUENTES DE CARBONO.	56
6.7 LA SOBREENPRESIÓN DE Crc AFECTA NEGATIVAMENTE EL CRECIMIENTO EN GLUCOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO.	58
6.8 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN GLUP.	59
7 CONCLUSIONES	69
<hr/>	
8 PERSPECTIVAS	69
<hr/>	
9 LITERATURA CITADA	70
<hr/>	
ANEXO	74
<hr/>	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. VÍA ENTNER DOUDOROFF EN <i>P. AERUGINOSA</i> ..	154
FIGURA 2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE GLUCOSA EN BACTERIAS	195
FIGURA 3. TRANSPORTE DE GLUCOSA EN <i>E. COLI</i> POR EL SISTEMA PTS.	19
FIGURA 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PROTEÍNA CRC.	232
FIGURA 5. MECANISMO DE ACCIÓN DE CRCZ Y CRCY.	253
FIGURA 6. CRECIMIENTO DE <i>A. VINELANDII</i> EN CULTIVO EN LOTE EN UNA MEZCLA DE ACETATO Y GLUCOSA	25
FIGURA 7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN GLUCOSA Y EN MEDIO DIÁUXICO GLUCOSA-ACETATO .	27
FIGURA 8. MODELO DEL TRANSPORTE Y METABOLISMO DE GLUCOSA PROPUESTO PARA <i>A. VINELANDII</i> .	29
FIGURA 9. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.	46
FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA AHI-R1	47
FIGURA 11. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL LOCUS <i>GLUP</i> DE <i>A. VINELANDII</i> .	48
FIGURA 12. LOCUS <i>GLUP</i> EN <i>A. VINELANDII</i> .	49
FIGURA 13. MAPA DEL PLÁSMIDO PAH-01 Y PERFIL DE RESTRICCIÓN	50
FIGURA 14. MAPA DEL PLÁSMIDO PAH-02 Y PERFIL DE RESTRICCIÓN	51
FIGURA 15. MAPA DEL PLÁSMIDO PKS-SP ^R Y PERFIL DE RESTRICCIÓN.	51
FIGURA 16. MAPA DEL PLÁSMIDO PAH-03 Y PERFIL DE RESTRICCIÓN	52
FIGURA 17. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS MUTANTES AHI20 Y AHI 30.	53
FIGURA 18. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA MUTANTE <i>GLUP</i> EN EL FONDO SILVESTRE Y E Y DE LA MUTANTE ALGD	54
FIGURA 19. MAPA DEL PLÁSMIDO PSRK- <i>GLUP</i> Y PERFIL DE RESTRICCIÓN	55
FIGURA 20. CRECIMIENTO EN MEDIO BURK-GLUCOSA Y BURK SACAROSA DE LAS CEPAS E, AHI30 Y AHI30 /PSRK- <i>GLUP</i> .	56
FIGURA 21. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PARENTAL EALGD Y DE SU DERIVADA <i>GLUP</i> :: SP ^R AHI20.	57
FIGURA 22. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CRC EN EL CRECIMIENTO EN GLUCOSA.	59
FIGURA 23. MAPA DEL PLÁSMIDO PUMATc GUSA T.	60
FIGURA 24. REGIÓN RÍO ARRIBA DEL GEN <i>GLUP</i> A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL GENOMA DE LA CEPA DJ DE <i>A. VINELANDII</i>	62
FIGURA 25. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL PRODUCTO DE PCR DEL FRAGMENTO DE 1.7 KB DE LA REGIÓN REGULADORA DE <i>GLUP</i> DE LA CEPA SILVESTRES E	62
FIGURA 26. PERFIL DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO PAH-04.	63
FIGURA 27. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL PRODUCTO DE PCR DE 1.7 KB DE LA REGIÓN RÍO ARRIBA DEL GEN <i>GLUP</i> .	64

FIGURA 28. PATRÓN DE RESTRICCIÓN DE LAS CANDIDATAS PAH-05.....	64
FIGURA 29. PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN DE 200PB DE LA FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL P <i>GLUP</i> - <i>GUSA</i> USANDO COMO TEMPLADO EL DNA CROMOSOMAL DE LAS TRANSFORMANTES DERIVADAS DE LAS CEPAS E Y <i>CBRA</i>	65
FIGURA 30. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>GLUP</i> Y CINÉTICA DE ACTIVIDAD DE β - GLUCURONIDASA DE LAS CEPAS AHI40 Y AHI50 CRECIDAS EN MEDIO BURK SACAROSA.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 SITIOS PUTATIVOS DE UNIÓN A CRC EN GENES METABOLISMO Y TRANSPORTE DE GLUCOSA EN <i>A. VINELANDII</i>	30
TABLA 2 CEPAS	32
TABLA 3 PLÁSMIDOS	34
TABLA 4 OLIGONUCLEÓTIDOS	35
TABLA 5 CONCENTRACIONES PARA LA REACCIÓN DE PCR.....	36
TABLA 6 CONDICIONES PARA EL TERMOCICLADOR.....	37

ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Cassette - Cassette de unión a ATP - (por sus siglas en inglés)
AC	Adenilato ciclasa
DNA	Deoxyribonucleic Acid - Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)
cAMP	Cyclic Adenosyn Monophosphate - Adenosín Monofosfato cíclico (por sus siglas en inglés)
CCA	Carbon Catabolic Activation - Activación catabólica por carbono (por sus siglas en inglés)
CCC	Carbon Catabolic Control - Control del catabolismo del carbono (por sus siglas en inglés)
CCR	Carbon Catabolic Repression - Represión Catabólica por Carbono Control del catabolismo del carbono
CRP	cAMP Receptor Protein - Proteína receptora de cAMP (por sus siglas en inglés)
ED	Entner-Doudoroff
kb	Kilo base (Mil pares de bases)
M	Molar
MFS	Major Facilitator Superfamily - Superfamilia de Facilitadores Mayores (por sus siglas en inglés)
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mRNA	Messenger RNA - ARN mensajero (por sus siglas en inglés)
pb	Pares de bases
PEP	Phosphoenol Piruvate - Fosfoenol piruvato (por sus siglas en inglés)
pg	pico gramos
PHB	Poli hidroxibutirato
PTS	Phosphotransferase System - Sistema Fosfotransferasa (por sus siglas en inglés)
RNA	Ribonucleic Acid - Ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés)
SD	Shine-Dalgarno
SGLT	Sodium/Glucose Transport - Transporte Sodio/Glucosa (por sus siglas en inglés)
sRNA	Small RNA - ARN pequeño (por sus siglas en inglés)
TCS	Two Component System - Sistema de dos componentes (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una proteobacteria Gram-negativa capaz de producir metabolitos de interés industrial como el alginato y el poliéster poli- β -hidroxibutirato; además fija nitrógeno en aerobiosis. *A. vinelandii* prefiere los ácidos orgánicos a los azúcares como fuente de carbono, de esta manera el acetato ejerce una represión catabólica en la utilización de glucosa. Sin embargo los mecanismos moleculares de esta represión catabólica aún se desconocen. En *Pseudomonas aeruginosa* el sistema de dos componentes CbrA/CbrB regula la utilización de distintas fuentes de carbono al activar la transcripción del RNA pequeño *crcZ*. *CrcZ* antagoniza la actividad de la proteína *Crc* la cual se une directamente a los mRNA de genes para la utilización de las fuentes de carbono no preferidas (p ej. glucosa) evitando su traducción. En trabajos previos se identificó en nuestro laboratorio una mutante *cbrA::Tn5*, la cual está afectada en la utilización de glucosa durante el crecimiento diáuxico glucosa-acetato. El objetivo de este trabajo fué identificar y caracterizar genes para la asimilación de glucosa y que pudieran estar bajo el control del Sistema CbrA/B-Crc/*crcZ* en *A. vinelandii*. Después de un análisis *in silico* identificamos un gen, llamado *gluP*, que codifica para un posible transportador de glucosa. Una mutante *gluP::Sp* fue incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono pero si fue capaz de crecer en acetato o sacarosa. Cuando la mutante se complementó en *trans* con una copia silvestre del gen *gluP*, recuperó la capacidad de crecer en glucosa. Este resultado indica un rol esencial de la proteína *GluP* en la asimilación de glucosa, probablemente como transportador. El gen *gluP* posee sitios probables de unión a la proteína *Crc* (AANAANAA) lo que sugiere una regulación directa por parte de esta proteína. La sobreexpresión en *trans* de *Crc* con el plásmido inducible pSRK-Crc tuvo un efecto negativo en el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono. Además mediante fusiones transcripcionales de la región promotora del gen *gluP* con el gen reportero *gusA* observamos una disminución de aproximadamente 10 veces en los niveles de expresión de *gluP* en el fondo de la mutante *cbrA* comparada con la cepa silvestre E. En conjunto nuestros resultados indican que el Sistema de regulación post-Transcripcional CbrA/B-Crc/*CrcZ* regula la expresión de *GluP*, el transportador de glucosa en *A. vinelandii*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*.

A. vinelandii es una bacteria de tipo Gram-negativa de la familia *Pseudomonadaceae*. Son organismos de células grandes y pleomórficas variando desde formas ovales hasta bacilares de 1.5 a 2.0 μ de diámetro. El volumen de *A. vinelandii* en estado vegetativo puede alcanzar de 5 a 10 veces el volumen de *Escherichia coli* y se ha vinculado a su poliploidía que alcanza hasta 80 copias de su cromosoma (Kennedy *et al.*, 2005).

Estos organismos se reproducen por fisión binaria, su locomoción es por flagelos peritricos y habitan tanto en suelo como en agua (Espín, 2003). Pese a la alta sensibilidad de la nitrogenasa hacia el oxígeno, *A. vinelandii* tiene la capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de aerobiosis (Espín, 2003; Stanier *et al.*, 1996; Sadoff, 1975). Bajo condiciones adversas, *A. vinelandii* inicia un proceso de diferenciación celular para formar quistes resistentes a la desecación (Sadoff, 1975). Es quimioorganótrofa y consume sales inorgánicas, alcoholes y azúcares. Tiene la peculiaridad de preferir los ácidos orgánicos a los azúcares, lo que se ve reflejado en crecimiento diáuxico cuando se cultiva en presencia de estos dos tipos de fuente de carbono, por ejemplo acetato y glucosa (Tauchert *et al.*, 1990).

En cultivo sólido *A. vinelandii* presenta un aspecto mucoide característico debido a la producción de alginato, un polisacárido extracelular. Además produce un polímero intracelular que es un material de reserva de carbono y energía, el poli- β -hidroxibutirato (PHB). Ambos polímeros tienen aplicaciones importantes en la industria alimenticia y cosmética.

En *A. vinelandii* la vía Entner-Doudoroff (ED) es la única vía glucolítica al igual que en las especies de *Pseudomonas*. Esta vía inicia cuando la glucosa es convertida a 6-fosfogluconato, el cual es generado por la oxidación de la glucosa-6-fosfato por medio de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Zwf). Posteriormente, el 6-P-gluconato es convertido a 2-ceto-3-deoxi-P-gluconato por una deshidratasa (EDD) y

finalmente escindido a piruvato y a gliceraldehído 3-P por una KDPG-aldolasa (EDA). Tanto EDD como EDA son las dos enzimas clave de la vía ED (Conway, 1992). En *P. aeruginosa*, así como en *A. vinelandii*, la vía ED y la ruta gluconeogénica constituyen la parte central para el metabolismo de fuentes de carbono (Conway, 1992). Aunque se han realizado estudios en torno al metabolismo de glucosa en *A. vinelandii*, se desconoce el transportador de glucosa en esta bacteria (Figura 1).

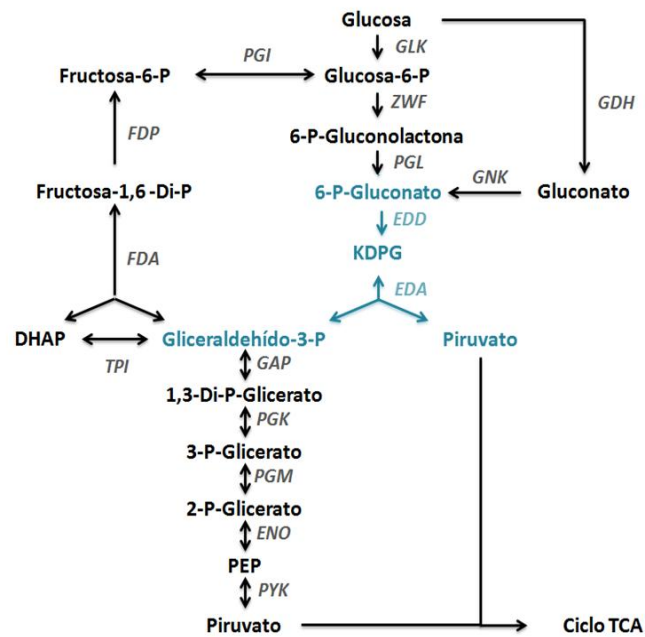


Figura 1 Ruta glicolítica y gluconeogénica en *P. aeruginosa*. La vía Entner Doudoroff se indica en azul. GLK, glucocinasa; ZWF, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; PGL, fosfoglucolactonasa; EDD, 6-fosfogluconato deshidratasa; EDA, 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa; GAP, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfoglicerato cinasa; PGM, fosfogliceromutasa; ENO, enolasa; PYK, piruvato cinasa; GDH, glucosa deshidrogenasa; TPI, triosa fosfato isomerasa; FDA, fructosa difosfato aldolasa; FDP, fructosa difosfatasa (Tomado de Conway, 1992).

transportadores están coloreadas de la siguiente manera: ABC, rojo; MFS, azul; PTS, amarillo; SGLT, azul oscuro; GlcU, verde (Jahreis *et al.*, 2008).

Dos de estas familias han sido reportadas como ubicuas en todas las clasificaciones de organismos vivientes. Una de ellas es la superfamilia ATP-binding cassette (ABC) y la superfamilia de facilitadores principales (Major Facilitator Superfamily), también llamada familia uniporte-simporte-antiporte. Mientras que las permeasas de la familia ABC son capaces de transportar moléculas pequeñas o macromoléculas en respuesta a la hidrólisis de ATP, los transportadores MFS son acarreadores simples capaces de transportar sólo solutos pequeños en respuestas a gradientes químicos de iones. Aunque han sido reconocidos y clasificados más de 100 familias de transportadores, la mitad de todos los transportadores codificados en los genomas de los microorganismos se encuentran en las superfamilias ABC y MFS. Por lo tanto, no puede ser subestimada la importancia de estos sistemas de transporte para los organismos vivientes (Jahreis *et al.*, 2008).

1.3 REPRESIÓN CATABÓLICA POR CARBONO.

Las bacterias de vida libre frecuentemente cuentan con metabolismos versátiles que les permite el uso de una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono y energía. Esto facilita la supervivencia en hábitats y la adaptación a los cambios del medio ambiente. La versatilidad metabólica está ligada a una ajustada pero flexible regulación de la expresión de las vías metabólicas, esta regulación está dirigida para optimizar la adecuación. Muchas redes de regulación global participan en la coordinación de los programas de expresión genética bajo diferentes situaciones. Algunas permiten a las células responder a condiciones de estrés como falta de nutrientes, limitación de oxígeno, etc. Otros sistemas coordinan el metabolismo bajo condiciones de abundancia, por ejemplo cuando diferentes fuentes de carbono se encuentran disponibles, sin inhibir el crecimiento (Rojo, 2010).

Bajo estas condiciones, las bacterias pueden co-metabolizar las diferentes fuentes de carbono o asimilar preferencialmente una en específico que la provea del crecimiento más eficiente, inhibiendo al mismo tiempo el consumo y/o la expresión de genes requeridos para el catabolismo de los compuestos no preferidos. Los procesos reguladores que permiten la selección de una fuente de carbono preferida han sido llamados Represión Catabólica por Carbono (Carbon Catabolic Repression). La CCR no solo inhibe la expresión de vías para compuestos no preferidos, sino que también genera una importante reorganización del metabolismo que requiere la activación de muchos genes, este proceso es llamado Activación Catabólica por Carbono (Carbon Catabolic Activation) (Rojo, 2010).

CCR y CCA pueden incluirse en el término más general de Control del Catabolismo por Carbono (CCC). La represión catabólica es importante para la competencia de las diferentes especies de bacterias en sus hábitats naturales porque juega un rol clave en la determinación de la velocidad de crecimiento, y del compuesto carbonado que será asimilado en primer lugar, permitiendo una especialización reversible y flexible por una fuente de carbono en particular (Rojo, 2010).

El proceso de CCR fué investigado a detalle por Monod en 1942, quien describió que *E. coli* siempre escoge primero a la glucosa cuando está expuesta a una mezcla de nutrientes como glucosa y sorbitol. Desde entonces, la glucosa ha sido la clásica fuente de carbono “preferida” y ha sido estudiada por décadas para revelar los mecanismos moleculares del transporte y regulación (Jahreis *et al.*, 2008).

1.3.1 *E. coli* Y EL SISTEMA PTS

El primer transportador de glucosa (GLT) fue descrito en 1966 cuando fue identificado el sistema PTS en *E. coli*. La secuencia de DNA de las subunidades de la permeasa fueron reportadas en los 80`s. En la actualidad se cuenta con la información de cientos de secuencias de sistemas de transportes de glucosa.

Alrededor de 30 de estos han sido caracterizados experimentalmente a nivel molecular en más de 20 especies diferentes de bacterias, siendo el sistema PTS de *E. coli* el modelo de transporte de glucosa clásico y más conocido.

PTS es un sistema de fosfotransferencia multiprotéico que acopla el transporte de carbohidratos a través de la membrana citoplasmática con su simultánea fosforilación (Figura 3). Este tipo de transporte activo existe exclusivamente en bacterias. En el caso de *E. coli*, el dominio EIIA del transportador de glucosa (EIIA^{Glc}) es la unidad central de procesamiento en la CCR en *E. coli*. Cuando se fosforila, EIIA^{Glc} se une y activa la adenilato ciclasa (AC), lo cual lleva a la producción de AMP cíclico (cAMP). También se requiere un “factor x” desconocido para la activación de la AC. Altos niveles de cAMP promueven la formación del complejo cAMP-CRP, el cual activa los promotores de genes catabólicos. En su estado no fosforilado EIIA^{Glc} no activa la AC. En este caso, EIIA^{Glc} inactiva enzimas metabólicas y transportadoras de fuentes de carbono secundarias, como GlpK, LacY y otras proteínas. El estado de fosforilación de EIIA^{Glc} es determinado por la actividad transportadora del sistema PTS (la presencia de cualquier azúcar PTS resulta en la defosforilación de EIIA^{Glc}) y la tasa intracelular entre fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato, la cual disminuye durante la acción de la glicólisis. HPr también contribuye a la CCR fosforilando a BglG, un antiterminador transcripcional que controla la expresión de genes de la utilización de β-glucósidos. De esta manera, en presencia de azúcares preferidos por el sistema PTS, el operón *bgl* no se expresa (Görke & Stülke, 2008).

deshidrogenasa (Zwf) 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (EDA) están reprimidas hasta que el succinato ha sido consumido (Rojo, 2010).

La expresión de genes para la asimilación de carbohidratos como gluconato, glicerol, fructosa y manitol también está inhibida por succinato o acetato. Por otro lado, la glucosa tiene un efecto represor en la expresión de varios genes, por ejemplo en los regulones de *P. aeruginosa* para la utilización de manitol o histidina y los genes de amidasa. La inducción de estos genes es también inhibida cuando las células crecen en medio completo, donde los aminoácidos son la fuente de carbono utilizada, o en un medio sintético que contiene casaminoácidos (un hidrolizado ácido de caseína). Por lo tanto existe una jerarquía secuencial donde algunos ácidos orgánicos y aminoácidos permanecen como las fuentes preferidas de carbono, los compuestos hidrocarbonados son los menos preferidos y la glucosa en un punto intermedio (Rojo, 2010).

1.3.3 LA PROTEÍNA Crc

Dentro de los sistemas reguladores involucrados en la CCR en *Pseudomonas* se encuentra el de la proteína Crc. Éste regulador global fué inicialmente descrito en *P. aeruginosa* como una proteína involucrada en el transporte y metabolismo de glucosa y manitol, así como en la represión de amidasa. Después se demostró que participa en la represión inducida por succinato, o por componentes de un medio completo, de varios genes catabólicos incluyendo los genes *bkd* necesarios para la asimilación de aminoácidos en *P. aeruginosa* y *P. putida*, los genes de *P. putida* para la asimilación de benzoato, 4-hidroxibenzoato y 4-hidroxifenilpiruvato, los genes de degradación de alcanos codificados en *P. putida* por el plásmido Gpo1 OCT, los genes de degradación de tolueno y fenol (Rojo, 2010).

Un análisis proteómico y transcriptómico para dilucidar el papel de Crc en *P. putida*, cultivada en medio completo (donde los aminoácidos son la principal fuente de carbono), demostró que la inactivación del gen *crc* modifica la expresión de al menos 134 genes, la mayoría involucrados en el transporte y asimilación de aminoácidos y

azúcares. Crc modificó la expresión de varias porinas y transportadores para el consumo de aminoácidos o dipéptidos e inhibió los genes necesarios para asimilar valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, treonina, glicina y serina. Crc no inhibió las vías para la utilización de prolina, alanina, glutamato, glutamina e histidina, aminoácidos que son buenas fuentes de carbono para *P. putida*. En el caso de la arginina, lisina, aspartato y asparagina, que pueden ser asimilados por otras vías, Crc favoreció una ruta particular inhibiendo otras alternativas. Por lo tanto no todos los aminoácidos son preferidos por igual y Crc es el elemento que organiza la asimilación jerárquica de los aminoácidos preferidos sobre los que no lo son, favoreciendo también el uso preferencial de una ruta cuando hay varias (Rojo, 2010).

En presencia de fuentes de carbono preferidas, Crc inhibe la traducción de los mRNA de los genes de *alkS* y *benR*, los cuales codifican para reguladores transcripcionales de genes requeridos para la asimilación de alcanos y benzoato respectivamente. Crc se une al extremo 5' de estos mRNA específicamente a una secuencia AAUAAUAA no apareada que puede estar localizada cercana a la secuencia Shine-Dalgarno o al codón de inicio AUG, siendo suficientemente estable para prevenir la formación del complejo de inicio de la traducción (Figura 4) (Moreno *et al.*, 2009).

En el caso específico de la glucosa, existe evidencia de que en *P. aeruginosa*, Crc podría estar controlando su asimilación. Una mutante en Crc exhibe aumentos en la cantidad de transcritos y expresión de proteínas involucradas en el transporte y metabolismo de la glucosa. Algunos genes cuyos niveles se ven aumentados son la *pgi-1*, los genes de la vía ED *edd* y *eda*, la porina *oprB-1* y los genes cuyos productos forman parte del sistema de transporte ABC de azúcar (Moreno *et al.*, 2009).

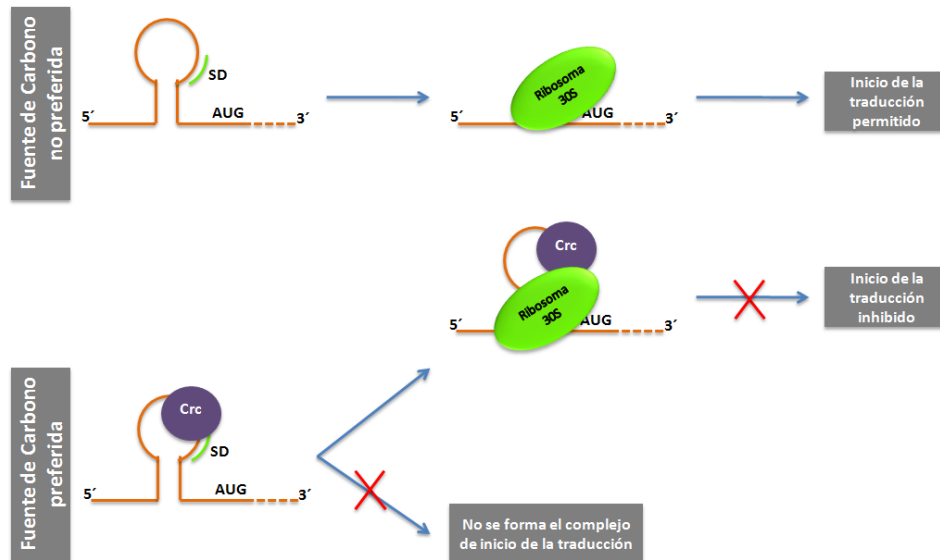


Figura 4 Mecanismo de acción de la proteína Crc. Crc se une a los RNA blanco en sitios específicos localizados cerca o sobrepuestos al sitio de traducción AUG, e inhibe la formación de un complejo de traducción productivo. Crc puede competir con la subunidad 30S del ribosoma por la unión al RNA o permitir que la subunidad 30S se una, pero atrapándola en un complejo no productivo. El mecanismo preciso depende del RNA que se considere y del sitio exacto de unión a Crc con respecto del sitio AUG. “SD” indica la secuencia Shine-Dalgarno (Rojo, 2010).

1.3.4 LOS sRNA CrcZ y CrcY COMO REGULADORES GLOBALES DE LA REPRESIÓN CATABÓLICA EN *Pseudomonas spp.*

Crc, la proteína de unión a mRNA de fuentes de carbono no preferidas tiene a su vez dos reguladores, los RNA pequeños (sRNA por sus siglas en inglés) CrcZ y CrcY. Se ha reportado que CrcZ contiene 5 motivos AANAANAA y tiene la capacidad de unirse a la proteína Crc con alta afinidad e incluso para removerla *in vitro* del mRNA de *amiE*, un gen cuyo producto tiene actividad amidasa. La traducción del mRNA de *amiE*, en presencia de una fuente de carbono preferida como el succinato, se ve inhibida debido a Crc. En ausencia de succinato, se expresa CrcZ, derivando en la titulación de Crc y permitiendo la traducción de *amiE* (Figura 5) (Sonnleitner *et al.*, 2009). La transcripción de CrcZ es activada por el sistema de dos componentes CbrA/B. En *P. aeruginosa* se describió que CrcZ tiene el motivo de unión a CbrB,

una secuencia palindrómica (TGTTAC-N₁₄-GTAACA) localizada entre las posiciones -151 y -125 de *pcrcZ* (Abdou *et al.*, 2011).

Sumado a *CrcZ*, *P. putida* contiene otro sRNA de 368 nucleótidos llamado *CrcY*, el cual varía sus niveles de transcripción de acuerdo a las condiciones de cultivo y, junto, con *CrcZ*, secuestran al regulador global *Crc*, modulando su actividad. *CrcY*, al igual que *CrcZ*, contiene seis regiones no apareadas que incluyen la secuencia AANAANAA, descrita como motivo de unión de *Crc* (Sonnleitner *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2012).

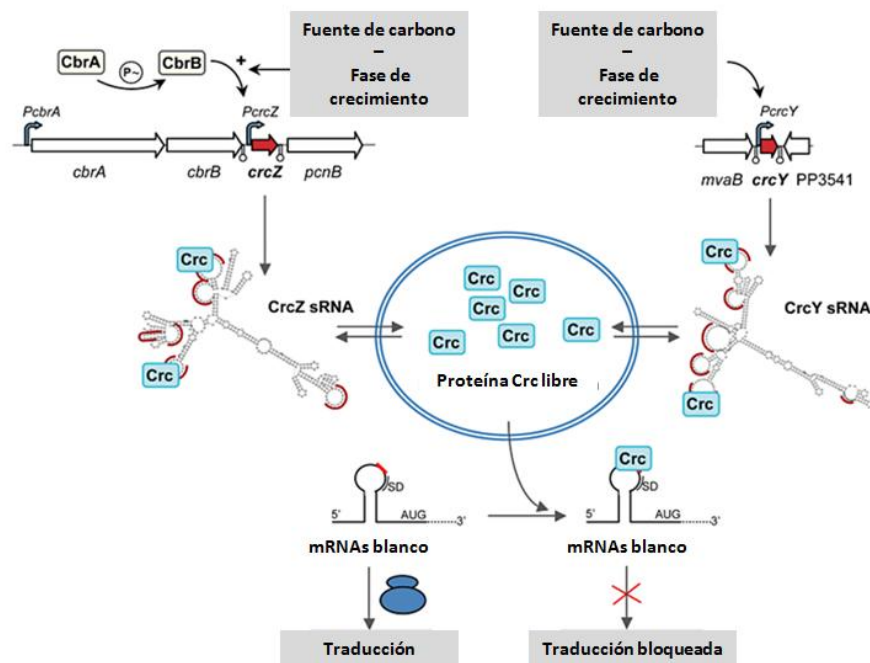


Figura 5 Mecanismo de acción de *CrcZ* y *CrcY*. *CrcY* sólo está presente en *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syringae*. En *P. aeruginosa* sólo está presente el sRNA *CrcZ*. Ambos modulan la disponibilidad de *Crc*. *CrcZ* y *CrcY* contienen 6 sitios de unión específica con los que secuestran a *Crc* bajo condiciones que generan poca o nula represión catabólica por carbono. Los niveles de *CrcZ* y *CrcY* varían de acuerdo a la fuente de carbono usada. Hasta ahora, se ha comprobado que sólo *CrcZ* es controlado por el sistema *CbrA/B* (Tomado de Moreno, *et al.*, 2012)

Bajo condiciones que generan una fuerte represión catabólica los niveles de *CrcZ* y *CrcY* son muy bajos comparados cuando la represión no se ejerce. Eliminaciones individuales de *CrcZ* o *CrcY* no afectan la represión catabólica, aunque la ausencia simultánea de ambos sRNA provoca que la actividad de *Crc* se mantenga aún en

medio de cultivo en condiciones no represoras. Una sobreproducción de estos sRNA resulta en la ausencia de represión aún en cultivos con condiciones fuertemente represoras.

1.3.5 EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES CbrA/B ACTIVA LA EXPRESIÓN DE CrcZ.

En *P. aeruginosa* se describió el sistema de dos componentes CbrA/CbrB en donde CbrA es la proteína sensora cinasa histidínica, y CbrB su regulador de respuesta par. En CbrA la sección del extremo amino terminal (490 residuos) parece ser el dominio sensor y está constituido por 12 posibles hélices transmembranales, mientras que la sección del extremo carboxilo terminal comparte homología con las cinasas histidínicas de la familia NtrB. El regulador de respuesta CbrB muestra similitud a aquellos de la familia NtrC (Nishijyo *et al.*, 1998; Nishijyo *et al.*, 2001). Se ha descrito que el sistema de dos componentes CbrA/CbrB regula la asimilación de fuentes de carbono, mientras que el sistema NtrB/NtrC regula la asimilación de fuentes de nitrógeno. El sistema regulador de dos componentes CbrA/CbrB, controla la expresión de varias rutas catabólicas y posiblemente, junto con el sistema NtrB/NtrC controlan los flujos catabólicos de carbono y nitrógeno en *P. aeruginosa*. (Li, W. & Lu, C., 2007).

Se ha demostrado que en *P. putida* la transcripción de CrcZ y CrcY está regulada por el sistema de dos componentes CbrA/B, ya que CbrB se une a las regiones reguladoras de estos sRNA promoviendo la activación del promotor tipo σ^{54} (Abdou *et al.*, 2011).

En resumen, en presencia de una fuente preferida de carbono, los niveles de CrcY y CrcZ permanecen bajos y las reservas de Crc son suficientemente altas para unir los mRNAs blanco, inhibiendo su traducción. Por el contrario, si la única fuente de carbono es una no preferida (como glucosa), los niveles de CrcZ se incrementan, presumiblemente mediante la activación del sistema CbrA/CbrB, secuestrando a Crc y permitiendo que el ribosoma se una y traduzca los mRNAs blanco. CrcY parece ser activado por otra vía alternativa al TCS (Moreno, *et al.*, 2012).

2 ANTECEDENTES

ARMANDO: ME APARECE LA PAGINA ANTERIOR VACIA..... CHECALO

2.1 CRECIMIENTO DIÁUXICO EN *A. vinelandii*.

Se ha reportado que *A. vinelandii* exhibe crecimiento diáuxico cuando se cultiva con suficientes concentraciones de más de una fuente de carbono como glucosa y acetato. El acetato es usado como la fuente de carbono primaria (George *et al.*, 1985; Tauchert *et al.*, 1990) y esto correlaciona con altos niveles de la enzima acetato cinasa. Figura 6)

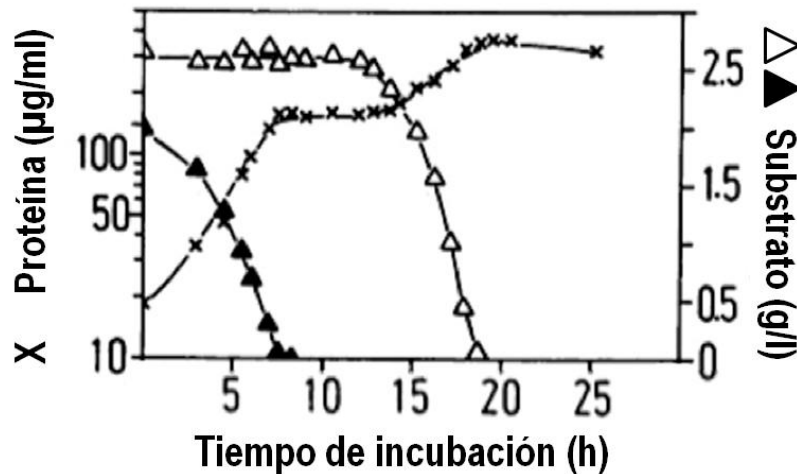


Figura 6. Crecimiento de *A. vinelandii* en cultivo en lote en una mezcla de acetato y glucosa. Se muestran las concentraciones de proteína celular (X), acetato (triángulos negros) y glucosa (triángulos blancos) (Tauchert *et al.*, 1990).

Posteriormente, una vez consumido el acetato hay un aumento de dos enzimas que intervienen en la glicólisis: la glucosa 6-P deshidrogenasa (Zwf) y la gliceraldehído 3-P deshidrogenasa, enzimas pertenecientes a la vía ED (Conway, 1992).

Aunque los mecanismos moleculares de esta regulación se desconocen, se sabe que metabolitos derivados del acetato como acetyl-CoA y acetyl-fosfato inhiben la actividad de la glucosa 6-P deshidrogenasa (Tauchert *et al.*, 1990)

2.2 En *A. vinelandii* LA CINASA HISTIDÍNICA CbrA ES NECESARIA PARA LA ASIMILACIÓN DE GLUCOSA EN EL CRECIMIENTO DIÁUXICO.

En el grupo de la Dra. Cinthia Núñez existe una línea de investigación encaminada a entender los mecanismos de regulación que controlan tanto la síntesis como las propiedades fisicoquímicas del alginato producido por *A. vinelandii*. En esta línea se demostró que el sistema de dos componentes CbrA/CbrB regula negativamente la síntesis de alginato, así pues, una mutante en el gen *cbrA*, que codifica la cinasa histidínica exhibió una sobreproducción 11 veces mayor de este polímero extracelular (Cepa silvestre: 60 µg alginato/mg de proteína; Cepa *cbrA::mTn5*: ~600 µg alginato/mg de proteína). Además la complementación genética de la mutante con la copia silvestre del gen *cbrA* redujo la producción de alginato a niveles silvestres (Serrano-Román 2011; Quiroz Rocha 2012).

Una caracterización más a detalle de la mutante *cbrA* demostró que ésta cinasa histidínica era necesaria para la utilización de glucosa en el crecimiento diáuxico acetato-glucosa pues la mutante *cbrA* fue incapaz de crecer en glucosa una vez consumido el acetato del medio Figura 7}(Hernández-Ortiz, 2011).

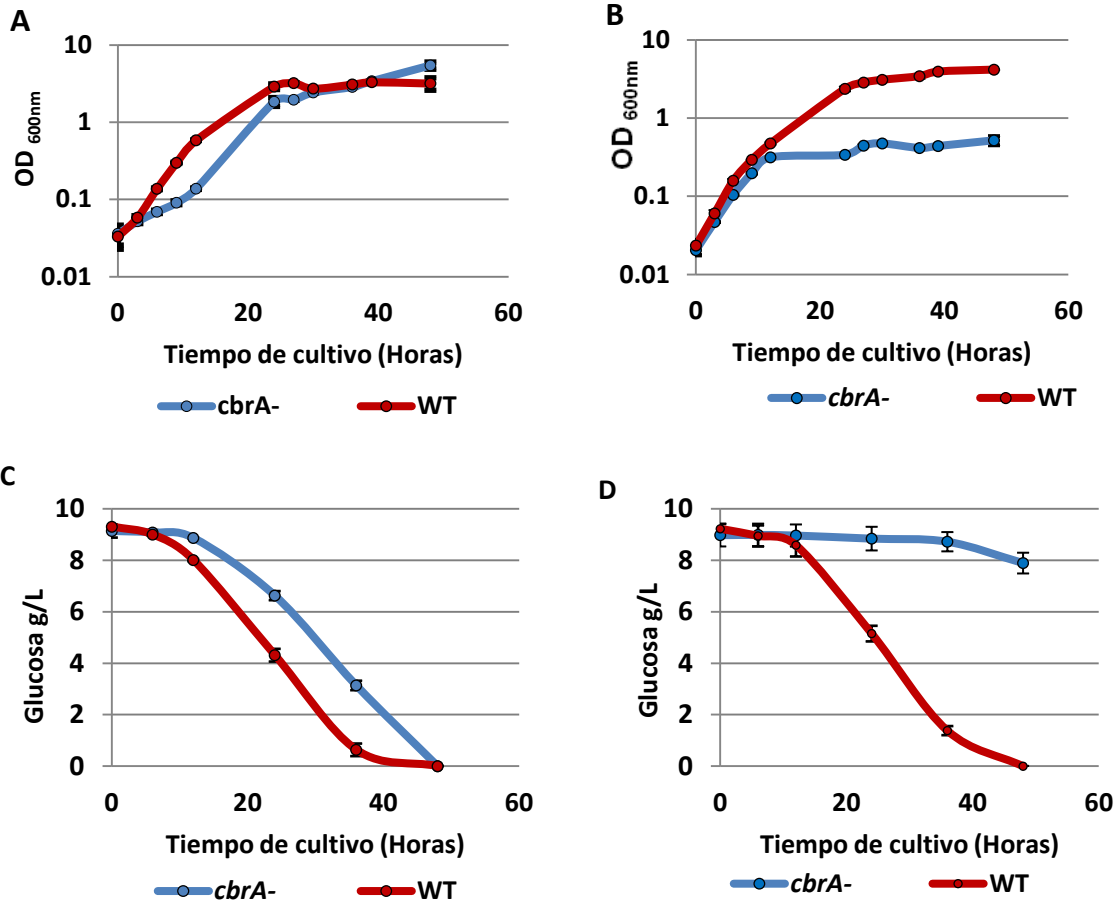


Figura 7- Cinética de crecimiento en glucosa (A) y en medio diáuxico glucosa-acetato (B), de la cepa EalgD y de su derivada *cbrA*::Tn5 AH1. Se muestra el consumo de glucosa en medio Burk Glucosa (C) o en medio Burk Glucosa-Acetato (D) (Hernández-Ortiz, 2011).

2.3 EL SISTEMA DE REGULACION CbrA/CbrB-Crc EN *A. vinelandii*.

Un análisis de la secuencia del genoma de *A. vinelandii* reveló la existencia de un gen ortólogo a *crc* de *P. aeruginosa*, y un gen ortólogo a *crcZ* y cuyo arreglo génico se conserva con respecto a especies de *Pseudomonas*. Además en el genoma de *A. vinelandii* se identificó un parálogo a *crcZ*, denominado *crcX* y cuya secuencia nucleotídica muestra una identidad del 67% con el *crcY* de *Pseudomonas* sp. El gen *crcX* se encuentra río abajo de un gen que codifica una proteína hipotética (Avin

04790). Por su parte la proteína Crc (Avin02870) de *A. vinelandii* posee un 83% de identidad con su homóloga en *P. aeruginosa*.

Se han hecho varios intentos de construir mutantes tanto en el gen *crc* como en *crcZ* de *A. vinelandii* sin que hasta la fecha se haya logrado obtener estas mutantes, lo que sugiere fuertemente que estos genes son esenciales bajo las condiciones de laboratorio ensayadas. Esto contrasta con lo reportado en *P. aeruginosa* en donde se han generado mutantes en *crc* y *crcZ* que sí son viables. Por esta razón, para evaluar el efecto del sistema de regulación CbrA/B-Crc sobre CrcZ, se construyó una fusión transcripcional del promotor de CrcZ con el gen reportero *gusA*. Al medir la actividad de β -glucuronidasa la fusión *pcrcZ-gusA* en el fondo genético *cbrA-* se observó que los niveles se abatían, comparados con los niveles observados en el fondo de la cepa silvestre. De esta manera, se propone que en *A. vinelandii* CbrA es necesaria para fosforilar su regulador de respuesta CbrB, el cual activa la transcripción del gen *crcZ* a partir de su promotor σ^{54} (Quiroz-Rocha, 2012).

Con estos antecedentes y considerando el reporte de Sonnleitner y cols. (2009) nos fue posible proponer un modelo en el que, al igual que en *P. aeruginosa*, el sistema de dos componentes CbrA/B en *A. vinelandii* participaría en la CCR al controlar el sistema de regulación post-transcripcional Crc/CrcZ. En la mutante *cbrA* la utilización de glucosa en el crecimiento diáuxico estaría reprimida de manera permanente por el efecto de la proteína Crc debido a que no hay expresión del sRNA CrcZ. En apoyo a este modelo hemos encontrado posibles secuencias de unión de Crc en genes del metabolismo de glucosa en *A. vinelandii* (Hernández-Ortiz, 2011).

2.4 ALGUNOS GENES PARA EL TRANSPORTE Y CATABOLISMO DE GLUCOSA EN *A. vinelandii* CONTIENEN SITIOS PROBABLES DE UNIÓN A LA PROTEÍNA Crc.

En términos generales, los genes responsables del transporte y catabolismo de glucosa están conservadas entre *A. vinelandii* y *P. putida*. Sin embargo, en *A.*

vinelandii no se encuentra el transportador de membrana externa OprB pero cuenta con la proteína GluP (Avin 04150) la cual ha sido anotada como un transportador de glucosa/galactosa homóloga al transportador de glucosa de *B. subtilis* (Mesak *et al.*, 2004). El modelo del transporte y catabolismo de glucosa que operaría en *A. vinelandii* se muestra en la Figura 8 y está basado en el modelo propuesto para *P. putida*.

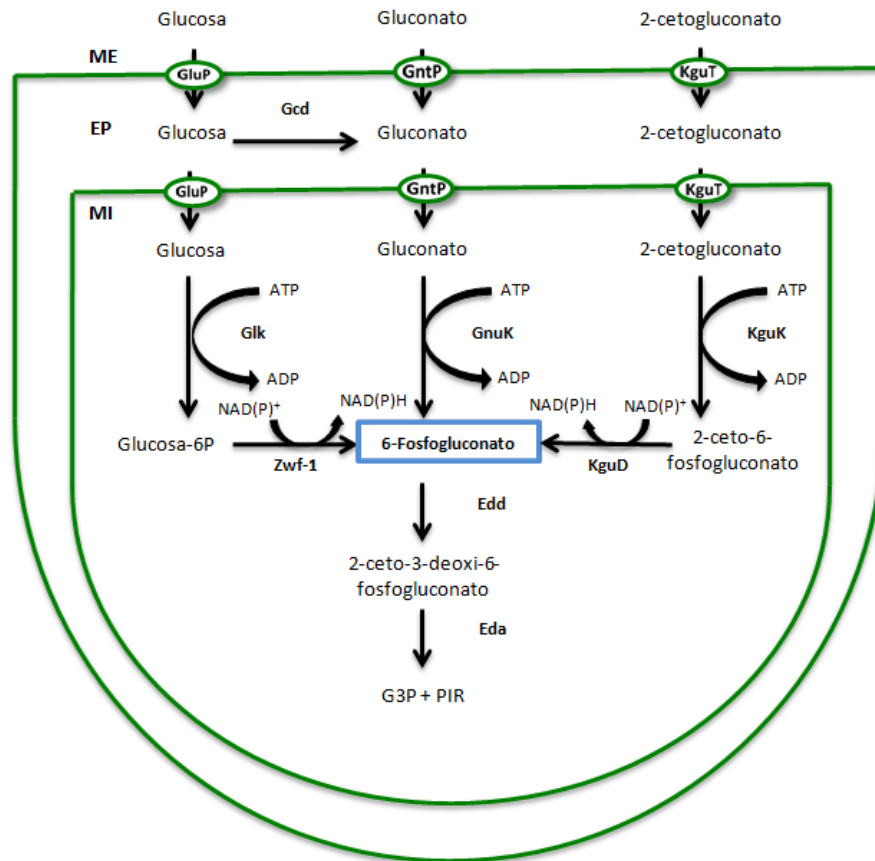


Figura 8 Modelo del transporte y metabolismo de glucosa propuesto para *A. vinelandii*. ME, Membrana Externa; EP, Espacio Periplásmico; MI, Membrana Interna. Las flechas señalan las proteínas cuyos genes presentan sitios putativos de unión a Crc. (Hernández-Ortiz, 2011).

Una vez establecidas las rutas de asimilación y metabolismo de glucosa en *A. vinelandii*, se realizó la búsqueda de sitios posibles de unión de la proteína Crc. Se encontraron cuatro sitios putativos en los genes que se enlistan en la Tabla 1: en el gen *gluP* (posible transportador de glucosa), en el gen *eno-6* (Enolasa), en el gen *kguT* (posible transportador de gluconato) y en el gen *eda-2* (2 ceto-3-deoxi- 6-P-

gluconato aldolasa). Este análisis sugiere que la asimilación de glucosa en *A. vinelandii* pudiera estar regulada por Crc desde su transporte al interior de la célula.

El mecanismo de represión catabólica por carbono en *A. vinelandii* no ha sido estudiado previamente. En este proyecto proponemos investigar la función del gen *gluP* en la asimilación de glucosa y si su expresión está controlada por el Sistema CbrA/B-Crc/CrcZ.

Tabla 1. Sitios putativos de unión a Crc en genes metabolismo y transporte de glucosa en *A. vinelandii*

<i>gluP</i>	
CÓDIGO AVIN	04150
ACTIVIDAD	Transportador de glucosa/galactosa
UBICACIÓN	395096-396385
RANGO	396335-396435
SECUENCIA	CGGCAGGGGCCTCTCCTTGAAGCAACAATC ACAACAAG GAGGAAATGCA CG ATG ACGACGGTAGAAACGACCTTCAACAATGCCGGCACGGACAATC CGGCG
<i>kguT</i>	
CÓDIGO AVIN	26900
ACTIVIDAD	Transportador de 2-cetogluconato
UBICACIÓN	2758851 -2760149
RANGO	2758801- 2758901
SECUENCIA	GATCCCGACGGCACCTGCTGCCACAAA AACAACAAG GCTCAGGAGACAT CC ATG CAAAATCCGCGTCTCGCCAGCCGCCGCTGGTGGTATCTCATCC CGGTC
<i>eno-6</i>	
CÓDIGO AVIN	Avin38790
ACTIVIDAD	Enolasa
UBICACIÓN	3921449-3922738

RANGO	3922688-3922788
SECUENCIA	AACAGCTTGAACCCTGTCGCTTGCAGTTATCTATGGAGTGTG AACAAC AATG GCAAAGATCGTCGCATCAAGGGACGCGAAGTGCTCGACTCCCG TGGC
	<i>eda-2</i>
CÓDIGO AVIN	Avin27250
ACTIVIDAD	KDPG aldolasa
UBICACIÓN	2797905-2798543 (Reverso)
RANGO	2798493-2798593
SECUENCIA	TGAACAGCATCCAG AACAACA ACCGGCCACTTCCAGAGCGTGCCGA GC ATG GCCGACAAGGTCGCCCTGATCGATCGGCTGTGCGCGGAAGCC CGCATC

En Verde: Codón de inicio de la traducción. En Rojo sitio putativo de unión de Crc.
(Tomado de Hernández-Ortiz, 2011).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Tabla 2. Cepas utilizadas en el presente trabajo

Especie	Cepa	Característica	Referencia
<i>A. vinelandii</i>	E	Cepa silvestre; NaI ^r	Larsen y Haug, 1971.
<i>A. vinelandii</i>	GG15	<i>cbrA</i> ::Tn5 / Mucoide	Guzmán 2001 Núñez C. Datos no publicados
<i>A. vinelandii</i>	<i>cbrA</i> ::Sp Polar	Derivada de la cepa E <i>cbrA</i> ::Sp	Quiroz Rocha 2012
<i>A. vinelandii</i>	EalgD	Derivada de la cepa E; <i>algD</i> ::Km ^r ; No productora de alginato.	Colección del laboratorio
<i>A. vinelandii</i>	AH1	Derivada de la EalgD; <i>cbrA</i> ::Tn5	Hernández-Ortiz 2011.
<i>A. vinelandii</i>	AH1-R1	Derivada de la EalgD; <i>cbrA</i> ::Tn5 sitio-dirigida; No mucoide	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i>	AHI20	Derivada de la cepa EalgD. Mutante <i>gluP</i> ::Sp ^r	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i>	AHI30	Derivada de la cepa E <i>gluP</i> ::Sp ^r	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i>	E/pSRK Km ^r	Derivada de la E portadora del plásmido	Quiroz Rocha 2012

		inducible pSRK Km ^r	
<i>A. vinelandii</i>	E/pSRK-Crc Km ^r	Derivada de la E portadora del plásmido inducible pSRK-Crc Km ^r	Quiroz Rocha 2012
<i>A. vinelandii</i>	AHI30/ pSRK- <i>gluP</i> Km ^r	Derivada de la AHI30 portadora del plásmido inducible pSRK- <i>gluP</i> Km ^r	Este proyecto
<i>A. vinelandii</i>	AHI40	Derivada de la cepa E, porta la fusión transcripcional <i>pgluP-gusA</i> cromosomal.	Este proyecto
<i>A. vinelandii</i>	AHI50	Derivada de la cepa <i>cbrA::Sp</i> polar. Porta la fusión transcripcional <i>pgluP-gusA</i> cromosomal.	Este proyecto
<i>A. vinelandii</i>	AHI60	Derivada de la cepa E, porta la fusión traduccional <i>pgluP-gusA</i> cromosomal.	Este proyecto
<i>A. vinelandii</i>	AHI70	Derivada de la cepa <i>cbrA::Sp</i> , porta la fusión traduccional <i>pgluP-gusA</i> cromosomal.	Este proyecto
<i>E. coli</i>	DH5-α	EndA1 <i>hsdR17 supE44 thi-1λ- recA1 gyrA96 relAΔlacU169φ80 (ΔlacZ ΔM15)</i>	Hanahan, 1983

Tabla 3. Plásmidos

Plásmido	Característica	Referencia
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Vector de clonación para productos de PCR; <i>lacZ</i> , Amp ^r .	Invitrogen™
pJET 1.2	Vector de clonación para productos de PCR; Amp ^r .	Thermo Scientific®
pBSL130	Plásmido que porta el cassette de resistencia a Km ^r	Alexeyev et al. 1995
pAH-01	Derivado del pCR [®] 2.1-TOPO [®] , posee un fragmento de 1945pb del gen <i>gluP</i> amplificado por PCR	Este trabajo
pAH-02	Derivado del pBluescript KS+, posee clonado el fragmento <i>EcoRI</i> del gen <i>gluP</i> .	Este trabajo
pKS-Sp	Derivado del pBluescript KS+, posee el fragmento <i>EcoRI</i> del cassette de resistencia Ω Sp ^r	Este trabajo
pAH-03	Derivado del pAH-02, posee una inserción del cassette de Sp dentro del gen <i>gluP</i> (<i>gluP::Sp^r</i>)	Este trabajo
pBluescript KS+	Vector de Clonación	Stratagene
pAH-04	Derivado de pJET 1.2 posee un fragmento de 1.7 kb de la región promotora de <i>gluP</i>	Este trabajo
pGG15	Derivado del pBluescript KS+, porta un fragmento <i>PstI</i> de 7000 pb del cromosoma de la cepa GG15, el cual contiene la inserción <i>cbrA::Tn5</i> .	Colección del laboratorio.

pSRK-Km	Vector de clonación, amplio rango de hospedero, derivado de los pBBR1MCS, posee un promotor inducible con IPTG. Km ^r	Khan <i>et al.</i> , 2008
pSRK-crc	Derivado del pSRK-Km, posee el gen <i>crc</i> en el mismo sentido del promotor inducible	Quiroz Rocha. E. Tesis de Maestría
pSRK- <i>gluP</i>	Derivado del pSRK-Km ^r , porta un fragmento de 1.9 kb correspondiente al gen <i>gluP</i>	Este trabajo
pRK2013	Vector de amplio rango basado en ColE1 Km ^r , plásmido <i>helper</i>	Ditta <i>et al.</i> , 1980
pUMA Tc <i>gusA</i> T	Plasmido derivado de pUC18. para construir fusiones transcripcionales con <i>gusA</i> en el locus cromosomal <i>melA</i> . Tcr.	Castañeda M.
pAH-05	Derivado de pUMA Tc <i>gusA</i> T posee la región reguladora de <i>gluP</i> de 1.8 kb en fusión transcripcional con <i>gusA</i> .	Este trabajo
pAH-06	Derivado de pUMA Tc <i>gusA</i> PT posee la región reguladora de <i>gluP</i> de 1.8 kb en fusión transcripcional con <i>gusA</i> .	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos

Oligos	Secuencia	Tm	Amplicón
<i>gluP</i> -F	CATGTGGATCGACTCAGGAG	60°C	Gen <i>gluP</i> mas 300pb río arriba y 300pb río abajo
<i>gluP</i> -R	CCAGGCATTTCGGTATAGAAG	60°C	
<i>cbrA</i> -F	CCTCTACCGAATGCTGGAC	60°C	Gen <i>cbrA</i>
<i>cbrA</i> -R	GGATCGCAGAGATTGAGG	60°C	

rpoS-5	GATTTGTCGCAGAGTATCG	60°C	500 pb del gen <i>rpoS</i> de <i>A. vinelandii</i>
rpoS-6	GACAGCGATCGAGGCCGTTC	60°C	
Sp1	GAGCAGGGGAATTGATCC	60°C	Gen Sp ^r de ~2 kb
Sp2	GGTGGATGACCTTTTGAATG	60°C	
gTraF	GAGCTC ¹ CCATGTTCCCGAGACTTC	58°C	Región reguladora de <i>gluP</i> de 1.7 kb
<i>gluP</i> -Trad	CTGCAGGAAGGTCGTTTCTACCG	58°C	
Fus-Gus F	GATGCCTCCTCTCGACAAAC	60°C	Región 3' de <i>pgluP</i> y 5' de <i>gusA</i> de la fusión transcripcional
Fus-Gus R	CTGCCTGGCACAGCAATTG	60°C	

3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Por cada 50 µl de reacción se usaron las siguientes concentraciones, siguiendo las especificaciones de la enzima Taq DNA Polimerase Fermentas[®].

Tabla 5. Concentraciones para la Reacción

Buffer Taq	5 µl (10x)
dNTP Mix	5 µl (0.2 mM c/u)
Prímero F	10 picomoles
Prímero R	10 picomoles
25 mM MgCl ₂	2 Mm
DNA Templado	2 µl (Stock: 20 pg/µl)
Taq polimerasa	1.25 U
Agua	cbp 50 µl
Volumen total	50 µl

Nota: Cada reacción contiene además 10% de DMSO.

Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Fermentas®) y a menos que se indique lo contrario, las condiciones se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Condiciones del Termociclador

95°C	5 min	1 ciclo
93°C	30 segundos	25 ciclos
60°C	30 segundos	
70°C	2 min	
72°C	15 min	1 ciclo

3.3 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAH-03 (pKS *gluP*::Sp)

El gen *gluP* fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos *gluP*-F y *gluP*-R con una T_m de 60°C y empleando DNA cromosomal de la cepa EalgD de *A. vinelandii* como templado; el producto de la reacción fué purificado y posteriormente clonado en el plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen), obteniendo el plásmido pAH-01.

El plásmido pAH-01 se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar un fragmento de 1.945 kb que contiene el gen *gluP*, el cual se purificó y se subclonó posteriormente en el vector pBluescript KS+ (pKS), para obtener el plásmido pAH-02. El plásmido pAH-02 se digirió con la enzima de restricción *StyI* la cual libera un fragmento interno de 600 pb del gen *gluP*. La enzima *StyI* deja extremos cohesivos por lo que estos se rellenaron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa. Posteriormente en este sitio se ligó un cassette de resistencia a Sp, liberado con la enzima *SmaI* a partir del plásmido pKS-Sp^r, generando el plásmido pAH-03 el cual porta la mutación *gluP*::Sp.

3.4 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pKS-Sp

El cassette de Sp^r fue obtenido mediante la digestión del plásmido pBSL130 (Alexeyev et al. 1995) con la enzima *EcoRI* y posterior a su purificación se clonó en el plásmido pBluescript KS+ también digerido con *EcoRI*. Al plásmido resultante se le denominó pKS-Sp.

3.5 CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES *gluP* EN LOS FONDOS GENÉTICOS E y EalgD DE *A. vinelandii*.

Se utilizó DNA del plásmido pAH-03, linearizado con la enzima *XhoI*, para transformar células competentes tanto de la cepa E como la cepa EalgD. Las transformantes se seleccionaron en medio Burk Acetato Sp₅₀ A las transformantes derivadas de las cepas E y EalgD se les denominó AHI 20 y AHI 30 respectivamente.

3.6 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pSRK-*gluP*

Se amplificó mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos gluP-F y gluP-R un fragmento de 1.9 kb de la cepa E que corresponde al gen *gluP*. Se clonó en el plásmido pJET 1.2 (Thermo Scientific®) utilizando el Kit CloneJET PCR Cloning Kit de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se escindió el fragmento correspondiente al gen *gluP* del plásmido con las enzimas *BglII* y *XhoI* y finalmente se clonó en el plásmido pSRK Km en los sitios *XhoI* y *BamHI* (Compatible con *BglII*).

3.7 COMPLEMENTACIÓN DE LA CEPA MUTANTE E *gluP*.

El plásmido pSRK-*gluP* se transfirió a la cepa AHI30 (*EgluP::Sp*) por conjugación mediante una cruce triparental tal y como se indica en Materiales y Métodos (Ver

3.10). Se seleccionaron transconjugantes resistentes a Km, dando origen a las cepas AHI30/pSRK- *gluP*

3.8 ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA.

Se prepararon geles de agarosa al 1% con solución amortiguadora de acetatos 1x (TAE) teñidos con bromuro de etidio (15 µg de bromuro de etidio / 30 ml de agarosa). Los pozos del gel se cargaron según la concentración requerida de la muestra de interés, añadiendo 1-2 µl de buffer de carga. Para estimar el tamaño o peso de las bandas de DNA en cada uno de los geles se emplean marcadores de peso molecular como GeneRuler™ DNA Ladder Mix ready-to-use (Fermentas) y/o DNA del fago λ restringido con *HindIII*. La electroforesis se realizan en solución amortiguadora de acetatos 1x a 100 volts / 30 min, aunque comúnmente, se corre a 80 voltios/ 45 min para una mejor separación de las bandas de DNA. Para visualizar el DNA, los geles ya teñidos con EtBr se visualizaron en el transiluminador de luz UV (Sambrook, 1989).

3.9 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DE *E. coli*.

Se cultivó *E. coli* en 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente durante por 16 horas 200 rpm a 37°C. Se centrifugaron 3 ml de cultivo y el pellet se resuspendió en 175 µl de TES (Sacarosa 15%, 50 mM Tris pH 8.5 y EDTA 50 mM pH 8) y se agregaron 25 µl de lisozima (10 mg/ml) y se dejó actuar 20 min en hielo. Posteriormente se agregó 400 µl de agua fría (0°C aprox) y se incubó a 73°C por 15 min. Se centrifugó por 15 min a 13 000 rpm y el sobrenadante se transfirió con cuidado a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregaron 60 µl de NaClO₄ 5 M y 600 µl de isopropanol. Después de agitar se centrifugó por 15 min y el pellet se lavó con etanol al 70%. Finalmente se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de solución con RNAsa (20 µg/ml).

3.10 CONJUGACIÓN TRIPARENTAL DE *A. vinelandii* y *E. coli*.

Se cultivó *A. vinelandii* en 50 ml de BS líquido en un matraz de 250 ml y se incubó 48 h 200 rpm 30°C. A las 24 horas de iniciado el cultivo de *A. vinelandii*, se cultivó *E. coli* (tanto la cepa que contiene el plásmido a conjugar, como la cepa pRK2013 o “Helper”) en 5 ml de medio LB (con los antibióticos correspondientes) a 200 rpm 37°C. Se lavaron las células de *A. vinelandii* con un volumen de solución de MgSO₄ 10 mM y se concentraron 25 veces, es decir en 2 ml de MgSO₄ 10 mM. Se mezclaron 100 µL de las células de *E. coli* pKR2013 (Helper), *E. coli* pSRK-gluP y de la cepa AHI 30 en proporción 1:1 y se platearon 0.3 ml en medio para placas de cruces. Se incubó por 24 horas. Se colectó el tapete con 1 ml de BS usando una espátula. Se realizaron diluciones con MgSO₄ 10 mM y se platearon 100-200 µL en cajas de selección.

Medio empleado para placas de cruces *A. vinelandii* / *E. coli*.

250 ml BS, 70 ml LB, 0.2% Glucosa*, 15 mM Acetato de amonio (no esencial) *Stock glucosa 20%: utilizar 3.2 ml / 320 ml medio.

3.11 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

Se mezclaron 5 µg de DNA con 200 µl de células competentes y se mantuvieron 30 min en hielo. Se sometieron a choque térmico 2 minutos a 42°C. Se agregó 1 ml de medio LB y se cultivó 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente se plateó en medio de selección.

3.12 PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE *A. vinelandii*.

Se cultivó *A. vinelandii* en 100 ml de medio BS adicionado de 20 ml de PY durante 48 horas a 200 rpm a 30°C. Posteriormente se centrifugó y el pellet se lavó con buffer TE 50/20. Se agregaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se agregaron 50 µl de proteasa (10 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Se adicionaron 50 µl de SDS 10%, se incubaron 15 min a 37°C. Después se

agregaron 100 µl de NaCl 5 M, se mezcló y se incubó 10 min a 65°C. Posteriormente se adicionaron 80 µl de solución CTAB 10% NaCl 0.7 M (Previamente incubada a 65°C) e incubó 15-20 min a 65°C. Para extraer, se usó un volumen de solución cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se agitó en vórtex 10 segundos y centrifugó 5 min a 13000 rpm. Éste último proceso de extracción se lleva a cabo 3 veces. Finalmente para precipitar el DNA se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó 5 min a 13000 rpm. El pellet se lavó 3 veces con 1 ml de Etanol al 70%. El pellet se secó, se resuspendió en 30 µl de solución RNAsa (20 µg/ml) y se Incubó 1 hora a 37°C. Finalmente se almacenó a -20°C. La integridad del DNA cromosomal extraído se verificó en electroforesis en gel de agarosa.

3.13 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *A. vinelandii*.

Se subcultivó la cepa de interés 2 veces en medio CM sólido (El medio CM es similar al medio Burk pero carece de FeSO₄ y NaMoO₄) incubando a 30 °C/ 48 horas. Después se colectó todo el tapete celular en 50 ml de CM líquido incubando a 30°C/ 48 horas a 200 rpm. Se obtuvo el pellet centrifugando a 4000 rpm/10 min y las células se lavaron con MgSO₄ 10 mM para retirar el alginato. Las células se resuspendieron en 2 ml de medio CM adicionado con 16 mM MgCl₂ pudiendo conservarse así hasta por 15 días a 4°C.

3.14 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *A. vinelandii* CON DNA CROMOSOMAL.

La transformación se llevó a cabo en un tubo de polipropileno Eppendorf de 1.5 ml utilizando 100 µl de células competentes y agregando 5 µg de DNA. La mezcla se colocó en placas con medio CM sólido y se distribuyó con la punta de la micropipeta a manera de lograr un tapete celular de 2 cm². Se incubó por 24 horas a 30°C. Posteriormente se recolectó el tapete celular con 500 µl de BS y se lavó con MgSO₄

10 mM. Por último se sembró en placas con medio de selección, incubando a 30 °C de 2 a 4 días.

3.15 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO PARA *A. vinelandii*

A. vinelandii se cultivó de manera rutinaria en medio Burk Sacarosa (BS) (Kennedy *et al.* 1986). El medio BS se compone de: K₂HPO₄, 0.8 g/l; sacarosa, 20 g/l; KH₂PO₄, 0.2 g/l; Na₂SO₄, 0.183 g/l; MgCl₂·6H₂O, 0.16 g/l; FeSO₄·7H₂O, 0.005 g/l; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.0002 g/l y CaCl₂·2H₂O, 0.073 g/l. Cuando se requiere, el medio Burk se adiciona con fuentes de carbono distintas Glucosa (BG), Acetato (BA), Glucosa-Acetato (BGA), Succinato (BScc). Cada una de las fuentes de carbono tiene una concentración final 50 mmoles/L. Los cultivos se incubaron a 30 °C por 48 horas. Para cultivos en placa se empleó agar al 1.5%. El medio CM se compone de K₂HPO₄, 0.8 g/l; sacarosa, 20 g/l; KH₂PO₄, 0.2 g/l; Na₂SO₄, 0.183 g/l; MgCl₂·6H₂O, 0.16 g/l y CaCl₂·2H₂O, 0.073 g/l. Los cultivos líquidos se agitan a 220 rpm durante la incubación

3.16 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.

Preinóculos: Estos se prepararon inoculando 100 ml de medio BG líquido para cada mutante con una asada proveniente de una caja con medio BG sólido subcultivada 2 veces por 48 horas a 30°C. El preinóculo se cultivó a 30°C por 18 h. Se lavaron las células centrifugando a 8000 rpm por 5 min y resuspendiendo en 30 ml de buffer Burk (medio Burk sin fuente de carbono). Una vez resuspendidas se midió la absorbancia de cada resuspensión en el espectrofotómetro Ultrospec 3300pro a una longitud de onda de 600nm.

Inóculos: Se iniciaron los cultivos ajustando la DO₆₀₀ a 0.05 preferentemente, esto equivale a 0.03 µgProteína/ml. Los medios utilizados son Burk Glucosa (BG), Burk Acetato de Sodio (BA), Burk Glucosa-Acetato de Sodio (B-GA) y Burk Succinato (B Succ).

La concentración de glucosa para los cultivos en medio BG o la de acetato para el medio BA fué de 50 mM; en cambio, en medio BGA la concentración del acetato y glucosa fué de 30 mM para cada uno.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Una vez inoculados los matraces, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm o la concentración de proteína por mililitro de cultivo cada 3 o 4 horas durante las primeras 16 horas y finalmente cada 8 horas hasta las 48 horas

3.17 CONSUMO DE GLUCOSA.

La concentración remanente de glucosa en el medio de cultivo se determinó por método enzimático en el equipo Biochemistry Analyzer 2700 SELECT (YSI). Para ello se midió la concentración de glucosa en el sobrenadante de 1 ml de cultivo previamente centrifugado a 13 000 rpm/1 min. El consumo se estimó mediante la diferencia entre la concentración de glucosa inicial y la final.

3.18 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.

Para el ensayo de cinética de crecimiento se realiza una cuantificación de proteína con en base al método reportado por Lowry *et al* (1951). El pellet obtenido del cultivo de *A. vinelandii* se lavó con MgSO₄ 10 mM y se resuspendió en 1 ml. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 200 µl con agua destilada, a la cual se le añadió 1 ml de solución reactiva*. Se dejó reposar 10 min para posteriormente agregar 100 µl de reactivo de Folin (Sigma) diluído en un volumen de agua, y se dejó otra vez en reposo por 30 min. Por último, la absorbancia se leyó a 625 nm. Paralelamente se corrió una curva de calibración con concentraciones de albúmina de 50, 100, 200 y 800 µg/ml. Las soluciones a usar son: A) Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1 N; B) Tartrato de sodio y potasio 2% y C) CuSO₄ 1%.

*La solución reactiva se preparó con 1 ml de solución C, 1 ml de solución B y 98 ml de solución A.

4 HIPÓTESIS

El gen *gluP* de *A. vinelandii* es necesario para el transporte de glucosa y su expresión está controlada por el sistema de regulación CbrA/CbrB-Crc/CrcZ

5 OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar la función del gen *gluP* en la asimilación de glucosa e investigar si su expresión está controlada por el sistema CbrA/B-Crc.

PARTICULARES

1. Estudiar la función de GluP en el crecimiento de *A. vinelandii* en glucosa como única fuente de carbono.
2. Investigar si la expresión de *gluP* está regulada por el Sistema de Dos componentes CbrA/CbrB
3. Investigar la función de Crc en el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 LA FALTA DE ASIMILACIÓN DE GLUCOSA EN PRESENCIA DE ACETATO EN LA MUTANTE AH1 SE DEBE SOLO A LA MUTACIÓN *cbrA::Tn5*.

Como se mencionó en Antecedentes, la caracterización de la mutante AH1 mostró que en medio mínimo Burk consumía glucosa cuando era la única fuente de carbono pero no consumía glucosa en presencia de acetato.

La mutante AH1 fue generada transformando la cepa EalgD con DNA cromosomal de la cepa GG15 (*cbrA::Tn5-Sp^r*), con la posterior selección de mutantes resistentes a Sp^r. Con el fin de corroborar si el fenotipo de la falta de asimilación de glucosa en presencia de acetato se debe a la mutación *cbrA::Tn5* y descartar la posibilidad de que dicho fenotipo se debiera a alguna mutación asociada al *locus cbrA*, se decidió reconstruir la mutante AH1 de forma sitio dirigida, es decir transformando la cepa receptora EalgD con DNA de un plásmido que porta solo la mutación *cbrA::Tn5* (plásmido pGG15). Así pues, se transformaron células competentes de la cepa EalgD (Km^r) y se seleccionaron candidatas en medio mínimo Burk Glucosa Sp₅₀ Km₃.

Para investigar si estas cepas portaban la mutación *cbrA::Sp^r* y/o si poseían aún copias silvestres del gen *cbrA* (*A. vinelandii* es poliploide) se trató de amplificar por PCR el alelo *cbrA* con oligos específicos (oligos *cbrA-F* y *cbrA-R*). Una de las candidatas, que no mostró copias silvestres del gen *cbrA*, fue denominada AH1-R. El DNA cromosomal de esta mutante se usó como templado para amplificar el cassette de Sp^r y amplificar el gen *rpoS*, propio del cromosoma de *A. vinelandii*, como control interno de la reacción de PCR. Como puede observarse en la Figura 9 se logró la amplificación del cassette de resistencia a espectinomicina y del gen *rpoS* a partir de DNA cromosomal de la mutante AH1, lo que confirma la mutación *cbrA::Sp^r* en esta cepa.

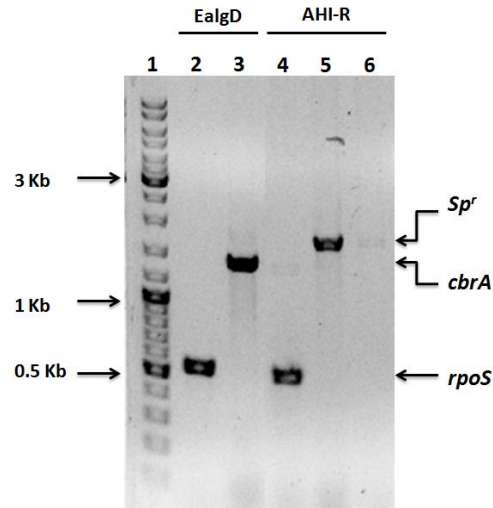


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados a partir de DNA cromosomal de la cepa parental EalgD y de la cepa mutante AH1-R. Amplificación del gen *rpoS* (Carriles 2 y 4), del gen *cbrA* (carriles 3 y 6), y del cassette de resistencia a espectinomicina (Carril 5). Marcador de peso molecular: O`GeneRUler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific® (Carril 1).

De esta manera, al reconstruir la mutante, el siguiente paso fue la caracterización del consumo de fuentes de carbono a través del crecimiento en medio mínimo Burk con glucosa como única fuente de carbono y en medio mínimo Burk con glucosa y acetato.

Como se había reportado previamente, nuestros resultados indican que la cinasa histidínica CbrA es necesaria para desactivar la CCR de glucosa por acetato en *A. vinelandii*. La cinética de crecimiento de la mutante AHI-R en la mezcla glucosa acetato demuestra que el fenotipo observado se debe a la mutación *cbrA::Tn5*. La mutante AHI muestra una tasa de crecimiento muy similar a la de la cepa parental durante las primeras 18 horas (etapa del consumo de acetato) ($E \mu = 0.225 \pm 0.021$; AHI-R $\mu = 0.193 \pm 0.227$). A partir de las 18 horas la mutante entra en etapa estacionaria mientras la cepa silvestre continúa en crecimiento hasta las 33 horas, antes de ingresar a la etapa estacionaria ($E \mu = 0.11 \pm 0.004$; AHI-R $\mu = 0.06 \pm 0.006$). Midiendo la concentración de glucosa del sobrenadante se observa que sólo la cepa silvestre consume la glucosa del medio, lo cual correlaciona con la cinética de crecimiento Figura 10).

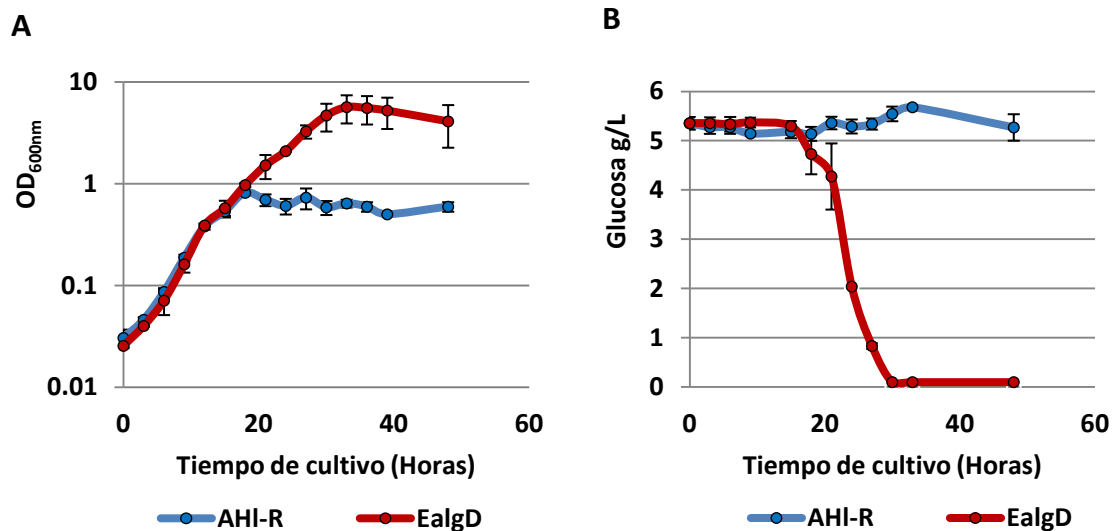


Figura 10. Panel A. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre EalgD (Rojo) y la mutante AHI-R1 (Azul) en medio BGA (Glucosa 30 mM – Acetato 30 mM). Panel B. Cinética de consumo de glucosa.

6.2 EL GEN *gluP* DE *A. vinelandii* CODIFICA UN POSIBLE TRANSPORTADOR DE GLUCOSA

Como ya se mencionó anteriormente, después de un análisis *in silico*, se encontraron sitios putativos de unión de la proteína represora Crc en genes del transporte y metabolismo de glucosa en *A. vinelandii*. Uno de ellos es el gen *gluP* (Avin 04150) que se ha reportado en *B. subtilis* como un transportador de glucosa (Mesak *et al.*, 2004).

El gen *gluP* de *A. vinelandii* es de 1.29 kb y codifica una proteína de 429 aa, con un peso estimado de 44.7 KDa y un pI de 8.01, y de localización membranal. Esta proteína está anotada como un transportador de Galactosa/Glucosa de la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily). Muestra la mayor identidad (63%) con un ortólogo en *Beijerinckia indica* y un 48% de identidad con un ortólogo ya caracterizado en *Brucella abortus* (Essenberg, 1997).


```

1  CATGTGGATC GACTCAGGAG CTGCCACCA CGGCCAGTTC CGCCTTGCT
51  GGCCATTCCA ACGGCACAGG GCGGCCACTC TCGGACGGCG AAGACACAAT
101 CCCCCCTGC GGCCTCAGCG TACCGATATC CGTCATTGAG GCCGGGCCGA
151 AGCCGGCTGA ACGCCTCCTG CCGCGAGCGG CGAAGGCGGC TACCACCGGC
201 CTCGCCATTC CGGCAAGACA CAAACCCCGG ATCGCCACCG GAACCGCCTC
251 AAGGTATCCC GAAACGGCAA GCGAGCATTG CGACACGATC GGATGCCTCC
301 TCTCGACAAA CCTTCACCGG CTAGAGACAG CGCCGTCTTG CCCACGGCAG
351 GGGCCTCTCC TTGAAGCAAC AATCACAAAC AGAGGAAATG CACGATGACG
401 ACGGTAGAAA CGACCTTCAA CAATGCCGGC ACGGACAATC CGGCGCCTCC
451 CCAGGCGCAG CGATTGAGCC TGTACGTTTT CGCCCTGTTC TTCATTTTCG
501 GAGGGCTGAC CAGCCTCAAC GACGTCCTCG TTCCGAAGCT GAAGGACCTG
551 TTCAGCCTCA GTTACACCGA GGCCATGCTC GTGCAGTCGG CGTTCTTCTT
601 CGCCTATTTT GTCGCCTCCA TTCCGGCGGG CTTGCTGATT TCGCGCATCG

651 GCTACATGAA GGCCGCCGTC GTCGGCCTGT TGACCATGGC CGCCGGCTGC
701 CTGATGTTCA TCCCGGCGAC CCTGTGACAG CTGTTCCCGG CCTTCCTCGG
751 CGCCCTGTTT ATCCTGGCGG TGGGCGTCAC CACCGTCCAG GTGGTCGCCA
801 ATCCCTGCTT GTCGCTGCTC GGGCCGGGCT CCACCGCCCA TAGCCGCTG
851 ACCCTGGGCC AGGGCTTCAA CTCGCTGGGC ACCACCGTGG CCCCTACAT
901 CGGCGCCATC CTGATTCTCG GCGCCCTGAA CGAAGTGGAC CCGTCGACGC
951 TATCGGGAGC CGAGCTCTCG GCCTTCCTGG CCCACGAAGC CAGCGTCATC
1001 AGCAATACCT ACGTCGGCAT CGCGCTGATC ATCTGCCTCA TCGCCGCTAT
1051 CGTCTGGCTG CAGCGCAACG CGCTGAAGTC CTCGAAAAGG CCCGAGCGTC
1101 TCAATCCGTT TTCCGCCCTC GACCTGCTGA AGCAGCCGCG CTTGCGCTTC
1151 GCGCGCCGCT GCATCTTCTT GTACGTGGGC GCCGAAGTGG CCATCGGCAG
1201 CCTGCTCACC GACTACCTGA TGCTGCCGAC CACCCTGCAT CTGGTCGCGG

1251 AGGAAGCCGG CAAGCACGTG GCCTTCTACT GGGGTGGCGC CATGGTGGGC
1301 CGCTTCGTG GCGCGGCCCT GATGCGCCGC TATGCGCCCG GCAAGCTGCT
1351 CGCCTTCGCC GCCGGTACCG CCATCGTCCT GATCAGCCTC TCCAGCCTCT
1401 CGACCGGCAG CATCTCCGGC TGGTCGCTAC TGGCCGTGGG ATTGTTCAAC
1451 TCCATCATGT TTCCGACCAT CTTCAGCCTG GCCTCCGAAG GGCTCGGCGA
1501 ACGGGCCGCC GAGGGCTCGG GCCTGATCTG CTGCGCCATC GTCGGCGGGC
1551 CGATCGTTCC GCCGCTCACC GGGTTCGCCG CCGATCTGTC GACGCTCTCC
1601 CTGGCGCTGG CCGTTCCGGC CATCTGCTAC GCCGGCATCG CCTCCTACGG
1651 CTGGTACGCA CGCCGTCCGC ACCTGGCGAG CTGATCGCGA AGCCACCGTT
1701 CTCTCCCTGC CGTTCCGGGC CGCACAGGCC CGGAATGCTG CTCCGGTCGA
1751 CGTCCCCTCC GCAGCCAGCG ACGATGCACG GTATCTTCCG TATCGTCCCG
1801 CCCCAGCGTC GGACCGCCCG CCAGGTCCAA ATCCCGTCAT TCACCCGATA
1851 CGAGCCATCA CGCCATGCGC CTTGCTGCA TACACCATGC CGCCATCATC
1901 TGTTCGAACT ACGAGGTTTC GAAGCGCTTC TATACCGAAT GCCTGG;

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica del locus *gluP* de *A. vinelandii*. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR se encuentra en azul. Los codones de inicio y término de la traducción de *gluP* se indican en verde y rojo, respectivamente. Los sitios *Styl* que sirvieron para eliminar un fragmento interno de *gluP* (subrayado) e insertar el cassette de resistencia a Sp^r para la generación de la mutante *gluP*::Sp^r en el plásmido pAH-03 también se encuentran indicados. El sitio de inicio de la traducción del gen (Avin04140) río abajo de *gluP* se indica en rosa y subrayado

El gen *gluP* en *A. vinelandii* se encuentra en una región del cromosoma que contiene río abajo y en la misma dirección de la transcripción un gen que codifica para una

proteína de la superfamilia de dioxigenasas y de resistencia a Bleomicina (Avin04140). Al extremo 3' de este gen y convergente a él se localiza el gen *glk-2* (Avin04130) el cual codifica para una glucocinasa, la primera reacción de modificación después del transporte de glucosa (Figura 11). Cabe mencionar que 800 pb río arriba de *gluP* se encuentra anotada un posible RNA no traducido llamado RsmZ2 involucrado en la regulación de la síntesis de alginato (Manzo, 2011).

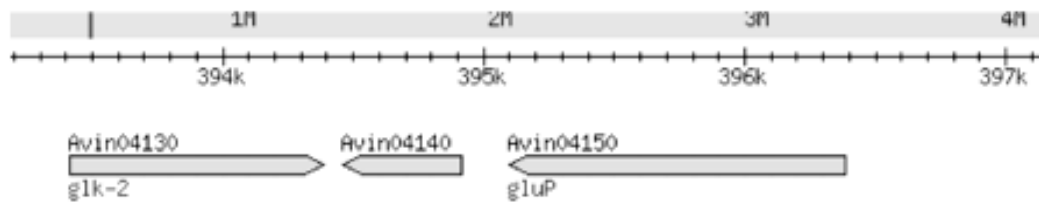


Figura 12. Locus *gluP* en *A. vinelandii*. Río abajo y en el mismo sentido de la transcripción se encuentra un gen que codifica para una dioxigenasa y resistencia a bleomicina (Avin 04140). Río abajo de este gen y en sentido contrario se localiza un gen que codifica una glucocinasa *glk-2*.

6.3 CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES AHI20 (EalgD *gluP*:: Sp^r) Y AHI 30 (E *gluP*:: Sp^r)

Con el fin de corroborar la función de la proteína GluP en la asimilación de glucosa en *A. vinelandii* se procedió a construir una mutante EalgD *gluP*::Sp^r. Como se describe en Materiales y Métodos se construyó el plásmido pAH-03 (*gluP*::Sp^r). Un fragmento de 1945 pb del gen *gluP* se amplificó por PCR utilizando los oligos gluP F y gluP R y se clonó en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®], a este plásmido se le llamó pAH-01 (Figura 13). A partir de pAH-01 se obtuvo el fragmento del gen *gluP* con la enzima *EcoRI* y se subclonó en pBluescript KS+ generando el plásmido pAH-02.

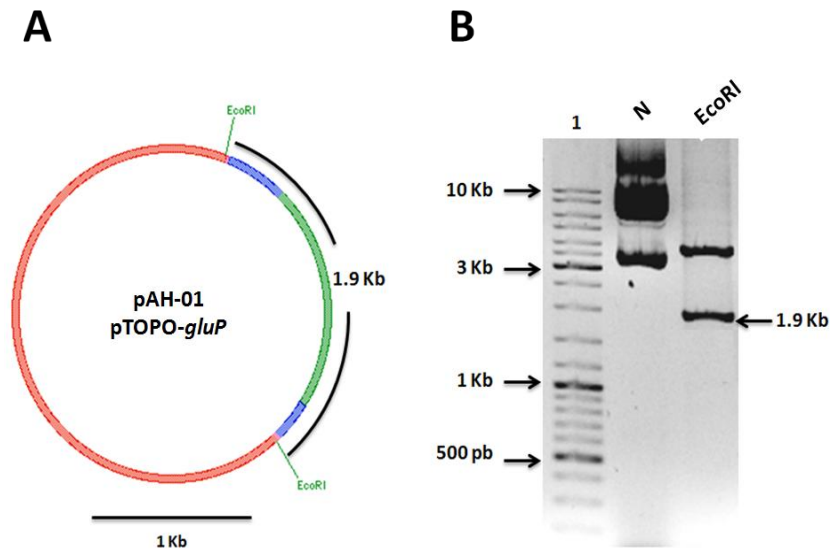


Figura 13. Panel A. Mapa del plásmido pAH-01. Panel B. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pAH-01 superenrollado (Carril 2) y su digestión con *EcoRI* (Carril 3). Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *StyI* liberando un fragmento interno de 600 pb (Figura 14) y en su lugar se clonó un *cassette* de resistencia a Sp. Este *cassette* de Sp se obtuvo a partir de la digestión con *SmaI* del plásmido pKS::Sp^r (Figura 15). De esta manera se generó el plásmido pAH-03 (Figura 16).

La mutación *gluP*::Sp^r que porta el plásmido pAH-03 se introdujo a la cepa silvestre E y a la derivada no productora de alginato *EalgD* (Km^r) por transformación tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las transformantes se sembraron en medio de selección Burk adicionado sólo con acetato como fuente de carbono (ya que se esperaba que la mutante fuera incapaz de asimilar la glucosa) y espectinomomicina como marcadores de selección.

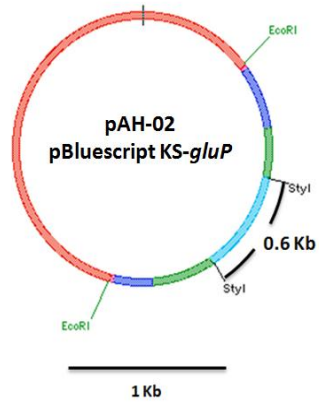
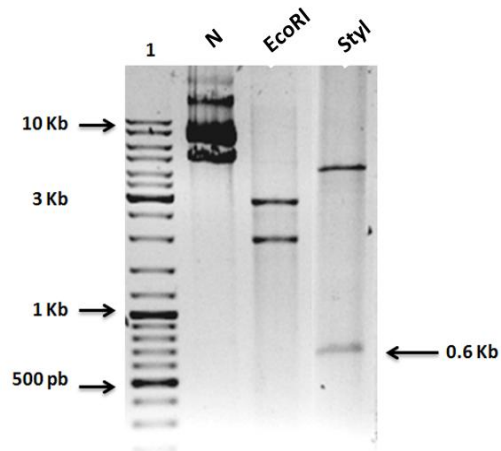
A**B**

Figura 14. Panel A. Mapa del plásmido pAH-02. Panel B. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pAH-02 superenrollado (Carril 2), su digestión con *EcoRI* (Carril 3) y con *StyI* (Carril 4). Carril 1: Marcador de peso molecular(O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

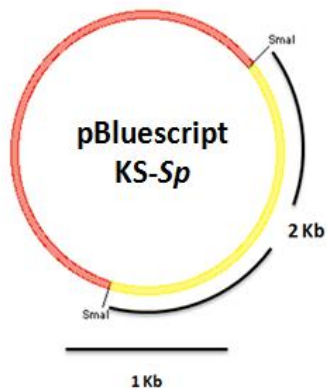
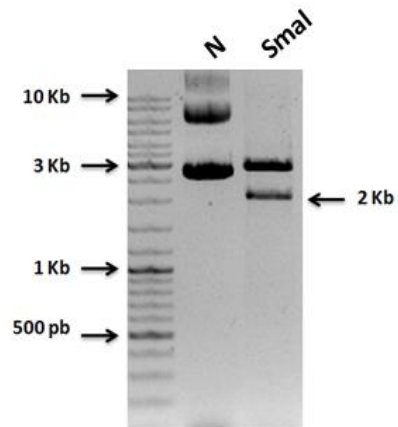
A**B**

Figura 15. Panel A. Mapa del plásmido pKS-Sp^r. Panel B. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pKS::Sp^r superenrollado (Carril 2), su digestión con *SmaI* (Carril 3). Carril 1: Marcador de peso molecular(O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

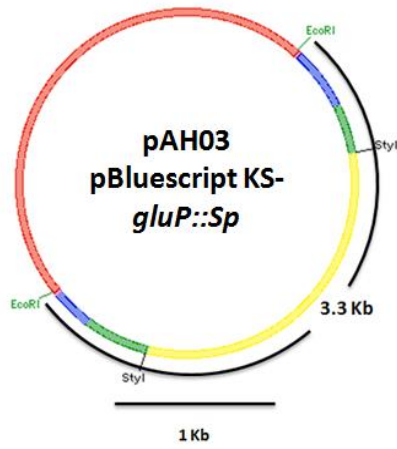
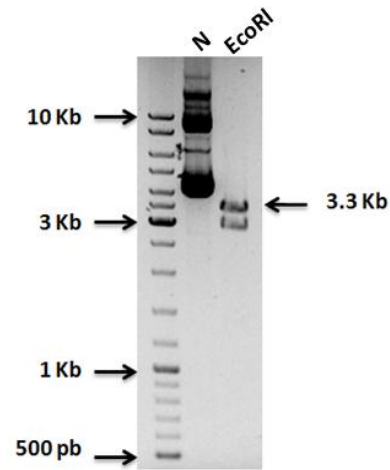
A**B**

Figura 16. Panel A. Mapa del plásmido pAH-03 el cual porta la mutación *gluP*::*Sp*^r Panel B. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pAH-03 superenrollado (Carril 2), su digestión con *EcoRI* (Carril 3). Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRUler™ DNA Ladder Mix de THERMO Scientific®)

Para comprobar que se hubiera realizado el reemplazo alélico, se intentó amplificar por PCR el fragmento de 1.9 kb que contiene el gen *gluP* con los oligos *gluP* F y *gluP* R. Como se observa en la Figura 17 sólo en la cepa silvestre se amplifica el gen *gluP* silvestre, mientras que en la mutante se infiere el reemplazo alélico ya que no amplifica el gen *gluP* silvestre, pero sí se amplifican tanto un fragmento correspondiente al gen *gluP* con el cassette de resistencia *Sp*, como el cassette de resistencia *Sp* por separado.

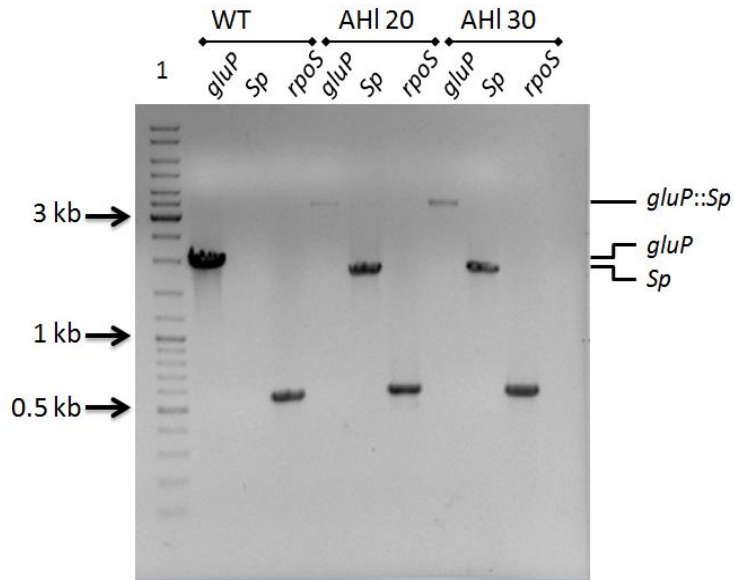


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la caracterización genotípica de las mutantes AHI20 y AHI 30. Amplificación del gen *gluP* (Carriles 2, 5 y 8), del cassette *Sp^f* (Carriles 3, 6 y 9) y del gen *rpoS* (Carriles 4, 7 y 10). Los DNA templados usados se indican sobre los carriles. Marcador de peso molecular: O`GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific® (Carril 1).

6.4 LA PROTEÍNA *GLuP* ES ESENCIAL PARA LA ASIMILACIÓN DE GLUCOSA EN *A. vinelandii*

Una vez caracterizada genotípicamente, las mutantes *gluP* tanto en el fondo silvestre como en el fondo *algD-* fueron caracterización en cuanto a su crecimiento en glucosa como única fuente de carbono. Esta caracterización consistió en una cinética de crecimiento en medio mínimo Burk adicionado con glucosa, esto para investigar si la mutación *gluP::Sp^f* afecta la asimilación de glucosa. El crecimiento en el fondo genético *algD-* se realizó a través de la densidad óptica, mientras que en el fondo de la cepa E, productora de alginato, se siguió a través de cuantificación de proteína por el método de Lowry (Figura 18).

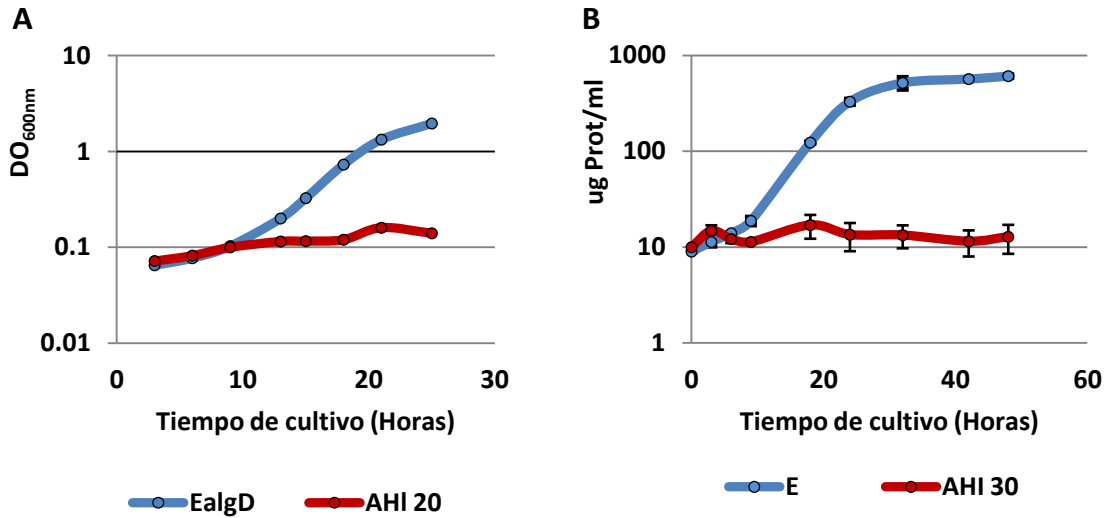


Figura 18. Cinética de crecimiento de la mutante *gluP* en el fondo silvestre E (panel A) y en el fondo de la mutante *algD* (Panel B) en medio Burk adicionado con 50 mM de glucosa como única fuente de carbono.

Como se observa en la Figura 18, se abatió el crecimiento en las mutantes *gluP*, tanto en el fondo de la cepa silvestre como en el fondo *algD*. Dado que los cultivos se llevaron a cabo en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, este resultado infiere que la mutación afecta la asimilación de glucosa.

El construir la mutante *gluP* en el fondo de la cepa silvestre E tiene doble fin. El primero es estudiar la función del gen sin modificar la producción de alginato, evitando afectar los flujos metabólicos y el segundo es facilitar la posterior complementación y selección con el plásmido pSRK-*gluP* ya que contiene un cassette de resistencia a Km^r al igual que la cepa *EalgD*.

6.5 COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTANTE AHI 30 (E *gluP*:: Sp^r)

Con fines de complementación decidimos clonar la misma región de 1.9 kb que incluye al gen *gluP* que se usó para construir el plásmido pAH 01 (Figura 12) en el plásmido inducible pSRK-Km^r. Este fragmento se amplificó con la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase y posteriormente se clonó en el vector pJET 1.2. El

fragmento *gluP* de 1.9 kb se liberó con una doble digestión BglII y XhoI. Una vez purificado, se subclonó en el plásmido inducible pSRK-Km^r (Kahn *et al* 2008; ver Materiales y Métodos) obteniéndose el plásmido pSRK-*gluP*. Este plásmido se conjugó a la cepa E *gluP*::Sp para fines de complementación Figura 19).

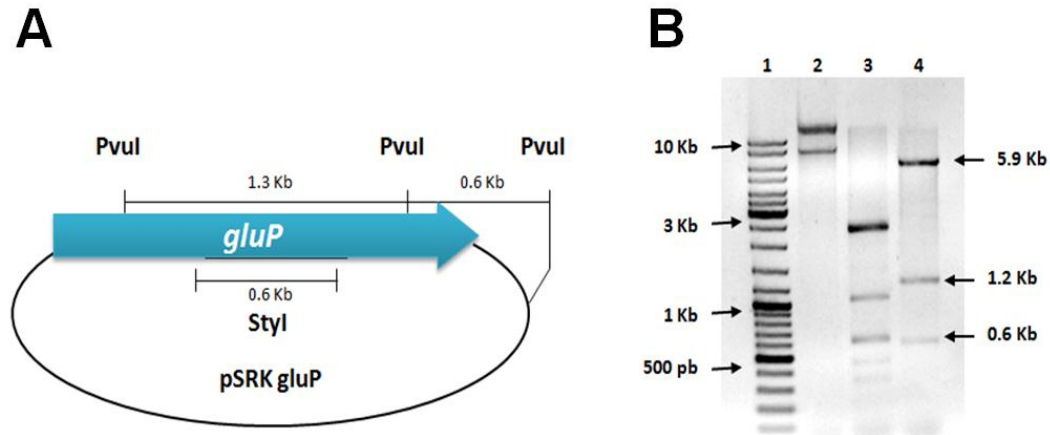


Figura 19. Panel A. Mapa del plásmido pSRK-*gluP*. Panel B. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pSRK-*gluP* superenrollado(Carril 2), digerido con *StyI* (Carril 3) y digerido con *PvuI* (Carril 4) Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

En la figura 19 se muestra el fenotipo de crecimiento en glucosa de la cepa mutante AHI 30 y la complementada con pSRK-*gluP*. Al cultivar en medio sólido Burk con glucosa como única fuente de carbono e inducida con IPTG 1 mM, sólo la cepa complementada AHI 30/pSRK-*gluP* muestra un crecimiento claro. Esto indica que el gen *gluP* codifica el transportador más importante de glucosa, si no es que el único en *A. vinelandii* Figura 20).

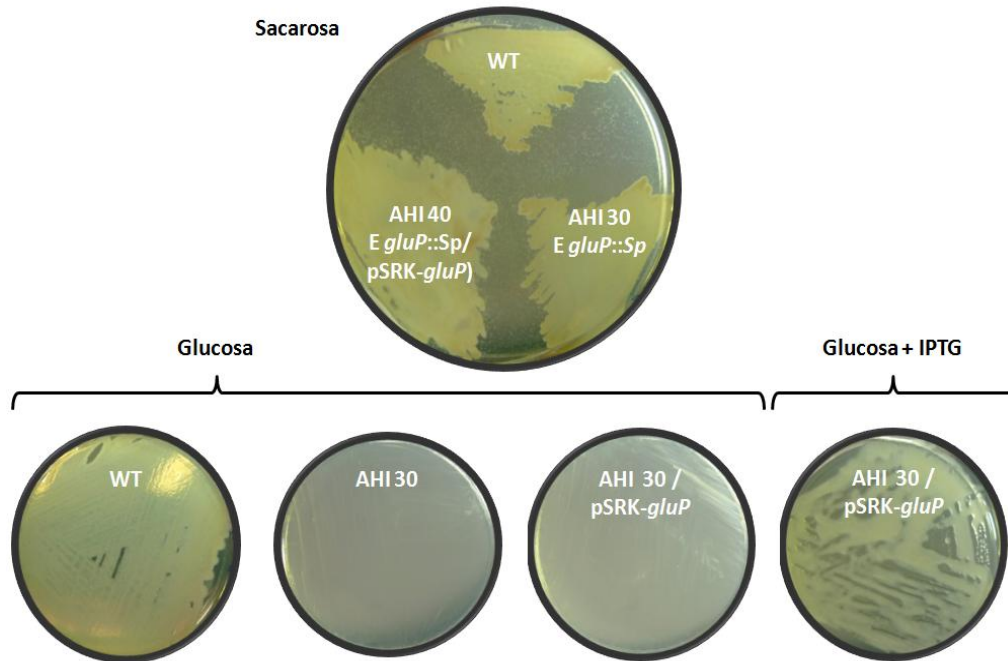


Figura 20. Crecimiento en medio Burk-Glucosa y Burk Sacarosa de las cepas E, AHI30 y AHI30 /pSRK-*gluP*. Se observa que en glucosa como única fuente de carbono el crecimiento de la cepa AHI30 se abate mientras que su complementación restaura el crecimiento en glucosa.

6.6 EFECTO DE LA MUTACIÓN *gluP*::*Sp*^r SOBRE EL CRECIMIENTO EN OTRAS FUENTES DE CARBONO.

Como ya se ha mencionado algunos transportadores de glucosa de la familia MFS tienden a ser inespecíficos, por lo cual decidimos probar la asimilación de otros azúcares como la fructosa o el disacárido sacarosa.

En presencia de fructosa la mutante *gluP*::*Sp*^r AHI20 mostró un retraso en el crecimiento con respecto a la cepa parental *EalgD*, pero al final del cultivo ambas cepas mostraron una densidad celular similar. En el caso del crecimiento en sacarosa, la mutante AHI20 presenta una fase *lag* que se prolonga hasta las 12 horas de cultivo después de la cual mostró un crecimiento franco alcanzando densidades celulares similares a los de la cepa parental. La mutante *gluP* también

presenta un ligero retraso en el crecimiento en presencia de acetato como única fuente de carbono aunque no es tan pronunciado como en el consumo de azúcares. Llama la atención este comportamiento lo que hace necesario hacer mas replicas biológicas para averiguar si esta diferencia es significativa.

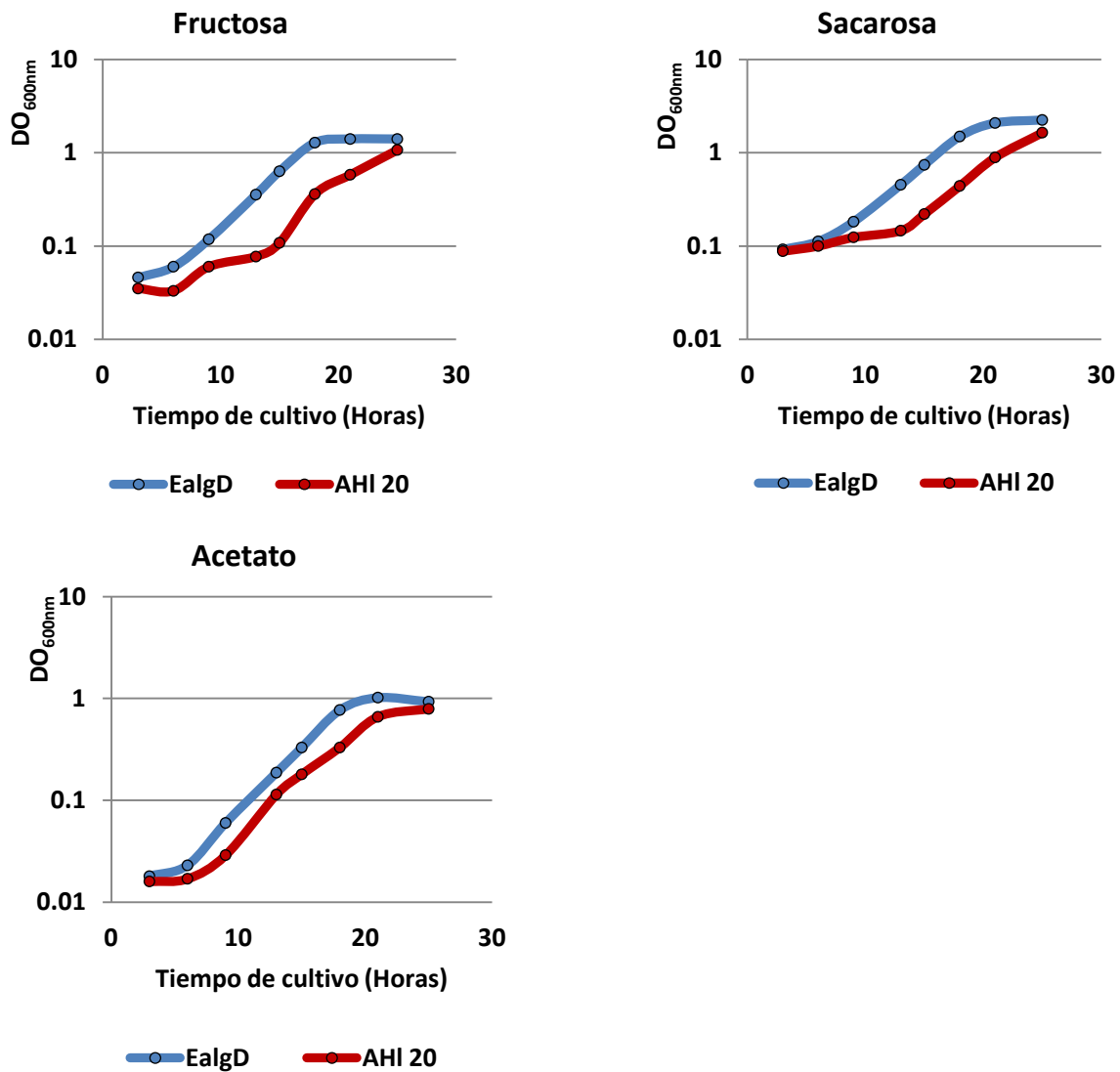


Figura 21. Cinética de crecimiento de la cepa parental EalgD y de su derivada *gluP*: Sp^r AHI20 en medio mínimo Burk adicionado con fructosa, sacarosa o acetato como única fuente de carbono.

Si bien la mutación *gluP::Sp^r* tuvo un efecto sobre la asimilación de fructosa y sacarosa el efecto claro fue en la utilización de glucosa. Estos resultados sugieren fuertemente que el gen *gluP* es necesario para el metabolismo de glucosa. Es necesario investigar si, efectivamente, el transporte de glucosa está afectado en la mutante AH120 de *A. vinelandii*.

6.7 LA SOBREENEXPRESIÓN DE Crc AFECTA NEGATIVAMENTE EL CRECIMIENTO EN GLUCOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO.

Como ya se describió anteriormente el gen *gluP* contiene un sitio putativo de unión a Crc, por lo que una sobreexpresión de Crc podría afectar el consumo de glucosa y por tanto el crecimiento. Por tal razón se investigó el efecto de la sobreexpresión en *trans* de Crc sobre el crecimiento de la cepa silvestre E en medio mínimo Burk suplementado con glucosa como única fuente de carbono. Se utilizaron las cepas E que contienen el vector inducible por IPTG pSRK-Km^r, ya sea vacío como control o el que porta el gen *crc*, pSRK-Crc (Quiroz Rocha 2012). Se realizó una cinética de crecimiento en medio Burk-glucosa la cual se grafica en la Figura 22. Se observó claramente un retardo de aprox. 20 h en el crecimiento de la cepa E/pSRK-Crc, solo en presencia del inductor IPTG. Este resultado indica claramente que Crc tiene un efecto negativo en el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono.

Si bien el efecto negativo no se observa desde las primeras horas, esto tal vez se deba a que al principio la concentración de Crc producto de la inducción con IPTG es aún insuficientemente y por lo tanto su actividad puede ser antagonizada por CrcZ.

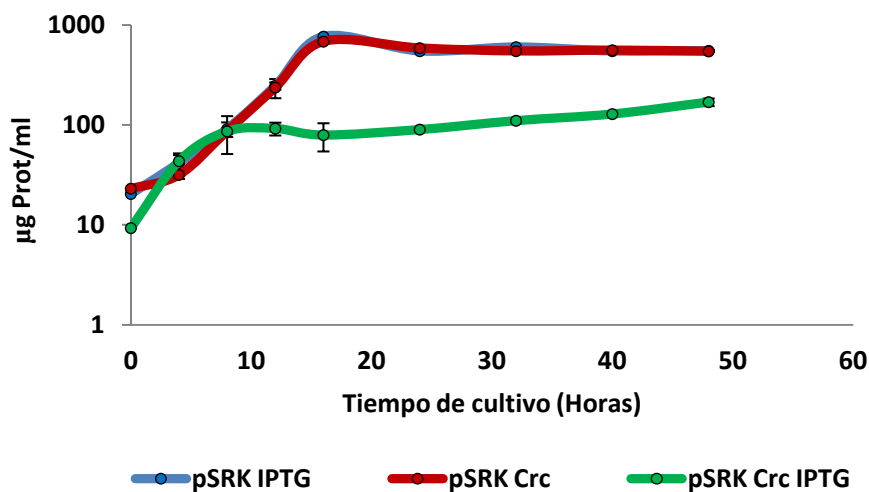


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de la proteína Crc en el crecimiento en glucosa. La cepa silvestre E porta el plásmido pSRK-Km^r vacío o con el gen *crc* (pSRK-Crc) clonado bajo el promotor inducible con IPTG.

6.8 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *gluP*.

Para investigar si la expresión de *gluP* se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes CbrA/CbrB nos propusimos evaluar los niveles de transcripción de *gluP* a través de fusiones transcripcionales de la región reguladora de *gluP* con el gen reportero *gusA*, utilizando el plásmido pUMA Tc *gusA* T (Figura 23). Estos plásmidos fueron construidos por el grupo del Dr. Miguel Castañeda de la BUAP y fueron diseñados para recombinar con el gen *melA*, que codifica para una α -glucosidasa y que solo se expresa en presencia de melobiosa. Esta zona del genoma de *A. vinelandii* se considera “neutra” ya que no afecta la fisiología de la bacteria y por lo tanto se ha escogido como sitio para la construcción de fusiones cromosomales.

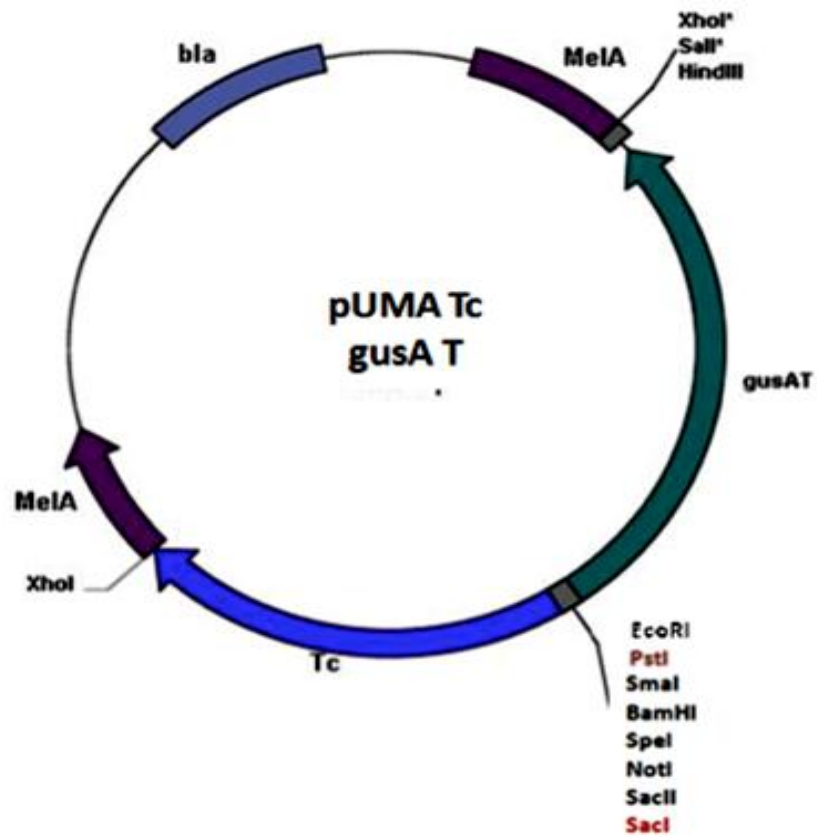


Figura 23. Mapa del plásmido pUMATc gusA T.

A

	SacI	gTraF	oligo		EagI
1	<u>GAGCTCCCAT</u>	<u>GTTC</u>	<u>CCCGAGA</u>	<u>CTTCGAGCCG</u>	CCGACTGCCG CCGCGCCTCG
51	GCCGCCGCTC	ATTCGCCCGG	AAAAACGCCG	GTTGCGCGCC	GGGACATTCC
101	CAGCAGTACC	CGGACGGCAC	TCCATACGGC	GACRAGCCCG	GAGCCACGGC
151	GGATCGTTCC	GGTTGCGGCC	CGGAACAGG	CCGGCGCAGC	CGGCTAGGGT
201	<u>CTGTTAACTC</u>	<u>TATTTACTAG</u>	<u>ARTGCAGCAA</u>	<u>AACAGTGTTG</u>	<u>AGACCGAGTG</u>
251	<u>CCATGCAACT</u>	<u>GACCGCCGAG</u>	<u>CAATTCARAC</u>	<u>AAATCGAAGG</u>	<u>CTTGTTGCCG</u>
301	<u>CGCCACGCG</u>	<u>GCARTGTACG</u>	<u>CCTGGGCARC</u>	<u>CTGCAGTAC</u>	<u>TCACGCCAT</u>
351	<u>CCTGTATGTG</u>	<u>GCAGCCACG</u>	<u>GCTGCAARTG</u>	<u>GCGCGCCTG</u>	<u>CCCGACGCT</u>
401	<u>ATGGCAACTG</u>	<u>GCACCCGTC</u>	<u>TACMCCCGCA</u>	<u>TGATGCGCTG</u>	<u>GARCAAGCC</u>
		PvuI			
451	<u>GGSGTGCTCG</u>	<u>ATCGTGTTTT</u>	<u>CGACAGTTG</u>	<u>CAGCGCCMGC</u>	<u>GACTTATGCA</u>
501	<u>GATACSCATC</u>	<u>GAGGCCATCA</u>	<u>GCCTCSACTC</u>	<u>CAGTATCGTG</u>	<u>AGGTTGCATC</u>
551	<u>CGGATGGTAC</u>	<u>GGGCGCGCGA</u>	<u>AAAAAACGG</u>	<u>TCCTCAGCC</u>	<u>CTCGTCCGA</u>
601	<u>GCCSCGGSGG</u>	<u>STGGAGCMCC</u>	<u>AACTGCATY</u>	<u>TGGTTGCCGC</u>	<u>GGATGATCGC</u>
651	<u>ARTGTGCTGA</u>	<u>CCTGGAGCCT</u>	<u>GACGGCGGGG</u>	<u>CAGGCTGGCG</u>	<u>ATGCCCCCGA</u>
701	<u>AGGCAGGCGC</u>	<u>TTGATTCAAG</u>	<u>CGTTGGGACC</u>	<u>TCACCACGGG</u>	<u>CTCGTGGCTC</u>
751	<u>TGTTGATGGA</u>	<u>CAGTGCATAC</u>	<u>CAGACARTG</u>	<u>CCACGCGCGA</u>	<u>GCTGGCTTGC</u>
801	<u>GGCCTGGGTT</u>	<u>TCGTGCCGGT</u>	<u>GGTGCCACCC</u>	<u>ACCCCCGGC</u>	<u>GGCGCCAGCC</u>
851	<u>GTGGGAGTAT</u>	<u>GACAAACCGC</u>	<u>TCTATCGCCG</u>	<u>ACGCACGGT</u>	<u>ATCGAGCGGC</u>
					HindIII
901	<u>TGTTTCGACG</u>	<u>ACTCAGGCC</u>	<u>TGGCGCCGCG</u>	<u>TGTTCCGCGG</u>	<u>CTACGACAG</u>
951	<u>CTTGACCTCA</u>	<u>TGTACGCCGC</u>	<u>CTTCGTCACT</u>	<u>GTGGCTCTTA</u>	<u>TCGCTGAGGC</u>
1001	<u>CCYVMCGGTA</u>	<u>GTGTTAMCAG</u>	<u>GCCCTAGTGA</u>	<u>AACGATTCAT</u>	<u>CAATAGCTGG</u>
		-35		-10	
1051	ACCTCAGCAC	<u>TTGTCAAGA</u>	AGARTCCAGC	<u>CACTAAGGTA</u>	GCGCTGTCTT
1101	AGCGATCTTC	CCTTATTCCC	CCAGGAGCCC	GCGGACCGCT	CCGCAGTGAA
1151	ATCCAGGCGG	CAATCGACAA	AACACACAG	CCGGACGGCA	GCAGACTCT
1201	CCGCTCGACA	ATGGGCTTCA	AGCCCGCGAG	ACAGCGCCGT	CCACGCATCG
1251	AGGTATCTTA	TGCGTTCACT	CAGCGCTGCC	CACCACGGCC	AGTTCCGCCT
1301	TGCCTGGCCA	TTCCACGGC	ACAGGGCGGC	CACTCTCGGA	CGGCGAAGAC
1351	ACARTCCCCC	CCTGCGGCC	CAGCGTACCG	ATATCCGTC	TTGAGGCCGG
1401	GCCGAGGCCG	GCTGACGCC	TCCTGCCGCG	AGCGGCGAAG	GCGGCTACCA
1451	CCGGCCTCGC	CATTCCGGCA	AGACACAAC	CCCGGATCGC	CACCGGARCC
					PvuI
1501	GCCTCAGGT	ATCCCGAAC	GGCAGCGAG	CATTCCGACA	CGATCGGATG
1551	CCTCCTCTCG	ACAAACCTTC	ACCGGCTAGA	GACAGCGCCG	TCCTGCCAC
					Cre
1601	GGCAGGGGCC	TCTCCTTGAA	GCACARTCA	<u>CAACCA</u> AGAGG	AAATGCACGA
	<i>gluP</i>		<i>gluP-Trad oligo</i>		
1651	<u>TGATGACGAC</u>	<u>GGTAGAACG</u>	<u>ACCTTC</u>		

B

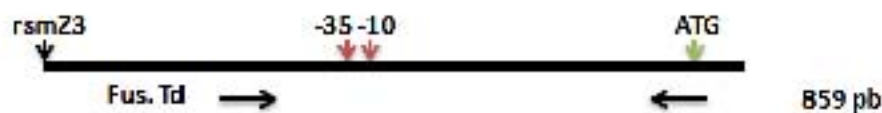


Figura 24. Región río arriba del gen *gluP* a partir de la secuencia del genoma de la cepa DJ de *A. vinelandii*. A) Secuencia nucleotídica de la región río arriba de *gluP*. El codón de inicio de *gluP* se encuentra en verde y el probable promotor sigma 70 (identificado en la página de SoftBerry: (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) se encuentra subrayado. El sitio probable de reconocimiento de la proteína Crc se encuentra indicado en rojo y subrayado. En azul se muestra la ubicación de los oligonucleótidos diseñados. La secuencia de inserción localizada en el genoma de la cepa E se indica en rojo B) Mapa de la región amplificada por PCR para la construcción de la fusión transcripcional.

La región río arriba de *gluP* se amplificó con la polimerasa comercial Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes). Como se puede observar en la Figura 25 el tamaño del producto de PCR fue de 1.7 kb y no corresponde a las 800 pb de bases esperado. Este resultado indica que en nuestra cepa de estudio, la cepa E, existe una inserción de aproximadamente 800 pares de bases que no se encuentra reportada en la base de datos del genoma de la cepa DJ.

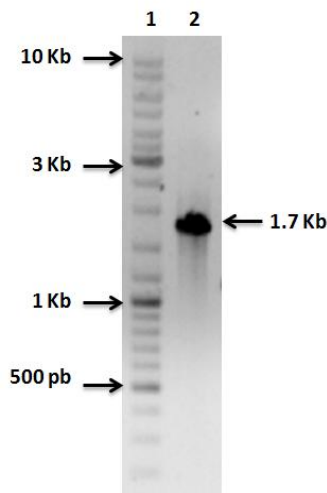


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del fragmento de 1.7 kb de la región reguladora de *gluP* de la cepa silvestres E (Carril 2). Carril 1: Marcador de peso molecular (O´GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

Dado que el fragmento amplificado era mayor al esperado, se analizó por secuenciación. Se obtuvo la secuencia nucleotídica de todo el fragmento amplificado de 1.7 kb y se identificó una secuencia de inserción de 800 pb (la cual se indica en rojo en la Figura 24) río arriba de *gluP*. Al realizar un BLAST se encontró que corresponde a una transposasa. Vale la pena mencionar que esta secuencia

nucleotídica se encuentra reiterada 7 veces en distintas regiones del genoma de *A. vinelandii*. El fragmento de 1.7 kb se clonó en el vector pJET 1.2 generando el plásmido pAH-04 (pJET 1.2-*pgluP*). Se corroboró la correcta construcción realizando una doble restricción con las enzimas *SacI-PstI* las cuales liberan el fragmento de 1.7 kb del vector (los oligonucleótidos poseen secuencias de reconocimiento para estas enzimas con el fin de clonaras en sentido correcto en el vector) (Figura 26).

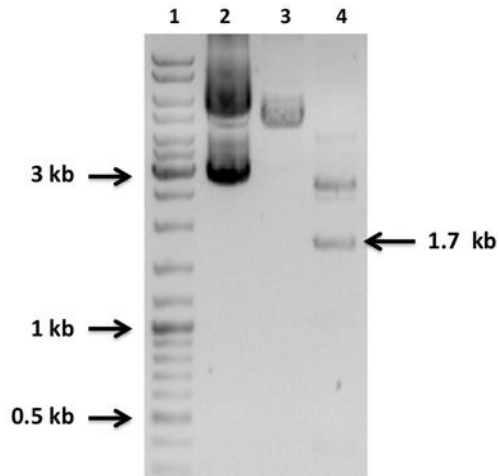


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pAH-04 superenrollado. (Carril 2), digerido con *SacI* (Carril 3) y con *SacI* y *PstI* (Carril 4). Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®).

El plásmido pUMA Tc *gusA* T fué digerido con las enzimas *SacI* y *PstI* y defosforilado con la enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase. Roche). Posteriormente el fragmento de 1.7 kb liberado con las enzimas *SacI* y *PstI* del plásmido pAH-04 fue clonado en este vector con la enzima T4 DNA Ligase (Roche). La ligación fué transformada en la cepa de *E. coli* DH5 α quimiocompetente. Las candidatas se seleccionaron en medio LB Tc₃₀. Se identificó la clona correcta, mediante amplificación por PCR del fragmento de 1.7 kb, a partir de suspensiones de 5 colonias candidatas a la vez (Figura 27).

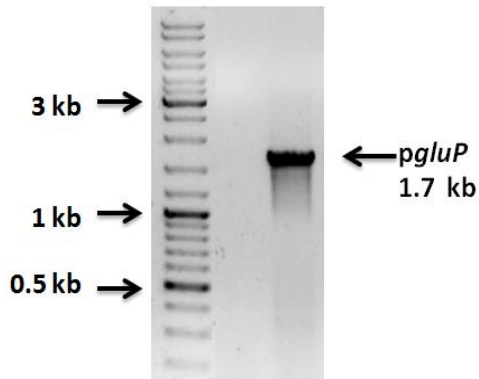


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de 1.7 kb de la región río arriba del gen *gluP*. Se muestra el resultado del PCR en donde se utilizó

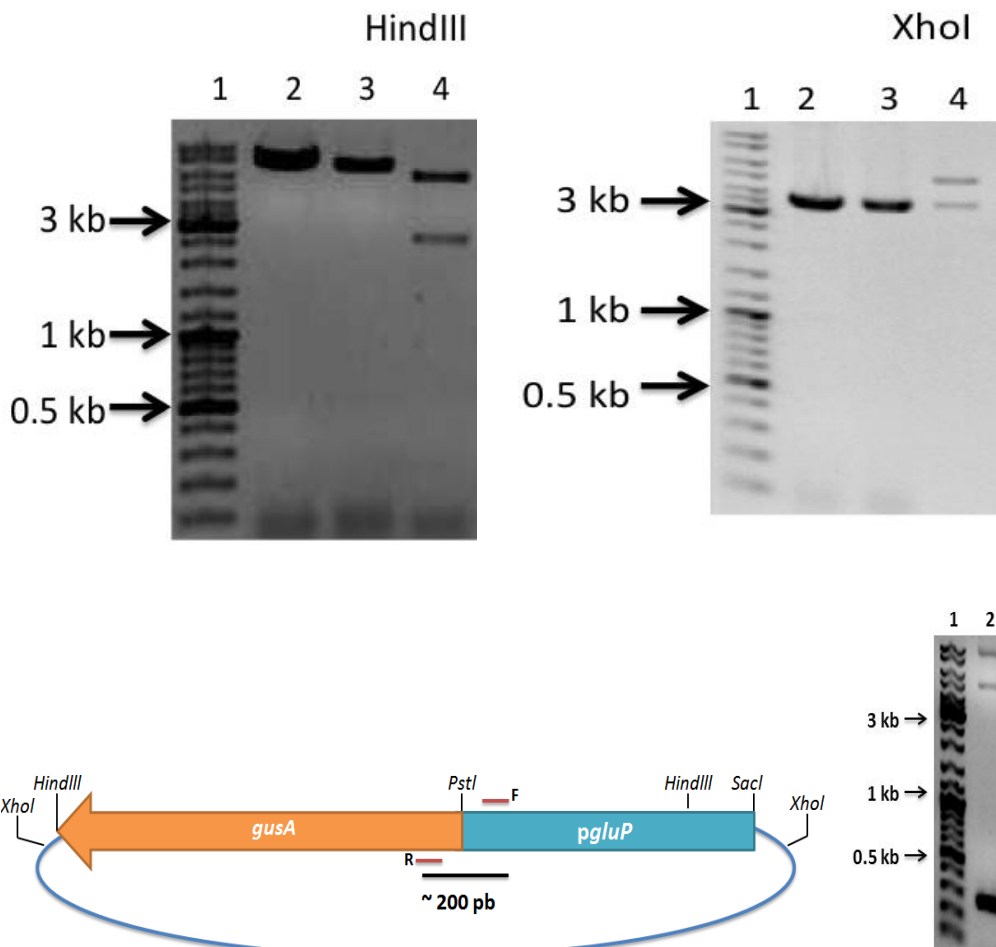


Figura 28. Patrón de restricción de las candidatas pAH-05. Panel Superior Izquierdo: Restricción con la enzima *XhoI*. Panel Superior Derecho: Restricciones con la enzima *HindIII*. Carriles 2-4. Candidatas pAH05. Panel Inferior Izquierdo. Mapa de restricción del plásmido pAH-05 y ubicación de los oligonucleótidos Fus Gus

F y Fus Gus R. Panel Inferior Derecho. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de 200 pb utilizando los oligonucleótidos Fus Gus F y Fus Gus y como DNA templado el pAH-05 (Carril 2). Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRUler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®).

De aquellos grupos que mostraron la banda correspondiente al fragmento de 1.7 kb se purificaron los plásmidos y se digirieron con las enzimas *XhoI* y *HindIII* (Figura 28) en donde esperábamos dos bandas de aprox. 3.5 y 4 kb. Así, se identificó el plásmido correcto al que se le llamó pAH-05 (pUMA Tc *gusA* T-*pgluP*) Para complementar éste análisis se diseñaron los oligos Fus-Gus F y Fus-Gus R, los cuales amplifican una región de 200m pb la cual comprende 100 pb del extremo 3' del fragmento de 1.7 kb y 100pb de la región 5' del gen reportero *gusA* (Figura 29).

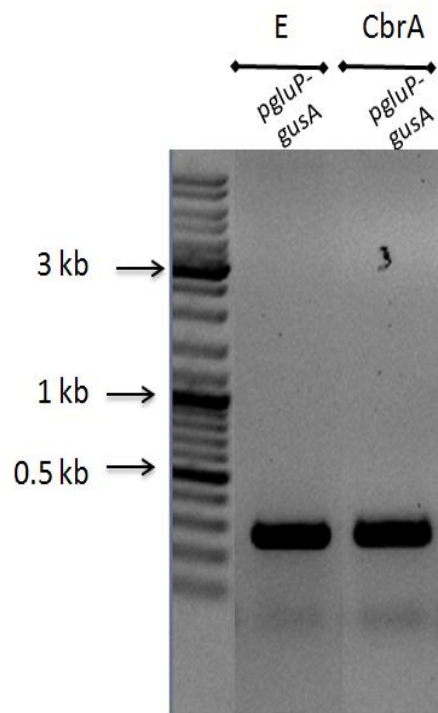


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región de 200pb de la fusión transcripcional *pgluP-gusA* usando como templado el DNA cromosomal de las transformantes derivadas de la cepa silvestre E (Carril 2) y de la mutante *cbrA* (Carril 3). Carril 1: Marcador de peso molecular(O'GeneRUler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

Como se muestra en la Figura 29 se comprobó la correcta construcción del plásmido pAH-05 que lleva en fusión transcripcional la región reguladora de *gluP* con el gen reportero *gusA* (*pgluP-gusA*). Este plásmido se utilizó para transformar células competentes de la cepa silvestre E y de su derivada *cbrA*. Se seleccionaron transformante resistentes a Tc₁₅ y posteriormente se sembraron en Tc₃₀. Finalmente para comprobar que dichos plásmidos hayan recombinado en el

cromosoma de las candidatas seleccionadas, nuevamente se amplificó el fragmento de 200 pb que comprende la fusión transcripcional *p_{gluP}-gusA*.

De esta manera se obtuvieron las cepas que portan la fusión transcripcional en el fondo de la cepa E silvestre (AHI40) o de la cepa *cbrA::Sp^r* (llamada AHI50). Se realizaron cinéticas de expresión de β -glucuronidasa utilizando las cepas AHI40 y AHI50 en medio Burk sacarosa para investigar si la HK CbrA controla la expresión de gen *gluP*. Los resultados se muestran en la Figura 30.

Los niveles de actividad de β -glucuronidasa nos muestran que la expresión de *gluP* está reducida hasta 15 veces en la mutante *cbrA* Figura 30 a todo lo largo de la curva de crecimiento. Aunque las barras de desviación estándar en la cinética de la cepa AHI40 indican que no hay diferencia significativa entre los diferentes puntos, la diferencia es clara entre la AHI40 y la AHI50. Esto indica claramente que la HK CbrA posee un efecto positivo en la expresión de este gen. La expresión de *gluP* en el fondo de la cepa *cbrA* también se trató de evaluar en glucosa como única fuente de carbono, sin embargo esta mutante mostró un pobre crecimiento en medio Burk glucosa 50 mM lo que impidió su análisis.

Aún cuando se utilizó una fusión transcripcional para rastrear los niveles de expresión de *gluP* es probable que al mismo tiempo se esté detectando el efecto de la proteína Crc sobre la unión al mRNA *gluP* y la inhibición de su traducción, ya que el fragmento del promotor de *gluP* evaluado contiene los sitios putativos de unión de la proteína Crc. En estos sistemas de regulación post-transcripcional estas proteínas de unión a RNA desestabilizan el mensajero acelerando su degradación (Rojo, 2010). En concordancia con este hallazgo fue el hecho de que al sobre-exresar a Crc en *trans*, en el fondo de la cepa silvestre E, se redujo el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono Figura 21. Sería deseable investigar si bajo estas condiciones de expresión en *trans* de Crc se abaten los niveles de expresión de *gluP* utilizando la fusión transcripcional *p_{gluP}-gusA*.

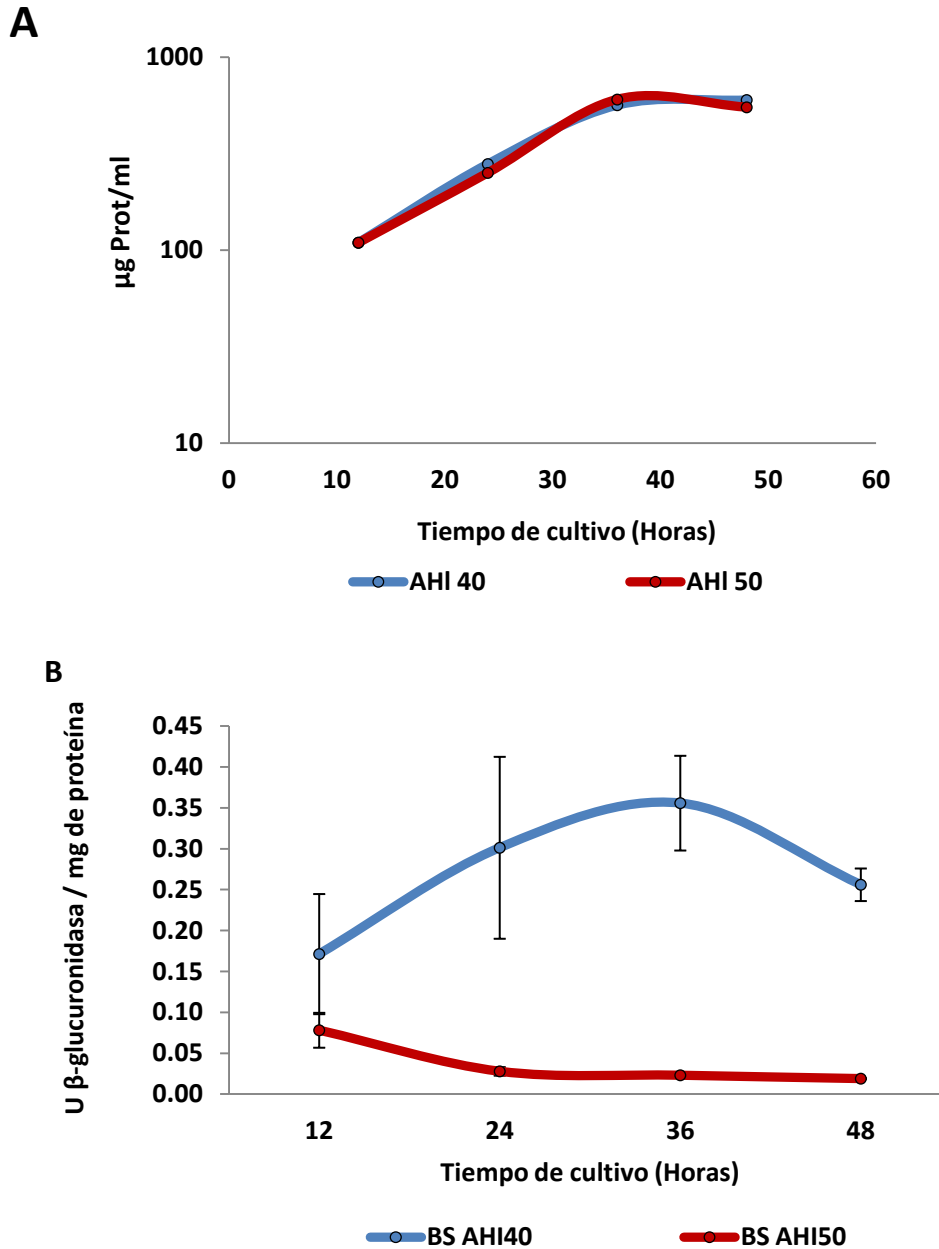


Figura 30. Cinética de expresión del gen *gluP* A) Cinética de crecimiento de las cepas AHI40(E *pgluP-gusA*) y AHI50 (*cbrA pgluP-gusA*) en medio Burk sacarosa 50 mM. B) Cinética de actividad de β -glucuronidasa de las cepas AHI40 y AHI50 crecidas en medio Burk sacarosa.

En este trabajo se intentó evaluar si el efecto de CbrA sobre la expresión de *gluP* ocurre a nivel traduccional, para este fin se construyeron fusiones traduccionales del promotor de *gluP* con el gen reportero *gusA* (descrito en Anexo 1); sin embargo, debido probablemente a la baja expresión de *gluP* no se detectaron niveles cuantificables de la actividad β glucuronidasa lo que nos impidió una evaluación directa del efecto de CbrA sobre la traducción del gen *gluP* (Anexo 1). Si bien los resultados del presente proyecto nos ayudan a concluir que sí existe una regulación de la expresión de *gluP* por la HK CbrA no podemos, hasta este momento, saber a qué nivel se ejerce este control. Por este motivo creemos necesario construir fusiones transcripcionales sin el sitio putativo de unión de Crc, de esta manera sabremos si el efecto es a nivel de transcripción exclusivamente o a nivel post-transcripcional.

Una de las preguntas que quedan pendientes por contestar es la razón por la que, en crecimiento diáuxico Acetato-Glucosa, la mutante *cbrA* es incapaz de crecer en glucosa. Los resultados del presente estudio sugieren que tal vez en el crecimiento diáuxico la Kinasa Histidinica CbrA es necesaria para la expresión del sRNA CrcZ y la liberación de la represión catabólica que ejerce la proteína Crc sobre la traducción del gen *gluP*. La propuesta es que, una vez consumido el acetato, en ausencia de CbrA no se pueda liberar la represión catabólica que ejerce el acetato sobre el consumo de glucosa, debido a un abatimiento en la expresión de sRNA CrcZ lo que resulta en una alta actividad de Crc y un bloqueo en la traducción del mRNA de *gluP*. En este contexto, sería conveniente realizar una cinética de expresión del gen *gluP* en el crecimiento diáuxico Acetato-Glucosa para determinar si en la cepa silvestre E la expresión de *gluP* está reprimida en presencia de acetato y si esta expresión se des-reprime una vez consumido el acetato; así mismo surge la necesidad de investigar si en la mutante *cbrA* la expresión de *gluP* continúa reprimida aún en presencia de glucosa.

7 CONCLUSIONES

- GluP es el principal transportador de glucosa ya que una mutante en *gluP* es incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono
- La sobreexpresión de Crc tiene un efecto negativo en el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono muy probablemente debido a inhibición de la traducción de *gluP*.
- La HK CbrA ejerce un efecto positivo sobre la expresión de *gluP*, dicho efecto muy probablemente sea a nivel traduccional mediante el control de la actividad de Crc.

8 PERSPECTIVAS

- Confirmar la actividad del GluP a través de experimentos de transporte de glucosa
- Medir el nivel expresión del gen *gluP* en crecimiento diáuxico acetato-glucosa
- Observar el efecto de la sobre-expresión de la proteína Crc en el patrón de expresión de *gluP* a través de fusiones transcripcionales (Sin los sitios putativos de unión a Crc) y fusiones traduccionales.

9 LITERATURA CITADA

Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160(1):63-7.

Abdou L, Chou HT, Haas D, Lu CD. 2011. Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 193(11):2784-92.

Conway T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Lett* 1:1-27

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. 1980 Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(12):7347-51.

Espin G. 2003. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Microbios en línea. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. www.ibt.unam.mx

Essenberg RC, Candler C, Noida SK (1997) *Brucella abortus* strain 2308 putative glucose and galactose transporter gene: cloning and characterization. *Microbiology* 143: 1549–1555.

George SE, Costenbader CJ & Melton T. 1985. Diauxic Growth in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* Nov 866-871

Görke B, Stülke J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6(8):613-24..

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4):557-80.

Hernandez-Ortiz A. 2011. Función de la cinasa histidínica CbrA en el metabolismo de glucosa en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Mexico.

Jahreis K, Pimentel-Schmitt EF, Brückner R and Titgemeyer F. 2008, Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 891–907.

Kennedy C, P Rudnick, T MacDonald and T Melton. 2005. Genus *Azotobacter*, p. 384-401. In G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, part B. Springer-Verlag, New York, NY.

Kennedy C, R Gamal, R Humphrey, J Ramos, K Brigle and D Dean. 1986. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol Gen Genet.* 205:318-325.

Sharik R. Khan, Jennifer Gaines, R. Martin Roop, II, Stephen K. Farrand. 2008. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti Plasmid Quorum Sensing. *Appl and Env Microbiol.* p. 5053–5062.

Li W & Lu Chung-Dar. 2007. Regulation of Carbon and Nitrogen Utilization by CbrAB and NtrBC Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2007 189:15 5413-5420.

Manzo J. 2011. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol Biotech.* 21(3-4):147-59.

Mesak LR, Mesak FM, Dahl MK. 2004. Expression of a novel gene, *gluP*, is essential for normal *Bacillus subtilis* cell division and contributes to glucose export. *BMC Microbiol.* 30;4:13

Moreno R, Fonseca P and Rojo F. 2012. Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol.* 83: 24–40.

Moreno R, Martinez-Gomariz M, Yuste L, Gil C, Rojo F. 2009. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a

complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics*. 9 (11):2910-28

Nishijyo T, Haas D, Itoh Y. 2001. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 40:917-31.

Nishijyo T, Park SM, Lu CD, Itoh Y, Abdelal AT. 1998. Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 180:5559–5566.

Quiroz-Rocha E. 2012. Estudio de la Posible Función del Sistema de Regulación Post- transcripcional Crc/CrcZ en la Síntesis de Alginato en *Azotobacter vinelandii* Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM. Datos no publicados

Rehm BH, Valla S. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 48 (3):281-8. Review

Rojo F. 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev*. 34:658-84.

Sadoff HL. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev*. 39(4):516-39

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory

Serrano J. 2010. Efecto del sistema de dos componentes CbrA/CbrB sobre la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.

Stanier R, Ingraham J, Wheelis M & Painter P. 1996. Eubacterias aeróbicas Gram-negativas. En: *Microbiología*. Editorial Reverté. España. 443-447 pp.

Setubal CJ, Dos santos P, Goldman BS, Ertesvag H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida FN, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Goodner B, Hellner B, Hernyez J, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, OLCarroll IP, Paulsen, I., Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin S, Stricklin SL, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wallin B, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R & Wood, D. 2009. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *J Bacteriol.* 191:4534-45.

Sonnleitner E, Abdou L, Haas D. 2009. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci.* 106:21866-71.

Tauchert K, Jahn A, Oelze J. 1990. Control of Diauxic Growth of *Azotobacter vinelandii* on Acetate and Glucose. *J Bacteriol.* 172:6447-51.

Anexo

Construcción de la fusión traduccional *gluP-gusA*.

Las fusiones traduccionales *pgluP-gusA* se construyeron de la misma manera que la fusión transcripcional *pgluP-gusA*, pero esta vez usando el vector pUMA *gusA* PT el cual posee sitios de restricción que permiten la clonación en fase con el gen reportero *gusA*. El plásmido pUMA *gusA* PT también fue digerido con las enzimas *SacI* y *PstI* y defosforilado con SAP. El fragmento de 1.8 kb que se utilizó en la construcción de la fusión transcripcional *pgluP-gusA* (sección 6.8) fue clonado en los sitios *SacI* y *PstI* del plásmido pUMA *gusA* PT con la enzima T4 DNA Ligase. La ligación fue transformada en la cepa de *E. coli* DH5 α quimiocompetente. Las candidatas se seleccionaron en medio LB Tc₃₀. El screening se realizó amplificando por PCR el fragmento de 1.7 kb en grupos de 5 colonias (Figura A1).

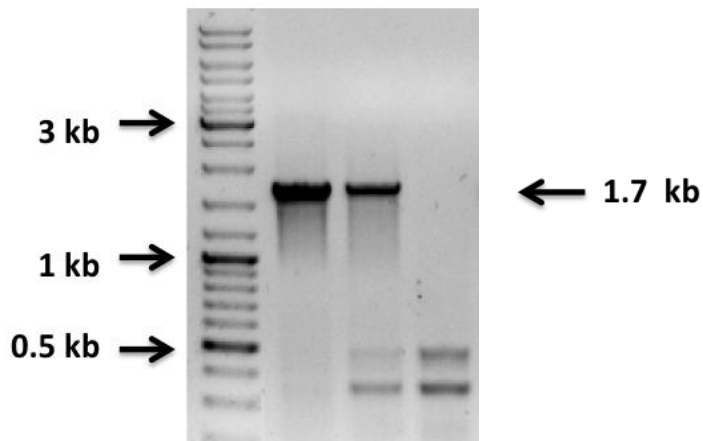


Figura A1. Electroforesis en gel de agarosa. Amplificación por PCR del fragmento de 1.8 kb. En cada carril se tomaron 5 colonias transformantes como templado.

De aquellos grupos que mostraron la banda correspondiente al fragmento deseado de 1.7 kb se purificaron los plásmidos y digirieron con las enzimas *XhoI* y *HindIII* para verificar la correcta construcción del plásmido (Figura A2).

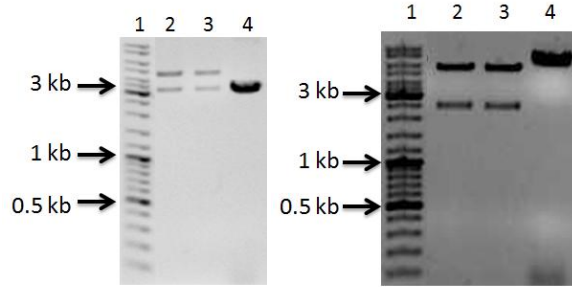


Figura A2. Patrón de restricción de las candidatas pAH-06 (pUMA *gusA* PT-*pgluP*). Panel Izquierdo: Restricción con la enzima *XhoI*. Panel Derecho: Restricciones con la enzima *HindIII*. Carriles 2-4 Candidatas pAH-06. Carril 1: Marcador de peso molecular(O´GeneRUler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

El patrón de restricción con la enzima *XhoI* genera 2 bandas ya que el vector cuenta con 2 sitios *XhoI*, uno río arriba del sitio de clonación y otro río abajo del gen reportero *gusA*. Por otro lado existen dos sitios de reconocimiento para *HindIII* uno en el sitio multiple de clonación y otro en la región interna del fragmento clonado (Figura A3).

Para complementar éste análisis se diseñaron los oligos Fus-Gus F y Fus-Gus R, con los cuales se amplificaría una región que comprende 100pb del 3` del fragmento TD y 100pb de la región 5´ del gen reportero *gusA* (Figura A3). Al plásmido resultante se le llamó pAH06.

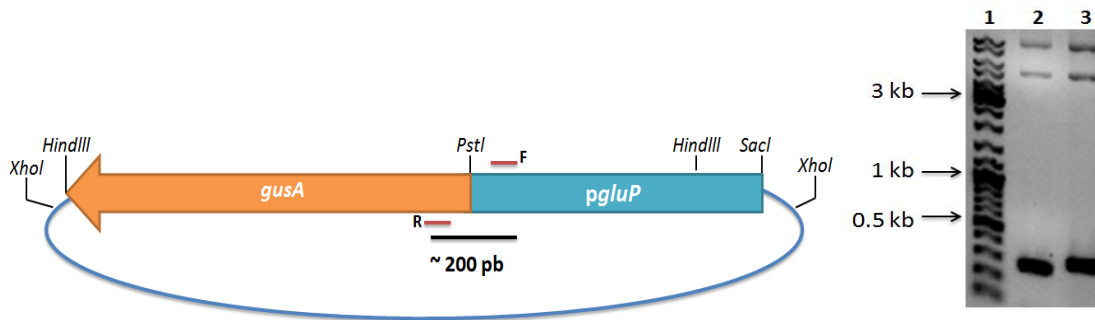


Figura A3. A: Mapa de restricción de la fusión traduccional *pgluP-gusA* en el plásmido pAH06. Se indica la disposición de los oligos Fus Gus F y Fus Gus R. B: Amplificación por

PCR de la región de 200 pb del extremo 3' de la región promotora de *gluP* y el 5' del gen reportero *gusA* usando como templado al plásmido pAH-06 (Carril 2). Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

El plásmido se conjugó con las cepas E y CbrA. Las candidatas se seleccionaron en medio BS con Tc₁₅ y posteriormente en Tc₃₀. Finalmente para comprobar que dichos plásmidos hayan recombinado en el cromosoma de las candidatas seleccionadas, nuevamente se amplificó el fragmento de 200 pb entre inserto de 1.8 y el gen *gusA* (Figura A4).

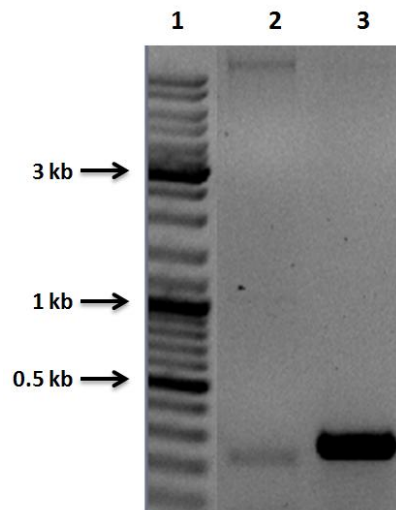


Figura A4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región de 200pb entre el inserto TD y el gen *gusA* usando como templado el DNA cromosomal de la cepa silvestre E (Carril 2) y *cbrA* (Carril 3) con las fusiones traduccionales *pgluP-gusA* en el cromosoma. Carril 1: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Thermo Scientific®)

Una vez comprobado el genotipo de las cepas AH160 (E pUMA PT::*pgluP-gusA*) y AH170 (CbrA pUMA PT::*pgluP-gusA*) y para saber si la expresión del gen *gluP* dependen de la cascada de regulación CbrA/B se intentó medir el nivel de expresión a través de la determinación de la actividad β -glucuronidasa. Sin embargo, los valores de esta actividad estaban por debajo del límite de detección de la técnica por lo que no fue posible determinarlos. Esto tal vez sea debido a una baja expresión del gen *gluP*.